

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Nutrition et Sciences des Aliments



# THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

## DOCTORAT

Filière : *Sciences alimentaires et Nutrition humaine*

Spécialité : *Nutrition humaine*

Par

**MERIEM MEDJEKANE**

Thème :

---

### **Prévalence de l'infection a *Helicobacter pylori* et son inhibition par des molécules bioactives**

---

Soutenue le 23/05/2017, devant le jury composé de :

Mr DILMI BOURAS A	Professeur	Université de Chlef	Président
Mme ALLEM R	Professeur	Université de Chlef	Rapporteur
Mr RIAZI A	Professeur	Université de Mostaganem	Examineur
Mr BENALI M	Professeur	Université de Sidi-Bel-Abbes	Examineur
Mr AICHOUNI A	Professeur	Université de Chlef	Examineur
Prénom NOM	MCA	Université de Chlef	Examineur

## Résumé

L'infection à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) est actuellement un problème majeur de santé publique dans le monde et particulièrement dans notre pays. Une bonne compréhension de l'épidémiologie de l'infection et des caractéristiques des souches locales permettent une meilleure prise en charge des patients. Dans un premier lieu, nous entreprenons une étude prospective sur une série de 190 patients symptomatiques colligée sur une période de trois ans ; de janvier 2013 à décembre 2015. Sur la base des examens microbiologiques et moléculaires, la prévalence de l'infection à *H. pylori* est de 70.50% dans la population étudiée.

Les résultats ont révélé que 71.42% des isolats des biopsies gastriques étaient résistants à un antibiotique au minimum particulièrement au métronidazole (58.87%), suivi par la clarithromycine (21.64%), les fluoroquinolones (10.44%), l'érythromycine (9.70%), la ciproflaxacine (3.37%) et l'amoxicilline (2.23%). Nous avons aussi trouvé des souches multi résistantes qui présentent 23.01% de résistance à deux antibiotiques et 2.38% de résistance à trois antibiotiques au minimum. Les tests de génotypage ont indiqué que 40% de nos isolats portent le facteur de virulence CagA+ impliqué dans la pathogénicité d'*H. pylori*. Nous avons par ailleurs évalué la susceptibilité des souches locales aux extraits de quatre plantes médicinales : *Chamaemelum nobile*, *Glycyrrhiza glabra*, *Origanum majorana* et *Pistacia lentiscus*. L'huile essentielle de *P. lentiscus* (HEPL) démontre une activité bactéricide la plus importante contre les souches d'*H. pylori*.

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *P. lentiscus* par CG-MS, révèle 65 composés dominés par les monoterpènes, notamment  $\alpha$ -pinène (15,47%), limonène (14,70%) et  $\beta$ -myrcène (9,93%). Ces composés sont responsables des activités biologiques exercés par l'HEPL et semblent travailler en synergie avec les composés présents à de faibles teneurs pour les activités anti-*H. pylori* et anti-oxydante *in vitro*, le potentiel anti-ulcérogène et anti-inflammatoire *in vivo*. Cette étude décrit que l'HEPL est une source naturelle de molécules bioactives ; elle pourrait être une alternative prometteuse pour les patients présentant un ulcère gastrique provoqué par *H. pylori*.

**Mots clés :** *Helicobacter pylori*, *Pistacia lentiscus*, CG-MS, activité antibactérienne, anti-oxydante, anti-ulcérogène, anti-inflammatoire.

## Abstract

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is currently a major public health problem in the world and particularly in our country. A good understanding of the infection epidemiology and the characteristics of the local strains allow better patients management. In a first place, we undertake a prospective study on a series of 190 symptomatic patients collected over a period of three years; From January 2013 to December 2015. On the basis of microbiological and molecular examinations, the prevalence of *H. pylori* infection is 70.50%.

The results revealed that 71.42% of gastric isolates were resistant to an antibiotic specifically to metronidazole (58.87%), followed by clarithromycin (21.64%), fluoroquinolones (10.44%), erythromycin (9.70%), Ciproflaxacin (3.37%) and amoxicillin (2.23%). We also found multi-resistant strains with 23.01% resistance to two antibiotics and 2.38% resistance to three antibiotics at least. Genotyping tests indicated that 40% of our isolates carry the virulence factor CagA + involved in *H. Pylori* pathogenicity. We also evaluated the susceptibility of local strains to the extracts of four medicinal plants: *Chamaemelum nobile*, *Glycyrrhiza glabra*, *Origanum majorana* and *Pistacia lentiscus*. *P. lentiscus* essential oil (PLEO) demonstrates the most important bactericidal activity against *H. Pylori* strains.

The study of the chemical composition of *P. lentiscus* the essential oil by CG-MS revealed 65 compounds dominated by monoterpenes, manely  $\alpha$ -pinene (15.47%), limonene (14.70%) and  $\beta$ - Myrcene (9.93%). These compounds are responsible for the biological activities exerted by PLEO and seem to work in synergy with the compounds present at low levels for the anti-*H. pylori* and anti-oxidant activities *in vitro*, the anti-ulcerogenic and anti-inflammatory potentials *in vivo*. This study describes that PLEO is a natural source of bioactive molecules; it could be a promising alternative for patients with gastric ulcer caused by *H. pylori*.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, *Pistacia lentiscus*, CG-MS, antibacterial activity, anti-oxidant, anti- ulcerative, anti-inflammatory.

## ملخص

عدوى الملوية البوابية يشكل أزمة عالمية في الصحة العامة وبوجه الخصوص في الجزائر. فهم وبائيات العدوى وخصائص السلالات المحلية يسمح بتوفير رعاية أفضل للمرضى. في المقام الأول، أجرينا دراسة استطلاعية على سلسلة 190 مريضا تبدو عليهم أعراض الإصابة على مدى فترة ثلاث سنوات من يناير 2013 إلى ديسمبر 2015 وعلى أساس الاختبارات الميكروبيولوجية والجزئية نسبة الإصابة بالملوية البوابية تقدر ب 70.50٪ من مجموع الذين شملتهم الدراسة.

وكشفت النتائج أن 71.42٪ من عزلات خزعات المعدة كانت مقاومة للمضادات الحيوية لا سيما ميترونيدازول (58.87٪) تليها كلاريثروميسين (21.64٪)، الفلوروكينولونات (10.44٪)، الأريثروميسين (9.70٪) و سيروفلوكساسين (3.37٪) (ولأموكسيسيلين (2.23٪). كما وجدنا سلالات مقاومة لعدة مضادات حيوية. 23.01٪ لمضادين اثنين،

و 2.38٪ مقاومة لثلاثة مضادات حيوية على الأقل. أشارت اختبارات التنميط الجيني أن 40٪ من العزلات تحمل عامل الفوعة ذو دور مهم في إمرضية الملوية البوابية. كما أننا قمنا بتقييم حساسية عزلات الملوية البوابية لأربعة نباتات طبية : البابونج الروماني، عرق السوس، المردقوش والمصطكي غير أن الزيت الاساسي للمصطكي أبدى أقوى فعالية ضد سلالات الملوية البوابية.

للزيت الاساسي للمصطكي إحتوائه ل 65 مركب مثلة خاصة في كشفت دراسة التركيب الكيميائي ألفا بينين (15.47٪)، الليمونين (14.70٪) و ميرسين (9.93٪). هذه المركبات هي المسؤولة عن الأنشطة البيولوجية للزيت الاساسي وعلى الاغلب بمآزرة المركبات الموجودة بنسب ضئيلة , خاصة فيما يتعلق بفاعلية الزيت الاساسي ضد الملوية البوابية، كمضادة للأكسدة، مضادة للقرحة ومضادة للالتهابات. توضح هذه الدراسة أن الزيت الاساسي للمصطكي يمثل مصدر طبيعي للجزئيات الحيوية النشطة يمكن أن تكون بديلا واعدا للمرضى الذين يعانون من قرحة المعدة التي تسببها بكتيريا الملوية البوابية..

كلمات البحث: الملوية البوابية المصطكي، المضادة للبكتيريا، المضادة للأكسدة، والمضادة للقرحة والمضادة للالتهابات.



## REMERCIEMENTS

Au Nom de Dieu le Très Miséricordieux, le Tout Miséricordieux, Que Dieu bénisse le Prophète Mouhammad, Imam des Bienheureux et Sauvegarde des Purifiés ainsi que Sa Noble Famille et ses Satisfaisants compagnons- Amin.

Je rends grâce à Allah le Tout Puissant de m'avoir donné la santé, le courage et la force de mener ce travail à bout.

### Mes remerciements s'adressent à :

Ma Directrice de thèse le **Pr Rachida ALLEM** pour m'avoir autorisée d'entreprendre ce travail de thèse sous sa direction, pour la confiance qu'elle m'a accordée, sa gentillesse, sa disponibilité et son soutien dans les moments difficiles, pour ses précieux conseils, pour son optimisme infailible et ses encouragements. Veuillez accepter l'expression de ma gratitude et de mes plus sincères remerciements.

Le **Pr Abdelkader DILMI BOURAS**, vous nous faites un grand honneur en acceptant de diriger ce jury malgré vos lourdes responsabilités. Pour vos qualités de formateur et votre rigueur scientifique qui ne sont plus à rappeler. Veuillez accepter l'expression de notre sincère reconnaissance.

Le **Pr Ali RIAZI**, de nous avoir fait l'honneur d'être examinateur et de participer au jury de cette thèse. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour le temps précieux que vous consacrer pour juger ce travail.

Le **Pr Mohammed BENALI**, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail en acceptant d'examiner ma thèse. J'adresse mes vifs remerciements pour vos efforts, contributions et commentaires précieux pour l'amélioration de ma thèse.

Le **Pr Ahmed AICHOUNI**, le grand honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans ce jury nous offre l'occasion de vous exprimer notre profond respect. Vos qualités humaines, ainsi que vos connaissances scientifiques font de vous un des professeurs le plus apprécié de tous. Veuillez recevez le témoignage de notre sincère reconnaissance.

Au **Dr Benali SETTI**, pour avoir examiné et jugé mon travail, vos remarques ne seront que constructives et me permettront de mieux entrevoir mes lacunes. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteur et de participer à ce jury.

**Mes remerciements s'adressent aussi :**

Aux très nombreux cliniciens et gastro-entérologues sans lesquels ce travail n'aurait pas pu être envisagé.

A l'ensemble du personnel des laboratoires dans lesquels ce travail a été effectué et plus particulièrement au personnel de l'animalerie de la faculté des sciences biologiques à l'USTHB.

Aux nombreuses personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à l'aboutissement ce travail.

A tous les doctorants de l'U.H.B Chlef, pour les bons et mauvais moments partagés. Je vous souhaite beaucoup de succès.

## DEDICACES

**A mes parents ;**

**MEDJKANE Omar** et **Kezadri laldja**, je vous adresse ici toute mon affection et ma plus profonde estime. Merci de m'avoir menée là où j'en suis aujourd'hui. Les mots me manquent et je ne pourrais jamais vous remercier suffisamment pour tout l'amour, les sacrifices, la tendresse et la confiance que vous m'avez témoignée. Merci d'avoir pu comprendre et supporter ma distance et pour m'avoir laissée la liberté de suivre mon propre chemin...

Cet achèvement je vous le dois.

Cette thèse vous est particulièrement dédiée ...

A mes chers frères et sœurs, qui ont une place privilégiée dans mon cœur. Je sais que cette thèse est un peu la votre et que sans vous elle ne serait pas terminée. Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour vous faire part de mon profond attachement et vous assurer de toute mon affection.

Je n'oserai guère laisser passer inaperçue, la présence émouvante des mes chers neveux et nièces, vous êtes le rayon de soleil de notre vie.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à une personne extraordinaire, mon cher époux, les quelques phrases que je me permets ici de t'adresser ne suffisent pas pour exprimer tout le respect, la reconnaissance et l'affection que j'éprouve envers toi. Merci pour ton optimisme invincible, ta patience admirable, ton énorme soutien, tes vivaces encouragements. Pour toute ta gentillesse, ton humour, ta disponibilité et ta patience.

A mes fidèles amis qui se reconnaîtront. Merci d'avoir été à mes côtés aux moments où j'en avais le plus besoin.

Cette thèse vous est dédiée...

# Tables des matières

Dédicaces

Remerciements

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

INTRODUCTION..... 1

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Chapitre I : L'infection à <i>Helicobacter pylori</i>.....</b>	<b>4</b>
1/ Découverte, émergence et microbiologie.....	4
2/ Taxonomie.....	5
3/ Pathologies associées à l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> .....	6
3-1/ Gastrite.....	7
3-2/ Ulcère gastroduodéal .....	7
3-3/ Cancer gastrique.....	7
3-4/ Lymphome gastrique du MALT.....	8
3-5/ Manifestation extra-gastrique de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> .....	10
4/ Les facteurs de virulence majeurs.....	10
5/ Epidémiologie de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> .....	12

5-1/ Prévalence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> .....	12
5-2/ Transmission de l'infection par <i>Helicobacter pylori</i> .....	12
5-2-1/ Voies de transmission de l'infection par <i>Helicobacter pylori</i> .....	12
5-2-1-1/ La transmission gastro-orale.....	13
5-2-1-2/ La transmission oro-orale.....	13
5-2-1-3/ La transmission féco-orale.....	14
6/ Diagnostic et traitement de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> .....	15
6-1/ Diagnostic.....	15
6- 2/ Traitement de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> .....	15
<b>Chapitre II : Eléments bioactifs des plantes médicinales.....</b>	<b>18</b>
1/ Les huiles essentielles.....	18
1-1/ Définition des huiles essentielles.....	18
1-2/ la composition des huiles essentielles.....	19
1-3/ les propriétés pharmacologiques des huiles essentielles.....	20
2/ Les antioxydants d'origine végétale .....	21
2-1/ La vitamine E .....	21
2-2/ La vitamine C.....	21
2-3/ Le sélénium.....	22
2-4/ Le $\beta$ -carotène.....	22
2-5/ Les composés phénoliques .....	22



2-6/ Les flavonoïdes.....	23
2-7/ Les alcaloïdes.....	23
3/ Les éléments anti- <i>Helicobacter pylori</i> d'origine naturelle connus.....	23
<b>Chapitre III: Description des plantes sélectionnées.....</b>	<b>28</b>
1/ <i>Pistacia lentiscus</i> (le lentisque).....	28
1-1/ Classification systématique et description botanique.....	28
1-2/ Propriétés pharmacologiques et intérêts thérapeutiques.....	28
2/ <i>Glycyrrhiza glabra</i> (la réglisse).....	29
2-1/ Classification systématique et description botanique.....	29
2-2/ Propriétés pharmacologiques et intérêts thérapeutiques.....	30
3/ <i>Origanum majorana</i> (la marjolaine).....	30
3-1/ Classification systématique et description botanique.....	30
3-2/ Propriétés pharmacologiques et intérêts thérapeutiques.....	31
4/ <i>Chamaemelum nobile</i> (la camomille).....	31
4-1/ Classification systématique et description botanique.....	31
4-2/ Propriétés pharmacologiques et intérêts thérapeutiques.....	32
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	
I/ MATERIEL ET METHODES.....	33
1/ MATERIEL.....	33
1-1/ Matériel biologique.....	33

1-1-1/ Matériel végétal.....	33
1-1-2/ Matériel animal.....	34
2/ METHODES.....	34
2-1/ Etude de la prévalence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> .....	34
2-2/ Isolement d' <i>Helicobacter pylori</i> .....	35
2-3/ Etude de la susceptibilité aux antibiotiques.....	36
2-4/ Caractérisation moléculaire des isolats d' <i>Helicobacter pylori</i> .....	37
2-4-1/ Extraction de l'ADN des isolats d' <i>Helicobacter pylori</i> .....	37
2-4-2/ Test d'identification et de génotypage « genotype Helico DR ».....	37
2-4-3/ Détection du génotype cagA.....	39
2-5/ La recherche des molécules bioactives anti- <i>Helicobacter pylori</i> .....	40
2-5-1/ Préparation des extraits.....	40
2-5-1-1/ Préparation des extraits alcooliques.....	40
2-5-1-2/ Préparation des huiles essentielles.....	41
2-5-2/ Activité anti-oxydante des extraits.....	42
2-5-2-1/ Estimation du pouvoir anti-radicalaire par la méthode au DPPH.....	42
2-5-2-2/ Test de blanchiment du $\beta$ -carotène.....	43
2-5-3/ Evaluation de l'activité anti- <i>H. pylori</i> des extraits par la méthode de diffusion par disque.....	44
2-5-4/ Caractérisation de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	45

2-5-4-1/ Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	46
2-5-4-1-1/ La chromatographie en phase gazeuse (CG).....	47
2-5-4-1-2/ Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM).....	48
2-5-4-2/ Caractérisation de l'activité anti- <i>Helicobacter pylori</i> de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	50
2-5-4-2-1/ Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	50
2-5-4-2-2/ Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	51
2-5-4-3/ Evaluation de la toxicité aigüe de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	51
2-5-4-4/ Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	53
2-5-4-5/ Evaluation de l'activité gastro-protectrice de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	54
II/ RESULTATS ET DISCUSSION.....	56
1/ Prévalence de l'infection à <i>Helicobacetr pylori</i> .....	56
1-1/ Prévalence selon la provenance.....	57
1-2/ Prévalence selon le sexe.....	58
1-3/ Prévalence selon l'âge.....	59
1-4/ Prévalence selon la pathologie associée à l'infection.....	62
2/ Isolement d' <i>Helicobacetr pylori</i> .....	64

3/ Analyse de la résistance aux antibiotiques.....	67
4/ Diagnostic, identification et génotypage d' <i>Helicobacter pylori</i> .....	72
4-1/ Le test « genotype Helico DR ».....	72
4-2/ Détection du génotype CagA.....	75
5/ Activité anti-oxydante des extraits.....	78
5-1/ Test au DPPH.....	78
5-2/ Méthode de blanchissement de la $\beta$ -carotène.....	81
6/ Criblage de l'activité anti- <i>H. pylori</i> .....	84
7/ Caractérisation de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	88
7-1/ La composition chimique de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	88
7-2/ Caractérisation de l'activité anti- <i>Helicobacter pylori</i> de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	91
7-3/ La toxicité aigüe de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	95
7-4/ L'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	98
7-5/ L'activité gastro-protectrice de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	101
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	112

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## PUBLICATIONS

## ANNEXES

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01 :</b> Principaux facteurs de virulence d' <i>H. pylori</i> .....	11
<b>Tableau 02 :</b> Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> déterminée par CPG-SM.....	88
<b>Tableau 03 :</b> L'activité anti- <i>Helicobacter pylori</i> de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> . ....	93
<b>Tableau 04 :</b> Mortalité des souris en fonction de la dose administrée.....	96
<b>Tableau 05:</b> L'activité anti-inflammatoire topique de l'huile essentielle de <i>P. lentiscus</i> ...	98
<b>Tableau 06 :</b> Effet du prétraitement de l'huile essentielle de <i>P. lentiscus</i> sur les lésions gastriques induites par l'éthanol sur des rats.....	102



## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> <i>Helicobacter pylori</i> en microscopie électronique .....	05
<b>Figure 02:</b> Physiologie et physiopathologie d' <i>H. Pylori</i> .....	06
<b>Figure 03:</b> Représentation schématique de la physio-pathogénie de l'infection à <i>H. pylori</i> dans le cancer gastrique et l'ulcère duodénal.....	09
<b>Figure 04:</b> Proportion de patients inclus dans l'étude en fonction des centres d'endoscopies.....	35
<b>Figure 05:</b> Le test « genotype Helico DR ».....	39
<b>Figure 06:</b> réduction du radical DPPH. ....	42
<b>Figure 07:</b> Principe de la méthode de diffusion par disque.....	44
<b>Figure 08 :</b> Protocole expérimental pour la recherche des activités pharmacologiques des plantes étudiées.....	46
<b>Figure 09 :</b> Principe de séparation de la chromatographie.....	47
<b>Figure 10 :</b> Unité CG-SM.....	49
<b>Figure 11 :</b> Prévalence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> .....	56
<b>Figure 12 :</b> Prévalence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> selon la provenance.....	58
<b>Figure 13:</b> Prévalence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> selon le sexe.....	59
<b>Figure 14:</b> Prévalence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> selon la tranche d'âge.....	60
<b>Figure 15:</b> Prévalence de l'infection à <i>Helicobacter pylori</i> selon la pathologie.....	62
<b>Figure 16:</b> Proportions des résultats de la culture d' <i>Helicobacter pylori</i> .....	65
<b>Figure 17:</b> Prévalence de la résistance d' <i>H. pylori</i> pour chaque antibiotique.....	67

<b>Figure 18:</b> Prévalence de la résistance d' <i>H. pylori</i> aux antibiotiques.....	68
<b>Figure 19:</b> Résultats des bandelettes d'ADN (GenoType HelicoDR) des isolats d' <i>H. pylori</i> .....	73
<b>Figure 20 :</b> Le gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium présentant les amplicons PCR du gène cagA à 349pb.....	75
<b>Figure 21 :</b> Génotype CagA+ et son association à l'antibio-résistance.....	76
<b>Figure 22:</b> Les valeurs d'IC50 (mg/ml) des différents extraits testés.....	79
<b>Figure 23 :</b> Le pourcentage de l'activité anti-oxydante des extraits.....	82
<b>Figure 24:</b> Activité anti- <i>Helicobacter pylori</i> des différents extraits.....	85
<b>Figure 25:</b> Sensibilité des souches d' <i>H. pylori</i> aux antibiotiques et à l'huile essentielle de <i>P. lentiscus</i> .....	92
<b>Figure 26:</b> Microphotographie de la structure histologique de l'estomac physiologique...	103
<b>Figure 27:</b> microphotographie de la structure histologique de l'estomac avec un ulcère induit à l'éthanol.....	103
<b>Figure 28:</b> microphotographie de la structure histologique de l'estomac avec un ulcère induit a l'éthanol et traité à l'oméprazole.....	104
<b>Figure 29:</b> microphotographie de la structure histologique de l'estomac avec un ulcère induit à l'éthanol et traité avec 100 mg/kg d'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	105
<b>Figure 30:</b> microphotographie de la structure histologique de l'estomac avec un ulcère induit a l'éthanol et traité avec 200 mg/kg d'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	105

## Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AMX : Amoxicilline

ARN : Acide ribonucléique

BHIB: Bouillon Cœur- cervelle

BHT : L'hydroxytoluène butylé

CagA : Cytotoxin Associated Gene A

CagE: Cytotoxin Associated Gene E

Cag-PAI: Complexe de pathogénicité cag (cag PATHogenicity Island)

CFU: Colony Forming Unit

CG: Chromatographie en phase gazeuse

CG/SM: Chromatographie en phase gazeuse-Spectrométrie de masse

CIP: Ciprofloxacine

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CLR: Clarithromycine

CLSI: The Clinical and Laboratory Standards Institute

CMB: Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

COX : Cyclooxygénases.

DL50 : a « dose létale ». La DL<sub>50</sub> est la quantité d'une matière, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50 % (la moitié) d'un groupe d'animaux d'essai.

DMSO : diméthylsulfoxyde

Dntp : Désoxyribonucléotide triphosphate

DPPH: 1,1-diphényl- 2-picryl-hydrazyl.

dupA: duodenal ulcer promoting gene A

EA: Extrait alcoolique,

EHSG: European *Helicobacter* Study Group

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ERO (Ou ROS): espèces réactives à l'oxygène

ERY : Érythromycine

FLUO : Fluoroquinolones

HE : Huile essentielle

*H. pylori*: *Helicobacter pylori*

HEPL: Huile essentielle de *P. lentiscus*

HDL : Lipoprotéine de haute densité.

IARC: International Agency for Research on Cancer

IC50 : Concentration d'un composé inhibant 50 % de l'effet observé

IGF: Insulin-like Growth Factor

IL: Interleukine

IPP : Inhibiteurs de la Pompe à Proton

IR : Indice de Rétention

LDL: Lipoprotéine de basse densité

LEV : Levoflaxacine

MALT : Tissu lymphoïde associé aux muqueuses (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue)

MET: Métronidazole

MHA: Müller-Hinton **agar**

MTZ: Métronidazole

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OR : Odds Ratio (Rapport des cotes)

Pb: Paires de bases

PCR : Amplification en chaîne par la polymérase (Polymerase Chain Reaction)

PGE2 : prostaglandine E2

PKC : Protéines Kinase C

PLA2 : PhospholipaseA2

PTI : Purpura Thrombocytopénique Idiopathique

RIFA : Rifampicine

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Rpm : rotation par minute

RUT: Test Rapide à l'uréase (Rapid Urease Testing)

TET: Tetracycline



TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor-  $\beta$

TNF : Tumor necrosis factor.

TPA: 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate

VacA: Cytotoxine vacuolisante A (Vacuolating Cytotoxin Agent A)

### I. Introduction

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) est une bactérie connue pour coloniser l'estomac où elle peut causer des ulcères gastriques, la gastrite et potentiellement conduire à un cancer de l'estomac (Sweeney et *al.*, 2012). En effet, L'OMS a reconnu *H. pylori* comme la seule espèce bactérienne agent carcinogène en 1994 (IARC, 1994).

Elle infecte plus de la moitié de la population mondiale, sa prévalence varie en fonction des populations, même au sein d'un même pays. Le diagnostic de l'infection peut se faire par différentes méthodes. Le gros avantage de la culture (méthode invasive) est la détermination de la sensibilité aux antibiotiques (Sgouras et *al.*, 2015 ; Peleteiro et *al.*, 2015).

L'infection est généralement acquise dans l'enfance et perdure pendant des dizaines d'années. Étant donné que la bactérie a été isolée dans des selles, ainsi que dans la salive et sur des plaques dentaires, ceci laisse supposer qu'une transmission est possible par voie oro-orale ou par voie féco-orale (Everhart, 2000).

La divergence de la réponse à l'infection à *H. pylori* est attribuée à une interaction entre les facteurs de virulence de la souche bactérienne, les facteurs environnementaux et l'immunité et la génétique de l'hôte. Ainsi, les différences d'incidence de cancer gastrique observées entre les continents seraient particulièrement attribuables aux différences dans les facteurs de virulence (notamment les sous types de CagA et de VacA) et aux habitudes alimentaires (Yamaoka et *al.*, 2010).

La prise en charge de l'infection par *H. pylori* demeure un problème de santé publique et représente un fardeau économique et sanitaire de plus en plus lourd dans de nombreux pays (Malfertheiner et *al.*, 2012 ; Roberts et *al.*, 2016).

Cela découle non seulement de son implication dans diverses pathologies graves mais aussi des nombreuses contraintes liées au choix des méthodes de diagnostic les plus précises possibles, de la recommandation de tester sa sensibilité aux antibiotiques avant toute prescription qui ne peut être applicable qu'à l'issue d'une endoscopie et de la culture d'*H. pylori*, une procédure lente et coûteuse, aux traitements lourds impliquant une trithérapie mais surtout au problème de l'antibiorésistance (Roberts et *al.*, 2016).

Le traitement de l'infection à *H. pylori* est devenu un défi ces dernières années. Cependant, les prévalences élevées de son infection et de sa résistance aux antibiotiques dans

## Introduction

---

les pays en développement méritent des investigations approfondies (Kanizaj et Kunac, 2014 ; Malfertheiner et Selgrad, 2014).

Dans ce contexte, la détermination des données épidémiologiques serait d'une valeur importante pour orienter le choix du régime thérapeutique le plus approprié: estimation précise des taux de résistance et l'apport des preuves de l'efficacité de chaque traitement antibiotique inclus dans les différents régimes thérapeutiques (Megraud, 2013 ; Graham et *al.*, 2014 ; Papastergiou et *al.*, 2014 ; Molina-Infante et Shiotani, 2015)

La résistance aux antibiotiques chez *H. pylori* est une préoccupation mondiale qui nécessite la recherche de nouveaux agents thérapeutiques. Plusieurs études à travers le monde ont montré des activités prometteuses de remèdes naturels contre *H. pylori* dans des études in vitro et in vivo (Drouin, 1999 ; Keenan et *al.*, 2012 ; Ayala et *al.*, 2014 ; Takeuchi et *al.*, 2014 ; Han et *al.*, 2015).

Aussi, au vu de la propagation du phénomène de résistance et du nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, la découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue plus qu'indispensable. Pour être innovants et contourner les mécanismes de résistance bactériens, les antibiotiques de demain devront viser de nouvelles « cibles » d'action chez les bactéries. Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme des plus prometteuses car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives (Zaidi et *al.*, 2015).

L'Algérie, offre une végétation riche et diverse avec un grand nombre de plantes aromatiques spontanées. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années (Soltani et *al.*, 2017).

Notre travail s'inscrit dans un but de contribution à l'amélioration de la prise en charge des patients infectés par *H. pylori*. Il implique une étroite collaboration avec les gastroentérologues dont l'attitude thérapeutique doit tenir compte de l'épidémiologie locale de l'infection et de la prévalence de la résistance aux agents anti-infectieux disponibles en Algérie.

Une grande partie des travaux de cette thèse a été dédiée à l'établissement d'un protocole expérimental en vue de caractériser un agent anti- *H. pylori* sûr et efficace nécessitant impérativement une caractérisation intégrale des différents effets biologiques et pharmacologiques du matériel d'intérêt.

## Introduction

---

La sélection des plantes médicinales s'est particulièrement basée sur l'endémisme de leurs utilisations en médecine traditionnelle contre les perturbations du tube digestif.

Cette thèse est subdivisée en deux grandes chapitres dédiés à :

- ✓ L'étude bibliographique comportant des rappels sur l'espèce bactérienne *H. pylori*, sa pathogénèse, son épidémiologie, les voies de sa transmission, la description des méthodes de diagnostic et les différents traitements à l'encontre de cette infection. Nous décrivons par la suite les éléments bioactifs des plantes médicinales, leur intérêt contre les souches d'*H. pylori* ainsi que les propriétés des plantes étudiées.
- ✓ La partie expérimentale se divisant en 2 grandes parties. La première partie consiste à une étude épidémiologique et microbiologique visant à étudier l'infection par *H. pylori* dans notre population. La deuxième partie traite la recherche de nouvelles alternatives aux traitements de l'infection par *H. pylori* ; elle vise la valorisation de la flore algérienne par la recherche de nouvelles sources de principes actifs d'intérêt thérapeutique.

Plusieurs objectifs ont été soulignés, à savoir :

- ✓ L'estimation de la prévalence de l'infection à *H. pylori* dans notre population.
- ✓ L'étude des facteurs épidémiologiques liés à cette infection notamment l'âge, le sexe et la pathologie associée à l'infection.
- ✓ La caractérisation du génotype des souches cliniques locales et l'étude de leur sensibilité aux différents antibiotiques disponibles sur le marché.
- ✓ La recherche et l'évaluation de substances bioactives contre les différentes souches d'*H. pylori* dans les quatre plantes médicinales: *Chamaemelum nobile*, *Glycyrrhiza glabra*, *Origanum majorana* et *Pistacia lentiscus*.
- ✓ La caractérisation du potentiel thérapeutique des substances bioactives contre *H. pylori* par un protocole expérimental incluant des tests *in vitro* et *in vivo*.

## Chapitre I : L'infection à *Helicobacter pylori*

### 1/ Découverte, émergence et microbiologie

L'identification d'*Helicobacter pylori* en 1982 a été le début d'une grande révolution concernant la conceptualisation des pathologies gastroduodénales. La découverte de cette bactérie qui colonise environ la moitié de la population mondiale (Peek et Blaser, 2002), a valu le prix Nobel en physiologie et médecine en 2005 aux deux chercheurs australiens ; Barry Marshall et Robin Warren ; ayant mis en évidence cette infection et son rôle dans les gastrites et les ulcères gastroduodénaux.

De nombreuses observations de la présence de microorganismes spiralés colonisant la muqueuse gastrique ont précédé cette découverte (Sgouras et *al.*, 2015) n'ont été prise au sérieux par la communauté scientifiques. En raison de son acidité élevée, cet organe a été considéré pendant longtemps comme un milieu pratiquement stérile. Le facteur limitant de la recherche restait l'impossibilité de cultiver la bactérie spiralée observée dans la muqueuse gastrique (Yamaoka, 2010).

En 1982, Marshall et Warren parviennent enfin à cultiver une bactérie spiralée, flagellée, en forme de croissant après de nombreuses tentatives avortées pour cause d'incubation trop courte à partir d'une biopsie gastrique d'un patient souffrant d'ulcère duodéal sur des plaques de géloses accidentellement laissées dans un incubateur pendant 5 jours.

La ressemblance de cette bactérie aux espèces du genre *Campylobacter* les mène à penser que c'est une nouvelle espèce de ce genre et la dénommaient *Campylobacter-like* organisme (CLO) (Marshall, 1983).

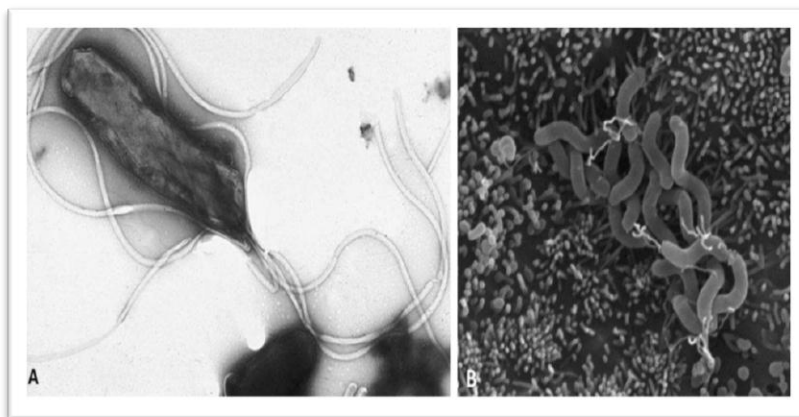
La bactérie fut ensuite appelée *Campylobacter pyloridis* (Marshall et *al.*, 1984) sur base de la suggestion de Skirrow (Skirrow, 1983). Pour des raisons grammaticales, elle fut alors nommée *Campylobacter pylori* (Marshall et Goodwin, 1987) puis *Helicobacter pyloridis*, et enfin *Helicobacter pylori* vu les caractéristiques morphologiques, structurelles et génétiques spécifiques à ce nouveau genre (Goodwin et *al.*, 1989).

*H. pylori* est une petite bactérie (largeur : 0.5-1.0 µm, longueur : 2.5-5.0 µm), Gram négatif de forme hélicoïdale et très mobile grâce à sa flagellation polaire (4 à 6 flagelles) protégée de l'acidité gastrique par une gaine protéique (Goodwin et Worsley, 1993).

La culture d' *H. pylori* est lente (2 à 7 jours) et nécessite un milieu spécifique en microaérophilie (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> et 85% N<sub>2</sub>) (Van Zwet et *al.*, 1996). La bactérie possède un important capital enzymatique : oxydase, catalase, amidases, peptidases, phosphatases mais la caractéristique biochimique la plus frappante est la production de grandes quantités d'uréase. Cette enzyme digère l'urée pour produire du dioxyde de carbone et l'ammoniac en présence d'eau, ce qui conduit à la formation d'hydroxyde d'ammonium (Hu et Mobley, 1993). De cette manière, *H. pylori* est capable de tamponner son environnement acide.

En outre, *H. pylori* possède un important matériel de surface, adhésines et immunogènes majeurs qui jouent un rôle dans la virulence de la bactérie et la colonisation (Fauchère, 1999).

*H. pylori* a également été l'une des premières bactéries à avoir le génome séquencé pour deux souches différentes, *H. pylori* 26 695 (Tomb et *al.*, 1997) et *H. pylori* J99 (Alm et *al.*, 1999).



**Figure 01** : *Helicobacter pylori* en microscopie électronique. (Tan et *al.*, 2009).

A. Une bactérie *H. pylori* ; B. Amas de *H. pylori* au niveau des cellules épithéliales gastriques.

## 2/ Taxonomie

La classification scientifique de la bactérie est:

Règne: les bactéries

Embranchement: Proteobacteria

Classe: Epsilon Proteobacteria

Ordre: Campylobacterales

Famille: Helicobacteraceae

Genre: Helicobacter

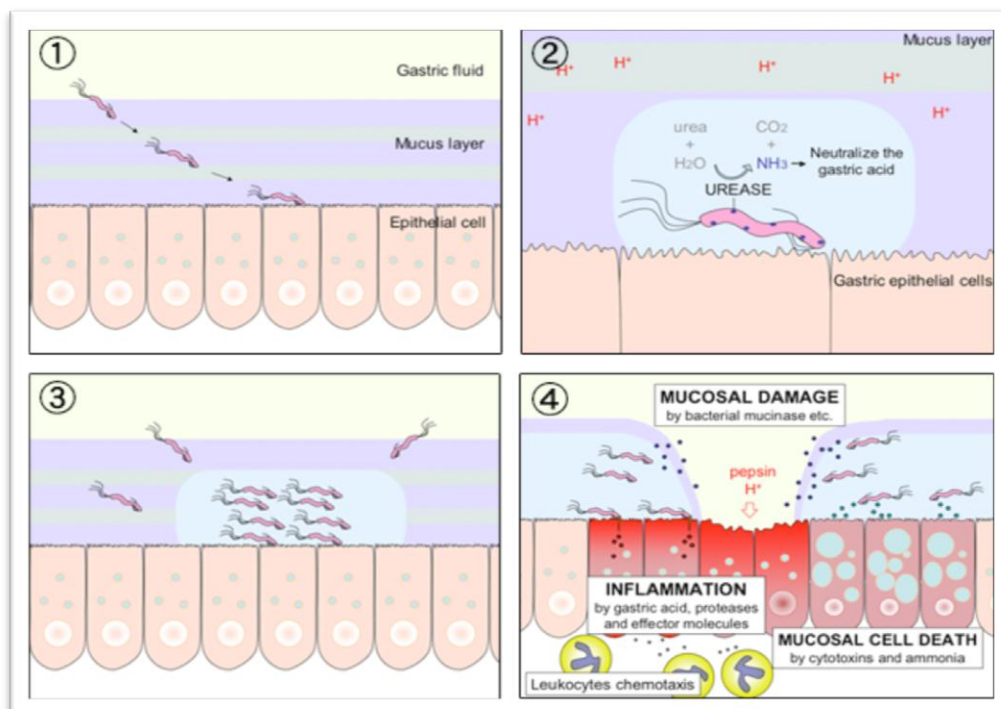
Espèce: *H. pylori* (Marshall et Warren, 1984).

### 3/ Pathologies associées à l'infection à *Helicobacter pylori*

L'infection par *H. pylori*, acquise le plus souvent dans l'enfance, s'accompagne systématiquement d'une inflammation gastrique mais peut passer asymptomatique pour de nombreuses années.

L'incapacité du système immunitaire à éliminer *H. pylori* va permettre à la bactérie d'évoluer durant des années dans la lumière et la muqueuse gastrique, causant ainsi une inflammation chronique de la muqueuse gastrique qui peut évoluer vers des pathologies plus sévères telles que les ulcères gastriques et duodénaux ou le cancer gastrique. L'interaction entre les facteurs de virulence de la bactérie, la susceptibilité individuelle de l'hôte et l'environnement est responsable de l'évolution de l'infection.

Au moment de son entrée dans l'estomac, *H. Pylori* a la capacité de résister à l'acidité du suc gastrique (pH=2) grâce à une enzyme membranaire : l'uréase. Après avoir résisté au suc gastrique, *H. Pylori* plonge grâce à ses flagelles dans le mucus tapissant la muqueuse gastrique (Figure 2, vignette n°1). La bactérie atteint ensuite la surface de la muqueuse gastrique. Elle baigne alors dans le mucus gastrique, protégée de l'acidité gastrique. Parfaitement adaptée à ce milieu, elle s'y multiplie (Figure 2, vignette n°3) (Orellana et Poniachik, 2003).



**Figure 02 :** Physiologie et physiopathologie d'*H. Pylori*. (Orellana et Poniachik, 2003).

### 3-1/ Gastrite

L'infection à *H. pylori* entraîne une gastrite aiguë caractérisée par une infiltration massive de polynucléaires neutrophiles au niveau de la muqueuse gastrique. Une libération de substances toxiques à l'issue de la phagocytose des germes induit des lésions (Graham et al., 2004).

Une infection persistante entraîne une gastrite chronique chez presque tous les individus infectés (Kusters et al., 2006). L'évolution de la gastrite chronique dépend de la localisation de l'infection (Graham, 1989; Correa, 1992; Uemura et al., 2001); La gastrite touchant l'antrum est caractérisée par une hypersécrétion acide (El-Omar, 1995). Elle évoluera dès lors vers un risque accru d'ulcère duodénal mais pas de cancer gastrique. Une infection fundique entraînera une hyposécrétion acide et évoluera vers l'ulcère gastrique, puis vers une gastrite atrophique chronique avec risque de cancer gastrique.

### 3-2/ Ulcère gastroduodénal

Des lésions pénétrant jusqu'à la couche musculaire et d'au moins 0,5cm de diamètre caractérisent les ulcères gastriques et duodénaux. Il est maintenant admis que *H. pylori* en est la cause majeure dans le monde entier (Kusters et al., 2006).

Près de 100 % des ulcéreux duodénaux portent *H. pylori* sur leur muqueuse antrale et 70 % des ulcères gastriques sont infectés (Guerre, 1994). De nombreuses complications peuvent avoir lieu telles que l'hémorragie, perforation ulcéreuse, sténose pylorique, récurrences et rare évolution vers un cancer gastrique. L'éradication diminue de manière significative le risque de récurrences d'ulcères (Ford et al., 2004).

### 3-3/ Cancer gastrique

Le cancer gastrique est le plus fréquent des cancers digestifs recensés dans le monde (Kamangar et al., 2006). C'est la 2ème cause de décès par cancer dans le monde (10% avec ≈1 million de nouveaux cas/an), avec une survie de 5 à 10 ans à 15% à un stade avancé de la maladie (Wang et al., 2003). L'association entre *H. pylori* et le cancer gastrique est clairement établie (Siman et al., 1997 ; Wald et al., 1997 ; Watanabe et al., 1997 ; Hansen et al., 1999 ; Limburg et al., 2001).



Le mécanisme de carcinogenèse généré par la bactérie à l'issue de sa persistance induit des dommages oxydatifs directs au niveau de l'ADN (Baik *et al.*, 1996 ; Farinati *et al.*, 1998 ; Obst *et al.*, 2000).

La génération d'espèces oxygénées réactives à ce niveau est associée aux facteurs de virulence de la bactérie notamment la protéine CagA et l'îlot *cag*, ce qui suggère leur forte contribution au processus de carcinogenèse (Ding *et al.*, 2007). Une forte corrélation entre le taux d'incidence du cancer dans différentes populations et la virulence des gènes *cagA* et *vacA* a été mentionnée (Rhead *et al.*, 2007 ; Basso *et al.*, 2008 ; Jung *et al.*, 2009 ; Jang *et al.*, 2010). Plusieurs polymorphismes de l'hôte en particulier l'interleukine 1 peuvent rehausser la réponse inflammatoire à la bactérie favorisant l'évolution vers le cancer (El-Omar *et al.*, 1997).

Les principales étapes « cascade de Correa » d'un processus de cancérisation induit par l'infection à *H. pylori* sont: la gastrite chronique active (omniprésente), l'atrophie gastrique (50% des cas), la métaplasie intestinale (40%), la dysplasie (8%) et le cancer gastrique (< 5%) (Correa, 1995 ; Kuipers, 1993 ; Peek et Blaser, 2002).

L'éradication a un effet favorable sur la survenue du cancer gastrique (Correa *et al.*, 2000 ; Nozaki *et al.*, 2003) notamment en l'absence de lésions précancéreuses initiales (Wong *et al.*, 2004). Par ailleurs, un supplément d'antioxydants dans l'alimentation aurait un effet favorable sur la régression des lésions (Correa *et al.*, 2000).

### **3-4/ Lymphome gastrique du MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue)**

La cytologie normale de l'estomac est dépourvue de tissu lymphoïde associé aux muqueuses. Le lymphome du MALT se caractérise par une infiltration massive de cellules lymphoïdes dans la *lamina propria* entraînant une destruction des glandes gastriques et la formation de lésions lympho-épithéliales (Capelle *et al.*, 2008).

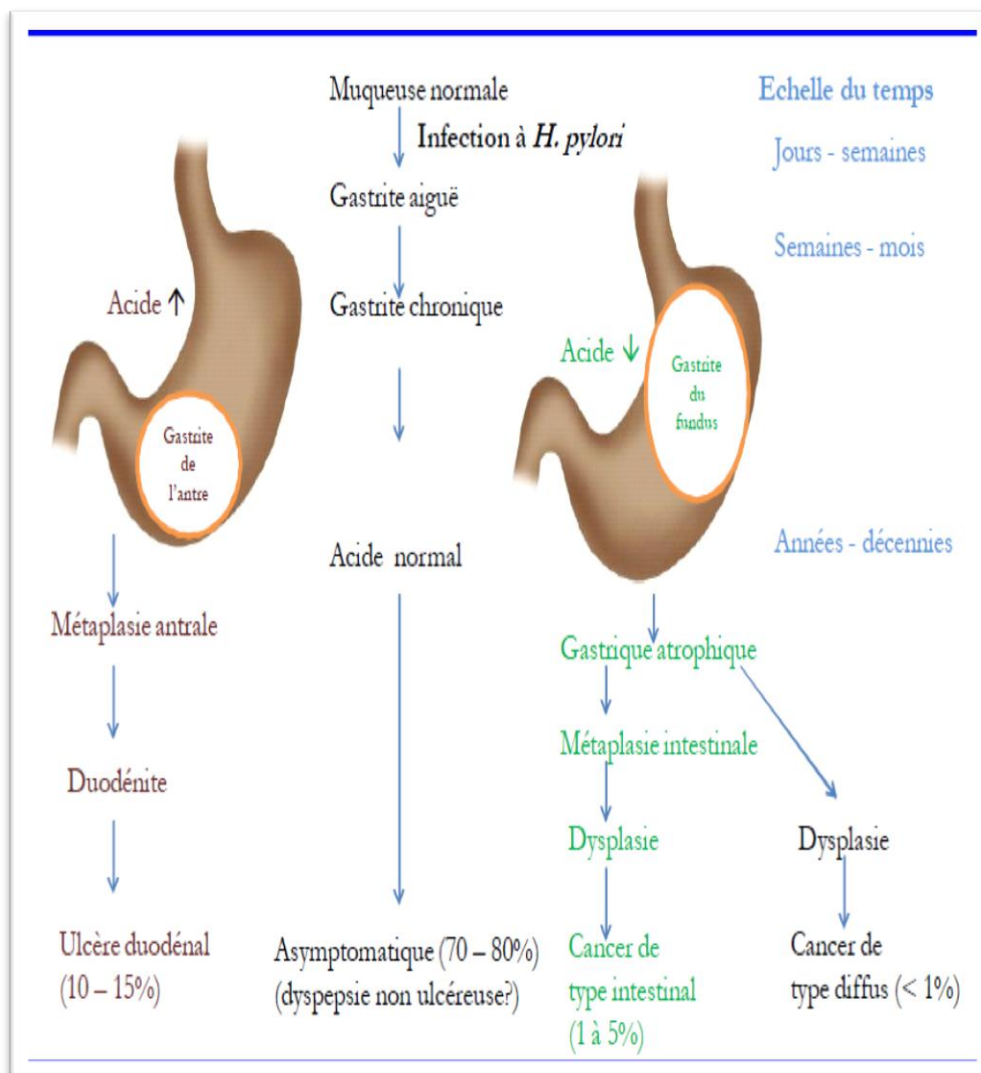
On distingue 2 types cliniques:

-Lymphome à grandes cellules (haut grade) caractérisé par une tumeur volumineuse et ulcérée.

-Lymphome à petites cellules (bas grade) caractérisé par une réaction inflammatoire lympho-plasmocytaire, une formation de nodules lymphoïdes et la prolifération d'un clone cellulaire.

Ce sont des lymphomes de faible degré de malignité, d'évolution indolente, généralement localisés et pouvant se transformer en lymphome de haut degré de malignité lorsqu'apparaît un ou plusieurs contingents de grandes cellules. 90 % des sujets atteints de lymphome du MALT sont infectés par *H. pylori* (Eidt et *al.*, 1994; Konturek et *al.*, 2000 ; Kusters et *al.*, 2006).

Il serait préférable de commencer le traitement de ces lésions par une antibiothérapie anti-*H. pylori*, avant de décider un traitement plus lourd : chirurgie et/ou chimiothérapie (Flejou, 1994 ; Sobhani, 1994).



**Figure 03:** Représentation schématique de la physio-pathogénie de l'infection à *H. pylori* dans le cancer gastrique et l'ulcère duodéal (Correa et Piazzuelo, 2012).

### 3-5/ Manifestation extra-gastrique de l'infection à *Helicobacter pylori*

#### - L'anémie ferriprive

Les sujets infectés par *H. pylori* ont une moyenne inférieure des niveaux de ferritine sérique par rapport à ceux non infectés, indépendamment de leurs apports en fer (Milman et al., 1998). Les mécanismes par lesquels l'infection à *H. pylori* peut causer une carence en fer n'ont pas été entièrement élucidés mais plusieurs facteurs pourraient en contribuer.

*H. pylori* entre en compétition avec l'organisme pour l'absorption du fer nécessaire pour sa croissance. L'infection entraîne aussi une diminution de concentration de vitamine C dans le suc gastrique, ce qui entraînerait la diminution de l'absorption du fer (Annibale et al., 2003).

De plus, une gastrite fundique, caractérisée par l'augmentation du pH, n'est pas favorable pour l'absorption gastrique du fer (Capurso et al., 2001). L'éradication contribue nettement à l'amélioration clinique, même en l'absence de toute supplémentation en fer (Choe et al., 1999).

#### - Purpura thrombopénique idiopathique PTI

La réaction inflammatoire et la réponse immunologique chroniques vis à vis l'infection à *H. pylori* peuvent causer des réactions croisées contre le tissu de l'hôte. La physiopathologie de PTI n'est pas bien élucidée mais la forte prévalence de l'infection à *H. pylori* (58%) chez les sujets présentant le PTI accuse la bactérie dans la genèse de cette pathologie (Franchini et al., 2007). L'éradication contribue à l'amélioration et la remise du PTI (Stasi et al., 2009).

Nombreuses sont les pathologies indirectement associées à l'infection à *H. pylori* notamment : dyspepsie fonctionnelle, troubles cardiovasculaires, pathologies auto-immunes, migraines, retard de croissance,... (Atherton et Blaser, 2009).

### 4/ Les facteurs de virulence majeurs

*H. pylori* est particulièrement bien adaptée à la colonisation de la muqueuse gastrique grâce à de nombreux facteurs bactériens tels qu'une uréase et des flagelles. *H. pylori*, armée de son pouvoir colonisateur et de ses facteurs de virulence, entraîne l'apparition de gastrites qui peuvent être chroniques et asymptomatiques ou évoluer vers des pathologies plus graves.

*H. pylori* dispose d'un certain nombre de facteurs de virulence qui sont essentiels à la colonisation de l'estomac et à la survie dans l'environnement hostile gastrique. Ils sont répartis en trois groupes: les facteurs de colonisation; les facteurs de persistance et les facteurs de pathogénicité. Certains facteurs de virulence sont présents uniquement dans certaines souches et sous-types et ils sont parfois corrélés à une pathologie plus ou moins sévère (Yamaoka, 2010).

**Tableau 01** : Principaux facteurs de virulence d'*H. pylori*. (Amir, 2006).

<b>Facteurs de virulence d'<i>H. pylori</i></b>	<b>Présent dans toutes les souches?</b>
<b>Facteurs de colonisation</b>	
Flagelles (mobilité)	OUI
Uréase (codée par plusieurs gènes dont ureA et ureB)	OUI
Adhésines (plusieurs dont BabA, SabA)	NON
Lipopolysaccharides (LPS)	OUI
<b>Facteurs de persistance</b>	
Catalase	OUI
Superoxyde dismutase (SOD)	OUI
alkylhydroperoxyde réductase (AhpC)	OUI
<b>Facteurs de pathogénicité</b>	
Ilot de pathogénicité cag (une trentaine de gènes dont cagA est immunodominant)	NON
VacA (Vacuolating cytotoxin A)	OUI
OipA (Outer inflammatory protein A)	NON
Uréase (ammoniac)	OUI
dupA (Duodenal ulcer promoting gene)	NON

## 5/ Epidémiologie de l'infection à *Helicobacter pylori*

### 5-1/ Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori*

*H. pylori* a coexisté avec l'être humain depuis 58 000 ans minimum (Linz et al., 2007), probablement depuis son origine (Falush et al., 2003), Il serait plus probable que tous les humains le portaient dans leurs estomacs.

La moitié de la population mondiale en est actuellement infectée (The EUROGAST Study Group, 1993 ; Brown, 2000), ce qui la rend l'infection la plus répandue dans le monde.

L'infection à *H. pylori* se produit dans le monde entier, mais des différences significatives dans la prévalence ont été trouvées à l'intérieur et entre les pays (Mitchell, 2001). Cette prévalence est très élevée dans les pays en voie de développement ou elle peut atteindre 90% alors qu'elle ne dépasse pas 20% dans les pays industrialisés (Krejs, 2010). Les exceptions notables de cette tendance sont le Japon et le Portugal, où la prévalence de *H. pylori* est supérieure à 80% (Fukuda-Parr, 2004). Il est maintenant bien connu que l'infection à *H. pylori* est principalement acquise dans l'enfance (Pounder et Ng, 1995 ; Megraud, 2003).

Plusieurs facteurs influencent la prévalence de l'infection à *H. pylori* (Goh, 1997; Malaty et al., 1999 ; Brown, 2000 ), entre autres, l'âge, le statut socio-économique, les appartenances ethniques et les relations interfamiliales (Mitchell et al, 1992a; Miendje at al., 2011 ; Rothenbacher et al., 1998).

### 5-2/ Transmission de l'infection par *Helicobacter pylori*

#### 5-2-1/ Les voies de transmission de l'infection par *Helicobacter pylori*

Plusieurs mécanismes de transmission ont été suggérés (Safaei et al., 2011 ; Prasad et al., 2016). *H. pylori* a été détectée dans la salive (Ferguson et al., 1999 ; Allaker et al., 2002), les vomissures (Ferguson et al., 1993; Leung et al., 1999 ; Kabir, 2004), le produit de reflux gastrique et les selles (Parsonnet et al., 1999 ; Sinha et al., 2004).

*H. pylori* a rarement été isolée à partir des animaux de compagnie (Brown et al., 2001 ; Brown et al., 2002). Ainsi, la présence d'animaux de compagnie peut être un facteur de risque de l'infection (Dore et al., 2001 ; Herbarth et al., 2001).

Les voies de transmission de personne à personne les plus pertinentes englobent les voies oro-orale, féco-orale et gastro-orales. L'allaitement et la transmission iatrogène sont

également inclus comme des voies alternatives pour la diffusion de la bactérie (Everhart, 2000).

### **5-2-1-1/ La transmission gastro-orale**

La transmission par voie gastro-orale est la plus susceptible pour les jeunes enfants chez lesquels les vomissements et le reflux gastro-œsophagien sont communs. Dans une étude (Parsonnet et *al.*, 1999), les vomissures et l'air ambiant des sujets infectés par *H. pylori* ont été collectés. Tous les échantillons de vomissures étaient positifs, et même les échantillons d'air testés étaient positifs pour 37,5% des cas.

Un argument indirect a été apporté par étude épidémiologique qui a montré que la présence d'un individu infecté présentant une gastroentérite avec vomissements était associée à un risque d'infection 6 fois plus élevé pour la communauté habitant sous le même toit (Perry et *al.*, 2006). Il a été montré par des méthodes de biologie moléculaire que la bactérie était 600 fois plus abondante dans les vomissements que dans les selles (Janzon et *al.*, 2009).

Notant aussi que l'exposition à des gouttelettes microscopiques de suc gastrique lors de la manipulation de l'endoscope pourrait expliquer une plus forte prévalence de l'infection chez les gastro-entérologues réalisant les endoscopies digestives (Mitchell et *al.*, 1989 ; Lin et *al.*, 1994 ; Hildebrand et *al.*, 2000 ; Velasco Elizalde et *al.*, 2007) ainsi que chez les chirurgiens exposés aux sécrétions/aérosolisations oro-gastriques (Upile et *al.*, 2002).

La présence d' *H. pylori* a été détectée sous l'ongle par PCR ce qui suggère le rôle des mains comme vecteurs potentiels de transmission (Oona et *al.*, 2004).

### **5-2-1-2/ La transmission oro-orale**

La cavité buccale a été considérée comme un réservoir adapté pour la subsistance d' *H. pylori*. Des souches identiques ont été détectées par PCR dans l'estomac et la bouche des sujets infectés par *H. pylori* (Khandaker et *al.*, 1993).

La transmission oro-orale a donc été suggérée de se produire avec un baiser (Albenque et *al.*, 1990), ainsi que l'utilisation de baguettes et de repas en commun dans certaines communautés (Chow et *al.*, 1995 ; Lambert et *al.*, 1995).

La plupart des rapports sur la présence d' *H. pylori* dans la cavité buccale sont basés sur la détection d'ADN spécifique trouvé dans les plaques dentaires, dans les poches parodontales et dans la salive (Song et al., 2000a).

L'inconvénient majeur de la PCR est son incapacité à distinguer entre les micro-organismes viables ou morts, et par conséquent, la détection de l'ADN du micro-organisme dans la cavité buccale n'est pas une preuve suffisante pour la considérer comme réservoir de l'infection (Oona et al., 2004). La réussite de la culture d'*H. pylori* à partir des échantillons de la cavité buccale a été rarement signalée (Parsonnet et al., 1999).

Des contre-arguments à cette voie de transmission sont évoqués dans la littérature. Notamment, la faible prévalence de l'infection à *H. pylori* chez les dentistes (Lin et al., 1994 ; El-Zaatari et al., 1995); l'hypothèse des baguettes chinoises a été controversée (Leung et al., 1999b). Par ailleurs, la présence d'une bactérie au niveau d'une localisation particulière ne démontre pas forcément l'implication de ce site dans la transmission.

### **5-2-1-3/ La transmission féco-orale**

Pour la transmission féco-orale, *H. pylori* doit être éliminée par les selles, viables et à des concentrations suffisamment élevées. La culture d'*H. pylori* à partir des selles normales a été rarement couronnée de succès, bien que des taux d'isolement plus élevés ont été obtenus en utilisant des conditions de culture modifiées (Oona et al., 2004). *H. pylori* peut être plus facilement isolée à partir des selles diarrhéiques (Parsonnet et al., 1999) indiquant que *H. pylori* peut mieux préserver sa viabilité quand le temps de transit à travers le tractus gastro-intestinal est plus court.

Elle est sensible à la bile et il est peu vraisemblable qu'elle survive au transit intestinal (Azevedo et al., 2007). Le risque d'infection pour une communauté habitant sous le même toit n'était pas significativement plus élevé lorsqu'un des membres infecté présentait une diarrhée (Perry et al., 2006).

Des essais de détection de *H. pylori* par PCR ou par méthode immuno-enzymatique (ELISA ou « enzyme-linked immunosorbent assay ») ont identifié la présence de la bactérie dans les selles de populations infectées (Russo et al., 1999 ; Ndip et al., 2004 ; Queralt et al., 2005) , mais il est essentiel de se rappeler que le fait de trouver de l'ADN ou un antigène de *H. pylori* n'implique pas forcément que les bactéries soient vivantes.

Les arguments en faveur de la transmission féco-orale sont, l'exposition particulière de l'enfant, qui porte facilement ses doigts à la bouche après la manipulation d'objets souillés (Vincent, 1994). D'autres voies de transmissions sont possibles, telles que l'eau ou les aliments contaminés (Poms et *al.*, 2001). La maman est considérée comme la figure clé de transmission à la descendance (Kivi et Tindberg, 2006 ; Vale et Vítor, 2010).

## **6/ Diagnostic et traitement de l'infection à *Helicobacter pylori***

### **6-1/ Diagnostic**

Actuellement, plusieurs méthodes sont disponibles pour détecter la présence de l'infection à *H. pylori*, chacun ayant ses propres avantages, inconvénients et limitations. Ils sont divisés en deux catégories :

- Les méthodes directes ou invasives, impliquant la pratique d'une endoscopie avec obtention de biopsies gastriques, (test rapide à l'uréase, culture bactérienne, tests moléculaires impliquant la PCR, histologie...etc).
- Les méthodes indirectes, ou non invasives, qui ne nécessitent quant à elles pas la pratique d'une endoscopie avec biopsies (Glupczvnski, 1994). (breath test, recherche des anticorps dans le sang ou les urines, recherche d'antigènes dans les selles...etc).

La sélection du test dépend de l'objectif de l'essai, la sensibilité et la spécificité, rapport coût-efficacité de la stratégie de tests et de la disponibilité de l'essai (Oona et *al.*, 2004).

L'avantage de la culture bactérienne est sa spécificité à 100% et il permet en outre la caractérisation de l'organisme (la détermination de sa sensibilité aux antibiotiques, d'enquêter sur ses facteurs de virulence, ... etc.).

### **6-2/ Traitement de l'infection à *Helicobacter pylori***

Un grand espoir est né pour le traitement des pathologies gastroduodénales par l'antibio-thérapie à l'issue de la reconnaissance d' *H. pylori* comme agent étiologique des maladies gastroduodénales. L'importance de l'éradication d'*H. pylori* est de réduire le risque de développement du cancer gastrique qui représente une charge exponentielle principalement dans les pays en voie de développement.



Mais l'on est actuellement confronté à un risque d'échec dû à l'augmentation des résistances aux antibiotiques. La bonne utilisation de ces derniers constitue un défi pour ces prochaines années; par conséquent la surveillance des résistances devient une mission essentielle.

Les traitements actifs sur *H. pylori* combinent antibiotiques et antisécrétoires gastriques, principalement les IPP. Les trithérapies (IPP et deux antibiotiques) étaient jusqu'à présent la référence, avec plusieurs lignes de traitement définies pour pallier aux échecs induits par la résistance aux antibiotiques et le défaut d'observance des patients favorisé par les effets indésirables fréquents (Chey et Wong, 2007 ; De Korwin, 2007 ; Afssaps, 2007; Malfertheiner et *al.*, 2012).

Bien qu' *H. pylori* est sensible à un large éventail d'antibiotiques in vitro, ils ont tous échoué en monothérapie in vivo. Le manque d'efficacité de la monothérapie est lié à la niche de *H. pylori*, pH acide dans une couche de mucus visqueux.

La tétracycline, l'amoxicilline, les imidazoles (principalement la métronidazole) et quelques macrolides (en particulier la clarithromycine) sont probablement les médicaments les plus largement utilisés pour le traitement d'éradication d' *H. pylori* (Megraud et Lamouliatte, 2003).

Différents régimes thérapeutiques, avec des durées, des doses et de nombreuses combinaisons médicamenteuses ont été étudiés mais aucun d'entre eux n'a atteint des niveaux d'éradication de 90%.

La détermination du traitement optimal pour l'infection à *H. pylori* est difficile, car cette bactérie se niche dans un environnement pas facilement accessible à de nombreux médicaments et l'antibiorésistance représente un défi supplémentaire. En outre, la majorité des schémas thérapeutiques recommandés sont difficiles à suivre par les patients; conduisant à un problème d'observance ; devant prendre un grands nombre de pilules au moins deux fois par jour et de faire face aux effets indésirables désagréables qui démotivent la coopération du patient.

De plus, une des majeures particularités d'*H. pylori* est sa grande capacité d'acquisition des résistances notamment par mutation. Cette résistance est transmise verticalement et son taux ne cesse d'augmenter. Tous les antibiotiques sont concernés bien

que la résistance à l'amoxicilline demeure exceptionnelle (Megraud, 2007; Megraud et Lehours, 2007 ; Boyanova et Mitov, 2010 ; De Francesco et *al.*, 2010).

## Chapitre II : Eléments bioactifs des plantes médicinales

Les plantes, qui ont déjà fourni à la médecine des molécules thérapeutiques majeures, comme l'aspirine, la morphine, la quinine ou le taxol, offrent un véritable potentiel pour la recherche de molécules à activité antibactérienne.

Peu d'espèces végétales sont connues et seule une minorité d'entre elles est explorée chimiquement. Il resterait entre 300 000 et 500 000 espèces de plantes à découvrir (UNEP-WCMC, 2002) ce qui laisse présager un nombre conséquent de nouvelles molécules à identifier.

Hormis cette vaste biodiversité, les plantes combinent un ensemble de critères, qui justifient le regain d'intérêt pour l'exploitation de cette ressource naturelle.

### 1/ Les huiles essentielles

Les molécules actives, impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, sont issues du métabolisme secondaire. Elles ne participent pas directement à la croissance des plantes, mais ont évolué pour leur fournir une protection naturelle contre les attaques de microbes ou d'insectes. Une partie de ces métabolites secondaires se concentre dans les sacs oléifères, qui sont des poches sécrétrices d'huiles essentielles. L'exploration des huiles essentielles pour la recherche de molécules à activité antibiotique semble donc être une voie intéressante.

#### 1-1/ Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, isolées des plantes par hydro-distillation ou par expression mécanique (Kalembe et Kunicka, 2003). Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits (Burt, 2004), mais également à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres.

L'hydro-distillation reste le moyen le plus employé pour produire les huiles essentielles, en particulier à des fins commerciales (Burt, 2004). Le volume d'huile essentielle récupéré dépend du rendement de distillation, qui est variable, chez une même plante, en fonction de la saison (Gonny et *al.*, 2004).

De nouvelles techniques permettant d'augmenter le rendement de production ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse

température et sous haute pression (Santoyo et *al.*, 2005) ou l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes (Kimbaris et *al.*, 2006).

### 1-2/ La composition des huiles essentielles

La composition de nombreuses huiles essentielles a été décrite dans la littérature. Elle varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (Delaquis et *al.*, 2002 ; Burt, 2004 ; Gonny et *al.*, 2004).

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) (Salzer, 1977). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles (Tomi et *al.*, 1995).

Une huile essentielle renferme majoritairement des terpènes volatils, issus de la condensation d'unités isopréniques, et des dérivés aromatiques dérivés du phénylpropane.

Concernant les composés terpéniques, Seuls les monoterpènes en C10 et les sesquiterpènes en C15 peuvent être extraits par distillation, les autres terpènes (diterpènes en C20 et triterpènes en C30) n'étant pas entraînés par la vapeur d'eau.

Ils sont classés selon :

- Leurs fonctions : alcools (géraniol, linalol), esters (acétate de linalyle), aldéhydes (citral, citronellal), cétones (menthone, camphre, thuyone), éthers-oxydes (cinéole) ;
- Leur structure : linéaire (farnésène, farnésol), monocyclique (humulène, zingiberène), bicyclique (cadinène, caryophyllène, chamazulène) ou tricyclique (cubébol, patchoulol, viridiflorol).

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents dans les huiles essentielles que les monoterpènes et sesquiterpènes : l'acide cinnamique et l'aldéhyde cinnamique (HE de cannelle), l'eugénol (HE de girofle), l'anéthole et l'aldéhyde (HE de badiane, d'anis, de fenouil), et le saffrole (HE de saffras). Les lactones dérivées des acides cinnamiques, comme les coumarines, sont, pour la plupart, entraînés par la vapeur d'eau et ainsi présentes dans certaines huiles essentielles (ex. HE de céleri).

Plus de 60 molécules différentes peuvent entrer dans la composition chimique d'une huile essentielle. Les composés majoritaires peuvent représenter, à eux seuls, plus de 85% de l'huile alors que d'autres composés ne sont présents qu'à l'état de traces (Senatore, 1996).

### 1-3/ Les propriétés pharmacologiques des huiles essentielles

La diversité moléculaire des métabolites que contiennent les huiles essentielles, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés.

De nombreuses huiles essentielles, comme les huiles de cannelle, de piment, de laurier et d'origan, présentent un pouvoir anti-oxydant (Mantle *et al.*, 1998 ; Karioti *et al.*, 2006). Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour les huiles essentielles de *Protium strumosum*, *Protium lewellyni*, *Protium grandifolium* (Siani *et al.*, 1999), ou, plus récemment, pour l'huile essentielle des racines de *Carlina acanthifolia* (Dordevic *et al.*, 2007).

Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles, incluant les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de l'arbre à thé ont été décrites (Burt, 2004). L'efficacité des huiles extraites des achillées, *Achillea fragrantissima* (Barel *et al.*, 1991), *A. setacea*, *A. teretifolia* (Unlu *et al.*, 2002) et *A. millefolium* (Candan *et al.*, 2003), contre la levure pathogène *Candida albicans*, a également été mise en évidence.

Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle, isolée des graines de *Nigella sativa* L., démontre une activité cytotoxique contre différentes lignées cellulaires tumorales. elle limite la prolifération de métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur P815 (Mbarek *et al.*, 2007). L'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est, quant à elle, révélée efficace contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant les cellules leucémiques HL-60 et K562 (De Sousa *et al.*, 2004).

D'autres applications médicales sont étudiées. Les travaux de Jafri *et al.*, (2001) ont prouvé la capacité de l'huile essentielle de cardamome à limiter la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol (Jafri *et al.*, 2001). Il a également été démontré que les huiles essentielles facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles, comme l'œstradiol (Monti *et al.*, 2002).

Des travaux tentent également d'analyser les effets des huiles essentielles sur le comportement (Umezu, 1999) ou d'évaluer la possibilité de les utiliser dans la lutte contre l'addiction à certaines drogues, comme la nicotine (Zhao et *al.*, 2005).

## **2/ Les antioxydants d'origine végétale**

Pour échapper aux graves séquelles du stress oxydant, il y a nécessité de maintenir l'équilibre entre oxydants et antioxydants, afin de préserver les performances physiologiques optimales de l'organisme.

Une consommation suffisante d'antioxydants s'impose. Les antioxydants alimentaires comprennent des vitamines (A, C et E), certains oligoéléments (sélénium, zinc), mais également des éléments bioactifs qui ne sont ni des vitamines ni des minéraux et qui se trouvent naturellement dans les aliments issus du règne végétal appelés phyto-nutriments. Ces métabolites secondaires sont fortement impliqués en prophylaxie de plusieurs cancers et pathologies chroniques (Liu, 2003; Prior, 2003).

### **2-1/ La vitamine E**

La vitamine E ou  $\alpha$ -tocophérol est le principal antioxydant de la famille des tocophérols. Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, qui est un inhibiteur de la propagation radicalaire, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical ROS. Il constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant cette protection (Esterbauer et *al.*, 1991).

### **2-2/ La vitamine C**

La vitamine C est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présents dans les fluides intra- et extra-cellulaires (compartiments hydrophiles). Ses activités biologiques antioxydantes viennent de son potentiel réducteur puissant (Fang et *al.*, 2002).

L'anion ascorbate (forme présente dans le milieu physiologique) agit principalement en piégeant directement les ROS. Il est aussi capable de recycler l' $\alpha$ -tocophérol de façon à agir en synergie avec ce dernier dans la prévention de la peroxydation lipidique.

### 2-3/ Le sélénium

L'atome de sélénium a, dans l'organisme, un rôle antioxydant. Cet élément trace essentiel est incorporé dans un acide aminé, la sélénocystéine. Il est indispensable au fonctionnement des enzymes anti-oxydants séléniés, dont la fonction est capitale chez les mammifères. Le Sélénium n'est pas libre dans le plasma. Chez le sujet sain, il est présent pour 55 % dans la sélénoprotéine P. Cette sélénoprotéine se fixerait sur l'endothélium activé pour le protéger. Ce mécanisme pourrait être à l'origine de la diminution très précoce de la séléniémie au décours de choc septique (Forceville et Van, 2008).

### 2-4/ Le $\beta$ -carotène

Le  $\beta$ -carotène est l'un des principaux caroténoïdes (Stahl *et al.*, 1992 ; Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008). Les caroténoïdes présentent des propriétés antioxydantes (Voutilainen *et al.*, 2006 ; Agte et Tarwadi, 2010). Ils ont un grand pouvoir pour réduire le risque de différentes maladies en raison de l'effet antioxydant (Glauert *et al.*, 2010 ; Kubo *et al.*, 2010).

### 2-5/ Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 9000 structures connues différentes (Bahorun, 1997), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Akowauh *et al.*, 2004). Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Ces corps jouent un rôle fondamental car sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles des végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi que dans les boissons, le café, le cacao ou le thé.

L'homme consomme environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E (Scalbert *et al.*, 2005).

L'activité antioxydante des polyphénols est reconnue et pourrait expliquer leur rôle potentiel dans la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives.

Ils sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique (Crozier et *al.*, 2010). De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires (Manach et *al.*, 2005). Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Ils sont regroupés dans la catégorie de veinotoniques et des vasculo-protecteurs (Ghosh et Scheepens, 2009). Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont également considérées comme des antiagrégants plaquettaires ou hypotenseurs (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

### **2-6/ Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes occupent une place prépondérante dans le groupe des phénols, ce sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. On estime que 2 % environ du carbone organique photo-synthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, est converti en flavonoïdes. Les plus couramment vendus ou utilisés en tant que compléments alimentaires sont : la vanilline et l'acide vanillique, le resveratrol, l'acide ellagique, curcumine, stilbène, epigallocatechine gallate et la quercitine (Ferguson, 2001).

### **2-7/ Les alcaloïdes**

Les alcaloïdes forment une grande famille de molécules chimiquement hétérogène. Leurs caractéristiques communes sont la présence d'au moins un atome d'azote et leur forte activité biologique. L'atome d'azote accepte souvent un proton, ce qui leur confère un caractère légèrement basique en solution (d'où leur nom d'alcaloïdes).

Les alcaloïdes provoquent chez l'homme diverses réponses physiologiques par ce qu'ils interfèrent avec les neurotransmetteurs. A fortes doses, la plupart des alcaloïdes sont très toxiques par contre à faible dose ils peuvent avoir une valeur thérapeutique. De la préhistoire jusqu'à nos jours, les alcaloïdes ont été utilisés comme médicaments relaxants musculaires, analgésique et tranquillisants (Hopkins, 2003).

## **3/ Les éléments bioactifs anti-*Helicobacter pylori* d'origine naturelle connus**

La trithérapie couramment utilisée contre l'infection à *H. pylori* représente une lourde charge aux patients, associée aux problèmes d'antibiorésistance et des effets secondaires indésirables tels que les allergies.

La recherche de nouvelles alternatives pour le traitement de l'infection à *H. pylori* demeure indispensable. Un grand nombre de produits naturels a été utilisé contre les



perturbations gastro-intestinales. Une panoplie de ces produits a démontré leur activité antimicrobienne contre *H. pylori* (Cogo et al., 2010) comme des stratégies alternatives ou complémentaires pour le traitement de cette l'infection.

### **-La vitamine C**

La vitamine C a inhibé la croissance d' *H. pylori* incubée in vitro (Zhang et al., 1997). L'administration orale de la vitamine C (10 mg / jour pendant 7 jours) réduit le nombre de colonies de *H. pylori* inoculées par voie orale à des gerbilles (Zhang et al., 1997).

Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si la vitamine C peut éradiquer *H. pylori*, si les doses élevées de vitamine C seraient tolérées par des patients souffrants d'ulcères gastro-duodénaux actifs et si la vitamine C tamponnée, qui vraisemblablement causerait moins d'irritations gastriques que l'acide ascorbique, est aussi efficace que la forme acide de la vitamine (Jagannath et al., 2011).

D'autre part, même un effet supprimeur de la vitamine C contre *H. pylori* peut avoir des implications cliniques importantes, car la plupart des gens peuvent ingérer des doses modérées de la vitamine C indéfiniment (Sezikli et al., 2012).

### **-Les acides gras polyinsaturés**

L'acide alpha-linolénique à une concentration de  $1,8 \times 10^{-4}$  M a inhibé de manière réversible la croissance d' *H. pylori* in vitro, alors qu'une concentration de  $10^{-3}$  M a tué la quasi-totalité des germes (Thompson et al., 1994).

Bien que les résultats à attendre seraient inférieurs à ceux réalisables avec la triple thérapie classique, les acides gras utilisés dans cette étude sont relativement inoffensifs et beaucoup plus sûrs que l'antibiothérapie classique (Frieri et al., 2000).

### **-Les lactobacilles**

Les lactobacilles ont montré leur efficacité à réduire l'incidence des effets gastro-intestinaux indésirables induites par des antibiotiques (Gotz et al., 1979 ; Armuzzi et al., 2001). En plus de réduire les effets secondaires, les données préliminaires indiquent que les lactobacilles pourraient accroître l'efficacité de l'antibiothérapie (Bhatia et al., 1989). En outre, l'administration *L. salivarius* à des souris a empêché la colonisation gastrique d' *H. pylori* (Kabir et al., 1997).

### **-La gomme du mastic**

Le mastic est un exsudat résineux obtenu à partir de la tige et des feuilles du lentisque (arbre du mastic). Dans une étude, l'administration de l'extrait de mastic à une dose de 1 g deux fois par jour pendant quatre semaines a promu la cicatrisation des ulcères (Huwez et Al-Habbal, 1986). Cependant, il reste difficile de déterminer le rôle du mastic dans la guérison des ulcères.

Dans une autre étude, 60 patients avec ulcère duodéal ont reçu le mastic (1 g / jour avant le petit déjeuner) pendant deux semaines (Al-Habbal et *al.*, 1984). Parmi les 38 les patients ayant terminé l'essai, la cicatrisation des ulcères a été observée dans 78% des patients recevant le mastic.

Ces études suggèrent l'implication du mastic dans la guérison des ulcères gastro-duodénaux. L'effet bactéricide du mastic contre *H. pylori* a également été montré *in vitro* (Huwez et *al.*, 1998). Ce qui pourrait, au moins en partie, expliquer son rôle dans la guérison des ulcères.

### **-L'ail**

L'extrait aqueux de gousses d'ail, normalisé pour sa concentration de thiosulfinate, a prouvé son pouvoir à inhiber la croissance d' *H. pylori* *in vitro* avec une concentration minimale inhibitrice de 40 µg/ml de thiosulfinate (Sivam et *al.*, 1997). Cette concentration de thiosulfinate exigerait environ 5 g d'ail frais (deux petites gousses) dans un volume de 500 ml, ce qui est considéré comme une dose assez modeste d'ail. Malgré les preuves de l'effet antibactérien *in vitro*, les essais cliniques utilisant des préparations à base d'ail ont été décevants (Ernst, 1999 ; Aydin et *al.*, 2000). Cependant Cellini et *al.*, (1996), Sivam (2001) et Canizares et *al.*, (2004) ont souligné l'activité de l'extrait aqueux de l'ail contre *H. pylori*.

Un effet synergique significatif de l'extrait aqueux de l'ail avec l'oméprazole a été observé par Jonkers et *al.*, (1999) ce qui a montré une augmentation significative de l'activité par rapport aux résultats obtenus par chaque traitement testé séparément.

### **-La berbérine**

La berbérine, un constituant de plantes herbacées telles que l'hydraste, l'épine-vinette, et le mahonia, a un large spectre antibactérien (Murray, 1995). La berbérine présente une activité anti-*H. pylori* (Hu, 1993).

Dans une étude chinoise, l'administration de 300 mg trois fois par jour de berbérine pour six semaines a abouti à la suppression d'*H. pylori* dans au moins 40 % d'un groupe de patients ayant des ulcères gastro-duodénaux.

### -Les flavonoïdes

Bien qu'aucune étude clinique n'a été menée sur les flavonoïdes et leur potentiel d'éradication d'*H. pylori*, plusieurs études in vitro et sur des modèles animaux montrent leurs avantages.

Leur potentiel inhibiteur contre *H. pylori* in vitro a été trouvé. Notamment la poncétine (issue des agrumes et d'autres plantes), l'hespéretine, la naringénine, la diosmétine, et la poncétine sont les inhibiteurs les plus puissants (Bae et al., 1999).

Dans une étude, l'étryptanthrine (un flavonoïde) isolé de *Polygonum tinctorium*, a inhibé *H. pylori*, à la fois in vitro et dans le l'estomac de gerbilles (Kataoka et al., 2001).

Il est également possible que certains flavonoïdes peuvent exercer une activité directe contre *H. pylori* ou agir en synergie avec des antibiotiques utilisés dans la thérapie conventionnelle (Tim Cushnie et Lamb, 2011).

### -Les huiles essentielles

Les études élucidant l'effet anti-*H. pylori* présenté par les huiles essentielles ont été développées au cours des dernières années en raison de la nécessité de nouvelles drogues pour le traitement des troubles liées à ce type d'infection (Craveiro et Queiroz, 1993 ; Simões et al., 2007 ; Nascimento et al., 2007).

Plusieurs huiles essentielles ayant un effet contre *H. pylori* sont rapportées dans la littérature. Par exemple, Kalpoutzakis et al., (2001) ont observé une action antibactérienne contre les souches cliniques d' *H. pylori* à partir de deux espèces de plantes du genre *Nepeta*, *Nepeta camphorata* L. et *Nepeta argolica* ssp. *dirphya*, appartenant à la famille des Lamiacées.

Ohno et al. (2003) ont rapporté l'action de 13 huiles essentielles contre les souches d'*H. pylori* d'origine clinique et standard (ATCC). L'étude a révélé une activité contre toutes les souches testées avec des huiles extraites de *Cupressus sempervirens*, *Juniperus communis*, *Melaleuca alternifolia*, *Lippia citriodora*, *Ocimum basilicum*, *Mentha piperita*, *Origanum*

*Majorana*, *Eucalyptus globulus*., *Ravensara aromatica*, *Citrus limonum*, citronnelle, *Rosmarinus officinalis* et *Lavandula latifolia* .

Le même profil de sensibilité a été observé par Deriu et *al.*, (2007), qui a enquêté sur l'activité de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. contre dix isolats cliniques de *H. pylori* résistants à la triple thérapie.

L'huile essentielle de citron de Sicile (*Citrus lemon* Burm. Rutaceae) est classée comme un produit potentiellement prometteur contre les maladies gastro-intestinales (Rozza et Pellizzon, 2012). Les auteurs ont caractérisé le monoterpène limonène comme le constituant principal de l'huile essentielle, ce qui représente environ 70,75% du produit total. De plus, la présence de  $\beta$ -pinène a également été détectée à une concentration de 13,19%. Ainsi, les résultats ont été en mesure d'attribuer le limonène comme composé principal responsable de l'activité anti-*Helicobacter pylori*.

**Chapitre III : Description des plantes sélectionnées****1/ *Pistacia lentiscus* (le lentisque)****1-1/ Classification systématique et description botanique**

*Pistacia lentiscus* est une espèce appartenant à la famille des Anacardiaceae (syn. Pistaciaceae). En Algérie, le genre *Pistacia* est représenté par quatre espèces: *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus*, *Pistacia vera* et *Pistacia atlantica* (Quezel et Santa, 1962).

Parmi les espèces du genre *Pistacia*, le *Pistacia lentiscus* L. est un arbrisseau très commun dans notre pays (Mitchel, 1986 ; Baudière et al., 2002):

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophyta (Angiospermae)

Classe : Dicotyledones

Ordre : Sapindales

Famille : Anacardiaceae (Pistaciaceae).

Genre : *Pistacia*

*Pistacia lentiscus* (Darou), caractéristique de la région méditerranéenne, est un arbrisseau de 1 à 3 mètres, à odeur résineuse forte et à écorce lisse (Coste, 1937). Elle est particulièrement représentative des milieux les plus chauds du bassin méditerranéen.

En Algérie, le lentisque se trouve sur le long du tell et dans les zones forestières, plus précisément dans le bassin du Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège. Les feuilles sont persistantes, composées, alternes pourvues d'un pétiole ailé, paripennées à 4-10 petites folioles elliptiques-obtuses, coriaces, luisantes en dessus, mates et pâles en dessous. Les fleurs en grappes spiciformes denses, naissant 1 ou 2 à l'aisselle d'une feuille et égalant au plus la longueur d'une foliole. Le fruit petit, sub-globuleux, apiculé, rouge, puis noir à la maturité (Yahia, 1992 ; Iserin, 2001 ; More et White, 2005).

**1-2/ Propriétés pharmacologiques et intérêts thérapeutiques**

*Pistacia lentiscus* est connue par ses propriétés médicinales depuis l'antiquité, les médecines traditionnelles pratiquées de part et d'autre des rives de la méditerranée, attribuent au lentisque des vertus dans le traitement des ulcères, des plaies et brûlures légères.

La médecine traditionnelle algérienne utilise surtout l'huile grasse des fruits du lentisque dans le traitement des petites blessures, brûlures légères et érythèmes. L'huile est aussi consommée par voie orale contre les problèmes respiratoires d'origine allergique et les ulcères de l'estomac. Ces usages sont plus répandus à l'Est du pays mais également très utilisés pour les mêmes indications en Tunisie (Yahia, 1992 ; Grosjean, 2007). La résine du pistachier lentisque est aussi connue pour son intérêt contre les ulcères d'estomac. Son efficacité contre la bactérie *H. pylori* a en effet été confirmée.

Selon Baudoux D, (2003) et d'autres auteurs, les huiles essentielles de lentisque sont utilisées pour leurs effets pharmacologiques tant que décongestionnant veineux-lymphatique et anti-spasmodique. La majorité des acides triterpéniques issus des extraits du pistachier lentisque sont incriminés dans l'activité inhibitrice d'*H. pylori* (Paraschos et al., 2007) .

Le Pistachier lentisque a été rapporté pour inhiber la croissance du cancer du côlon (Balan et al., 2007 ), du cancer de la prostate (He et al., 2007) et la lignée cellulaire d'érythroleucémie (Loutrari et al., 2006).

## 2/ *Glycyrrhiza glabra* (la réglisse)

### 2-1/ Classification systématique et description botanique

Selon Hayashi (2009), la réglisse est originaire de l'Eurasie, dans le centre et le sud-ouest de l'Asie et la région méditerranéenne. C'est une plante vivace de 100 à 150 cm de hauteur. Les inflorescences sont des grappes de fleurs couleur lilas plus ou moins foncées. Les parties souterraines de couleur jaune sont très développées. La Réglisse pousse spontanément dans les prairies et dans les zones ensoleillées. La racine est la partie utilisée en médecine (Institut Européen Des Substances Végétales, 2012).

*Glycyrrhiza glabra* est inscrite à la Pharmacopée européenne 3ème édition (1999) (Wichtl et Anton, 2001) selon la classification suivante :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement: Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : Glycyrrhiza.

## **2-2/ Propriétés pharmacologiques et intérêts thérapeutiques**

La réglisse est un édulcorant naturel puissant, elle est 50-170 fois plus sucrée que le saccharose (Mukhopadhyay et Panja, 2008). Les constituants chimiques des Racines comprennent plusieurs composés bioactifs tels que Glycyrrhizine (~ 16%), de différents sucres (jusqu'à 18%), des composés phénoliques, flavonoïdes, saponosides, stérols, amidons et des acides aminés (Blumenthal et *al.*, 2000).

Les rhizomes de réglisse sont considérés comme expectorants et carminatifs, agent aromatisant, antimicrobien, hypolipidémique, anti-athérosclérotique, antiviral, anti-ulcérogène, hépatoprotecteur, spasmolytique, antidiurétique, antimutagène, antipyrétique, anti-inflammatoire (Isbrucker et Burdock, 2006 ; Meena et *al.*, 2010).

Il a été signalé que la réglisse possédait de nombreuses propriétés thérapeutiques en potentialisant l'action du cortisol. Chez les femmes, elle exerce une activité de type œstrogène-like et réduit la masse corporelle grasse (Armanini et *al.*, 2002).

*G. glabra* a été associée à un large éventail de propriétés telles que l'effet antioxydant, anti-inflammatoire, antiathérogène, la régulation du métabolisme énergétique, Œstrogénique, neuro-protecteur et anti-ostéoporotique (Simmler et *al.*, 2013).

La glabridine est l'un des flavonoïdes de réglisse les plus étudiés, la glabridine et l'extrait de réglisse ont un impact alimentaire significatif comme suppléments diététiques et cosmétiques comme en témoigne le montant des brevets et d'articles scientifiques depuis 1976, date pour laquelle la glabridine a été décrite pour la première fois. La réglisse doit être utilisée avec modération et ne devrait pas être prescrite pour les femmes enceintes ou les personnes souffrant d'hypertension artérielle (Armanini et *al.*, 2002).

## **3/ *Origanum majorana* (la marjolaine)**

### **3-1/ Classification systématique et description botanique**

La marjolaine (*Origanum majorana*) est une plante annuelle de la famille des lamiacées, cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles aromatiques. C'est une espèce, très proche de l'origan, qui possède des feuilles de 1 à 2 cm de long, opposées, d'un vert grisâtre, de forme

ovale entière. Ses fleurs sont petites, blanches ou mauves, disposées en groupes serrés à l'aisselle des feuilles avec deux bractées en forme de cuillère (Vera et Channe- Ming, 1999).

Règne: Plantae

Embranchement: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiaceae

Genre: Origanum

### **3-2/ Propriétés pharmacologiques et intérêts thérapeutiques**

La marjolaine est utilisée depuis des temps immémoriaux pour traiter un large éventail d'infections. Elle a été soumise à un nombre assez étendu d'études phytochimiques ainsi qu'à des investigations expérimentales (Rafsanjani et *al.*, 2007 ; Rezaie et *al.*, 2011) et cliniques (Mohamed et *al.*, 2009 ; He et *al.*, 2007).

Ses constituants actifs incluent les dérivés monoterpènes, les esters terpéniques, le monoterpénol et les sesquiterpénoïdes. Ces études expérimentales ont démontré ses effets anti-oxydants (Perez Gutierrez, 2012 ; Ninfali et *al.*, 2005), insecticides, apoptotique, activité antiproliférative (Abdel-Massih et *al.*, 2009 ; Ramadana et *al.*, 2012), antimutagène, activité antimicrobienne (Gutierrez et *al.*, 2008) et anti-ulcère.

De nombreux chercheurs ont conclu que la marjolaine doit être utilisée comme aliment fonctionnel (Baranauskiene et *al.*, 2005 ; Kunicka-Styczynska, 2011 ; Hussein et *al.*, 2012 ) car elle possède plus d'une propriété avantageuse pour la santé (Baranauskiene et *al.*, 2006).

## **4/ *Chamaemelum nobile* (la camomille)**

### **4-1/ Classification systématique et description botanique**

La camomille est l'une des herbes médicinales les plus anciennes connues de l'humanité. Il est membre de la famille Asteraceae et représenté par deux variétés communes. Camomille allemande (*Chamomilla recutita*) et Camomille romaine (*Chamaemelum nobile* / *Anthemis nobilis*). C'est une plante herbacée vivace de 10 à 30 cm de haut, ses tiges velues se terminent par des capitules floraux, de couleurs blancs et jaunes, odorants, solitaires. De couleur vert blanchâtres, ses feuilles sont finement divisées en lobes courts et étroits.



Très connu en Europe du sud, de l'ouest (Angleterre, Belgique, France, Allemagne, Italie et Espagne), sur les terrains sablonneux au bord des étangs à l'état sauvage; et en Afrique du nord (USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network, 2013).

La classification systématique de *Chamaemelum nobile* est:

Règne: Plantae

Ordre : Asterales

Classe : Magnoliopsida

Famille : Asteraceae

Genre : Chamaemelum

#### **4-2/ Propriétés pharmacologiques et intérêts thérapeutiques**

Les fleurs séchées de la camomille contiennent beaucoup de terpénoïdes et de flavonoïdes qui contribuent à ses propriétés médicinales. Les préparations de camomille sont couramment utilisées pour de nombreuses affections humaines telles que le rhume des foins, l'inflammation, les spasmes musculaires, les troubles menstruels, l'insomnie, les ulcères, les blessures, troubles gastro-intestinaux, douleurs rhumatismales et hémorroïdes.

L'infusion froide a été utilisée dans la débilité gastrique or que l'infusion chaude a été utilisée comme diaphorétique, émétique, pour soulager les rhumes en raison de refroidissement cutané soudain, dans la dysménorrhée pour diminuer la douleur et faciliter l'écoulement, comme antispasmodique et sédatif.

L'huile a été utilisée comme carminative, et pour les crampes intestinales et les coliques dues à la flatulence (Felter, 1992 ; Newall et *al.*, 1996). L'activité biologique de la camomille était principalement liée aux flavonoïdes apigénine, lutéoline, quercétine, patuletin et aux constituants de l'huile essentielle tels que l'  $\alpha$ -bisabolol et son Oxyde et azulène (Sharafzadeh et et Alizadeh, 2001).

## I/ MATERIEL ET METHODES

La partie expérimentale a été réalisée au niveau des laboratoires du Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Hassiba Ben Bouali CHLEF (UHBC) et le laboratoire de Génie de la Réaction, Faculté de Génie des Procédés, Université des Sciences et Technologie Houari Boumediene (USTHB).

L'activité anti-*H. pylori* des différentes plantes médicinales a été étudiée au laboratoire d'*Helicobacter pylori*, service des entérobactéries, Institut Pasteur d'Alger.

L'étude de la prévalence de l'infection s'est basée sur la collection des biopsies gastriques suite à une endoscopie digestive haute au niveau de nombreux services hospitaliers cités dans le chapitre dédié à cette étude.

### 1/ MATERIEL

#### 1-1/ Matériel biologique

##### 1-1-1/ Matériel végétal

L'étude a été initiée par la sélection et la collection de plantes les plus susceptibles d'avoir un effet anti-*Helicobacter pylori*. La sélection des plantes s'est essentiellement reposée sur les propositions des herboristes traditionnels pour les douleurs épigastriques et troubles digestives.

Le choix s'est particulièrement posé sur :

- Les fleurs de *Chamaemelum nobile* (camomille) ; récoltées au printemps 2013 à la Wilaya de Chlef.

- Les racines de *Glycyrrhiza glabra*, (réglisse) ; récoltées au printemps 2013 à la Wilaya de Chlef.

- Les feuilles d'*Origanum majorana* (marjolaine) ; récoltées au printemps 2013 à la Wilaya de Chlef.

- Les feuilles de *Pistacia lentiscus* (lentisque) ; récoltées pendant la saison de fructification pendant le mois d'octobre 2013 à la région de « Bouderbala » à la Wilaya de Bouira.

Après la récolte, les échantillons ont été lavés avec l'eau du robinet, séchés à l'ombre pendant deux semaines, concassés dans un mortier traditionnel puis pulvérisés au moulin.

### 1-1-2/ Matériel animal

Pour nos expériences, nous avons eu recours à des rats Wistar et des souris blanches (*Mus musculus*), nous avons réalisé des élevages à l'animalerie de l'USTHB.

Les animaux étaient placés dans des cages en polypropylène de 90cmx35cm équipées de mangeoires et d'abreuvoirs, exposés à la lumière 12h/24h à une température de 20 - 25°C. L'alimentation standard était fournie à volonté.

Nous avons constitué des lots homogènes (sexe, poids). Tous les animaux ont subi une période de stabulation de deux semaines avant toute expérience.

## 2/ METHODES

### 2-1/ Etude de la prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori*

Il s'agit d'une étude prospective intéressant 200 patients présentant des symptômes digestifs et ayant bénéficié d'une fibroscopie digestive haute, un diagnostic clinique et des tests suggérant l'infection à *Helicobacter pylori* sont inclus à l'étude, les facteurs épidémiologiques sont étudiés.

Les principaux objectifs de cette étude sont:

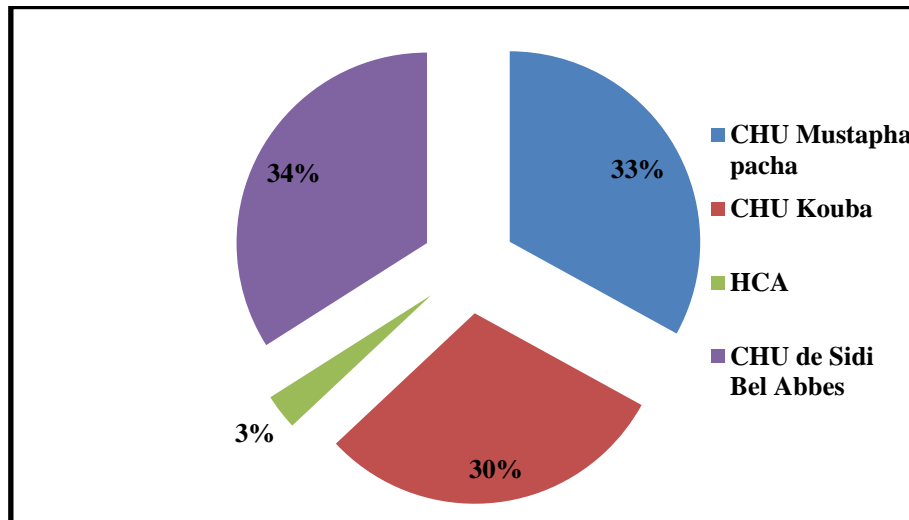
- L'étude de La prévalence de l'infection à *H. pylori* dans la population étudiée.
- L'effet de différents facteurs épidémiologiques sur cette prévalence (âge, sexe...etc).

Le terme « **prévalence** » doit être considéré ici comme étant le pourcentage de patients infectés dans la population de patients pour lesquels nous avons effectué une recherche de l'infection à *H. pylori* par la culture.

Nous avons donc mené une étude observationnelle afin d'analyser et contribuer à la compréhension de l'épidémiologie de l'infection à *H. pylori* dans notre population au cours des 3 dernières années.

L'étude a porté sur des patients qui ont fréquenté plusieurs centres d'endoscopies digestives principalement dans les régions d'Alger et de *Sidi-bel-Abbès*.

- **Période de l'étude** : Du 01 janvier 2013 au 31 décembre 2015.
- **Patients et prélèvements**: Les patients ont été recrutés dans différents centres d'endoscopie, situés principalement dans les régions d'Alger et de *Sidi-bel-Abbès* (Figure 4). Notamment : Le Centre Hospitalo-Universitaire Mustapha pacha, Hôpital Bachir Mentouri de Kouba, l'Hopital Central de l'Armée à Alger et Le Centre Hospitalo-Universitaire Hassani Abdelkader de Sidi Bel Abbes.



**Figure 04** : Proportion de patients inclus dans l'étude en fonction des centres d'endoscopies.

Le critère d'inclusion des patients dans notre étude était basé sur l'obtention d'un résultat (positif ou négatif) pour la culture d'*H. pylori*.

## 2-2/ Isolement d'*Helicobacter pylori*

### ✓ Collection des biopsies

Les biopsies gastriques constituent le matériel biologique objet de cette partie de notre étude. Celles-ci sont prélevées en salle d'endoscopie et sont acheminées dans un milieu de transport (BHIB) au laboratoire.

Cependant, si l'endoscopiste est contraint de mettre fin à l'examen, en cas de réflexes nauséux ou d'hémorragies digestives constatées, une seule biopsie est prélevée. Les biopsies reçues au laboratoire furent soit immédiatement traitées, soit conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment de la mise en culture.

### ✓ Culture d'*Helicobacter pylori*

Toutes les procédures de cette partie ont été réalisées comme décrit par Lee et Mégraud (1999). Après broyage des biopsies gastriques, la culture d'*H. pylori* a été réalisée sur gélose Columbia supplémenté avec 10% de sang de cheval et le supplément sélectif *Helicobacter* (SR147E, Oxoid, Angleterre). Sous atmosphère microaérophile (5% O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> et 85% N<sub>2</sub>) dans une jarre d'anaérobiose utilisant BD GasPak EZ Systems Pouch à 37°C pendant 2-14 jours. Passé ce délai, la culture était considérée négative en cas d'absence de croissance.

### ✓ Identification par méthode biochimique

La croissance bactérienne a été surveillée toutes les 48 heures pour contrôler la croissance de colonies typiques. L'identification fut confirmée par la coloration de Gram (fines bacilles spiralées Gram négatifs) et les tests biochimiques (urée, catalase et oxydase positives).

### 2-3/ Etude de la susceptibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme était effectué par la technique de diffusion à partir de disques pour le métronidazole (16µg), la clarithromycine, l'amoxicilline (30µg), la tétracycline (80µg) et la ciprofloxacine (10µg).

Une suspension standardisée de colonies fraîches (obtenue après 48 heures d'incubation) d'*H. pylori* (densité de 3 à 4 Mac Farland) est ensemencée de manière homogène par écouvillonnage sur une gélose Mueller Hinton contenant 10% de sang de cheval préparé au laboratoire (Bonnet et *al.*, 2012).

Les disques d'antibiotiques à tester (amoxicilline, ciprofloxacine, clarithromycine, métronidazole et tétracycline) sont déposés à la surface de la gélose. Les boîtes sont incubées pendant 48 à 72h. Après incubation, on mesure la zone d'inhibition (exprimée en mm) autour de chaque disque et on interprète. Pour tous les disques testés, la bactérie est considérée comme sensible lorsque le diamètre d'inhibition est supérieur à 40mm (Bonnet et *al.*, 2012).

## 2-4/ Caractérisation moléculaire des isolats d'*Helicobacter pylori*

### 2-4-1/ Extraction de l'ADN des isolats d'*Helicobacter pylori*

L'ADN génomique a été isolé à partir des différentes souches d'*H. pylori* selon les recommandations de Salonen et ses collaborateurs (2010).

- 1 ml d'une culture bactérienne préalablement cultivée pendant 24 heures est prélevé et centrifugé, pendant 5 mn, à 13 000 rpm ;
- Elimination du surnageant et le culot est re-suspendu dans 1 ml de TE. Puis centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 mn ;
- Elimination du surnageant et le culot est de nouveau re-suspendu dans 500 µl de TE. La suspension est chauffée à 95°C pendant 10 mn, puis placée dans la glace à -15°C pendant 10 mn. Cette étape (chauffage et refroidissement) peut être répétée plusieurs fois pour permettre l'éclatement des cellules bactériennes et la libération de l'ADN.
- La suspension est ensuite centrifugée à 13 000 rpm pendant 3 mn. Le surnageant obtenu, contenant de l'ADN, est transféré dans un nouveau tube Eppendorf.

### 2-4-2/ Test d'identification et de géotypage « genotype Helico DR »

Le Genotype® HelicoDR permet la détection rapide et fiable d'*H. pylori* isolée à partir des biopsies, basé sur un procédé génétique moléculaire. En même temps, les mutations les plus fréquentes qui entraînent une résistance à la clarithromycine et fluoroquinolone, sont en outre identifiées (Cattoir et *al.*, 2007).

L'Amplification et l'hybridation ont été effectuées selon les instructions du manuel d'utilisation fourni avec le test Genotype HelicoDR (Hain-lifescience, GmbH)

L'ADN génomique des souches d'*H. pylori* et l'ADN total extrait des échantillons de biopsies gastriques étaient soumis à un test aux bandes d'ADN. Les bandes ont été revêtues à l'usine de Hain Life science (Nehren, Allemagne) avec différentes oligonucleotides spécifiques (sondes d'ADN) en utilisant la technologie de bandes d'ADN. Les sondes ont été conçues pour s'hybrider avec les séquences des allèles de type sauvage (sondes WT) ou des allèles mutées (sondes MUT). L'amplification, l'hybridation et l'interprétation ont été effectuées dans une procédure semblable à ceux des autres tests GenoType (Megraud et Lehours, 2007).

En résumé, 35µl d'amorces 5'- Biotinylées et de mélange de nucléotides, 5µl du tampon polymérase, 2 µl de solution mère du MgCl<sub>2</sub> à 25mM, 3µl d'eau et 5 µl d'ADN total ont été mélangés avec 1U de Taq polymérase Hot Star (Qiagen) par mélange réactionnel (Hillemann et *al.*, 2005).

Le cycle PCR comprenait 30 cycles pour les échantillons de souche et de 35 cycles pour les échantillons de biopsie. Le cycle de dénaturation était de 1 cycle à 95 ° C pendant 15 min, suivi par 10 cycles à 95°C pendant 30s et à 58°C pendant 2 min. Ensuite, 20 cycles (souche) ou 25 cycles (échantillon de biopsie) ont été composés d'une première étape à 95 ° C pendant 25s, une seconde étape à 53°C pendant 40 s et une troisième étape à 70°C pendant 40s. La PCR s'est terminée par 8min à 70°C (Hillemann et *al.*, 2005 ; Hillemann et *al.*, 2007).

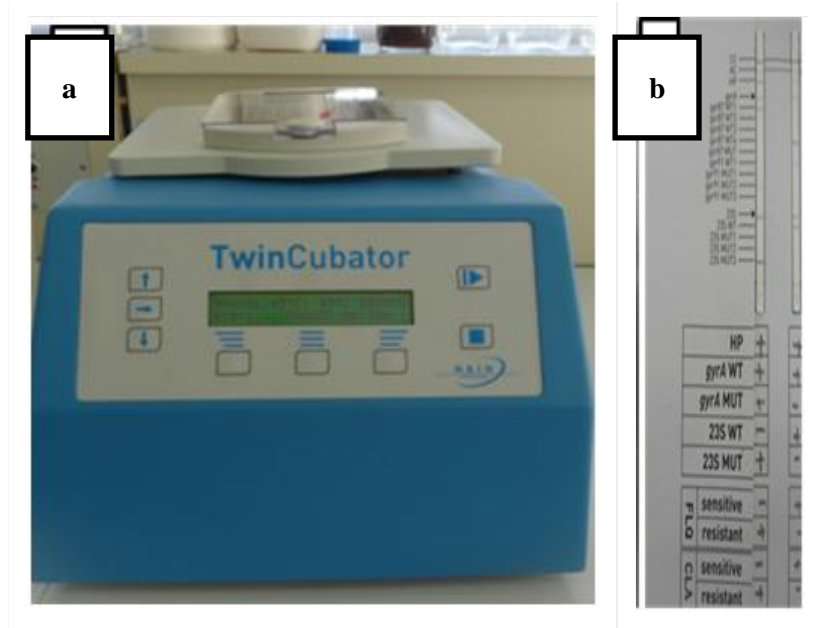
L'hybridation a été effectuée en utilisant le TwinCubator à une température de 45°C. La solution de dénaturation a été mélangée avec 20µl de l'échantillon amplifié et soumis au protocole habituel d'hybridation (Hillemann et *al.*, 2005 ; Hillemann et *al.*, 2007).

Afin d'évaluer les bandes positives et négatives, Les bandes d'ADN ont été collées sur une feuille d'évaluation après l'hybridation.

Les bandes de contrôle qui doivent paraître positives pour valider le test, sont celles qui correspondent aux bandes correspondant au témoin conjugué et au témoin d'amplification.

Les autres bandes correspondent à une bande d'identification pour *H. pylori* (le fragment PCR qui code pour l'ARNr 23S) et des contrôles d'amplification des gènes *rrl* et *gyrA*.

Contrairement à la culture qui permet d'étudier la sensibilité aux antibiotiques dans un délai de 1 à 2 semaines et dont la précision dépend des conditions optimales de transport et de traitement (Mégraud et Lehours, 2007) ; ce test permet en plus de la détection moléculaire d'*H. pylori* (région spécifique du gène 23S-ARNr) la détection et la caractérisation des mécanismes de résistance à la clarithromycine (Mutations dans le gène 23S-ARNr aux positions 2146 et 2147) et pour les fluoroquinolones (mutations les plus significatives de la région de résistance aux quinolones du gène *gyrA*, en particulier aux codons 87 et 91) en 6 h (Cambau et *al.*, 2009).



**Figure 5:** Le test « genotype Helico DR »

a : TwinCubator, b : bande après le test

### 2-4-3/ Détection du génotype *cagA*

La présence du génotype *cagA* a été déterminée par PCR en utilisant la paire des amorces suivantes :

*cagA*-F1: GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G

*cagA*-B1: CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A

Le master mix de 10µl est constitué de 1x PCR buffer, 1.5mM Magnésium Chloride, 200µM dNTP, 0,5pmol de chaque amorce, 0.5U hot start taq polymerase (Promega, USA) et 2µl de l'ADN matrice. L'amplification a été mise au point grâce à un Eppendorf Mastercycler gradient. Les cycles de la PCR sont les suivants: une dénaturation initiale à 94°C pour 10 minutes et 40 cycles de 94°C pour 30secondes, 58°C pour 30secondes et 72°C pour 1 minute (Moaddeb et *al.*, 2016).

Ceux ci ont été suivis par une étape d'extension finale de 72°C pour 5minutes. Le produit de PCR a été séparé sur un gel d'agarose à 2%. La taille du produit est 349pb (Farshad et *al.*, 2007).



## Analyse des données

La base de données a été analysée à l'aide du logiciel Epi Info (Centers for Disease Control and Prevention, USA). Les outils d'analyse statistique de ces bases de données incluent les formules intégrées au logiciel Excel de la suite bureautique Microsoft et le programme EpiInfo.

## 2-5/ La recherche des molécules bioactives anti- *Helicobacter pylori*

### 2-5-1/ Préparation des extraits

Les composés bioactifs à partir de matières végétales peuvent être extraits par diverses techniques d'extraction classiques. La plupart de ces techniques sont basées sur le pouvoir d'extraction de différents solvants utilisés et l'application de chaleur.

Afin d'obtenir les composés bioactifs de plantes, les techniques classiques existantes sont: (1) l'extraction Soxhlet, (2) Macération et (3) hydrodistillation

Dans ce travail, nous avons eu recours à deux techniques d'extraction classique : l'extraction Soxhlet et l'hydrodistillation.

### 2-5-1-1/ Préparation des extraits alcooliques

#### *-Principe*

L'extracteur Soxhlet a été proposé pour la première fois par le chimiste allemand Soxhlet (1879).

L'extraction Soxhlet a été largement utilisé pour l'extraction de composés bioactifs précieux à partir de diverses sources naturelles. Il est utilisé comme modèle pour la comparaison des nouvelles alternatives d'extraction.

En règle générale, une petite quantité d'échantillon sec est placée dans un filtre en forme de dé. Le filtre est alors placé dans un ballon de distillation, qui contient le solvant. Après avoir atteint un niveau de saturation, la solution est aspirée par un siphon. Le siphon décharge la solution de nouveau dans le ballon de distillation. Cette solution porte les solutés extraits dans le liquide en vrac. Le processus est répété jusqu'à ce que l'extraction soit terminée.

**-Mode opératoire**

Les extraits méthanoliques des échantillons de *Chamaemelum nobile*, *Glycyrrhiza glabra*, *Origanum majorana* et de *Pistacia lentiscus* ont été obtenus à partir de la poudre de la matière végétale par un appareil de Soxhlet (extraction de 4 heures).

les extraits sont concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 48°C (Peixoto et *al.*, 2011) jusqu'à l'obtention d'un résidu sec dont la quantité est exprimée en mg conservé à - 4°C.

**2-5-1-2/ Préparation des huiles essentielles****-Principe**

L'hydrodistillation est une méthode traditionnelle pour l'extraction des composés bioactifs et les huiles essentielles des plantes. Les solvants organiques ne sont pas impliqués dans ce procédé d'extraction (Vankar, 2004).

Dans l'hydrodistillation, tout d'abord, la matière végétale est placée dans un compartiment; d'autre part, l'eau est suffisamment ajoutée, puis portée à ébullition. L'eau chaude et la vapeur agissent comme les principaux facteurs influant pour libérer les composés bioactifs du tissu végétal. Le refroidissement indirect par l'eau condense le mélange vapeur d'eau - huile. Ce mélange condensé circule du condenseur vers un séparateur, où l'huile et les composés bioactifs se séparent automatiquement de l'eau (Silva et *al.*, 2005).

L'hydro-distillation implique trois principaux processus physico-chimiques; Hydro-diffusion, hydrolyse et la décomposition par la chaleur. À une température d'extraction élevée certains composants volatiles peuvent être perdus. Cet inconvénient limite son utilisation pour l'extraction des composés thermolabiles.

**-Mode opératoire**

Les huiles essentielles à partir des feuilles d'*Origanum majorana* et de *Pistacia lentiscus* ont été obtenues au laboratoire par hydrodistillation avec un appareil de type Clévenger jusqu'à extraction totale de l'huile essentielle (quatre heures en moyenne) à partir d'une masse de végétal de 500g. Les huiles essentielles sont conservées dans des piluliers à 4°C à l'abri de la lumière (Silva et *al.*, 2005).

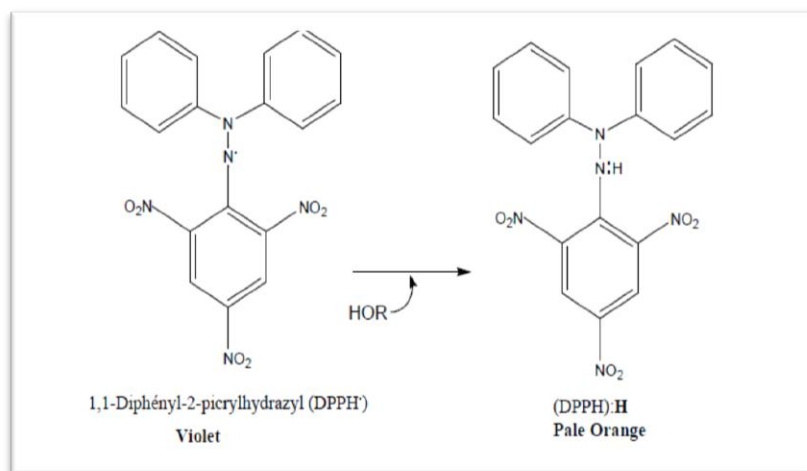
## 2-5-2/ Activité anti-oxydante des extraits

### 2-5-2-1/ Estimation du pouvoir anti-radicalaire par la méthode au DPPH

#### -Principe

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm.

En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).



**Figure 06:** réduction du radical DPPH. (Sanchez-Moreno, 2002).

#### -Mode opératoire

Le protocole utilisé est celui décrit par Parejo *et al.* (2002). Dans des tubes on introduit 2.5ml de chaque extrait (0.1mg/ml) et 1ml de la solution méthanolique au DPPH (0.3 mM), après agitation au vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$\text{I\% d'activité Anti-radicalaire} = [(A1 - A2) / A1] \times 100$$

**I%** : pourcentage de l'activité anti-radicalaire

**A1** : absorbance de l'échantillon

**A2**: absorbance du contrôle négatif

Le contrôle négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique au DPPH et de 2,5ml de méthanol. Plusieurs concentrations ont été testées (2,5 mg/ml – 20 mg/ml) jusqu'à l'obtention de la concentration idéale de chaque extrait. Les essais ont été effectués en triple.

### **2-5-2-2/ Test de blanchiment du $\beta$ -carotène**

#### ***-Principe***

Dans le test du  $\beta$ -carotène, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes et des hydroperoxydes conjugués (Kaur et Kapoor, 2002), ces radicaux vont par la suite oxyder le  $\beta$ -carotène hautement insaturé. Ceci entraîne la perte de ses doubles liaisons et par conséquent la disparition de sa couleur rouge.

Cependant la présence d'un antioxydant (extraits, témoins positif) permet de neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc la prévention de l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ -carotène (Yanishlieva et Marinova, 1995 ; Belhattab, 2007 ; Yang et *al.*, 2008).

#### ***-Mode opératoire***

La méthode décrite par Tepe et *al.*, (2005) a été employée avec une légère modification. Une émulsion  $\beta$ -carotène / acide linoléique, préparée par solubilisation de 2mg de  $\beta$ -carotène dans 1ml de chloroforme, a été additionnée de 25 $\mu$ l de l'acide linoléique et 200mg de tween 40. Après évaporation complète du chloroforme au rotavapeur, 100ml d'eau saturée en oxygène sont ajoutés. L'émulsion résultante est vigoureusement agitée.

Dans des tubes à essai, 2,5ml du mélange précédant sont additionnés de 350 $\mu$ l d'extrait puis incubés à l'obscurité à la température du laboratoire. Deux tubes contrôles ont été aussi préparés avec la même procédure: l'un contenant un antioxydant de référence BHT (témoin positif) et l'autre sans antioxydant (témoin négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 $\mu$ l de méthanol.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 470nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures. L'activité antioxydante des extraits (AA %) est calculée selon l'équation suivante :

$$AA \% = \text{Abs } 48\text{h} [(\text{échantillon}) / \text{Abs } 48\text{h} (\text{BHT})] \times 100$$

### 2-5-3/ Evaluation de l'activité anti- *H. pylori* des extraits par la méthode de diffusion par disque

#### -Principe

Cette méthode permet d'évaluer l'activité antibactérienne d'une huile essentielle. Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs (NCCLS, 1997).

La technique utilisée est une modification de la méthode de Hayes et Markovic (2002). Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé d'extrait, sur un tapis bactérien au tout début de sa croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. Les diamètres d'inhibition, qui traduisent l'activité antibactérienne des extraits et huiles essentielles sont ainsi déterminé (figure 7).

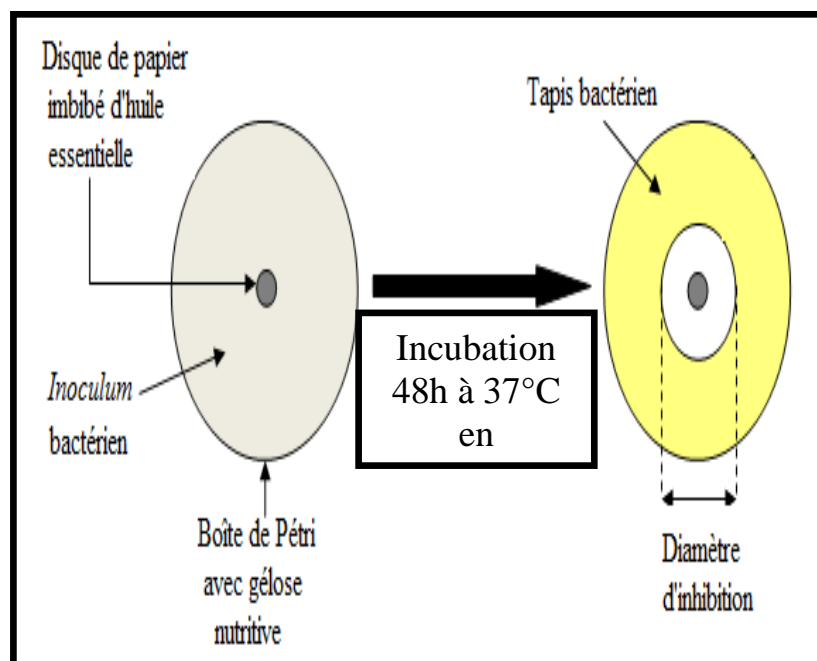


Figure 07: Principe de la méthode de diffusion par disque.

**-Mode opératoire**

En bref, des suspensions de 22 souches différentes d' *H. pylori* ont été préparés dans le bouillon cœur cervelle (BHIB) à une densité au standard 3 à 4 de McFarland (environ  $10^9$  UFC / ml) et étalées par écouvillons sur de la gélose de Mueller Hinton additionnée de 10% de sang de cheval.

Des disques de papier filtre (Whatman no ° 3, 6 mm de diamètre) ont été imbibés de 20 µl de différents extraits et placés sur les boîtes étalées de suspensions des différentes souches d' *H. pylori*.

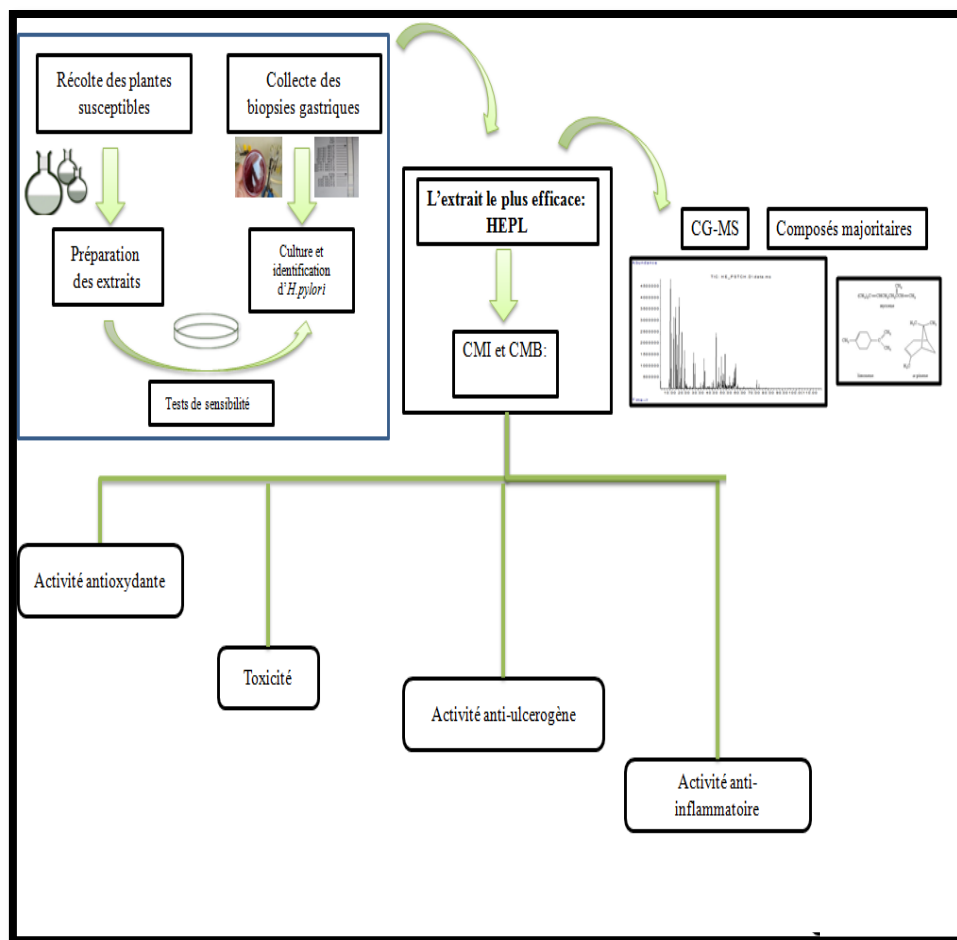
Des disques saturés de DMSO ont été utilisés comme témoin négatif (NCCLS, 1997). Les boîtes de pétri ont été incubées pendant 48H à 37 ° C dans des conditions microaérophiles tel que décrit précédemment. Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètres, disque inclus. Chaque test est réalisé trois fois au cours de trois expériences successives.

**2-5-4/ Caractérisation de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus***

De très nombreuses études se sont intéressées au pouvoir antibactérien des plantes médicinales et aromatiques, or le développement d'une thérapie complémentaire efficace nécessite impérativement une caractérisation intégrale des différents effets biologiques et pharmacologiques du matériel d'intérêt.

Ayant comme objectif le développement d'un bon traitement alternatif ou complémentaire contre l'agent causal des gastrites et ulcères gastriques, nous avons conçu un protocole d'exploration complet de l'extrait s'avérant le plus efficace contre *H. pylori* à l'issu du criblage.

Nous nous sommes intéressés à la caractérisation moléculaire de l'extrait en question et ainsi définir les molécules bioactives les plus susceptibles d'exercer l'effet anti- *H. pylori*. Puis à l'étude de certains paramètres pharmacologiques liés à l'infection à *H. pylori* notamment la caractérisation de l'activité contre les souches cliniques d'*H. pylori*, la toxicité, les activités anti-oxidante, anti-ulcérogène et anti-inflammatoire (figure 8).



**Figure 08** : Protocole expérimental pour la recherche des activités pharmacologiques des plantes étudiées.

#### 2-5-4-1/ Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*

La composition de nombreuses huiles essentielles a été décrite dans la littérature. Elle varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (Delaquis et *al.*, 2002 ; Gonny et *al.*, 2004 ; Burt, 2004).

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) (Salzer, 1977).

### 2-5-4-1-1/ La chromatographie en phase gazeuse (CG)

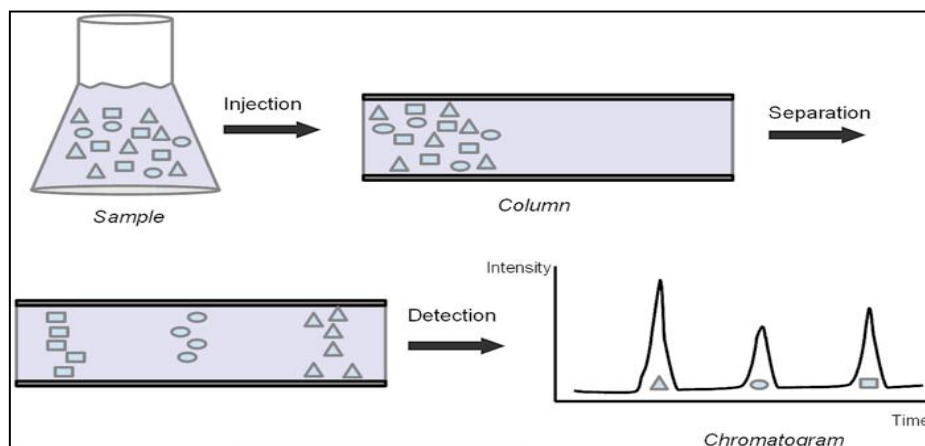
#### -Principe

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est le terme qui englobe des procédés chromatographiques dans lesquels la phase mobile est un gaz.

La séparation chromatographique en phase gazeuse découle de la distribution des composants d'un mélange entre la phase stationnaire et la phase mobile le long de la colonne chromatographique. Des interactions spécifiques avec la phase stationnaire résultent des propriétés chimiques particulières de chaque composant dans le mélange. Les composés ayant une affinité plus élevée pour la phase stationnaire restent plus longtemps dans la colonne que le reste. La phase mobile agit comme un gaz porteur et elle n'a pas d'interaction avec les constituants de l'échantillon (Sánchez-Guijo et *al.*, 2013).

Lorsque la séparation est réussie, les constituants du mélange sont élués à différents moments (temps de rétention) de la colonne et ils sont enfin représentés par des pics différents dans un chromatogramme.

Un mélange de substances chimiques est séparé par une méthode chromatographique (figure 10). Dans la plupart des cas, les échantillons analysés par CG sont des liquides. Une séparation par CG efficace ne peut se produire que lorsque l'analyte est à la fois volatil et stable à la température de fonctionnement, de manière à pouvoir interagir avec la phase stationnaire liquide et être porté par la phase mobile (Sánchez-Guijo et *al.*, 2013).



**Figure 09** : Principe de séparation de la chromatographie (Sánchez-Guijo et *al.*, 2013).



**-Mode opératoire**

L'étude chromatographique en phase gazeuse a été menée en utilisant un chromatographe de type Perkin Elmer instruments clarus 500. Ce dernier est équipé de :

- Un injecteur Split/splitless, utilisé en mode Split avec division de 1/60.
- Un détecteur à ionisation de flamme (FID).
- Colonnes capillaires carbowax 20M (longueur 30m, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur du film 0,25 micromètre).

Les conditions opératoires choisies sur le chromatographe pour l'analyse par CG de l'huile essentielle de *P. lentiscus* pistachier sont les suivantes :

- Température du four de 60°C jusqu'à 230°C à raison de 4°C/min.
- Température de l'injecteur 250°C.
- Température du détecteur 300°C.
- Débit du gaz vecteur (azote) 1,2 ml /min
- Quantité injectée : 1µl.

**2-5-4-1-2/ Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM)****-Principe**

CG-SM est une technique d'analyse «hybride», puisqu'elle combine une séparation chromatographique avec une méthode de détection spectrométrique (Sánchez-Guijo et *al.*, 2013). Une représentation du CG-SM est représentée sur la figure 10.

Une unité GC-MS est composée de deux blocs principaux: un chromatographe en phase gazeuse et un spectromètre de masse. Les molécules sortent (éluées) à différents temps (temps de rétention) du chromatographe en phase gazeuse, ce qui permet au spectromètre de masse en aval de capturer, ioniser, accélérer, dévier et de détecter les molécules ionisées séparément.

Le spectromètre de masse brise pour cela chaque molécule en fragments ionisés et détecte ces fragments en fonction de leur rapport masse sur charge. Ces deux composantes utilisées ensemble, permettent l'identification d'une substance à un degré beaucoup plus fin que chaque unité utilisée séparément.

Cette technique permet d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances présentes en très petites quantités, voire en traces.

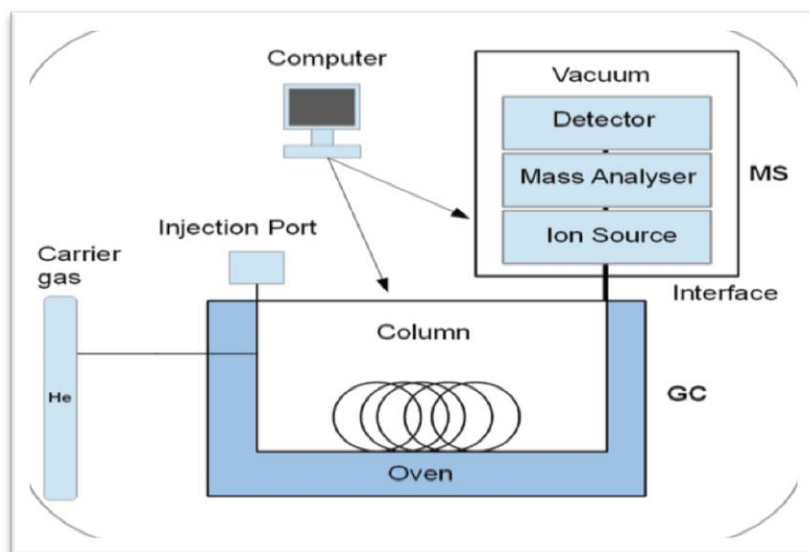


Figure 10 : Unité CG-SM (Sánchez-Guijo et al., 2013).

### *-Mode opératoire*

Cette analyse est réalisée au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) à Alger.

Le spectromètre de masse, *Hewlett-Packard 5972* à quadripôle, est couplé à un chromatographe en phase gazeuse *Hewlett-Packard 6890*. Les constituants des huiles essentielles sont séparés simultanément sur une colonne capillaire polaire (Supelcowax 10) et une colonne apolaire (DB-5) (longueur: 30 m ; diamètre interne: 0,25 mm; épaisseur du film: 0,25  $\mu\text{m}$ ).

Les conditions opératoires sont: 250°C pour la température de l'injecteur split et 250 °C. La programmation de température pour l'analyse des huiles essentielles est : 40°C (pendant 2 min) puis montée à 210°C à raison de 2°C/min et maintien constant à 210 °C pendant 30 min.

L'identification des différents constituants est réalisée à partir de leurs indices de rétention selon Kovats (Kovats, 1965) sur les deux types de colonne, en comparaison avec la littérature (Adams, 2001; Adams, 2003). Une confirmation est apportée à l'aide des spectres

de masse en comparaison avec ceux des composés standards de la banque de données informatisée (Adams, 2001; Adams, 2007).

### **2-5-4-2/ Caractérisation de l'activité anti- *Helicobacter pylori* de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus***

#### **2-5-4-2-1/ Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)**

##### ***-Principe***

La technique de dilution en milieu solide est recommandée par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007) pour évaluer la sensibilité des bactéries microaérophiles aux agents antibactériens

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentrations décroissantes en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne.

##### ***-Mode opératoire***

Le test de la CMI est réalisé sur 22 souches d' *H. pylori* que nous avons isolées à partir des biopsies gastriques. Les essais sont effectués selon la méthode de dilution standard sur milieu gélosé MHA, supplémenté avec 10% de sang de cheval. Une série de dilutions (1/10, 1 / 25/1/50, 1/100, 1/200, 1/500 et 1/100 v / v) dans DMSO était Préparée et ajoutée au milieu après refroidissement pour obtenir une des concentrations de 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1 / 2000, 1/5000 et 1/10000 (v / v).

Des spots de 2 $\mu$ L d'un inoculum standardisé à 10<sup>8</sup> UFC/mL-1 (soit 2.10<sup>5</sup> UFC par spot) sont déposés sur les boîtes de gélose. Le DMSO est utilisé comme contrôle négatif. Les boîtes sont incubées dans une jarre d'anaérobiose, pendant 48 h à 37°C, sous atmosphère micro-aérophile, générée par un sachet « GENbox anaer » (bioMérieux). (CLSI, 2007)

La CMI de l'huile essentielle est définie à partir de la première boîte de la gamme dépourvue de croissance bactérienne. Chaque expérience est répétée trois fois au cours de trois expériences successives.

### 2-5-4-2-2/ Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

#### **-Principe**

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'*inoculum* bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle.

#### **-Mode opératoire**

La même gamme de concentration, réalisée par la technique de macrodilution en milieu liquide, est utilisée pour déterminer la CMI et la CMB de l'huile essentielle à tester.

Des prélèvements sont effectués dans le tube témoin et dans chacun des tubes dépourvus de culot bactérien puis déposés « en strie » sur gélose MHA. Les boîtesensemencées sont incubées 48 heures à 37°C.

La CMB (% v/v) de l'huile essentielle est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactéries. Chaque expérience est réalisée trois fois au cours de trois expériences successives.

### 2-5-4-3/ Evaluation de la toxicité aigüe de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*

Avant d'entreprendre les autres tests biologiques *in vivo*, nous avons jugé la détermination de la dose létale 50 (DL50) par voie orale impérative.

#### **-Principe**

La toxicité aigüe d'une substance peut être définie comme les effets adverses survenant dans un court laps de temps après administration d'une dose unique.

Ce test permet de déterminer la dose létale 50 (DL50), c'est à dire la dose capable de tuer par la voie d'administration choisie la moitié des animaux mis en expérience, de définir la nature des effets toxiques observés en établissant une relation dose-effet, de donner des informations sur les risques des expositions accidentelles et de donner des indications sur la manière de conduire les études toxicologiques de plus longue durée (Lapointe, 2004).

Nous administrons généralement le produit à des rats ou à des souris, répartis en plusieurs groupes, à des doses croissantes suffisantes pour obtenir un pourcentage de mortalité s'échelonnant entre 0 % et 100 %. (Derache, 1986 ; Reichl, 2004).

Selon la méthode de Karber et Behrens (Adjoungoua et *al.*, 2008), la DL50 est obtenue par la formule :

$$DL\ 50 = DL\ 100 - (\Sigma\ a \times b) / n$$

DL100 = la plus petite dose tuant tous les animaux

a = la moyenne de la somme des morts à deux doses consécutives.

b = la différence entre deux doses successives.

n = nombre d'animaux utilisés par lot.

$\Sigma$  = somme.

#### ***-Mode opératoire***

07 lots homogènes de 10 souris ont été constitués et répartis dans des cages plastiques avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Celle-ci est composée d'un mélange standard de maïs, orge, soja, additionnés de complexe multivitaminé, et conditionnée sous forme de granulées.

Après avoir soumis les animaux à un jeun de 24h, chaque lot a reçu une dose unique de l'huile essentielle de *P. lentiscus* par voie orale à : 0 (contrôle), 0.5 ; 1.5 ; 10 ; 50 ; 100 et 500 mg/kg alors que le groupe contrôle a reçu seulement le véhicule (NaCl à 0,9% contenant 0,1% de Tween 20) (Turner, 1965).

Après administration de l'huile, les animaux ont été d'abord mis en observation pendant 2 heures pour détecter des changements dans le système nerveux autonome ou les réponses comportementales avant de leur donner à manger et à boire (pour noter les cas de morts immédiates) et tous les jours une seule fois à la même heure pour une durée de 7 jours.

Pendant cette période d'observation, on note le nombre de morts ainsi que les troubles symptomatologiques observés, afin de déceler les effets de l'huile essentielle de *P. lentiscus*.

Ce suivi des signes cliniques de la toxicité inclue l'observation de l'évolution de poids chez les souris des différents lots expérimentaux tout au long de la période de la toxicité aigue

(Adjoungoua et *al.*, 2008). Dans notre cas, nous avons adopté la méthode de Kabber et Berhens (Adjoungoua et *al.*, 2008) pour le calcul de la DL50.

#### **2-5-4-4/ Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus***

##### ***-Principe***

Pour déterminer les propriétés anti-inflammatoires de l'huile essentielle de *P. lentiscus*, un modèle d'inflammation expérimentale aigüe est réalisé.

L'inflammation aigüe est caractérisée par les quatre signes cardinaux : douleur, rougeur, chaleur et tumeur (œdème). Une drogue présente une activité anti-inflammatoire sur la phase aigüe si elle a un effet anti-œdémateux, analgésique, anti-érythémateux et antipyrétique.

Dans ce travail, seule l'activité anti-œdémateuse a été mise en avant par l'application topique du 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA) sur l'oreille des souris. Le TPA induit une réaction inflammatoire caractérisée par une production importante de médiateurs pro-inflammatoires, augmentation de la perméabilité vasculaire et un œdème (Delaporte et *al.*, 2004).

##### ***-Mode opératoire***

L'œdème a été induit sur l'oreille des souris comme décrit par Young et De Young (1989), par application topique du 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA).

Quatre groupes de dix souris ont été formés, l'œdème a été induit sur l'oreille droite par application topique de 2,5mg de TPA dans 20 ml d'acétone (10µl de chaque côté de l'oreille). Les souris ont reçu une application topique de l'huile essentielle de *P. lentiscus* immédiatement après l'application du TPA pour les doses de 3 et 10 mg/oreille.

L'oreille gauche a été utilisée comme témoin et a reçu le véhicule (acétone) et l'indométacine (0,5mg/oreille) a été utilisé comme témoin positif.

Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale 4 heures après l'application du traitement et des disques de 6 mm de diamètre ont été retirés de chaque oreille pour

déterminer le poids de l'œdème. Le gonflement a été mesuré comme la différence de poids entre les disques obtenus à partir des oreilles droite et gauche.

L'activité anti-inflammatoire a été exprimée en pourcentage d'inhibition de l'œdème induit par l'huile essentielle de *P. lentiscus* par rapport au groupe témoin (Fernandez et *al.*, 2001). Au moins trois expériences indépendantes ont été réalisées.

#### **2-5-4-5/ Evaluation de l'activité gastro-protectrice de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus***

##### ***-Principe***

Ce test consiste à induire de façon aigüe des ulcères chez des rats ou souris avec une solution ulcérogène qui produit des ulcères distincts ou mesurables (Skliar et Bucciarelli, 2007 ; Ayala et *al.*, 2014).

L'activité antiulcéreuse ou gastro-protectrice d'une substance peut être testée en l'administrant avant ou après l'agent ulcérogène et à évaluer son effet. L'évaluation de l'activité antiulcéreuse se fait par la détermination et l'appréciation d'une échelle de gravité des lésions ou de l'indice d'ulcère.

##### ***-Mode opératoire***

Afin de vérifier l'action protectrice de l'huile essentielle de *P. lentiscus* contre l'ulcère provoqué chez les animaux par administration de l'éthanol, nous avons formé 5 lots de 4 rats.

Après 48h de jeûne, le groupe 1 et 2 ont reçu par voie orale 1ml du véhicule (1% de Tween-80 dans une solution aqueuse) et d'oméprazole (30 mg / kg), respectivement. Les autres groupes ont reçu 50, 100 et 200 mg / kg de l'huile essentielle de *P. lentiscus*.

Une heure plus tard, l'ulcération est induite par l'instillation intra-gastrique de 1 ml d'éthanol à 90% (Germano et *al.*, 1996). Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale 1 heure après l'induction des lésions gastriques.

Leurs estomacs ont été enlevés, en les ouvrant le long de la grande courbure, le contenu enlevé et la muqueuse de l'estomac est délicatement lavée avec une solution saline (0,9%).

Les estomacs ont été représentés de sorte que les lésions peuvent être prises en compte à l'aide du logiciel ImageJ. La somme de la superficie de toutes les lésions pour chaque rat a été calculée et utilisée comme indice d'ulcère. Au moins trois expériences indépendantes ont été réalisées.

Pour les échantillons d'ulcères gastriques aigus, la partie glandulaire de l'estomac (fixée dans du formol à 2%) a été intégrée dans une cire de paraffine, sectionnée en sections sagittales de 5  $\mu\text{m}$  et colorée avec l'hématoxyline-éosine (H & E). Les zones représentatives ont été sélectionnées pour l'analyse qualitative par microscopie optique.

### ***Etude statistique***

Les analyses de la variance ont été réalisées par le logiciel statistique XL Stat Pro 7.5. La détermination des taux de signification est effectuée par ANOVA suivie du test de Tukey. Les différences ont été considérées statistiquement significatives à  $P < 0,05$ .

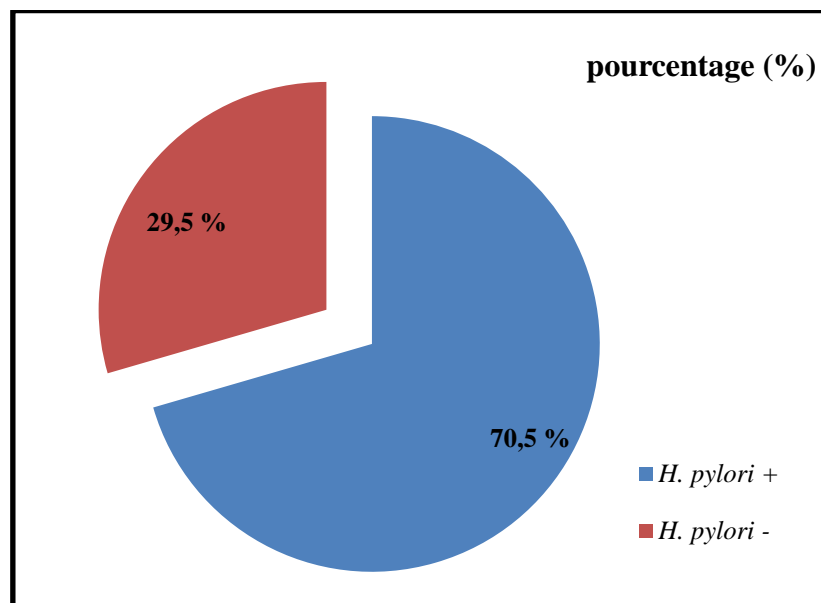


## II/ RESULTATS ET DISCUSSION

### 1/ Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori*

Dans notre étude, 190 patients ont subi une endoscopie pour la recherche d'*H. pylori*. 96 patients étaient de sexe féminin et 94 de sexe masculin. L'âge moyen était de 37 ans sans différence significative ( $P > 0,05$ ) entre les hommes et les femmes.

*H. pylori* a été détectée dans 134 isolats parmi les 190 échantillons, ce qui représente une prévalence de 70.5% de son infection dans la population étudiée (figure 11).



**Figure 11** : Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori*.

L'infection à *H. pylori* est ubiquitaire, c'est une des infections les plus répandues dans le monde avec une prévalence de 50% dans la population mondiale. Cette prévalence varie à travers les pays et parmi des groupes de population dans un même pays, en corrélation avec les conditions socio-économiques (Rudi et al., 1999; Andreson et al., 2002; Cover et Blanke, 2005; Ndip et al., 2008).

Notre étude a permis d'estimer une forte prévalence de l'infection par *H. pylori* (70,5%) dans la population. Bien que nos résultats soient ceux d'une étude limitée aux populations fréquentant les centres de soins spécialisés en endoscopie, ils corroborent avec d'autres travaux réalisés en Algérie. Notamment, l'étude basée sur l'analyse histologique (service de pathologie du CHU Mustapha sur une période de cinq années de Janvier 1996 à

décembre 2000) sur une série de 3411 patients porteurs d'une pathologie gastrique, a révélé une prévalence de l'infection de 75% (Amir, 2006). L'étude séro-épidémiologique rapporté par Mégraud en 2004, a montré une prévalence entre 80 et 90% en Algérie et en Côte d'Ivoire. Selon Faik (2000), la prévalence était de 71% en Algérie en 2000.

En comparaison avec les pays développés tels que la France où la fréquence de l'infection à *H. pylori* est de 46%, l'Angleterre de 45% et la Belgique de 30% (Vincent, 1998), nos chiffres, sont nettement plus élevés et similaires à ceux rapportés dans les pays d'Afrique. Cette fréquence apparaît ainsi corrélée au niveau de développement des pays.

La prévalence de l'infection à *H. pylori* dans notre étude est semblable à celles déjà constatées dans de nombreux pays en développement : 90% en Égypte (Yaron Niv, 2008) , 94% en Libye (Bures et *al.*, 2011) , 80% en Arabie saoudite (Suerbaum et Michetti, 2002), 88% en Inde (Bardhan, 2000), 69% en Côte d'Ivoire (Dangou et *al.*, 1997), 82.8 % à Dakar (Holcombe, 2001), 85% au Nigeria et 88% au Zaïre (Glupczinski, 1991), 82% en Jordanie (Bani-Hani et Hammouri, 2001), 82% à Madagascar (Ramanampamonjy et *al.*, 2007), 68,3% au Cameroun (Andoulo et *al.*, 2013) et de 30,9% chez les enfants au Nigeria (Etukudo et *al.*, 2012).

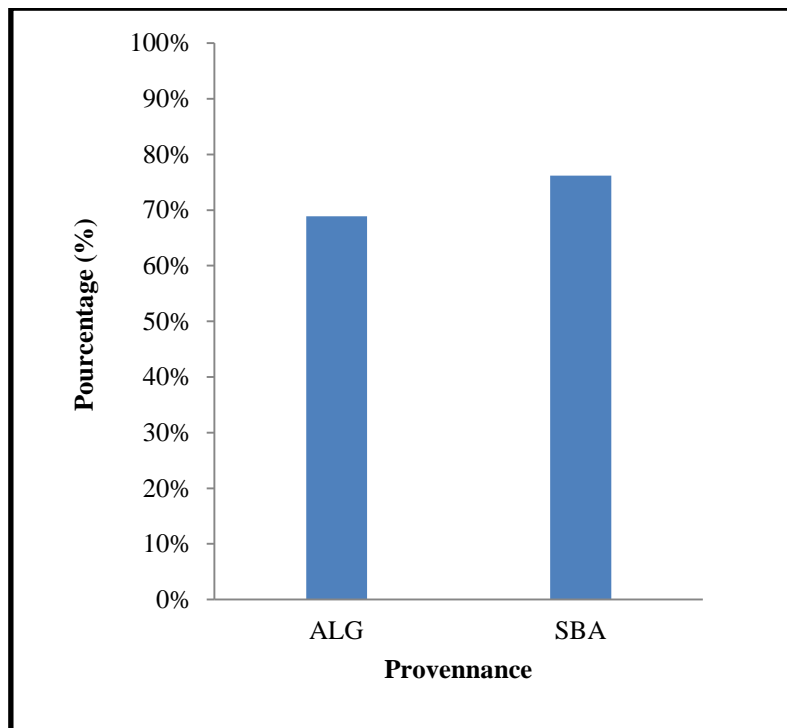
Attaf et *al.*, (2004), Joutei et *al.*, (2010) et Benajah et *al.*, (2013) rapportent respectivement dans leurs études des taux de 64,6%, de 69%, de 75 % et de 75,5% au Maroc. Les prévalences sont beaucoup plus faibles dans les pays industrialisés, elles sont entre 10% et 30% (Krejs, 2010).

L'un des facteurs de risque les plus importants de l'infection à *H. pylori* est le faible niveau socio-économique (Graham et *al.*, 1991 ; Fiedorek et *al.*, 1991). Les exceptions notables de cette tendance sont le Japon et le Portugal, où la prévalence d' *H. pylori* est supérieure à 80% (Fukuda-Parr, 2004).

### **1.1/ Prévalence selon la provenance**

Selon la provenance des patients, 148 patients sont issus des centres endoscopiques d'Alger avec une moyenne d'âge de 34 ans et 42 patients sont issus de Sidi Bel Abbes avec une moyenne d'âge de 49 ans. La prévalence était de 68.91% pour les échantillons issus d'Alger et 76.19 % pour ceux de Sidi Bel Abbes (figure 12).

Cependant, l'étude statistique ne révèle pas d'associations significatives ( $p > 0.05$ ) entre l'infection par *H. pylori* et la provenance des patients.



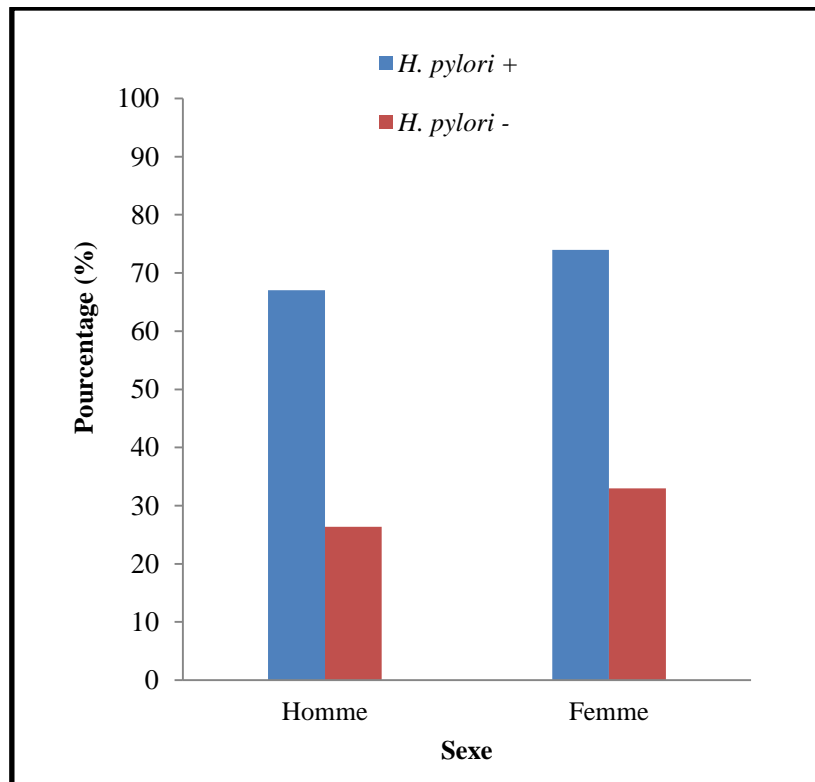
**Figure 12 :** Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* selon la provenance.

(ALG: Alger ; SBA : Sidi Bel Abbes).

Une large étude a été réalisée à Bruxelles par Miendje et *al.*, (2011) durant 20 ans, la proportion de patients infectés par *H. pylori* au sein de la population Bruxelloise était de 37,7%. Une diminution significative (33%) de la proportion de patients infectés au cours du temps, probablement reliée à l'amélioration des conditions de vie. Comparés aux caucasiens européens, les patients d'origine africaine étaient plus fréquemment infectés par *H. pylori*. Cette étude a souligné l'importante variabilité de l'épidémiologie de l'infection à *H. pylori*, même parmi les personnes vivant dans un même pays, la Belgique, voire une même agglomération, Bruxelles.

### 1.2/ Prévalence selon le sexe

Le groupe féminin avait une proportion de cas positifs plus élevée par rapport au groupe masculin (73.95% vs 67.02%) (figure 13). Cependant, il n'y avait pas d'association significative ( $P > 0.05$ ) entre le sexe et la présence d'infection d'*H. pylori*.



**Figure 13:** Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* selon le sexe.

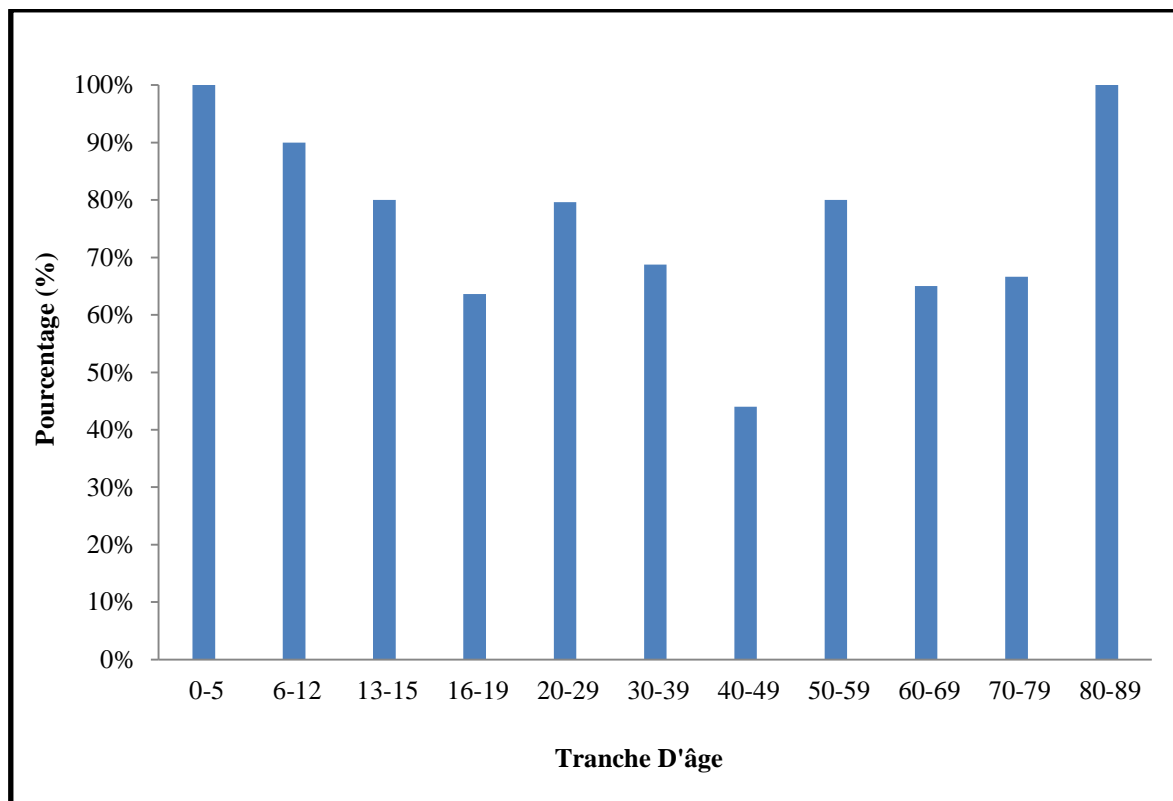
L'effet du sexe sur l'infection à *H. pylori* est controversé. Néanmoins, la majorité des études inclut un faible nombre de sujets, rendant les résultats difficilement interprétables. Une tendance plus élevée du nombre de sujets infectés chez les hommes (surtout ceux âgés de 20 à 40 ans) a été suggérée suite à une méta-analyse (De Martel et Parsonnet, 2006).

Elmanama *et al.*, (2008) ont démontré que les deux sexes sont indifféremment touchés par l'infection à *H. pylori*, confirmant les résultats de notre série. Cependant, d'autres études ont noté une prédominance masculine (Fukushima *et al.*, 2000 ; Ramanampamonjy *et al.*, 2007).

### 1.3/ Prévalence selon l'âge

Selon la tranche d'âge des patients, la prévalence de l'infection à *H. pylori* a varié dans notre population (figure 14), elle est très élevée (80 à 100%) pour les 3 premières tranches d'âge des sujets mineurs puis diminue (63.63%) pour le groupe d'âge allant de 16 à 19 ans. Pour les tranches d'âge adulte la prévalence est de 79.62%, 68.75%, 44% et 66.66% pour les groupes de 20 à 29, 30 à 39, 40 à 49, 60 à 69 et 70 à 79 ans respectivement. Cette

prévalence reprend des taux élevés de 80 et 100% pour les tranches d'âge allant de 50 à 59 ans et de 80 à 89 ans respectivement.



**Figure 14:** Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* selon la tranche d'âge.

Concernant l'effet de l'âge, l'infection par *H. pylori* est acquise tôt dans la vie (presque toujours avant l'âge de 10 ans) mais les symptômes se produisent principalement chez les adultes. Chez les enfants, l'infection est généralement transitoire et peut résulter des récurrences spontanées (Duque et *al.*, 2012), ce qui est exprimée par nos prévalences de 100, 90 et 80% pour les tranches d'âge allant de 0 à 5, de 6 à 12 et de 13 à 15 ans.

Le microorganisme peut être transmis oralement (Goh et *al.*, 1997 ; Al Sayed et *al.*, 2014). Selon Mitchell et ses collaborateurs (1992a), il existe deux grandes périodes d'acquisition du microorganisme dans les pays en développement. Le premier se produit dans l'enfance lorsque le risque d'infection est très élevé, et le second pendant l'âge adulte.

Plus de 120 études ont été publiées dans la littérature médicale sur la récurrence d' *H. pylori* après l'éradication réussie et les taux de récurrence sont assez différents entre les études (Xia et *al.*, 1997 ; Gisbert, 2005 ; Cheon et *al.*, 2006 ; Gisbert et *al.*, 2006). La récurrence d' *H. pylori* est rare dans les pays développés comme l'Europe et les Etats-Unis et plus fréquente

dans les pays en développement tels que le Pérou, le Brésil, le Chili, le Vietnam et le Bangladesh, qui sont tous des pays ayant une forte prévalence de l'infection à *H. pylori* (Rollan et al., 2000 ; Hildebrand et al., 2001 ; Seo et al., 2002 ; Okimoto et al., 2003 ; Soto et al., 2003 ; Wheeldon et al., 2005 ; McMahon et al., 2006).

Aux Etats-Unis, en Europe occidentale et en Australie, le taux de réinfection a varié de 0 à 2,3% / an (Rowland et al., 1999 ; Knippig et al., 2002).

Dans les pays en développement, les taux de réinfection ont varié considérablement, allant de 1,1% à 2 ans en Chine, à 73% à 8 mois dans les études du Pérou (Mitchell et al., 1998 ; Leal-Herrera et al., 2003).

Des taux intermédiaires de réinfection se trouvent dans la région méditerranéenne et au Japon, allant de 1,5% à 16,7% (Gisbert et al., 2002 ; Seo et al., 2002 ; Okimoto et al., 2003).

Il est parfois difficile de distinguer entre réinfection, définie comme l'éradication complète d'une infection à *H. pylori* suivie par l'introduction d'une nouvelle infection à *H. pylori* et la récurrence, définie comme la clairance apparente d'une infection à *H. pylori* en raison de la suppression, mais pas de son éradication, suivi d'un test positif pour *H. pylori* (Laine et al., 1998). Une détection de différentes souches d' *H. pylori* est nécessaire pour différencier entre réinfection et récurrence (van der Hulst et al., 1997 ; Simsek et al., 2000 ; Jeen et al., 2001 ; Niv et Hazazi, 2008).

De plus, des études de séro-prévalence effectuées en France (Broutet, 1996) rapportent une prévalence de l'ordre de 5 à 10% chez les jeunes adultes et de 25% chez l'adulte en général ; elles déduisent que l'infection à *H. pylori* est en diminution dans le monde occidental.

Ceci semble être la conséquence de l'amélioration des conditions socio-économiques ; comme, le niveau économique qui détermine la taille du logement et son niveau sanitaire, ainsi que souvent la taille de la famille et le niveau d'éducation qui peuvent retentir sur les pratiques d'hygiène (Gisbert et al., 2006).

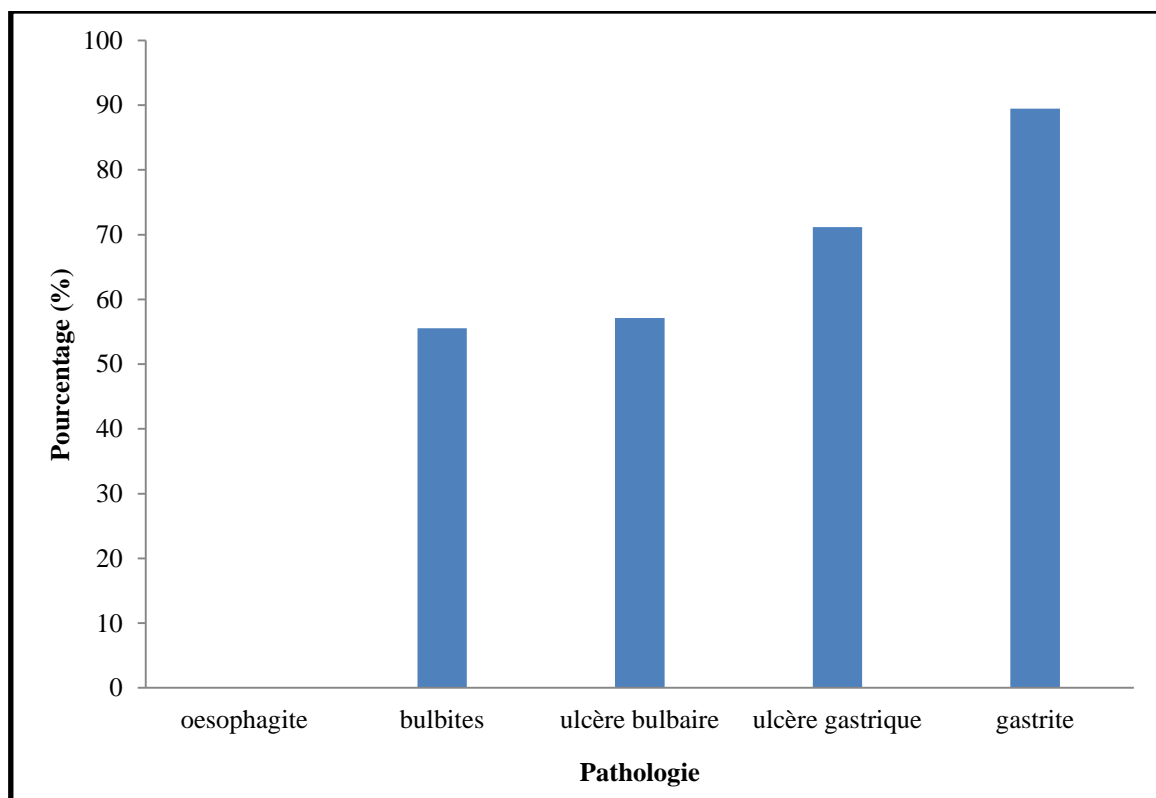
En effet, dans les pays en développement, une grande partie de la population est infectée et vit dans des conditions socio-économiques et d'assainissement de base qui

favorisent la relation personne-à-personne et la transmission du micro-organisme, même à l'âge adulte (Drumm et *al.*, 1990; Berroterán et *al.*, 2002; Leal et *al.*, 2008).

L'effet de l'amélioration des conditions de vie des populations est ressenti quand il s'agit d'un développement global des pays. C'est en effet le cas de la Chine où l'infection est passée de 62,5% en 1993 à 49,3% en 2003 (Chen et *al.*, 2008), de la Corée où elle est passée de 64,7% en 1998 à 40% en 2005 (Do et *al.*, 2009) et de la Russie où elle est passée de 44% en 1995 à 13% en 2005 chez les enfants âgés de moins de 19 ans (Tkachenko et *al.*, 2007).

#### 1.4/ Prévalence selon la pathologie associée à l'infection

Selon la pathologie associée à l'infection par *H. pylori*, la prévalence est de 0% dans les œsophagites, 55.55% pour les bulbites, 57.14% pour les ulcères bulbaires. Les prévalences pour les gastrites et les ulcères gastriques sont de 89.47% et 71.15% respectivement (figure 15).



**Figure 15:** Prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* selon la pathologie.

Dans le monde entier, la cause la plus fréquente de gastrites chroniques est l'infection par *H. pylori*. Elle est maintenant considérée comme jouant un rôle causal dans un certain

nombre de maladies, y compris l'ulcère gastrique, l'ulcère duodéal et le cancer gastrique (Malfertheiner et *al.*, 2009 ; Malfertheiner et *al.*, 2012 ; Fock et *al.*, 2013).

En effet, la gastrite induite par *H. pylori* est considérée comme le facteur de risque le plus important pour l'ulcère gastro-duodéal et ses complications, ainsi que pour le cancer gastrique (Malfertheiner et *al.*, 2012).

Une autre étude épidémiologique réalisée au Maroc, sur un échantillon de 755 patients collectés durant la période allant de 1998 à 2007 et présentant des symptômes digestifs, a mentionné une prévalence de l'infection de 69%. 92 % de la population infectée par *H. pylori* était atteinte de gastrites chroniques, 5 % d'ulcère gastrique alors que le cancer n'a été observé que chez 3% de cette population (Joutei et *al.*, 2010). *H. pylori* est effectivement corrélée le plus souvent à une gastrite chronique avec une prévalence de 95,56 % (Attaf et *al.*, 2004).

Il est à noter qu'une population atteinte de gastrites et d'ulcères constituerait un terrain à risque pour la survenue d'un cancer. Il est aujourd'hui clairement établi qu' *H. pylori* est responsable du cancer gastrique et qu'aucun cancer de ce type ne se développe en l'absence de cette bactérie (Delchier, 2003).

Les études menées par Haruma (2000) ont montré une prévalence plus élevée d'infections à *H. pylori* dans les populations affectées de cancers gastriques que dans les populations témoins. Ces résultats établissent un lien de causalité qui a conduit un groupe d'experts réuni par le Centre International de Recherche sur le Cancer (1993) à classer *H. pylori* comme carcinogène certain. Néanmoins, le nombre de patients susceptibles de développer un cancer est minime comparativement à l'importance de la population infectée par *H. pylori* (Haruma, 2000).

Cependant, une étude menée en Europe orientale (Lettonie), a d'ailleurs montré que la proportion de malades infectés par *H. pylori* était la même que celle des sujets asymptomatiques du même âge (Daugule et *al.*, 2007).

De nombreux paramètres épidémiologiques peuvent influencer la prévalence de l'infection à *H. pylori*. Nous avons alors étudié la prévalence de l'infection à *H. pylori*, l'effet de la provenance, du sexe, de l'âge et de la pathologie. En effet, la principale limite de notre étude est le faible nombre de sujets inclus ce qui est principalement dû à la nature de l'examen invasif, la dépendance aux gastro-entérologues, le problème de transport des biopsies, la



culture assez difficile et le problème de contaminations. Notre recrutement, multicentrique, ne reflète en aucune façon la prévalence ou l'incidence réelle de l'infection, car les sujets asymptomatiques ont toutefois une muqueuse gastrique pathologique.

Benajah *et al.*, (2013) ont réalisé une étude épidémiologique au Maroc, une population partageant le même style de vie qu'en Algérie. La prévalence était estimée à 75,5%, sans différence significative entre les hommes et les femmes. Cette prévalence de l'infection a augmenté de façon significative avec l'âge. Une association inverse a été observée entre la prévalence de l'infection et le niveau d'éducation. Aucune association n'a été observée entre statut socio-économique, l'environnement rural / urbain, la consommation du tabac et d'alcool, le nombre de sujets par chambre, la consommation de l'eau des puits privés, la consommation du sel dans les aliments et la prévalence de l'infection.

Des divergences dans les résultats de la prévalence peuvent être expliquées par la différence de sensibilité et de spécificité de chaque méthode de la recherche d'*H. pylori* (sensibilité de 80% à 98% et une spécificité de 100% pour la culture; Sensibilité de 75% - 100% et une spécificité de 84 à 100% pour la PCR) (Abdo *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2014).

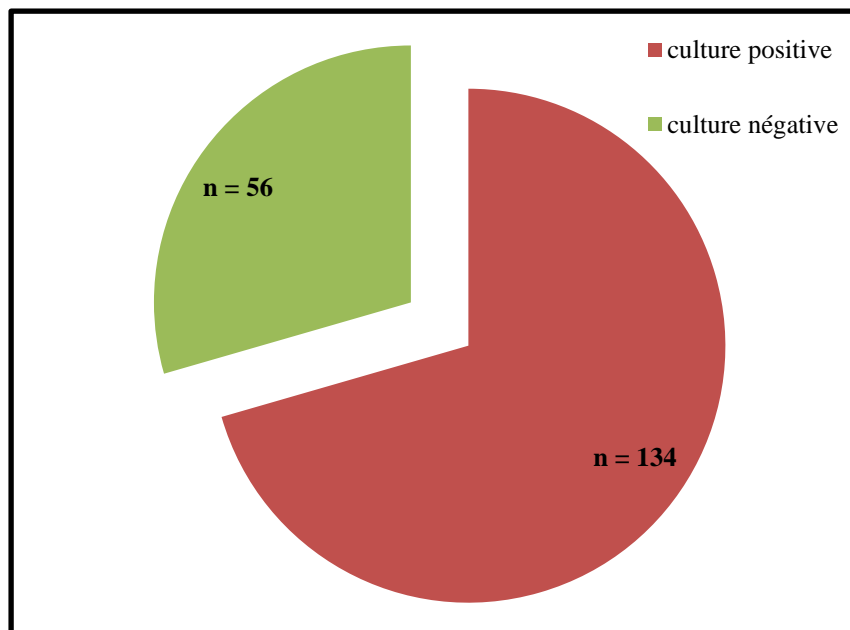
Ainsi, la PCR et la culture sont des méthodes complémentaires dans la détection d'*H. pylori*. Actuellement, une combinaison de deux tests pour diagnostiquer l'infection à *H. pylori* est recommandée, en raison de leur distribution inégale dans l'estomac (Malfertheiner *et al.*, 2012).

## **2 / Isolement d'*Helicobacter pylori***

La recherche d'*H. pylori* a été effectuée par la culture sur les biopsies gastriques des patients inclus dans l'étude. L'isolement a été réalisé sur un milieu Columbia additionné de 10% de sang de cheval et de supplément sélectif *Helicobacter* (SR147E, Oxoid, Angleterre), sous atmosphère microaérophile (5% d'O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> et 85% de N<sub>2</sub>) dans une jarre d'anaérobiose à l'aide des systèmes de BD GasPak EZ à 37° C pendant 2 à 14 jours.

La croissance bactérienne a été surveillée toutes les 48 heures pour contrôler la croissance de colonies typiques. Dépassant ce délai, la culture est considérée négative. La morphologie typique des colonies a été confirmée par la morphologie microscopique assez typique d'*H. pylori* (bacilles Gram-négatives incurvées), catalase et oxydase positives et l'hydrolyse rapide de l'urée qui est le test clé pour l'identification d'*H. pylori*. Parmi les 190

biopsies gastriques collectées, Nous nous sommes parvenus à isoler et identifier 134 souches d'*H. pylori* (figure 16).



**Figure 16:** Proportions des résultats de la culture d'*Helicobacter pylori*.

La détection d'*H. pylori* par la culture s'avère lente et fastidieuse, nécessitant un test invasif dépendant de la pratique d'une endoscopie digestive et du médecin gastro-entérologue pratiquant ce prélèvement.

Une fois la biopsie prélevée, c'est le souci de transport qui reste difficile à harmoniser. *H. pylori* est une bactérie très fragile, sensible à la dessiccation, à la température ambiante et au contact avec l'oxygène de l'air. Par conséquent, le transport rapide des échantillons constitue un point essentiel dans l'efficacité de l'isolation de la bactérie.

Lorsque la clinique d'endoscopie est à proximité du laboratoire de bactériologie en charge de la culture, les échantillons peuvent être acheminés sans perte d'efficacité de diagnostic microbiologique grâce à un transport rapide (Meunier et *al.*, 1997).

Dans le meilleur des cas, un prélèvement conforme, acheminement très rapide des échantillons réfrigérés au laboratoire, broyage, ensemencement et incubation à 37°C en atmosphère micro-aérophile humide ; le microbiologiste reste confronté au souci de contamination des milieux de culture par des bactéries à croissance plus aisée. Dans tous les

cas, si les échantillons ne sont pas traités immédiatement, ils sont conservés dans un surgélateur à  $-70^{\circ}\text{C}$ , prévu à cet effet (Heep et *al.*, 1999).

La mise en culture des biopsies passe par une phase de broyage des échantillons. En effet, peu de temps après la découverte d'*H. pylori*, Goodwin et *al.*, (1989) ont procédé à une étude comparative de l'efficacité de la culture réalisée avec ou sans broyage. Il en est ressorti une nette augmentation du nombre de colonies après broyage (Goodwin et *al.*, 1989).

Le choix du milieu de culture utilisé en routine est crucial. Idéalement, il faudrait utiliser l'association d'un milieu sélectif et d'un milieu contenant des antibiotiques (Piccolomini et *al.*, 1997). Vu l'exigence d'*H. pylori*, il est indispensable d'utiliser les milieux les plus frais possible. C'est pour cette raison que depuis les années 80, peu de temps après le premier isolement de la bactérie (Marshall et *al.*, 1984), des milieux sélectifs étaient préparés aux laboratoires pour la mise en culture de la bactérie (Glupczynski et *al.*, 1987).

Outre sa bonne spécificité, la méthode de diagnostic par culture offre la possibilité d'étudier la sensibilité des souches aux antibiotiques disponibles, permettant au clinicien d'adapter le traitement du patient aux résultats de l'antibiogramme.

Malheureusement, en pratique courante, peu de cliniciens recourent à la demande de mise en culture des biopsies gastriques. Or dans les pays industrialisés, une endoscopie est effectuée quasiment dans tous les cas de suspicion d'une pathologie causée par *H. pylori*. Ils se contentent systématiquement d'un diagnostic histologique complété, dans certains cas, par le test rapide à l'uréase.

Dans les pays aux ressources limitées, c'est très compréhensible qu'un traitement soit amorcé à base du seul test rapide à l'uréase (Malfertheiner et *al.*, 2007), malgré le manque de sensibilité décrit (Mégraud et Lehours, 2007). En effet un test peu sensible, mais peu coûteux, est fort utile dans les zones à haute prévalence comme l'Afrique du nord.

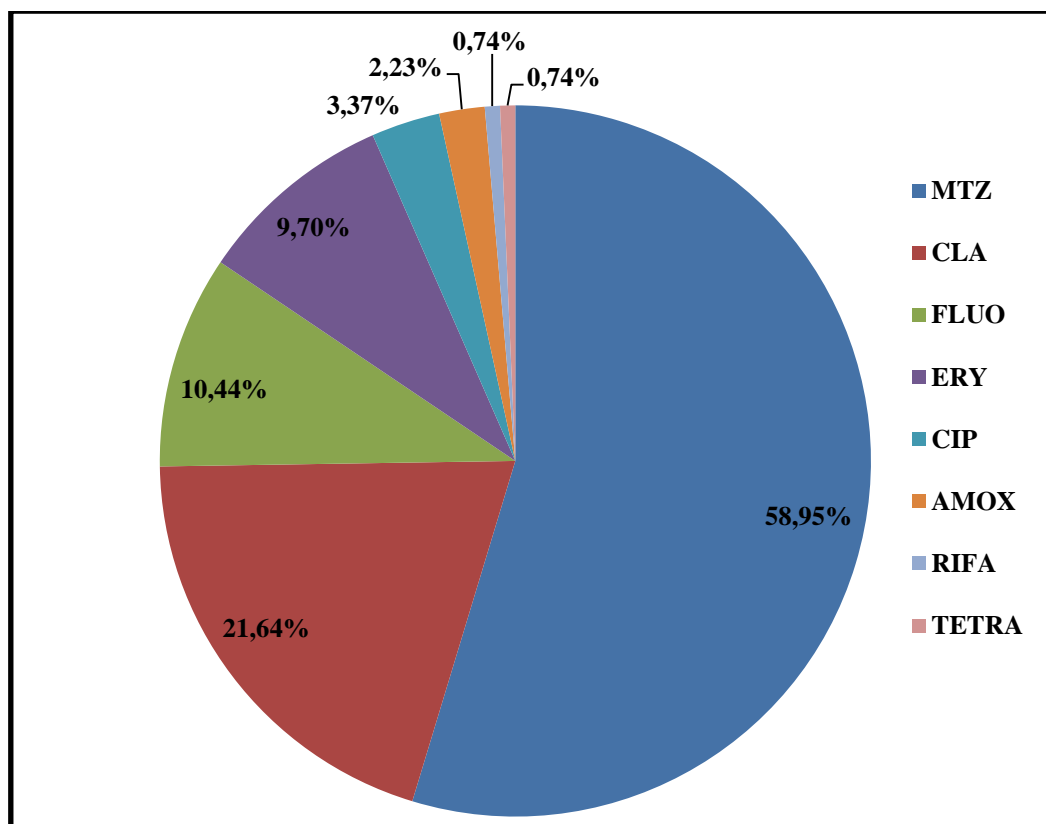
Tous ces facteurs ont influencé l'étendue de notre étude qui dépendait de la collaboration directe des cliniciens pratiquant l'endoscopie et à qui la décision d'effectuer un prélèvement revenait à leur unique volonté. Malgré ces nombreuses contraintes, un effectif de 134 isolats cliniques d'*H. pylori* durant la période d'étude s'avère important.

### 3/ Analyse de la résistance aux antibiotiques

Dans le but d'avoir des données concrètes susceptibles à aider les cliniciens à faire un choix rationnel parmi les agents thérapeutiques disponibles, nous avons procédé à une analyse de la résistance des isolats cliniques d' *H. pylori* aux antibiotiques.

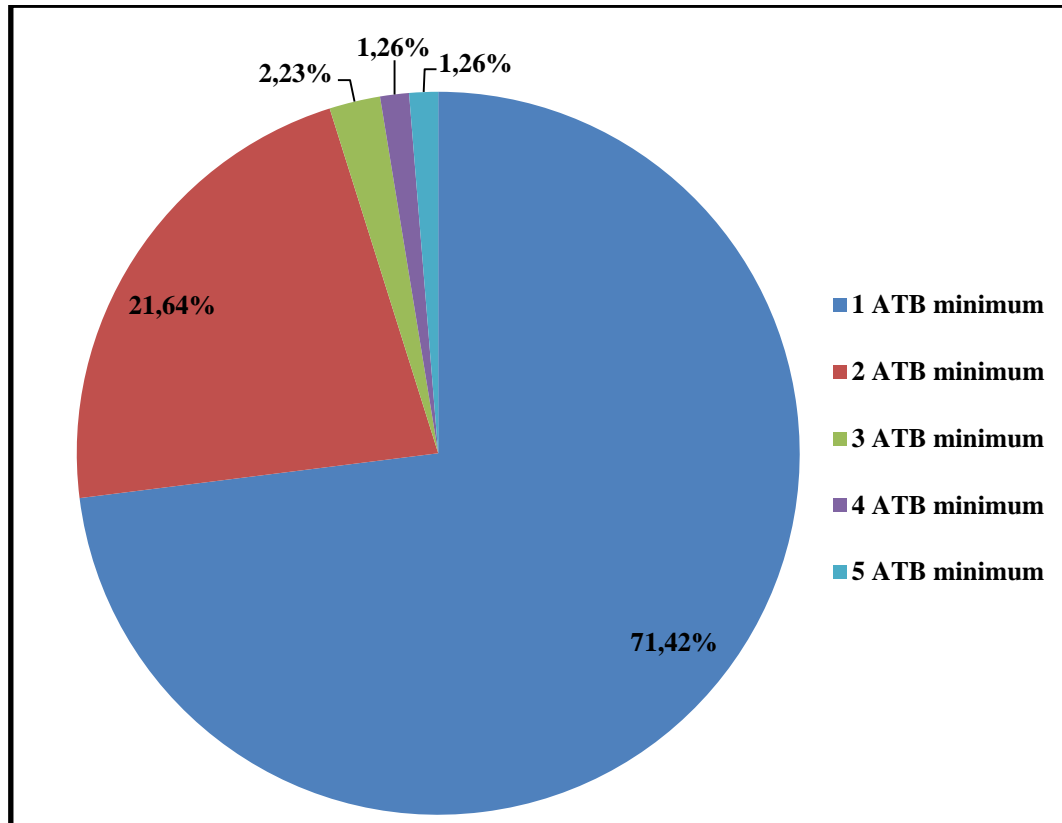
Parmi les différentes molécules anti-infectieuses proposées actuellement dans la littérature, les macrolides (clarithromycine), les 5- nitroimidazoles (métronidazole), l'amoxicilline, la tétracycline et les fluoroquinolones (lévofloxacin ou moxifloxacin) sont utilisés. Afin d'effectuer le meilleur choix des antibiotiques, l'idéal serait d'utiliser la culture, comme méthode diagnostique. Suite à l'isolement et l'identification d'*H. pylori* à partir des biopsies gastriques, des tests de susceptibilité aux différents antibiotiques ont été réalisés.

Les résultats révèlent une forte prévalence de résistance au métronidazole (58.95%) suivie par la clarithromycine (21.64%), les fluoroquinolones (10.44%), l'érythromycine (9.70%), la ciproflaxacine (03.37%), l'amoxicilline (2.23%), la rifampicine et la tétracycline (0.74 %) et la levoflaxacine (0%) (figure17).



**Figure 17:** Prévalence de la résistance d' *H. pylori* pour chaque antibiotique.

En outre, 71.42% des isolats étaient résistants à l'un des antibiotiques testés au minimum, 21.64 % des isolats étaient résistants à au moins deux antibiotiques, 2.23 % à trois antibiotiques et 1.26% sont résistantes à 4 et 5 antibiotiques (une souche résistante au métronidazole, clarithromycine, tétracycline, Ciprofloxacine et à l'érythromycine) (figure 18).



**Figure 18:** Prévalence de la résistance d' *H. pylori* aux antibiotiques.

La prise en charge du malade inclut le choix des agents à utiliser pour un éventuel traitement d'éradication. Dans tous les cas, le traitement d'une infection à *H. pylori* doit associer un antisécrétoire (anti-H2 ou IPP) à au moins 2 antibiotiques (Chey et Wong, 2007 ; Malfertheiner et *al.*, 2007). Reste alors au clinicien le choix des antibiotiques, qui devrait être déterminé en fonction de l'épidémiologie locale de la résistance d' *H. pylori* aux antibiotiques.

Il est bien connu que l'utilisation généralisée des antibiotiques a conduit à une augmentation de la prévalence de la résistance d' *H. pylori* aux antibiotiques, cette résistance est en hausse dans le monde entier (Mégraud, 2004).

Dans l'ensemble, la résistance d'*H. pylori* au métronidazole est répandue, tandis que la résistance à l'amoxicilline et la tétracycline sont faibles. Toutefois, la prévalence de l'antibio-

résistance est beaucoup plus complexe au niveau régional. Par exemple, la résistance à l'amoxicilline est inférieure à 3% en Amérique et en Europe, mais elle est de plus de 60% en Afrique (De Francesco et *al.*, 2010).

Dans le programme de surveillance de la résistance d' *H. pylori* aux antimicrobiens, un modèle de résistance indiquait que 29,1% des isolats des États-Unis étaient résistants à un agent antimicrobien et 5% étaient résistants à deux agents antimicrobiens ou plus (Duck et *al.*, 2004), les taux indiqués par notre étude dépassent largement ceux-ci.

La famille des 5 nitro-imidazolés, dont fait partie le métronidazole, reste historiquement la plus ancienne famille de molécules utilisées pour l'éradication d' *H. pylori* (Marshall et *al.*, 1984). Elles ont été largement utilisées peu de temps après la découverte de l'implication d' *H. pylori* dans les maladies gastro-duodénales. Par conséquent, il s'en est suivi une explosion de la résistance à cet antibiotique (Miendje et *al.*, 2011).

Le rapport de Miendje et ses collaborateurs (2011) sur la relation des taux de résistance d' *H. pylori* aux antécédents ethniques des patients en Europe, a rapporté un taux de résistance à la clarithromycine plus élevé chez les patients d'origine européenne que chez ceux du moyen-orient, ce qui est probablement lié à des taux plus élevés de consommation de macrolides en Europe, les taux de résistance au métronidazole étaient plus élevés pour les souches d' *H. pylori* isolées chez des patients originaires des pays d'Afrique.

Ces différences en relation avec l'origine ethnique ont également été décrites précédemment par une étude prospective multicentrique portant sur des enfants vivants en Europe (Koletzko et *al.*, 2006).

Il est à mentionner qu'en Afrique, le métronidazole est souvent utilisé pour traiter les infections parasitologiques (amibiase, giardias et trichomonas) avec des conséquences dramatiques pour la résistance d' *H. pylori* (Ndip et *al.*, 2008 ; Oyedeji et *al.*, 2009).

En effet, des taux plus élevés de résistance au métronidazole (90%) ont été signalés pour l'Afrique centrale (Ndip et *al.*, 2008 ; Oyedeji et *al.*, 2009). Ce qui pourrait prédire que plus que l'on s'approche des zones tropicales plus la résistance au métronidazole serait élevée.

La résistance au métronidazole est supérieure à 50% dans la majeure partie du monde, mais il semble qu'elle soit en baisse dans le nord de l'Europe (Ierardi et *al.*, 2013). Par

conséquent, selon le rapport de consensus de Maastricht III (Delchier, 2006), le métronidazole ne devrait pas être utilisé avant le test de sensibilité des patients originaires d'Asie et d'Afrique or ce n'est pas le cas des pratiques en Algérie où selon nos résultats plus d'un patient sur deux présentent une résistance au métronidazole (58.87%).

Suite à ce consensus, Les macrolides, particulièrement la clarithromycine, étaient alors les bienvenus, et d'autres nouvelles alternatives de seconde ou troisième ligne ont été proposées pour l'éradication d' *H. pylori*, notamment les rifampycines et les fluoroquinolones (Gisbert et Pajeres, 2002 ; Malfertheiner et *al.*, 2007).

En Europe, les schémas de résistance varient selon les pays et même au sein d'un même pays. Par exemple, le taux de résistance à la clarithromycine est de 1,5% en Suède, mais de 7,5% en Allemagne, en Italie elle est plus faible dans le nord que dans le sud (Ierardi et *al.*, 2013).

Nos résultats pour la lévoflaxacine (0% de résistance) corroborent avec la méta-analyse de Gisbert et Morena, (2006) qui mentionnent l'utilité de la levofloxacin, en particulier, après un échec de l'éradication d'*H. pylori*.

Il ressort aussi de notre travail que les souches d' *H. pylori* isolées sont presque toujours sensibles à l'amoxicilline et à la tétracycline. C'est également le cas dans de nombreux autres pays (Mégraud et *al.*, 1999; Duck et *al.*, 2004 ; Storskrubb et *al.*, 2006 ; Boyanova et *al.*, 2010 ; Vécsei et *al.*, 2010). Ceci est probablement dû au fait que plusieurs mutations sont nécessaires pour conférer la résistance à ces antibiotiques.

Cependant, en Amérique latine et en Asie, des cas d'importants taux de résistances ont été observés à l'encontre de l'amoxicilline (6 à 59%) et de la tétracycline (9 à 27%) (Boyanova et Mitov, 2010).

Comme recommandés dans de nombreux consensus (Chey et Wong, 2007 ; Malfertheiner et *al.*, 2007), nos données confirment le bien fondé de l'inclusion de l'amoxicilline dans tous les schémas thérapeutiques de première intention pour l'éradication d'*H. pylori*. Plus particulièrement, l'absence de résistance serait en faveur de la généralisation de la thérapie séquentielle qui consiste à administrer dans un premier temps un IPP + amoxicilline, suivi par un IPP + 2 autres antibiotiques (généralement clarithromycine et métronidazole).

Néanmoins, cette thérapie reste controversée et plusieurs études présentent des résultats contradictoires. Deux études ont montré une efficacité d'éradication principalement sur une population infectée par des souches résistantes au métronidazole (Zullo et al., 2000; Jafri et al., 2008). Par contre deux autres études ont présenté soit des résultats équivalents à la tri-thérapie (Wu et al., 2010), soit même inférieurs (Sanchez-Delgado et al., 2008).

Quant à la tétracycline, sa principale utilité réside dans la synergie observée entre celle-ci et les sels de bismuth dans le cadre d'une quadruple-thérapie incluant le métronidazole. L'usage de la tétracycline pourrait néanmoins être envisagé en traitement de seconde ligne (tri-thérapie en association IPP et métronidazole) tel que le suggère le groupe des experts du EHSO (Malfertheiner et al., 2007).

La clarithromycine est la molécule clé dans le traitement de l'infection à *H. pylori* (Vakil et Mégraud, 2007). Si elle reste de loin la molécule la plus efficace, son utilisation est à proscrire en cas de présence de résistance vu l'impact négatif observé sur les taux d'éradication.

En effet, l'usage de la clarithromycine dans un schéma thérapeutique réduit de l'ordre de 70% le succès d'éradication lorsque les souches y sont résistantes (Mégraud, 2004). La résistance à la clarithromycine et à la levofloxacine a été attribuée à l'utilisation généralisée de ces antibiotiques pour les infections des voies respiratoires et des voies urinaires, respectivement (De Francesco et al., 2010).

Cependant, il est maintenant bien connu que l'existence d'une résistance primaire à la clarithromycine due à une mutation de sa cible ribosomale est la principale raison de l'échec de l'éradication lorsque cet agent est utilisé (Taylor, 1997).

Il est aussi bien établi que la résistance à *H. pylori* est essentiellement due à des mutations ponctuelles pouvant, par conséquent, être détectées par des tests moléculaires. Différentes techniques ont été développées à cet effet (Owen, 2002). Le taux des souches multi-résistantes est probablement lié aux nombres de traitements infructueux (Duck et al., 2004).

Afin de limiter la survenue de cette résistance, il serait donc plus judicieux de procéder à un test de sensibilité aux antibiotiques avant l'instauration du premier traitement. Chey et Wong, (2007) prédisent que même si *H. pylori* est sensible *in vitro* à de nombreux agents, peu d'entre eux ont prouvé leur efficacité *in vivo*.



Face à la haute prévalence, la flambée de la résistance ou la multi-résistance aux antibiotiques et de nombreuses contraintes pour établir un traitement sûr et efficace contre *H. pylori* et les pathologies associées à cette infection, la recherche de nouvelles alternatives de l'éradication d' *H. pylori* s'avère impérative.

#### 4/ Diagnostic, identification et génotypage d' *Helicobacter pylori*

##### 4-1/ Le test « genotype Helico DR »

L'ADN d'*H. pylori* a été extrait avec succès pour 100 isolats cliniques pour lesquels nous avons alors effectué des tests d'identification et de génotypage.

Le test « GenoType HelicoDR » permet d'identifier :

- ✓ *H. pylori* et la détection simultanée d'infections mixtes ou des souches hétérogènes.
- ✓ La résistance aux fluoroquinolones par la détection des mutations les plus courantes dans le gène *gyrA*.
- ✓ La résistance à la clarithromycine par la détection des mutations les plus courantes dans le gène 23S de l'ARNr.

Dans un premier lieu, il est important de valider le test en vérifiant l'apparition du trait « contrôle du conjugué, CC sur la figure 19» puis le contrôle de la réaction de l'amplification d'ADN par l'apparition du trait au niveau de la ligne « contrôle de l'amplification, AC sur la figure 19». Si l'un ou les deux lignes n'apparaissent pas, le test est considéré comme ininterprétable.

Une fois le test validé, la présence d' *H. pylori* est représentée par l'apparition du trait au niveau de la ligne HP (figure 19). A chaque fois, un contrôle négatif est représenté par la bande NC pour évaluer la spécificité du test (figure 19).

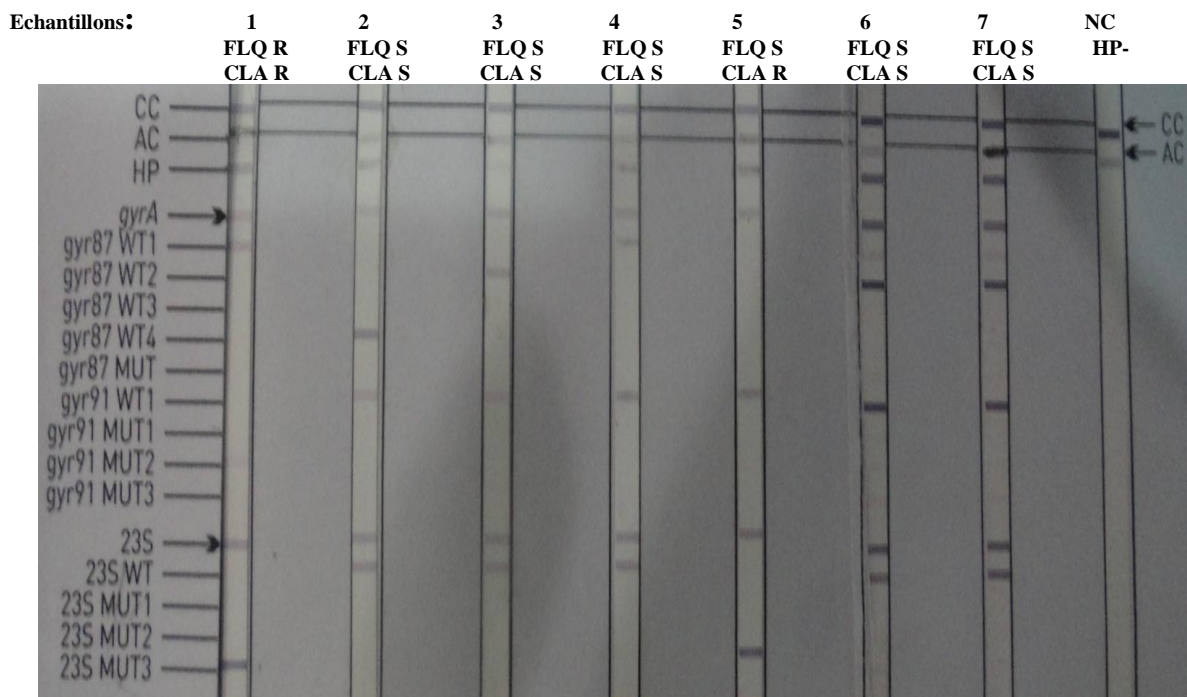
L'amplification du gène *gyr A* correspondant au gène responsable de la susceptibilité aux fluoroquinolones est exprimée par la ligne *gyr A* sur chaque bandelette, le test permet de détecter 5 allèles sauvages notamment 4 allèles sauvages du codon 87 (*gyr 87 WT* 1, 2, 3 ou 4) et un allèle sauvage pour le codon 91 (*gyr 91 WT* 1) indiquant une souche *H. pylori* sensible aux fluoroquinolones comme pour les bandelettes 2, 3, 4,5, 6 et 7 (figure 19).

Les allèles mutés du gène *gyr A* détectés par ce test correspondent à une mutation du codon 87 (*gyr 87 MUT*) et 3 mutations différentes du codon 91 (*gyr 91 MUT* 1, 2 et 3). La

souche 01 présente alors une résistance au fluoroquinolone avec une mutation au niveau du codon 91 de type gyr 91 MUT 2 (figure 19).

Le gène 23S, responsable de la susceptibilité à la clarithromycine, est détecté par ce test, avec identification d'un allèle sauvage (23S WT) et 3 allèles mutés (23S MUT1, MUT2 et MUT3), les souches 2, 3, 4, 6 et 7 ne portent pas de mutations sur le gène 23S et sont alors sensibles à la clarithromycine contrairement aux souches 1 et 5 qui portent des allèles mutés de type 23S MUT3 et sont ainsi résistantes à la clarithromycine (figure 19).

A la lumière de ces résultats et en analysant la figure 19, on estime que ce test nous a permis d'identifier, à l'échelle moléculaire, les différents isolats et de déduire qu'une simple mutation représente la résistance à un antibiotique (exemple : la souche 5 résistante aux fluoroquinolones) et une double mutation représente la résistance à 2 antibiotiques (souche 1 résistante aux fluoroquinolones et clarithromycine). L'identification moléculaire d'*H. pylori* et le génotypage sont ainsi réalisés pour nos isolats cliniques.



**Figure 19 :** Résultats des bandelettes d'ADN (GenoType HelicoDR) des isolats d' *H. pylori*.

(FLQ : Fluoroquinolones, CLA : Clarithromycine, S : Sensibles, R : Résistantes, CC : Contrôle du conjugué, AC : Contrôle de l'amplification, HP : *Helicobacter pylori* NC : Contrôle négatif, WT (Wild type) : allèle sauvage, MUT : allèle mutée).

Ce test semble très utile, car il pourrait encourager les gastro-entérologues d'envoyer facilement les échantillons de biopsies à température ambiante et donc de traiter le patient en fonction des résultats des tests de sensibilité en particulier dans les populations où le taux de résistance à la clarithromycine est élevé (Raymond et *al.*, 2010 ). L'analyse moléculaire peut montrer une, plusieurs, ou différentes combinaisons de mutations responsables de résistances (Vandoorn et *al.*, 2001 ; Bogaerts et *al.*, 2006).

Bien que d'autres mécanismes de résistance existent probablement, les mutations ponctuelles A2143G, A2142G et A2142C sont responsables de la résistance à la clarithromycine chez *H. pylori* (Kim et *al.*, 2009). Cattoir et *al.*, (2007) ont signalé que certaines mutations du gène *gyrA* sont associées à la résistance aux fluoroquinolones.

Cependant, la nécessité d'adapter les sondes d'hybridation des bandelettes du test de génotypage à la prévalence de mutations locales, afin d'optimiser la recherche et de détecter la majorité des souches mutées reste une limitation de la méthode. Un séquençage des gènes *gyrA* et 23S d'un grand nombre de souches résistantes aux fluoroquinolones et à la clarithromycine pourrait être utile dans la détection de nouvelles mutations.

Le test HelicoDR est actuellement l'unique méthode proposant à la fois la détection de la présence d' *H. pylori* et la détermination de la sensibilité aux macrolides et aux fluoroquinolones, ce qui satisfait aux recommandations du groupe des experts européens (EHSg) qui suggère de tester particulièrement ces 2 familles d'antibiotiques (Malfertheiner et *al.*, 2007).

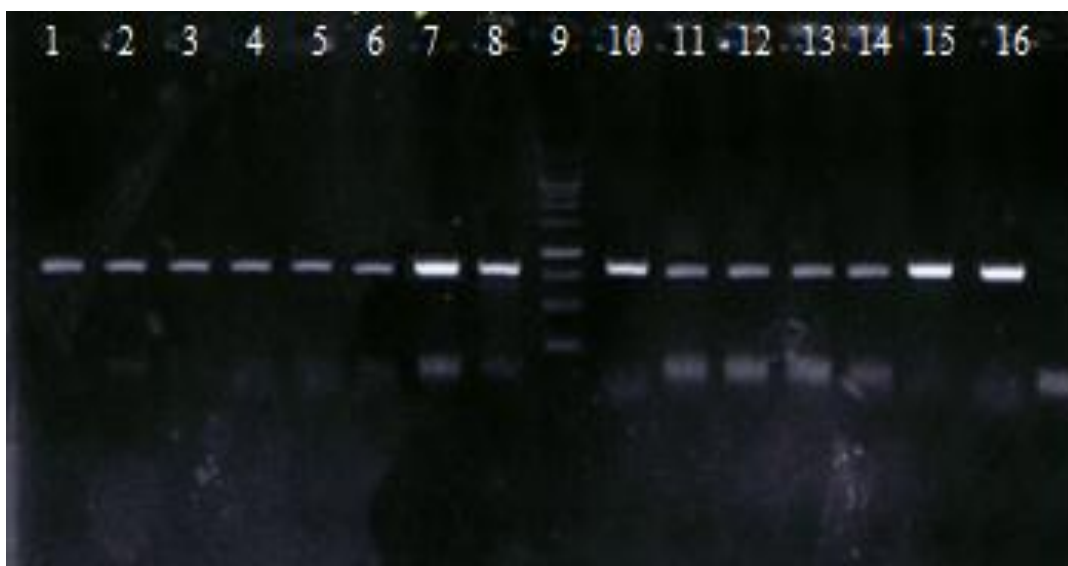
Dans une vision à plus long terme, vu l'adaptation permanente des bactéries aux antibiotiques, il n'est pas exclu de nouvelles mutations aux antibiotiques testés. Par conséquent, contrairement aux méthodes phénotypiques, ce kit devrait être constamment mis à jour et au mieux en fonction des zones géographiques.

D'autres procédés de génotypage ont été développés pour la détection de la résistance aux antibiotiques chez *H. pylori*, basés sur la technologie LiPA (Van der Ende et *al.*, 2001 ; Van Doorn et *al.*, 2001), PCR en temps réel (Lascols et *al.*, 2003 ; Oleastro et *al.*, 2003 ; Lottspeich et *al.*, 2007 ; Burucoa et *al.*, 2008 ), hybridation in situ en fluorescence (Guimaraes et *al.*, 2007), microréseau (Xing et *al.*, 2005 ; Chen et *al.*, 2008) ou autres (Woo et *al.*, 2009).

Grâce à l'utilisation restreinte de la culture, Genotype® HelicoDR est un outil moléculaire très prometteur pour le diagnostic et la détection de la résistance à la clarithromycine et aux fluoroquinolones chez *H. pylori* directement à partir d'échantillons de biopsies gastriques ou dans les isolats obtenus à partir de la culture.

#### 4-2/ Détection du génotype CagA

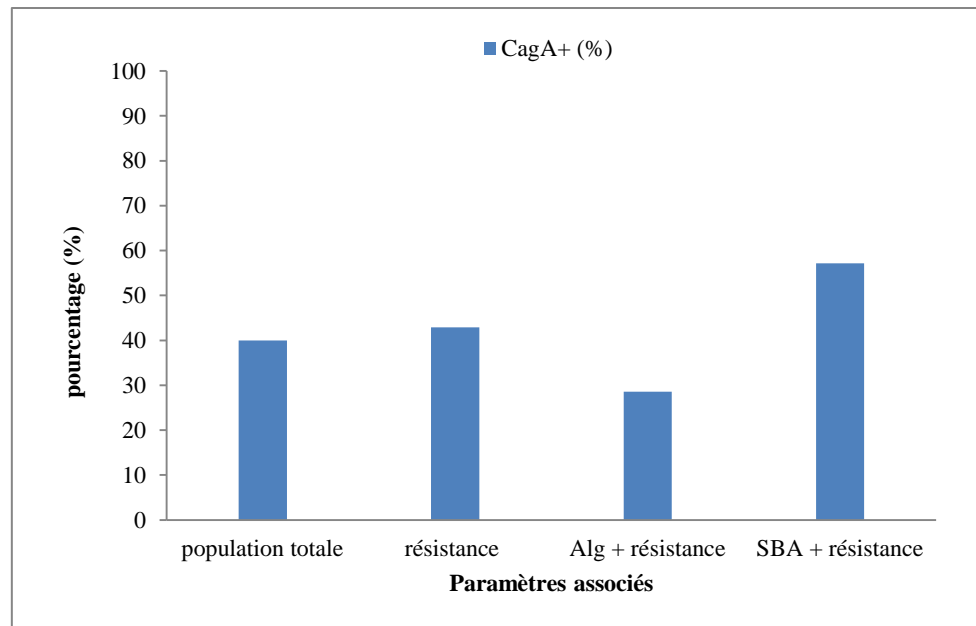
Le test de génotypage CagA, a été réalisé sur nos isolats, le produit de l'amplification du gène CagA a été visualisé sous la forme d'une bande de 349 pb sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium (figure 20).



**Figure 20** : Le gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium présentant les amplicons PCR du gène CagA à 349pb.

(Ligne 9 : marqueur de taille).

40% de nos isolats portent le facteur de virulence CagA+. L'étude de l'association du facteur de virulence CagA+ avec la résistance aux agents antimicrobiens testés dans notre étude, a révélé une association de 42.85% entre la résistance à un antibiotique au minimum et la présence du facteur de virulence CagA+. Le taux de cette association varie selon l'origine des patients, elle a été estimée à 57.14% pour ceux de Sidi Bel Abbes et à 28.57% pour ceux d'Alger (figure 21).



**Figure 21** : Génotype CagA+ et son association à l'antibio-résistance.

Le gène associé à la cytotoxine A (CagA) a été proposé comme marqueur de l'îlot de pathogénicité (PAI) *cag* et est associé à des résultats cliniques plus sévères (Atherton, 1997; Van Doorn et *al.*, 2000). Les gènes Cag PAI contiennent un gène CagE (Cytotoxin Associated Gene E) qui code pour une protéine sécrétoire qui est nécessaire pour l'induction de l'interleukine IL-8 (Tummuru et *al.*, 1995) et pour la translocation et la phosphorylation de la protéine CagA (Odenbreit et *al.*, 2000). La présence du gène CagE a été associée à un résultat clinique sévère, en particulier dans les pays développés (Fallone et *al.*, 1999). Mais les études sur cette association restent controversées (Tanih et *al.*, 2010).

Tanih et *al.*, (2010), ont indiqué une prévalence de 90% du facteur de virulence CagA+, une prévalence similaire à celle rapportée dans de nombreux pays africains et dans d'autres parties du monde (Smith et *al.*, 2002 ; Wong et *al.*, 2004 ; Asrat et *al.*, 2004).

La prévalence du gène CagA+ varie de 26% en Jordanie à 100% en Inde (Datta et *al.*, 2003 ; Nimri et *al.*, 2006). Ces différences ont été attribuées à la diversité génétique et aux emplacements géographiques (Covacci et *al.*, 1999).

La présence de CagA+ dans des isolats iraniens a été rapportée pour varier de 44% à 91% selon différents rapports (Talebkhani et *al.*, 2008 ; Dabiri et *al.*, 2009). Dans une autre étude iranienne (Dabiri et *al.*, 2010), 67% des patients iraniens ont été infectés par des souches de CagA+ semblables à celles d'autres rapports iraniens (67%) (Jafarzadeh et *al.*, 2007 ; Dabiri et *al.*, 2009). C'est relativement différent des études effectuées dans des pays

asiatiques comme le Japon, la Corée, la Chine, Hong Kong, la Malaisie, la Thaïlande et l'Inde, où plus de 90% des souches portent le gène CagA+, indépendamment des résultats cliniques (Pan et *al.*, 1998 ; Datta et *al.*, 2003 ; Wong et *al.*, 2004 ; Chomvarin et *al.*, 2006 ; Tan et *al.*, 2009).

Les résultats concernant les souches isolées présentant le facteur de virulence CagA+ varient considérablement dans le monde. En Europe et aux Etats-Unis, la prévalence des souches CagA+ était estimée entre 60 et 70% (Van Doorn et *al.*, 2000), 46%, aux pays-bas, 60% chez les Afghans, 55% au Bangladesh et une très forte prévalence de souches CagA+ (100%) en Inde (Datta et *al.*, 2003 ; Rahman et *al.*, 2003).

Ces variations dans la prévalence selon la zone géographique même dans des pays voisins concordent avec les variations de nos prévalences selon la provenance des patients. Le génotype de la souche peut influencer sur le succès du traitement d'éradication d' *H. pylori* (Sugimoto et Yamaoka, 2009).

De nombreuses études ont montré que les souches CagA+ sont directement associées à la gastrite aiguë, à l'ulcère gastrique et au cancer gastrique (Elviss et *al.*, 2004 ; Ayala et *al.*, 2011 ; Ghotaslou et *al.*, 2013).

Les antibiotiques peuvent atteindre des concentrations plus élevées dans la muqueuse enflammée. Ainsi, les souches CagA-, qui produisent une inflammation moins sévère, seraient moins accessibles aux antibiotiques et donc plus difficiles à éradiquer (Van Doorn et *al.*, 2000).

Il serait donc plus facile d'éliminer les souches virulentes (CagA +) avec le traitement d'éradication d' *H. pylori* (Elviss et *al.*, 2004 ; Sugimoto et Yamaoka, 2009 ; Ayala et *al.*, 2011 ; Ghotaslou et *al.*, 2013).

## 5/ Activité anti-oxydante des extraits

### 5-1/ Test au DPPH

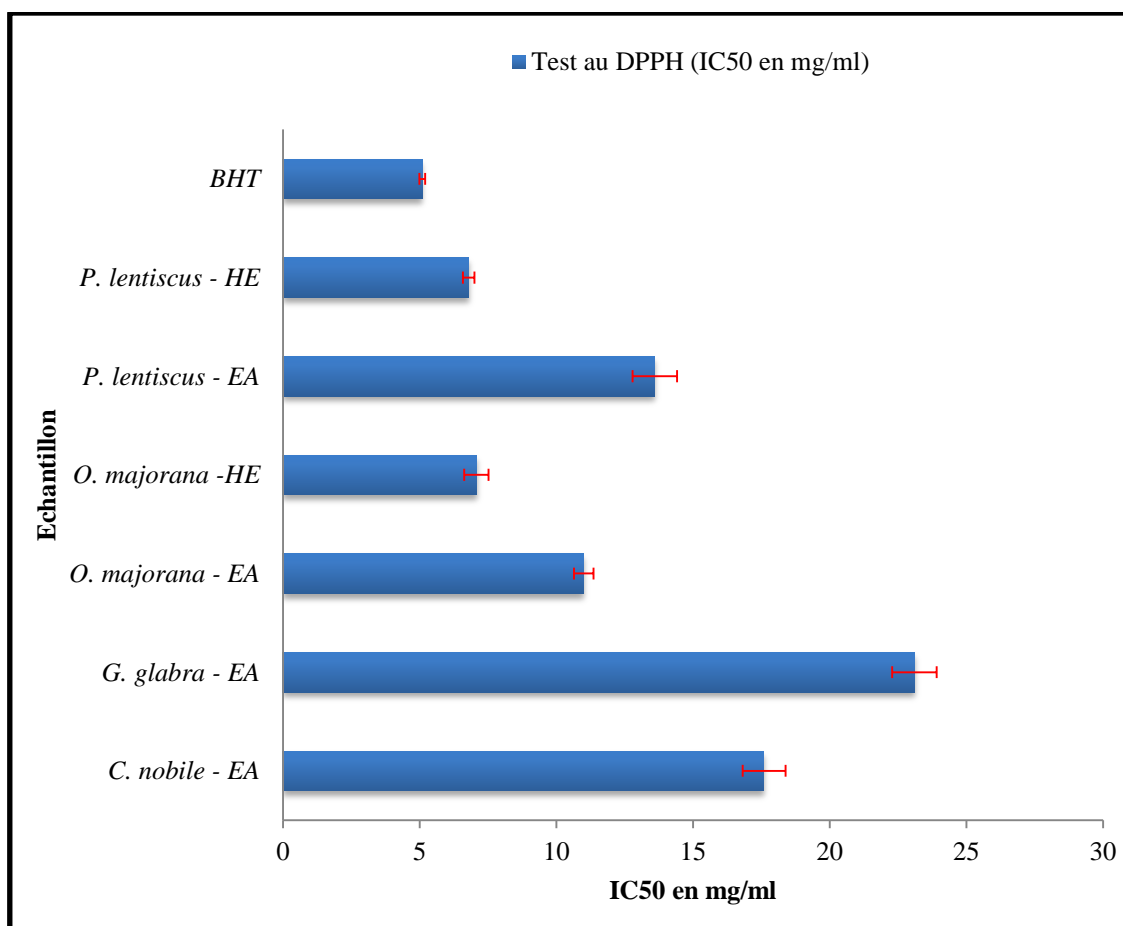
Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée avec une substance qui peut donner un atome d'hydrogène, cela donne lieu à la forme réduite avec une perte de la couleur violette. La décoloration sera directement proportionnelle au nombre de protons captés et peut être suivie par la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel à 517 nm. Elle permet d'évaluer le taux de réduction du DPPH et fournit donc un moyen pratique pour mesurer le pouvoir antioxydant des extraits étudiés.

L'IC50 est inversement liée à la capacité anti-oxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydants requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité anti-oxydante d'un composé est grande.

La détermination de l'activité anti-oxydante des différents extraits par le test au DPPH a révélé que l'huile essentielle de *P. lentiscus* (HEPL) a montré une activité anti-radicalaire significative ( $P < 0,05$ ) avec une IC50 de  $6.79 \pm 0,21$  mg/ml comparative à l'huile essentielle d'*O. majorana* qui a aussi montré une activité anti-radicalaire significative ( $P < 0,05$ ) avec une IC50 de  $7,07 \pm 0,45$  mg/ml (figure 22).

L'extrait alcoolique des feuilles d'*O. majorana* présente une activité anti-radicalaire plus élevée par rapport à celle trouvée pour l'extrait alcoolique des feuilles de *P. lentiscus* avec des IC50 significatives ( $P < 0,05$ ) de  $11 \pm 0.36$  mg/ml et  $13.6 \pm 0,81$  mg/ml respectivement. L'activité anti-radicalaire de l'extrait alcoolique des fleurs de *C. nobile* est exprimée par une IC50 significative ( $P < 0,05$ ) de  $17.6 \pm 0.78$ mg/ml (figure 22).

La plus faible activité anti-radicalaire a été présentée par l'extrait alcoolique des parties sous-terraines (racines) de *G. glabra* avec une IC50 significative ( $P < 0,05$ ) de  $23.1 \pm 0.81$  mg/ml nettement plus élevée par rapport à tous les échantillons testés. Le BHT a présenté une IC50 de  $5.09 \pm 0.11$  mg/ml significativement inférieure ( $P < 0,05$ ) aux IC50 de tous les extraits testés (Figure 22).



**Figure 22:** Les valeurs d'IC50 (mg/ml) des différents extraits testés.

(EA : Extrait alcoolique, HE : Huile essentielle ; Les barres d'erreurs, figurées en rouge, représentent les écarts types à la moyenne pour chaque test).

La production des radicaux libres chez les organismes vivants est un processus physiologique, régulé par le biais de divers processus chimiques ou enzymatiques de détoxification.

En effet l'organisme possède ses propres moyens de défense lui permettant de lutter contre ces radicaux libres. Quand ce système de protection perd son efficacité ou quand le nombre de radicaux libres augmente de manière importante, il survient un stress oxydant (Koechlin, 2006).

Les antioxydants de synthèse tels que le BHA et le BHT sont certes très efficaces, mais susceptibles de manifester des effets secondaires et voire toxiques (Manian et *al.*, 2008). Pour pallier les effets secondaires des produits synthétiques et leurs toxicités, les scientifiques se trouvent devant l'obligation au recours à la phytothérapie.



Les différences dans l'activité anti-radicalaire sont certainement liées à la nature et aux taux des composés bioactifs, ce qui est proportionnel à l'activité anti-radicalaire et qui peut être variable en fonction de certains facteurs écologiques comme le sol, l'humidité, la sécheresse, ou en fonction de la période de la récolte de la plante ainsi que la partie utilisée.

Les espèces appartenant au genre *Origanum* sont riches en acide rosmarinique, en flavonols et en flavones (Exarchou et al., 2002; Kosar et al., 2003). *O. Majorana* L., appartenant à la famille des Lamiacées, a un grand potentiel antioxydant et a été utilisée contre l'asthme, l'indigestion, maux de tête et les rhumatismes; En outre, les huiles essentielles de cette plante ont été largement utilisées dans l'industrie alimentaire (Erenler et al., 2016). Suite à l'isolement et à la caractérisation de leurs activités anti-oxydante et antiproliférative importantes, Erenler et al., (2016) ont proposé l'utilisation des extraits de cette plante dans l'industrie alimentaire et comme un médicament anticancéreux.

Les travaux de Baratto et ses collaborateurs (2003) montrent que les dérivés de l'acide phénolique extraits des feuilles de *P. lentiscus* ont une activité scavenger importante vis-à-vis du radical DPPH. La présence de l' $\alpha$ -tocophérol dans les feuilles de *P. Lentiscus*, explique l'activité anti-oxydante des extraits (Kivaçak et Akay, 2005).

Considérée comme l'une des plantes médicinales les plus anciennes et les plus polyvalentes connues, les fleurs de *C. nobile* séchées ont de nombreuses implications pour la santé grâce à leur grande teneur en molécules anti-oxydantes comme les terpénoïdes et les flavonoïdes notamment le chamazulène et les dérivés acétyléniques, l'apigénine, la quercétine, la patuletine ainsi que divers glucosides. Ces composés réduisent l'inflammation en luttant contre les dommages des radicaux libres et en empêchant les mutations (Han et al., 2013).

L'extrait des racines de *G. glabra* présente la plus faible activité anti-radicalaire par rapport aux autres extraits car les substances issues de parties aériennes ont été identifiées comme étant les antioxydants naturels les plus puissants (Amessis-Ouchemoukh et al., 2014; Foddai et al., 2015; Mehenni et al., 2016).

### 5-2/ Méthode de blanchissement de la $\beta$ -carotène

Dans la méthode de blanchissement de la  $\beta$ -carotène, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux libres dûs à l'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir des groupes méthylène de l'acide linoléique (Kumaran et Karunakaran, 2006), puis le radical libre va oxyder le  $\beta$ -carotène hautement insaturé.

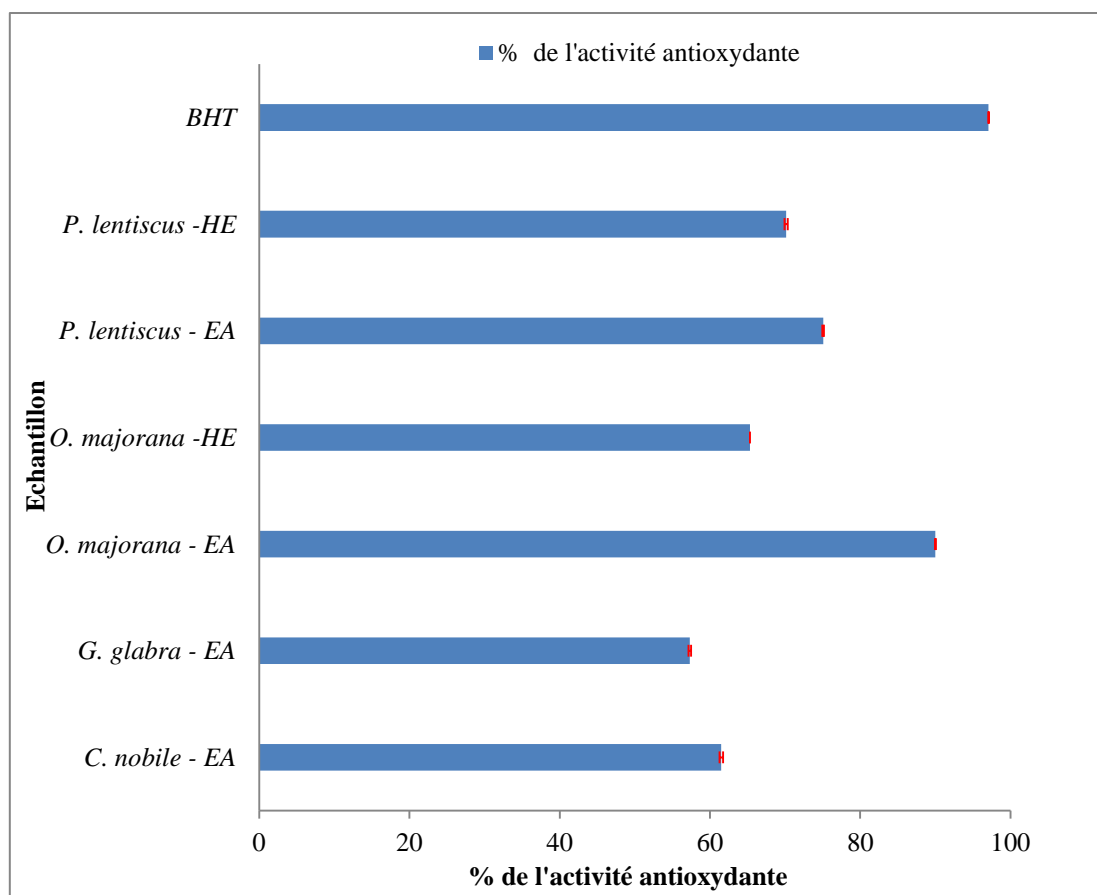
La présence des antioxydants dans l'extrait permet de minimiser l'oxydation du  $\beta$ -carotène par les hydro-péroxydes. Les hydro-péroxydes formés dans ce système seront neutralisés par les antioxydants des extraits (Mariod et al., 2009). Donc cette méthode est généralement utilisée pour évaluer l'activité anti-oxydante des composés dans des émulsions accompagnées de l'oxydation du  $\beta$ -carotène et de l'acide linoléique.

L'extrait alcoolique des feuilles d'*O. majorana* a montré l'activité anti-oxydante significativement ( $P < 0,05$ ) la plus élevée avec un pourcentage s'élevant à  $88,13 \pm 0,15\%$  (figure 23) et présente donc le plus grand potentiel antioxydant.

Les valeurs des pourcentages de l'activité anti-oxydante des extraits alcooliques des feuilles de *P. lentiscus* et des fleurs de *C. nobile* sont de  $75,06 \pm 0,1 \%$  et  $61,5 \pm 0,23\%$  respectivement et sont significativement ( $P < 0,05$ ) supérieures à celle trouvées avec les extraits des racines de *G. glabra* ( $57,32 \pm 0,16 \%$ ) (figure 23).

Les valeurs significatives ( $P < 0,05$ ) des pourcentages de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles sont de  $65,33 \pm 0,01$  et  $70,12 \pm 0,21\%$  pour *O. majorana* et *P. lentiscus* respectivement. Toutes Ces valeurs sont significativement inférieures ( $P < 0,05$ ) par rapport au BHT ou l'activité anti-oxydante est de  $96,19 \pm 0,19 \%$  (Figure 23).

Selon nos résultats, *O. majorana* et *G. glabra* sont les deux plantes qui présentaient les pourcentages d'activités anti-oxydantes les plus élevés et sont donc les plus riches en molécules bioactives anti-oxydantes responsables de cette activité.



**Figure 23 :** Le pourcentage de l'activité anti-oxydante des extraits.

(EA: Extrait alcoolique, HE : Huile essentielle ; Les barres d'erreurs, figurées en rouge, représentent les écarts types à la moyenne pour chaque test)

Guimarães et *al.*, (2001) ont testé le pouvoir antioxydant de *C. nobile* par quatre tests différents. L'échantillon avait donné des résultats très intéressants, ce qui est rapporté à sa plus forte teneur en composés phénoliques par rapport à notre échantillon.

Les espèces d'*Origanum* (*O. majorana* et *O. vulgare*) contiennent principalement du carvacrol et/ou du thymol avec des quantités considérables de terpènes ce qui confère à leurs différents extraits une activité anti-oxydante élevée. Ces espèces ont été largement utilisées dans la médecine et l'industrie alimentaire (Heath, 1981 ; Akgul et Bayrak, 1987).

Selon Martins et *al.*, (2015a), l'activité anti-oxydante de l'extrait alcoolique de la réglisse est proportionnellement liée à la présence de composés phénoliques tels que les flavones, les flavanones et des chalcones.

Les fruits et les feuilles de *P. lentiscus* sont riches en composés poly-phénoliques (Romani et *al.*, 2002 ; Luigia et *al.*, 2008). Les polyphénols trouvés dans les fruits de *P.*

*lentiscus* sont des flavonoïdes de type  $\alpha$ -aglycones et  $\beta$ -glycosides (Hamad *et al.*, 2011) et anthocyanine (majoritairement le cyanidine 3-O-glucoside) (Luigia *et al.*, 2008), alors que les feuilles sont riches en acides phénoliques ; myricétine, quercétine, isoflavone ; qui sont tous doués d'activité anti-oxydante.

Les activités anti-oxydantes des huiles essentielles impliquent plusieurs classes de terpènes. Les monoterpènes oxygénés et les quaterpènes oxygénés fournissent des propriétés redox aux huiles essentielles et par conséquent des potentialités anti-oxydantes (Ruberto et Baratta, 2000; Wang *et al.*, 2008; Moghaddam *et al.*, 2015).

Dans les extraits de plantes, outre les polyphénols, plusieurs familles de métabolites secondaires peuvent présenter une activité anti-oxydante qui, par leur effet synergique, peuvent influencer l'activité des extraits de plantes (Liu, 2004).

Le pourcentage de l'activité anti-oxydante est probablement expliqué par la grande spécificité de ce test pour les composés apolaires donc lipophiles (Gachkar *et al.*, 2007). Ainsi l'extrait qui contient la quantité la plus élevée en polyphénols ou d'autres composés hydrophobes est le plus actif.

Terpinc *et al.*, (2009) ont mis en évidence que la polarité et l'hydrophobicité des agents antioxydants sont deux facteurs importants dans les systèmes de biomembranes. C'est la raison pour laquelle beaucoup de chercheurs choisissent le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplé à celle du  $\beta$ -carotène comme modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria *et al.*, 2006).

Il y a de plus en plus d'intérêt à l'utilisation des antioxydants naturels comme des composants bioactifs dans les aliments (Hertog *et al.*, 1993). Grâce à leur habilité à piéger les espèces d'oxygène réactif (ERO), les antioxydants sont capables d'inhiber le processus d'oxydation du cholestérol et par la suite diminuent le risque des maladies cardiovasculaires (Diaz *et al.*, 1997).

Bien que l'oxydation du LDL (lipoprotéine à basse densité) peut être empêchée par l'addition d'antioxydants synthétiques, plus d'attention est dirigée vers les antioxydants naturels pour leur meilleure sécurité comparée au composants chimiques (Amro *et al.*, 2002).

Les effets protecteurs des régimes riches en végétaux, contre certains cancers ont été attribués en partie aux antioxydants qu'ils contiennent, particulièrement aux polyphénols (Hertog et al., 1993).

Pour maintenir l'état souhaité des aliments, certaines pratiques physiques sont utilisables (cuisson sous vide, conditionnement sous atmosphère modifiée...), mais l'emploi d'additifs rajoutés aux préparations est un moyen facile et économique de pallier les évolutions oxydatives, principale cause de dégradation hors celles des micro-organismes. Dans ce contexte on peut proposer l'utilisation des antioxydants naturels extraits des végétaux.

### 6/ Criblage de l'activité anti- *H. pylori*

La première phase de ce travail a consisté à évaluer l'activité anti- *H. pylori* de différents extraits de plantes médicinales que nous avons suspectés d'avoir un effet inhibiteur contre *H. pylori*. Cette étape préliminaire est indispensable pour sélectionner les extraits les plus efficaces contre *H. pylori*.

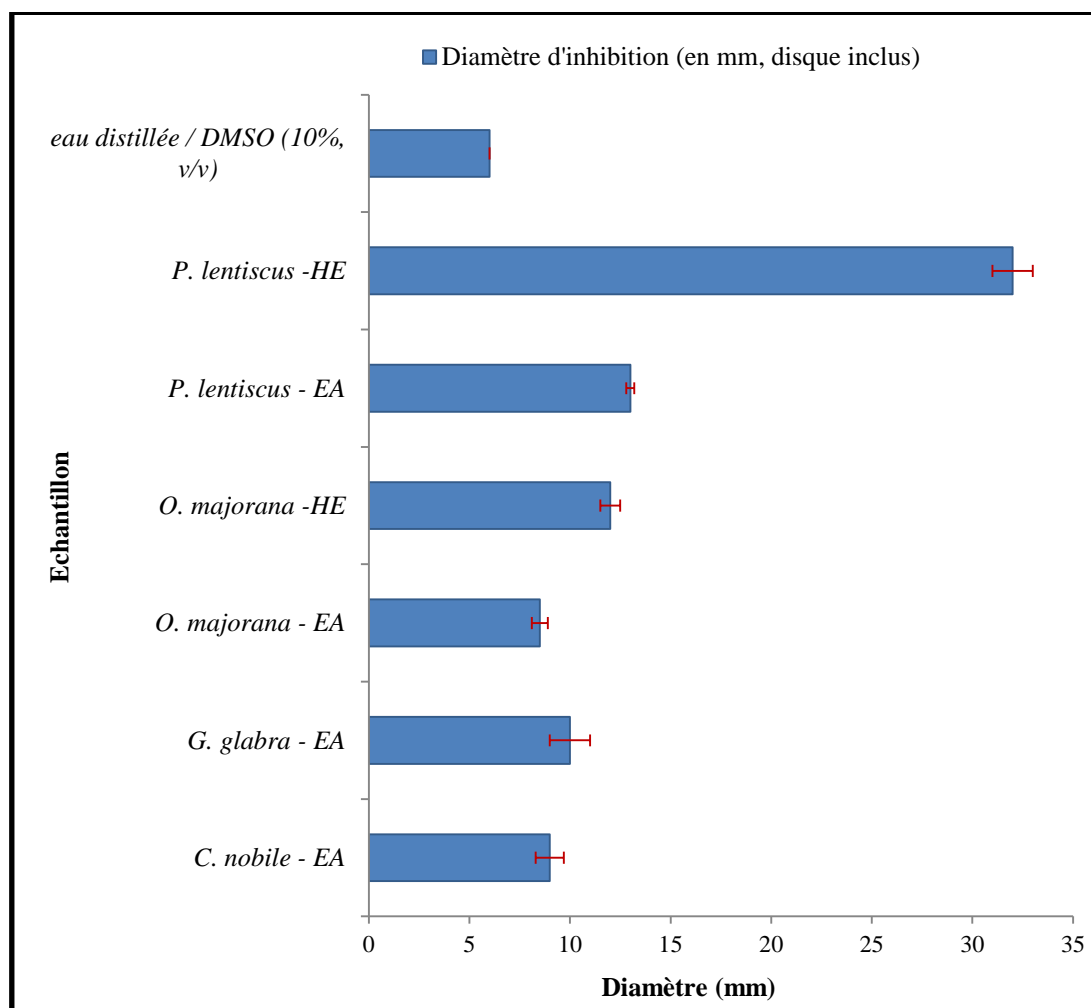
L'activité anti- *H. pylori* des extraits de *C. nobile*, *G. glabra*, d'*O. majorana* et de *P. lentiscus*, a été évaluée par la méthode de diffusion par disque pour 22 souches cliniques d'*H. pylori*. Ces souches ont été isolées et identifiées à partir des biopsies gastriques des patients inclus dans l'étude de la prévalence de l'infection à *H. pylori*.

Le sulfoxyde de diméthyle (DMSO) est un solvant utilisé pour améliorer la solubilisation des extraits. Le mélange eau distillée / DMSO (10%, v/v) sert de contrôle négatif interne. Avec un diamètre d'inhibition égal à celui du disque stérile non imprégné (6 mm), le DMSO est sans effet sur *H. pylori* à la concentration utilisée (Figure 24).

La plus grande zone d'inhibition est générée par l' HEPL à  $32 \pm 01.00$  mm qui dépasse de loin le diamètre d'inhibition exercé par l'huile essentielle d'*O. majorana* estimé à  $12.50 \pm 0.50$  mm (figure 24).

En ce qui concerne les différents extraits alcooliques, ils présentent une faible activité anti- *H. pylori* avec des diamètres d'inhibition de  $13.20 \pm 0.2$ ,  $10 \pm 1.00$ ,  $9 \pm 0.70$  et  $8.5 \pm 0.40$  mm pour l'extrait alcoolique de *P. lentiscus*, *G. glabra*, *C. nobile* et *O. majorana* respectivement (figure 24).

La grande zone d'inhibition enregistrée avec l'HEPL exprime une très forte activité anti- *H. pylori*. Cette activité est au minimum plus de 2 fois plus importante que les autres extraits testés dans cette étude.



**Figure 24:** Activité anti-*Helicobacter pylori* des différents extraits.

(EA : Extrait alcoolique, HE : Huile essentielle ; Les barres d'erreurs, figurées en rouge, représentent les écarts types à la moyenne pour chaque test).

Les huiles essentielles montrent une activité antimicrobienne contre un large éventail de bactéries, y compris les espèces résistantes aux antibiotiques et les champignons (Carson et al., 1995). elles peuvent être efficaces contre des bactéries Gram négatif et Gram positif en plus des levures (Pattnaik et al., 1997 ; Delaquis et al., 2002).

Parmi les espèces bactériennes les plus redoutables, *H. pylori* est associée à des ulcères gastriques chez l'homme (Blaser, 1996). Les thérapies actuelles utilisant des antibiotiques sont

coûteuses et ont le potentiel pour le développement de la résistance aux antibiotiques (Hamasaki et *al.*, 2000).

La variation de la composition chimique des extraits d'une même ou différente plante explique les variations observées dans l'activité antibactérienne. L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action synergique de différents composés (Essawi et Srour, 2000).

Selon Rossi et *al.*, (2007a), un mélange complexe de molécules bioactives tel que les huiles essentielles est considéré comme actif s'il produit des diamètres d'inhibition de microorganismes supérieurs ou égaux à 15 mm, parmi nos extraits seule l'huile essentielle *P. lentiscus* a présenté des diamètres d'inhibitions supérieurs à ce seuil minimal exigé.

Haji-mahmoodi et *al.*, (2011) ont évalué l'effet anti-*H. pylori* des extraits méthanoliques de 23 plantes médicinales utilisées dans le traitement des troubles gastro-intestinales. Les plantes ont été sélectionnées sur la base de leur utilisation dans les pratiques traditionnelles par communauté iranienne. Parmi ceux-ci, seulement les extraits de *Punica granatum* L. (Punicaceae) et *Juglans regia* L. (Juglandaceae) ont présenté une activité élevée contre des souches d' *H. pylori*, avec des zones d'inhibition de 39 et 16 mm respectivement par la méthode de la diffusion sur gélose.

Contrairement à nos résultats, Ohno et ses collaborateurs (2003) ont mentionné l'activité d'*O. majorana* vis-à-vis des souches de référence et des souches cliniques d'*H. pylori*. Cette différence pour une espèce donnée est certainement la conséquence de la divergence des profils moléculaires et chimiques exprimés par la nature et la teneur des molécules bioactives. Ainsi, il serait plus raisonnable d'attribuer chaque activité biologique à un profil moléculaire bien défini qu'à une espèce ou ses extraits.

*G. glabra* possède des activités anti-virales, anti-inflammatoires, anti-cancéreuses et anti-ulcéreuses (Dong et *al.*, 2007). il a été signalé que *G. glabra* présentait une activité antimicrobienne contre plusieurs souches bactériennes gram-négatif et gram-positif comprenant *H. pylori* (Gupta et *al.*, 2008).

Min Kim et *al.*, (2013) ont prouvé les propriétés anti-*H. pylori* de GutGard™ contre la souche de référence *H. pylori* SS1 sur deux modèles expérimentaux ; les gerbilles et les souris C57BL/6. Il s'agit d'un produit commercial développé à partir des extraits des racines de

réglisse et enrichis en flavonoïdes (glabridine  $\geq 3,5\%$ , glabrol  $\geq 0,5\%$ , eicosanylcaffeinate  $\geq 0,1\%$ , docosylcaféate  $\geq 0,1\%$ , Flavonoïdes totaux  $\geq 10,5\%$ ).

Fukai et *al.*, (2002) ont mentionné un faible effet anti- *H. pylori* contre quatre souches pour les flavonoïdes caractéristiques de *G. glabra* principalement représentés par pyranoisoflavane, la glabridine et le glabrène .

Cogo et *al.*, (2010), ont évalué l'effet anti-*H. pylori* des extraits de différentes plantes médicinales dont la camomille et les résultats ont montré une activité modérée à l'encontre de la croissance *in vitro* d'*H. pylori*. Des études sur des modèles précliniques suggèrent que la camomille inhibe *H. pylori* (Weseler et *al.*, 2005).

Concernant *P. lentiscus*, un grand nombre d'études a signalé l'effet anti- *H. pylori* de la gomme mastic *in vitro* mais son effet *in vivo* reste controversé (Tassou et Nychas, 1995 ; Huwez et *al.*, 1998 ; Bona et *al.*, 2001 ; Marone et *al.*, 2001 ; Bebb et *al.*, 2003).

Miyamoto et *al.*, (2014), ont mentionné des effets antibactériens du méthyl isoeugenol et  $\alpha$ -terpineol contre des souches d' *H. pylori* résistantes à la clarithromycine et au métronidazole. Ces composés isolés des extraits de *P. lentiscus* pourraient être utiles pour l'éradication d'*H. pylori* même pour des souches résistantes aux médicaments.

Autant qu'agents antimicrobiens, les huiles essentielles présentent deux principaux avantages: le premier, c'est leur origine naturelle, qui signifie plus de sécurité pour les personnes et l'environnement. Le deuxième, est qu'elles ont été considérées à faible risque de développement de résistance des micro-organismes pathogènes (Daferera et *al.*, 2000).

Cependant, il semble très raisonnable de chercher des agents spécifiques pour le traitement ou la prévention de l'infection à *H. pylori* dans des sources naturelles. D'autres études concernant l'efficacité de substances naturelles sur l'infection à *H. pylori* sont alors justifiées.

Dans cette étude, la capacité d'inhiber la croissance d' *H. pylori* par 4 plantes médicinales fréquemment utilisées en médecine traditionnelle a été étudiée et l'HEPL démontre la plus forte activité contre les différentes souches d' *H. pylori*.

Sur la base de cette activité, cette huile essentielle est sélectionnée en vue de caractériser sa composition et ses caractéristiques biologiques et pharmacologiques en relation avec l'infection par *H. pylori*.



7/ Caractérisation de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*7-1/ La composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*

L'analyse de la composition chimique de l'HEPL par CG et CG/SM révèle soixante cinq composés qui représentent 97,65% de l'huile essentielle (tableau 2).

Les composés identifiés de l'HEPL ainsi que les pourcentages et l'Indice de Rétention (IR) de chaque composé sont présentés dans le tableau 2. Les principaux constituants de l'huile essentielle étaient particulièrement des monoterpènes, majoritairement représentés par  $\alpha$ -Pinène à 15.47%, Limonène à 14.7%,  $\beta$ -Myrcène à 9.93% et  $\beta$ - Pinène à 7.31%. D'autres composants sont présents dans des quantités égales ou inférieures à 5% (tableau 2).

**Tableau 02 :** Composition chimique de l'huile essentielle de *P. lentiscus* déterminée par CPG-SM.

N°	Composé <sup>a</sup>	%	IR <sup>b</sup>
1.	Tricyclene	0,73	927
2.	$\alpha$ -Thujene	0,11	935
3.	<b><math>\alpha</math>-Pinène</b>	<b>15,47</b>	<b>939</b>
4.	Camphene	2,94	954
5.	<b><math>\beta</math>-Pinène</b>	<b>7,31</b>	<b>979</b>
6.	<b><math>\beta</math>-myrcène</b>	<b>9,93</b>	<b>991</b>
7.	$\alpha$ -Phellandrene	3,21	1003
8.	$\delta$ -3-Carene	0,08	1011
9.	$\alpha$ -Terpinene	2,81	1018
10.	<b>Limonène</b>	<b>14,7</b>	<b>1029</b>
11.	<i>trans</i> -Ocimene	0,11	1033
12.	<i>(Z)</i> - $\beta$ -ocimene	0,23	1037
13.	<i>(E)</i> - $\beta$ -ocimene	0,9	1049
14.	$\gamma$ -terpinene	4,49	1060
15.	<i>p</i> -mentha-3,8-diène	0,14	1072
16.	2-Nonanone	0,31	1079
17.	$\alpha$ -Terpinolene	2,4	1089
18.	Linalool	0,16	1097
19.	1-Methyladamantane	0,09	1100
20.	Isoamylisovalerate	0,19	1104
21.	<i>n</i> -Amylisovalerate	T <sup>c</sup>	1108
22.	Fenchol	0,1	1115
23.	<i>cis</i> - <i>P</i> -2-Menthen-1-ol	0,08	1121
24.	Isopinocarveol	T	1148
25.	4-Terpineol	2,99	1176
26.	Cryptone	T	1187
27.	$\alpha$ -Terpineol	1,8	1189

28. Borneol	0,09	1196
29. Isoamyl caproate	0,33	1250
30. Vitispirane	0,26	1277
31. Bornyl acetate	1,63	1285
32. 2-Undecanone	0,93	1293
33. $\alpha$ -Cubebene	0,07	1340
34. $\gamma$ -Pyronene	0,05	1345
35. Ylangene	0,13	1371
36. $\alpha$ -Copaene	0,76	1377
37. $\beta$ -Bourbonene	T	1388
38. $\beta$ -Elemene	0,43	1391
39. Benzyl iso valerate	0,05	1395
40. $\beta$ -Caryophyllene	5,03	1421
41. Aromadendrene	0,28	1441
42. $\alpha$ -Amorphene	1,44	1442
43. Geranyl acetone	0,12	1455
44. $\alpha$ -Humulene	1,21	1457
45. <i>allo</i> -Aromadendrene	0,11	1463
46. Germacrene-D	2,13	1480
47. Valencene	0,15	1482
48. $\beta$ -Selinene	0,1	1498
49. $\alpha$ -Muurolene	0,83	1499
50. ( <i>E,E</i> )- $\alpha$ -Farnesene	0,78	1507
51. $\delta$ -Cadinene	3,82	1523
52. Cadina-1,4-diene	0,19	1532
53. $\alpha$ -cadinene	0,16	1539
54. $\alpha$ -Calacorene	0,13	1546
55. Elemol	0,17	1550
56. Nerolidol	0,14	1561
57. Germacrene B	0,1	1562
58. 3-Hexen-1-ol, benzoate, ( <i>Z</i> )-	0,19	1568
59. Caryophyllene oxide	1,01	1583
60. <i>T</i> -Muurolol	0,71	1642
61. $\beta$ -Eudesmol	0,73	1651
62. $\alpha$ -Cadinol	1,68	1654
63. Benzyl Benzoate	0,06	1753
64. Hexahydrofarnesyl acetone	0,37	1844
65. Octacosane	T	2800
<b>Total</b>	<b>97,65</b>	

Composés cités selon l'ordre d'éluion de la colonne HP-5 MS.

<sup>b</sup> Indexe de Réention

<sup>c</sup> T = trace, moins de 0.05 %.

Ces résultats sont cohérents avec certaines études et se distinguent d'autres. Des échantillons de l'HEPL provenant de différentes zones de la Méditerranée ont été caractérisés par la présence de l'un des monoterpènes suivants comme composant majoritaire:  $\alpha$ -pinène (17%, Tunisie) (Ben Douissa et *al.*, 2005), (16%, France) (Buil et *al.*, 1975), (16,1 à 25,3%, Italie) (Vidrich et *al.*, 2004), myrcène (25%, en Espagne et Sicile) (Calabro et Curro, 1974) (39,2%, Maroc) (Amhamdi et *al.*, 2009) et terpinène-4-ol (22%, Sardaigne) (Picci et *al.*, 1987), et D-3-carène (65%, Egypte) (DePooter et *al.*, 1991). Selon le composé prédominant, divers types de l'HEPL ont été trouvés.

Mecherara-Idjeri et *al.*, (2008) ont montré différents profils chimiques de l'HEPL après l'analyse de 17 échantillons provenant de différentes régions de l'Algérie, 15 de ces échantillons ont montré une prédominance de monoterpènes caractérisés principalement par  $\alpha$ -pinène, sabinène,  $\beta$ -pinène, myrcène,  $\alpha$ -phellandrène ou limonène, contrairement aux 2 autres échantillons dominés par sesquiterpènes caractérisés par  $\beta$ -caryophyllène.

Deux types de l'HEPL algérienne ont été mentionnés par Dob et *al.*, (2006) caractérisés par longifolène ou  $\alpha$ -pinène. Benyoussef et *al.*, (2005) ont signalé des taux élevés de sesquiterpènes ; trois types de l'HEPL algérienne ont été principalement caractérisés par terpinène-4-ol,  $\alpha$ -terpinéol et germacrène D. Ce qui est partiellement en accord avec d'autres huiles méditerranéennes comme des échantillons issus de la Turquie (Kivçak et *al.*, 2004), de l'Italie (Lo Presti et *al.*, 2008) et de la Corse (Castola et *al.*, 2000).

Divers facteurs peuvent jouer un rôle crucial dans la composition chimique, notamment les facteurs environnementaux tels que la géographie, la saison de la récolte (la longueur du jour ainsi que la température) et de l'état nutritionnel de la plante (Gardeli et *al.*, 2008).

Les terpènes et les terpénoïdes sont des composés actifs contre les bactéries (Amaral et *al.*, 1998), les champignons (Suresh et *al.*, 1997), les virus (Fujioka et *al.*, 1994; Sun et *al.*, 1996) et les protozoaires (Vishwakarma, 1990 ; Ghoshal et *al.*, 1996).

L'activité anti- *H. pylori* de l'HEPL peut être attribuée à ses composés majoritaires ;  $\alpha$ -pinène, limonène,  $\beta$ -myrcène et  $\beta$ -pinène. Plusieurs constituants des huiles essentielles présentent des propriétés antimicrobiennes importantes lorsqu'ils sont testés séparément (Kim et *al.*, 1995; Lambert et *al.*, 2001).

Cependant, il est prouvé que les huiles essentielles sont plus fortement antimicrobiennes que leurs composants majoritaires séparément isolés; ceci est expliqué par l'effet additif des composants mineurs qui semblent jouer un rôle significatif (Lattaoui et Tantaoui-Elaraki, 1994). La possibilité de renforcer leurs effets antimicrobiens naturels par l'addition de petites quantités d'autres conservateurs naturels peut être un moyen pour atteindre un équilibre entre l'acceptabilité sensorielle et efficacité antimicrobienne.

Il a été signalé que 60% des dérivés d'huiles essentielles examinés étaient inhibitrice des champignons tandis que 30% uniquement a réussi à inhiber les bactéries (Chaurasia et Vyas, 1997).

Le mécanisme d'action de terpènes n'est pas entièrement élucidé, mais il est le plus probable qu'ils impliquent la rupture de la membrane plasmique par des composés lipophiles. Par conséquent, ils ont constaté que l'augmentation du caractère hydrophile des diterpénoïdes par addition d'un groupe méthyle réduit considérablement leur activité antimicrobienne.

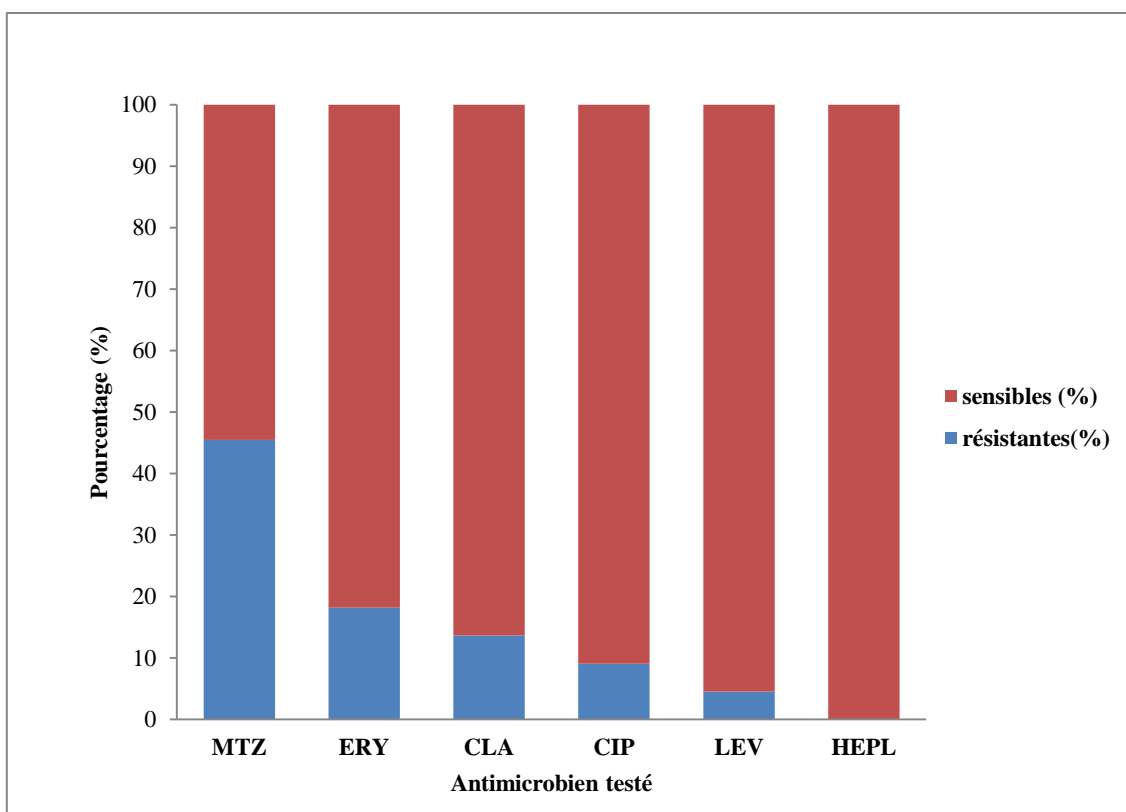
La plupart des huiles essentielles issues des épices et des plantes médicinales sont classées par la US Food and Drug Administration «généralement reconnus comme sûrs», indiquant que les consommateurs peuvent les prendre sans crainte. En conséquence, le rapport bénéfique / risque pour les huiles essentielles serait élevé.

D'autres avantages potentiels des huiles essentielles, contrairement aux antibiotiques, les bactéries ne développent pas de résistance aux huiles essentielles (Schmidt et *al.*, 1994).

### **7-2/ Caractérisation de l'activité anti- *Helicobacter pylori* de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus***

L'HEPL a été sélectionnée en vue d'une caractérisation de différentes activités biologiques ayant relation avec l'infection par *H. pylori*.

Les 22 souches cliniques sur lesquelles nous avons testés l'effet anti- *H. pylori* de l'HEPL présentaient des profils d'antibio-susceptibilité différents : 45.45% de souches étaient résistantes au métronidazole, 18.18% de souches étaient résistantes à l'érythromycine, 13.63% souches étaient résistantes à la clarithromycine, 9.09% de souches étaient résistantes à la ciproflaxacine et 4.54% de souches était résistantes à la levoflaxacine mais aucune souche testée ne présentaient de résistance à l'HEPL (figure 25).



**Figure 25:** Sensibilité des souches d' *H. pylori* aux antibiotiques et à l'huile essentielle de *P. lentiscus*.

Ces résultats s'avèrent encourageant pour évaluer l'effet anti- *H. pylori* de l'HEPL après une série de dilutions. Sachant que le diamètre d'inhibition pour l'huile pure est de  $32 \pm 1$  mm, il est alors de  $26,66 \pm 0,57$ ,  $19,67 \pm 0,57$  et de  $12,33 \pm 0,57$  mm pour l'huile diluée au 1/2, 1/4 et 1/8 dans du DMSO (v / v) respectivement (tableau 3).

Des tests de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) ont été réalisés afin de caractériser l'activité anti- *H. pylori* de l'HEPL et ainsi préciser son caractère bactériostatique ou bactéricide. La CMI de l'HEPL est de 1/5000 alors que la CMB s'affiche au 1/10000 (tableau 3).

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide de l'huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur à 4, l'huile est considérée comme bactéricide.

Le rapport CMB/CMI estimée pour l'HEPL est égal à 2 (tableau 3) et l'huile étudiée semble donc exercer une action bactéricide. Ces résultats valident l'utilisation traditionnelle de *P. lentiscus* dans le traitement des maux d'estomac.

Les grandes zones d'inhibition même après dilution, le pouvoir inhibiteur des souches résistantes ou encore multi-résistantes aux antibiotiques ainsi que l'effet bactéricide reflètent clairement la forte activité contre les différentes souches d'*H. pylori* de l'HEPL.

**Tableau 03** : L'activité de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* contre les souches d'*Helicobacter pylori*.

Moyenne des diamètres des zones d'inhibition d' <i>H. pylori</i> mm <sup>a</sup> pour les différentes concentrations				CMI	CMB	CMB/CMI
1(v/v)	1/2 (v/v)	1/4 (v/v)	1/8 (v/v)			
32,00 ± 1	26,66 ± 0,57	19,67 ± 0,57	12,33 ± 0,57	1/5000	1/10000	2

Les valeurs représentent les moyennes ± Ecart type

Ohno et *al.*, (2003) ont évalué l'action d'une panoplie d'huiles essentielles sur 13 souches cliniques d'*H. pylori*. L'étude a révélé une activité considérable contre les souches testées avec des huiles extraites de *Cupressus sempervirens*, *Juniperus communis*, *Melaleuca alternifolia*, *Lippia citriodora*, *Ocimum basilicum*, *Mentha piperita*, *Origanum majorana*, *Eucalyptus globulus*, *Ravensara aromatica*, *Citrus limonum*, *Cymbopogon citratus*, *Rosmarinus Officinalis* et *Lavandula latifolia*.

Le même profil de sensibilité a été observé par Deriu et *al.*, en 2007, qui ont étudié l'activité de l'huile essentielle de *Myrtus Communis* L. contre dix isolats cliniques d'*H. Pylori* ayant un profil résistant pour la triple thérapie au métronidazole, clarithromycine et levofloxacine.

Aouinti et *al.*, (2013) ont évalué l'activité anti-bactérienne de l'HEPL de diverses régions de l'est du Maroc contre six souches bactériennes. Tous les échantillons ont montré une activité forte à modérée contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Pneumonia* et *Salmonella sp* et une activité modérée à aucune activité contre *Pseudomonas* et *Streptococcus* avec des différences dans ce pouvoir d'une région à une autre.

Généralement, les principaux composants des huiles essentielles reflètent assez bien leur effet antibactérien. Les monoterpènes sont les composés les plus fréquents dans les huiles essentielles et ils possèdent une activité antimicrobienne (Knobloch et *al.*, 1989 ; Juliani et *al.*, 2002 ) et d'autres activités biologiques considérables (Delaquis et *al.*, 2000 ; Kim et *al.*, 2003), en particulier  $\alpha$ -pinène a prouvé son activité antibactérienne contre *E. coli* et *S. aureus* (Moghtader, 2009). Les énantiomères  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène ainsi que le limonène ont une forte activité antibactérienne (Magiatis et *al.*, 1999).

L'étude de l'activité de l'huile essentielle de *Sicilian lemon* (*Citrus lemon* Burm. Rutaceae) (Rozza et *al.*, 2011) a révélé une concentration minimale inhibitrice de 125  $\mu\text{g/ml}$ . En outre, les auteurs ont réalisé une analyse phyto-chimique pour identifier les composés présents dans l'huile. Environ 17 composés ont été identifiés, dont 13 ont été identifiés par chromatographie en phase gazeuse. Les auteurs caractérisent comme principal de l'huile essentielle le monoterpène limonène, ce qui équivaut à environ 70,75% du produit total. Par ailleurs, la présence de  $\beta$ -pinène a également été détectée à un taux de 13,19%. Le profil antimicrobien des deux composés majoritaires isolés a donné lieu à la CMI de 75  $\mu\text{g/ml}$  et 500  $\mu\text{g/ml}$  pour le limonène et le  $\beta$ -pinène respectivement. Ainsi, les résultats ont été en mesure d'attribuer au limonène le principal composé responsable de l'effet antibactérien contre les différentes souches *H. pylori*.

L'activité antimicrobienne démontrée par les terpènes est attribuée à leur interférence avec la structure et le fonctionnement de la membrane cellulaire par induction potentielle de changements dans la membrane, perte de matériel cytoplasmique et d'inhibition de la chaîne respiratoire (Nascimento et *al.*, 2007).

Des études visant à élucider l'activité anti-*H. Pylori* par les huiles essentielles ont été développées ces dernières années en raison de la nécessité d'alternatives dans le traitement des troubles découlant de ce type d'infections. Ce fait est justifié par l'augmentation du nombre de souches résistantes à la thérapie médicamenteuse standard utilisée dans la pratique clinique (Siqueira, 2007).

Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles essentielles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires. La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les

membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema et al., 1994). Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires (Carson et al., 2002 ; Ultee et al., 2002). Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire. Certains agents antimicrobiens détruisent la membrane plasmique de manière irréversible conduisant ainsi à la mort cellulaire par un processus lytique (Denyer et Hugo, 1991 ; Hamouda et Baker, 2000 ; Song et Kim, 2003 ; Razzaghi-Abyaneh et al., 2006).

Pour notre étude nous attribuons l'activité contre les différentes souches d' *H. pylori* au  $\alpha$ -pinène, au limonène et au le  $\beta$ -pinène présents à 15.47%, 14.7% et 7.31 % respectivement. Ces molécules ont été précédemment impliquées dans des effets antibactériens (Magiatis et al., 1999 ; Moghtader, 2009).

Selon nos résultats et l'analyse des études que nous venons de citer, nous pouvons prédire que l'efficacité antibactérienne de l'HEPL est due à la synergie d'un certain nombre de ses composants. Les composés majoritaires de cette huile ont des propriétés antimicrobiennes significatives contre les deux types de souches d'*H. pylori* ; sensibles et résistantes aux antibiotiques conventionnels.

Cela peut très bien être un nouveau traitement encourageant pour les pathologies induites par l'infection à *H. pylori*, ce serait une véritable alternative dans les pays ou régions où les antibiotiques ne sont pas facilement disponibles et où la résistance aux antibiotiques a réduit l'efficacité des traitements.

### **7-3/ La toxicité aigüe de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus***

Le test de toxicité aigüe a été réalisé sur des souris adultes par administration intra-gastrique (gavage) de l'HEPL. Sept lots homogènes ont été constitués, le lot 1 est constitué de souris (n = 10) sans traitement à l'HEPL, traitées au véhicule (NaCl à 0,9% contenant 0,1% de Tween 20). Les lots de souris 2, 3, 4 et 5, 6 et 7 ont reçu des quantités variables de l'HEPL 0.5 ; 1.5 ; 10 ; 50 ; 100 et 500 mg/kg respectivement, une seule fois pour le premier jour J1.

Nous n'avons noté aucune mortalité durant la période d'étude pour les doses étudiées, la DL50 dépasse alors la dose 500mg/kg (tableau 4).



Des observations des signes cliniques sont effectuées pendant différents intervalles de temps durant 7 jours. L'étude de la toxicité aiguë de l'HEPL sur des souris a montré une bonne tolérance à la solution de l'huile.

Les deux stades d'observations, J1 et J2-7, après administration de l'huile essentielle à des doses graduelles (0.5 ; 1.5 ; 10 ; 50 ; 100 ; 500 mg/kg) n'ont montré aucun symptôme clinique grave de souffrance durant les 7 jours d'observation. Quelques signes cliniques habituels sont observés pour les doses de 100 et 500 mg/kg comme l'anorexie, l'hypoactivité, l'asthénie pendant une courte durée. Ces quelques signes ont disparu vers le 3ème jour, et n'ont pas réapparu pendant les 4 jours restants (tableau 04).

**Tableau 04 :** Mortalité des souris en fonction de la dose administrée.

Lots	1	2	3	4	5	6	7	DL50
Nombre de souris	10	10	10	10	10	10	10	>500 mg /kg
Dose mg/kg	0	0,5	1.5	10	50	100	500	
Mortalité	0	0	0	0	0	0	0	
Signes cliniques	RAS	RAS	RAS	RAS	RAS	AN +HA	AN+HA+AS	

(RAS : rien à signaler, AN : anorexie, HA : hypoactivité ; AS : asthénie)

L'échelle de Hodge et Sterner permet ainsi de classer les toxicités en fonction des DL50 orale mesurées :

Jusqu'à 1 mg/kg ; la substance est extrêmement toxique

De 1 à 50 mg/kg ; la substance est hautement toxique

De 50 à 500 mg/kg ; la substance est modérément toxique

De 500 à 5 000 mg/kg ; la substance est légèrement toxique

De 5 000 à 15 000 mg/kg ; la substance n'est presque pas toxique

Plus de 15 000 mg/kg ; la substance est relativement inoffensive.

Selon cette échelle, l'HEPL n'appartient pas aux trois premières catégories et serait donc légèrement toxique ou pas toxique puisque nous n'avons noté aucune mortalité jusqu'à la dose de 500mg/kg.

Kartalis et Chios Gum Mastic Growers Association (2003), ont évalué la toxicité par voie orale de l'HEPL sur des rats par la détermination de la DL50 qui a dépassé 5g/kg, basée sur 3 morts sur 10 rats à cette dose.

Il est à signaler qu'un test cutané réalisé avec un patch de 48 h à 8% de l'HEPL dans la vaseline sur le dos de 61 volontaires n'a pas provoqué d'irritations (Kartalis et Chios Gum Mastic Growers Association, 2003).

Pour confirmer la nature non toxique d'un produit d'origine végétale, on doit prendre en considération plusieurs facteurs qui peuvent modifier son profil de toxicité y compris le stade de croissance, de maturité de la plante, la partie spécifique utilisée de la plante (feuilles, racines, graines), la saisonnalité, variation de l'abondance relative des composés photochimiques, les conditions de stockage du produit (fraichement prélevé ou stocké pour une longue période), etc...

Pour équilibrer les effets de ces variables, les études devraient être menées avec l'extrait végétal fait avec des plantes entières, fraîchement récoltées de différents stades de croissance. Des études supplémentaires à long terme avec des doses progressives sont nécessaires pour se prononcer sur les effets indésirables à long terme avec l'utilisation d'un grand effectif d'animaux pour mieux comprendre la cause des perturbations notamment celles de la fonction rénale.

Hormis que les doses que nous avons testées peuvent être considérées comme non toxiques. Elles n'ont pas causé de létalité et de changement dans le comportement général des animaux.

Un soutien supplémentaire vient du fait que les animaux sont plus sensibles à la toxicité orale que l'homme, le lentisque est inclus dans la liste des plantes qui sont acceptables pour une utilisation dans les aliments l'homme (Tahraoui et *al.*, 2010).

Au vu de ces résultats, nous pouvons dire que l'HEPL ne présente pas de toxicité aiguë dans ces conditions de travail. L'absence de signes cliniques graves et de souris mortes durant les 7 jours d'observation, indique que l'HEPL administrée par voie orale est dépourvue de toxicité aiguë chez les souris.

#### 7-4/ L'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*

L'activité anti-inflammatoire de l'HEPL a été évaluée selon la méthode de Young et De Young (1989) et Delaporte et al, (2004). Elle consiste à mesurer l'inhibition de l'œdème induit par 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA).

Les animaux du lot contrôle ont uniquement reçu une application locale du TPA, les autres lots ont reçu une application de l'HEPL à 1mg et à 10mg immédiatement après l'application du TPA.

Les résultats du test de l'œdème induit par le TPA sont présentés dans le tableau 5. l'HEPL a inhibé de manière significative ( $P < 0,05$ ) l'œdème de l'oreille avec les deux doses de 1 et 10 mg / oreille de 35.26% et 45.93 % respectivement (tableau 05).

L'indométacine réduit l'inflammation à 38.32%, ce qui est significativement supérieur ( $P < 0,05$ ) à l'effet anti-inflammatoire (35.26%) exercé par la dose de 1mg mais significativement ( $P < 0,05$ ) inférieur (45.93 %) à la dose de 10mg de l'HEPL. L'indométacine est un inhibiteur de la cyclo-oxygénase, elle est utilisée dans cet essai comme un anti-inflammatoire de référence.

**Tableau 05:** L'activité anti-inflammatoire topique de l'huile essentielle de *P. lentiscus*.

Groupe	Œdème (mg) moyenne $\pm$ écart-type	Inhibition (%)
TPA	7.620 $\pm$ 0.164	–
HEPL (1 mg/Oreille)	4.933 $\pm$ 1.917	35.26
HEPL (10 mg/Oreille)	4.120 $\pm$ 0.084	45.93
Indométacine (0.5mg)	4.700 $\pm$ 0.283	38.32

Résultat significativement différent du contrôle  $P < 0,05$ .

Le TPA induit une réaction inflammatoire aiguë caractérisée par une vasodilatation, infiltration des leucocytes polynucléaires dans les tissus, une augmentation de l'IL-1 $\beta$  et la formation de l'œdème. Comme elle augmente l'activité de la xanthine oxydase et la peroxydation lipidique (Rahman et al., 2011). L'épaisseur de l'œdème atteint son maximum 6 heures après l'application (Michel et al., 2005).

Ces changements sont déclenchés par la protéine kinase C (PKC) qui favorise une augmentation de l'activité de la phospholipase A2 (PLA2) (Wang et *al.*, 2002 ; Rahman et *al.*, 2011). La PLA2 catalyse l'hydrolyse des phospholipides membranaires en acide arachidonique, ce dernier est impliqué dans la synthèse des eicosanoïdes, prostaglandines et leucotriènes, ce qui constitue la première étape dans la réaction inflammatoire (Murakami et *al.*, 2005; Sato et *al.*, 2009).

En outre, la PKC favorise également la sécrétion et l'activation de plusieurs médiateurs immunitaires comme les cytokines et les chemokines qui augmentent et maintiennent la réponse inflammatoire de la peau (Denning, 2004). Ces phénomènes se traduisent principalement par une inflammation ou une progression tumorale (Goel et *al.*, 2007).

Evans et *al.*, (1987) ont montré que chez les souris, le meilleur test pour évaluer l'activité pro-inflammatoire de l'ester de phorbol est la détermination de l'érythème sur la peau. L'apparition de l'érythème ne semble pas dûe à un effet direct des esters de phorbol sur la peau, mais à la libération, sous l'effet des esters de phorbol, de médiateurs endogènes de l'inflammation au niveau de la micro vascularisation.

Ce modèle d'étude est alors parfait pour l'évaluation des produits naturels, de plus l'application locale évite le métabolisme des drogues ou extraits testés. Nous choisissons cette méthode de dépistage pour vérifier si l'HEPL est capable de réduire la réaction inflammatoire en réponse à un agent phlogistique, le TPA.

Certains auteurs suggèrent que les valeurs plus de 1mg / oreille ne sont pas assez intéressantes pour poursuivre la purification des composants actifs (Garcia et *al.*, 1999). Néanmoins, il doit être considéré que cela est un extrait brut et l'indométacine est un composé pur.

Selon Conforti et ses collaborateurs (2008), la diminution de l'œdème de l'oreille est probablement dûe à la présence de composés dotés d'activité anti-oxydante, sachant que les espèces oxygénées réactives produites au cours de l'inflammation par les cellules phagocytaires, et durant le métabolisme de l'acide arachidonique peuvent également activer la phospholipase A2 (Linda et *al.*, 2004; Geronikaki et Gavalas, 2006 ). Les phytostérols trouvés dans les plantes, tel que le  $\beta$ -sitostérol ou le stigmastérol, ont une activité anti-inflammatoire topique vis-à-vis du TPA (Garcia et *al.*, 1999).

De nombreuses plantes médicinales présentent une propriété anti-inflammatoire topique (Kim et *al.*, 2004; Mujumdar et Misar, 2004; Panthong et *al.*, 2004).

Il a été démontré que les extraits de *Cordia verbenacea* et son huile essentielle présentent une activité anti-inflammatoire dans différents modèles d'inflammation (Sertié et *al.*, 2005). Parmi les principaux constituants de l'huile essentielle de *C. verbenacea* est  $\alpha$ -pinène (De Carvalho et *al.*, 2004)

Sayyah et *al.*, (2003) ; Chao et *al.*, (2005) et Miguel, (2010) ont rapporté que les huiles essentielles riches en  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, le phellandrène,  $\alpha$ -sabinène possèdent une activité anti-inflammatoire. Ces principes anti-inflammatoires sont contenus dans l'HEPL qui présente alors une efficacité pour le traitement de divers états inflammatoires.

Bacanli et *al.*, (2015) ont montré que le limonène présente une forte activité anti-inflammatoire en inhibant les cytokines, la production des ERO et l'inactivation de la migration des éosinophiles, Ce qui est d' une efficacité potentielle pour le traitement de l'asthme bronchique.

L' $\alpha$ -pinène est un composé anti-inflammatoire qui prévale dans les huiles essentielles de diverses plantes. Une injection intra-péritonéale d' $\alpha$ -pinène chez la souris a conduit à l'inhibition de la COX-2 et au soulagement de la douleur (Pan et *al.*, 2015).

Les composés des huiles essentielles peuvent avoir un effet anti-tumoral, sachant que les tumeurs sont irriguées par les capillaires sanguins (angiogenèse), qui fournissent les nutriments. Les composés des huiles essentielles, tels que les terpènes et certains polyphénols, peuvent réduire et prévenir la formation de réseau alimentant la tumeur, c'est le cas du limonène (Lu et *al.*, 2004). Beaucoup de constituants des huiles essentielles inhibent cette voie et bloquent ainsi le développement du cancer ; c'est le cas du limonène (Chaudhary et *al.*, 2012). Le limonène conduit également à la diminution des facteurs de croissance tels que le mitogène IGF-II, et active les facteurs de stabilisation de la cellule tels que le TGF- $\beta$  (Loza-Tavera et *al.*, 1999). Dans les cellules tumorales mammaires, ces phénomènes induisent, par exemple, l'arrêt du cycle cellulaire (en phase G1), suivi de la mort des cellules tumorales (Loza-Tavera et *al.*, 1999).

L'ensemble de nos analyses mène à attribuer l'activité anti-inflammatoire de l'HEPL à ses composés majoritaires notamment :  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, et myrcène par l'inhibition de la COX-2 et au limonène par son effet anti-angiogénique. D'autre part, nous devons mentionner

que dans ce travail, nous avons testé un modèle aigüe, il est donc important d'explorer l'activité anti-inflammatoire chronique par différentes voies d'administration afin de déterminer son potentiel thérapeutique anti-tumoral. Enfin, il doit être pris en compte que ceci est une autre propriété pharmacologique d'une grande importance qui s'ajoute à l'HEPL.

#### **7-5/ L'activité gastro-protectrice de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus***

L'activité antiulcéreuse ou gastro-protectrice de l'HEPL a été évaluée par son administration orale aux rats avant un agent ulcerogène, l'éthanol qui induit des ulcères mesurables.

L'effet préventif de l'HEPL contre l'ulcération induite par l'éthanol est déterminé par l'estimation des indices d'ulcères après l'analyse des photos des estomacs des rats des différents lots par le logiciel ImageJ ainsi que par l'analyse des coupes histologiques. Pour observer et mesurer ces ulcères, les animaux sont disséqués et les estomacs sont prélevés et ouverts le long de la grande courbure.

L'administration intra-gastrique (gavage) d'1 ml d'éthanol à 90% aux animaux a induit des ulcères gastriques significatifs ( $P < 0.05$ ) avec un indice d'ulcère de  $2.4 \pm 0.6$ . Le prétraitement à l'HEPL a inhibé de manière significative ( $P < 0.05$ ) et dose dépendante les ulcères induits par l'éthanol avec des indices d'ulcère de  $1.3 \pm 1.0$ ,  $1.0 \pm 0.8$  et  $0.7 \pm 0.1$  pour les doses de 50, 100 et 200 mg/ kg respectivement (Tableau 6).

Les pourcentages d'inhibition significatives ( $P < 0.05$ ) des lésions gastrique étaient alors de 41.66%, 45.83%, et 58.33% pour les doses de 50, 100 et 200 mg/ kg respectivement (Tableau 6).

Le prétraitement à l'Oméprazole, inhibiteur de la pompe à protons qui réduit la sécrétion acide de l'estomac, a révélé un indice d'ulcère significatif ( $P < 0,05$ ) de  $1.4 \pm 0$  ce qui correspond à un taux d'inhibition des lésions gastriques significatif ( $P < 0,05$ ) de 58.40% (Tableau 6).

Ces résultats indiquent que l'HEPL exerce un effet gastro-protecteur. L'inhibition maximale (58.33%) obtenue par le prétraitement de l'HEPL à 200 mg/kg est comparable au prétraitement au médicament de référence l'oméprazole (58.40 %).

L'HEPL a également réduit de manière significative ( $P < 0,05$ ) la surface ulcérée et l'indice d'ulcère par rapport au contrôle. Ceci indique que L'HEPL assure la cytoprotection gastrique en stimulant la synthèse du mucus.

**Tableau 06 :** Effet du prétraitement de l'huile essentielle de *P. lentiscus* sur les lésions gastriques induites par l'éthanol sur des rats.

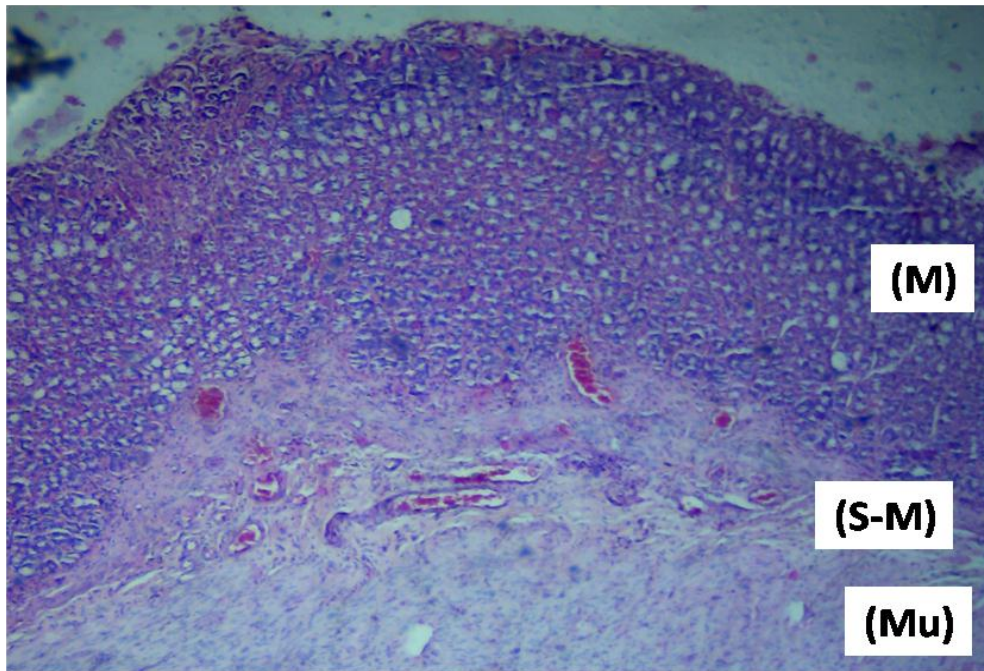
Groupe traité (mg/ kg)	Moyenne des indices des lésions gastriques ± Ecart type	Inhibition des lésions(%)
Ethanol 1ml à 90%	2.4 ± 0.6	0
Omeprazole (20)	1.4 ± 0*	58.40
HEPL (50)	1.3 ± 1.0*	41.66
HEPL (100)	1.0 ± 0.8*	45.83
HEPL (200)	0.7 ± 0.1*	58.33

\* Résultat significativement différent du contrôle  $P < 0,05$ .

L'étude histologique des estomacs a inclus les paramètres concernant la muqueuse notamment la desquamation épithéliale et l'endommagement des glandes de la muqueuse gastrique ; des paramètres de la sous-muqueuse tels que l'œdème et l'infiltration des leucocytes et des paramètres de la musculature. L'apparition d'hémorragie est un paramètre qui s'ajoute à l'analyse.

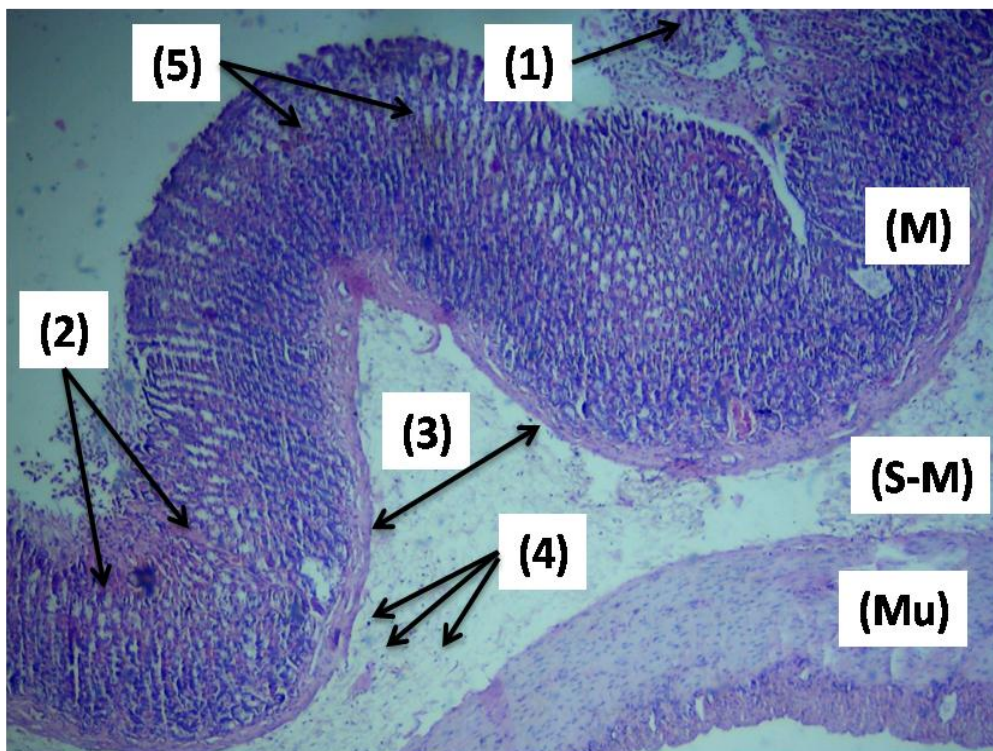
La figure 26 représente la structure histologique de l'estomac physiologique qui est parfaitement intacte. Elle est formée de trois couches bien distinctes, la muqueuse (épithélium + glandes), la sous muqueuse et la musculature.

La figure 27 représente la structure histologique de l'estomac avec un ulcère induit à l'éthanol. L'étude histologique montre une très forte desquamation épithéliale, la destruction des glandes, une très forte inflammation de la sous-muqueuse, une importante infiltration des leucocytes et des hémorragies.



**Figure 26:** Microphotographie de la structure histologique de l'estomac physiologique.

(M : muqueuse, S-M : sous-muqueuse, Mu : Musculeuse).



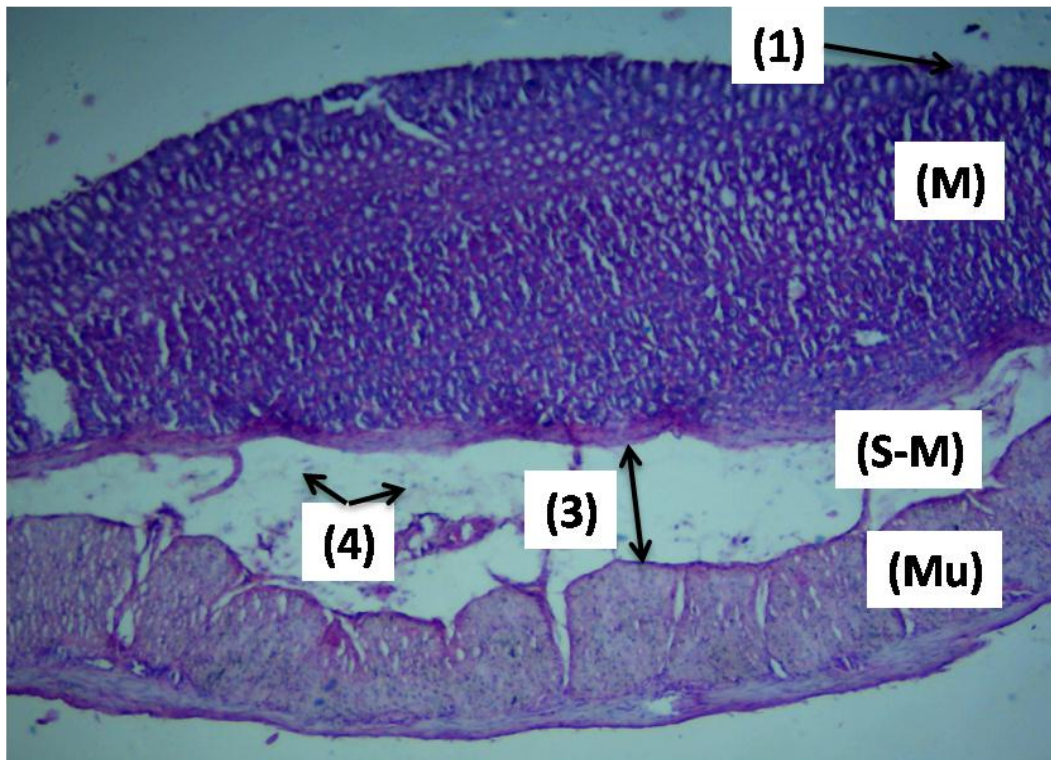
**Figure 27:** microphotographie de la structure histologique de l'estomac avec un ulcère induit à l'éthanol.

(M : muqueuse 1 : desquamation épithéliale, 2 : endommagement des glandes ; S-M : sous-muqueuse : 3 : œdème, 4 : infiltration de leucocytes ; Mu : Musculeuse ; 5 : hémorragie).



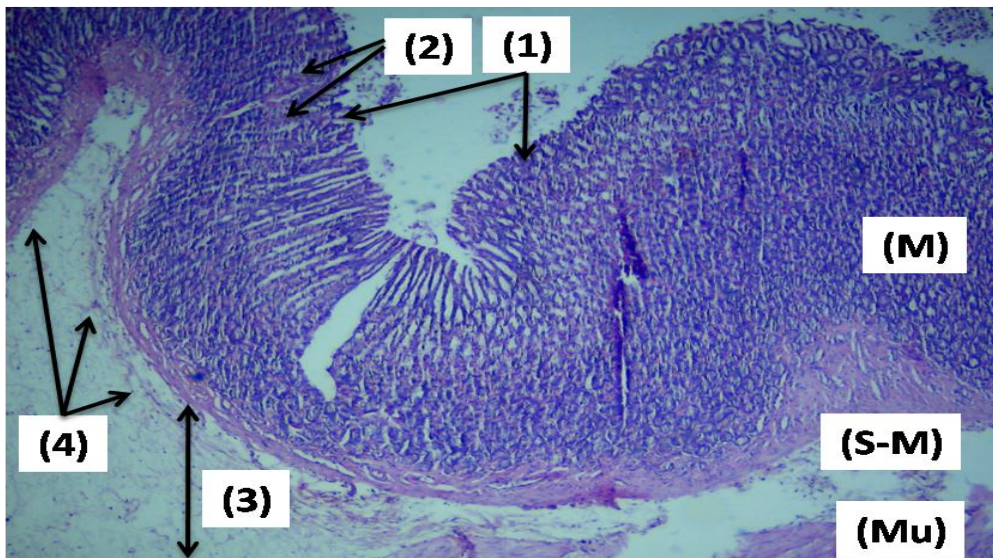
La figure 28 représente la structure histologique de l'estomac avec un ulcère induit à l'éthanol et traité à l'oméprazole. L'étude histologique montre une légère desquamation épithéliale, des glandes intactes, une inflammation bien visible de la sous-muqueuse, une faible infiltration des leucocytes et une absence totale des hémorragies.

La figure 29 représente la structure histologique de l'estomac avec un ulcère induit à l'éthanol et traité avec 100 mg/kg de l'HEPL. L'étude histologique montre une légère desquamation épithéliale, un léger endommagement des glandes, une inflammation bien visible de la sous-muqueuse, une faible infiltration des leucocytes et une absence totale des hémorragies.



**Figure 28:** microphotographie de la structure histologique de l'estomac avec un ulcère induit à l'éthanol et traité à l'oméprazole.

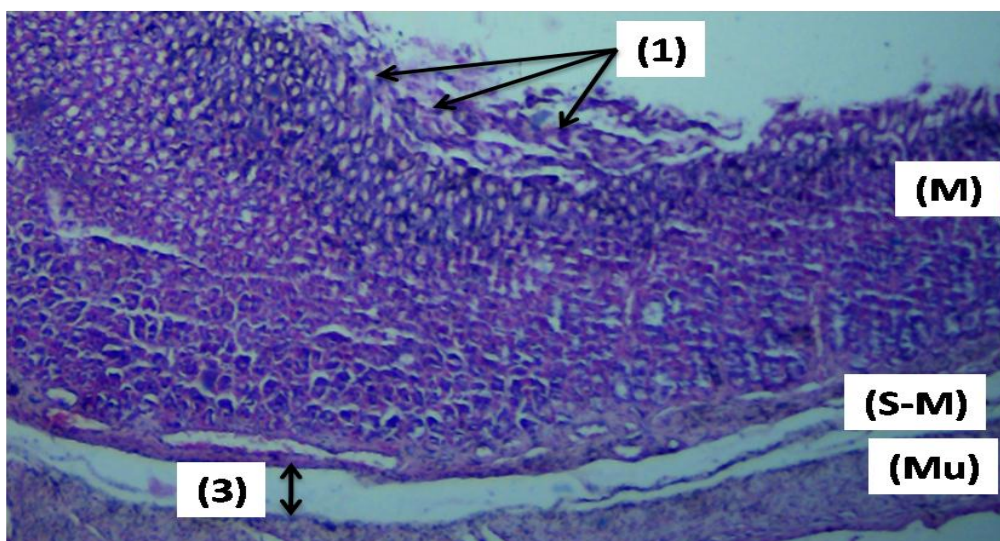
(M : muqueuse 1 : desquamation épithéliale ; S-M : sous-muqueuse : 3 : œdème, 4 : infiltration de leucocytes ; Mu : Musculeuse).



**Figure 29:** microphotographie de la structure histologique de l'estomac avec un ulcère induit à l'éthanol et traité avec 100 mg/kg d'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*.

(M : muqueuse 1 : desquamation épithéliale, 2 : endommagement des glandes ; S-M : sous-muqueuse : œdème, 4 : infiltration de leucocytes ; Mu : Musculeuse).

La figure 30 représente la structure histologique de l'estomac avec un ulcère induit à l'éthanol et traité avec 200 mg/kg de l'HEPL. L'étude histologique montre une légère desquamation épithéliale, des glandes intactes, une faible inflammation de la sous-muqueuse, aucune infiltration des leucocytes et une absence totale des hémorragies.



**Figure 30:** microphotographie de la structure histologique de l'estomac avec un ulcère induit à l'éthanol et traité avec 200 mg/kg d'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*.

(M : muqueuse 1 : desquamation épithéliale ; S-M : sous-muqueuse : 3 : œdème ; Mu : Musculeuse).

De manière générale le traitement de l'ulcère par l'huile essentielle ou l'oméprazole permet une bonne protection de l'estomac et la diminution significative ( $P < 0,05$ ) des scores des ulcères.

Nous observons que la dose de l'huile essentielle utilisée influence de manière importante la structure histologique de l'estomac. La dose 200 mg/kg comparée à 100 mg/ml, permet d'assurer la protection des glandes de la muqueuse, de diminuer l'œdème de la sous-muqueuse de manière plus importante, elle permet aussi d'éviter l'infiltration des leucocytes.

De plus, le traitement de l'ulcère par l'HEPL à 200 mg/kg permet une activité gastro-protectrice plus importante que le médicament de référence (oméprazole), en présentant une diminution importante de l'œdème. Cette diminution plus importante de l'œdème est due à l'activité anti-inflammatoire très importante de l'HEPL.

Le modèle de l'ulcère induit par l'éthanol est largement utilisé dans l'expérience *in vivo* pour évaluer l'activité gastro-protectrice de différents agents de ressources botaniques.

On a constaté que les plaies gastriques après traitement à l'éthanol sont induites par son effet toxique direct et indirect par le biais de différents mécanismes physiopathologiques. L'éthanol absolu est l'une des solutions ulcérogéniques les plus dangereuses. Non seulement, il a une action corrosive sur la muqueuse gastrique mais il provoque aussi la nécrose cellulaire soit en entraînant un manque réduit du flux sanguin gastrique, soit en oxydant la membrane plasmique des cellules. En plus, l'alcool provoque la congestion de la muqueuse (Apfelbaum et Roman, 2009).

Expérimentalement, l'administration intra-gastrique de l'éthanol a été reconnue pour produire des bandes hémorragiques allongées, des œdèmes sous-muqueux étendus, une friabilité de la muqueuse, infiltration des cellules inflammatoires et la perte de cellules épithéliales. De plus, l'alcool a une triple action inductrice d'ulcères, il érode la muqueuse, provoque sa congestion et provoque la nécrose cellulaire (Sherwood, 2006 ; Apfelbaum et Roman, 2009).

Sachant que les cyclo-oxygénases sont des enzymes qui interviennent dans la biosynthèse des prostaglandines, ces dernières stimulent la sécrétion du mucus et réduit le flux sanguin (Selling et al., 1987 ; Whittle, 1997). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'indométacine, inhibe la cyclo-oxygénase, par conséquent la production du mucus (MacNaughton et Cushing, 2000). Cette action inhibitrice expose la muqueuse, qui se trouve

presque nue, sans défense. Ceci permet à l'acide et/ou l'alcool d'attaquer sévèrement la paroi gastrique et de générer les ulcères.

L'HEPL exercerait une protection physique sur le mucus en renforçant les liaisons entre les cellules de la muqueuse gastrique, de ce fait empêche les protons  $H^+$  de diffuser dans la paroi gastrique et d'induire les ulcères. Ces résultats rejoignent l'hypothèse émise par Tan et *al.*, (2002) pour l'extrait des feuilles d'*Ocimum suave*.

Par son effet antisécrétoire, l'oméprazole offre une certaine protection à la muqueuse gastrique. Il a été largement utilisé comme inhibiteur d'acide dans le traitement des troubles liés à la sécrétion d'acide gastrique (Li et *al.*, 2004). Les résultats de Takayama et *al.*, (2011) ont démontré que l'action gastro-protectrice des huiles essentielles est proportionnelle à une augmentation de la production de mucus gastrique induite par les taux de PGE2 (Takayama et *al.*, 2011). Les Cox 1 sont produits dans de nombreux organes et sont impliqués dans la synthèse de la PGE2 au niveau de la muqueuse gastrique (Frolich, 1997). L'absence des prostaglandines est généralement considérée comme responsable de l'augmentation des lésions gastriques (Mignon, 1992).

En plus de l'éthanol, les AINS sont également responsables de l'ulcère humain. Cependant, l'impact de l'efficacité de ce mécanisme thérapeutique s'avère commun (Vane, 1971), à savoir, leur nature acide et l'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines par le cox 1; qui demeure cependant une cause majeure de mortalité, engendrée par leur effet indésirable (Lichtenstein et *al.*, 1995 ; Brater, 2002). Le cas parfait est de développer de nouveaux inhibiteurs de cox qui maintiendraient les propriétés thérapeutiques des AINS sans conserver leurs effets indésirables (Jouzeau et *al.*, 1997), ce qui est le cas de l'huile essentielle de *P. lentiscus*.

En fait, la capacité de cette huile est d'accélérer le processus de guérison de l'ulcère peut-être attribuée à sa possibilité de stimuler la synthèse de PGE2. Les résultats ont été confirmés par l'examen histo-pathologique (figure 29 et 30). En effet, les rats du groupe témoin (figure 27) ont montré une perturbation importante de l'épithélium de surface et une nécrose hémorragique, ainsi qu'une perte de la couche épithéliale, un œdème évident et une infiltration des leucocytes. Cependant, les rats prétraités avec de l'huile essentielle (figure 29 et 30) et à l'oméprazole à 20 mg/kg (Figure 28) ont montré l'amélioration des paramètres histologiques par rapport au groupe témoin.



Il est bien connu que l'ulcère gastroduodéal provient aussi du déséquilibre entre des facteurs de protection et des facteurs agressifs des muqueuses et de nombreux agents gastro-protecteurs agissent en améliorant les réponses cellulaires ; en augmentant la résistance des muqueuses ou en diminuant les facteurs agressifs.

Le stress oxydatif a été reconnu comme l'un des principales causes pathogènes, ce qui implique l'induction et l'aggravation de l'ulcère gastrique. Il a été établi que le stress oxydatif et la diminution de molécules anti-oxydantes endogènes sont impliqués dans le développement de l'effet délétère direct et immédiat des détériorations induites par l'éthanol sur la muqueuse gastrique

Beaucoup de plantes médicinales montrent dans leur constitution chimique des flavonoïdes, des triterpénoïdes et des tanins qui protègent la muqueuse de l'estomac par l'induction de mécanismes gastro-protecteurs ou agissant comme antioxydants naturels (Repetto et Llesuy, 2002).

Il a été mentionné que divers terpènes exercent leurs effets gastro-protecteur en augmentant la synthèse de prostaglandines *in vivo* (Lewis et Hanson, 1991; Matsuda et al., 2003; Pongpiriyadacha et al., 2003). De nombreux terpènes ont été rapportés comme étant des composés gastro-protecteurs (Lewis et Hanson, 1991; Sepúlveda et al., 2005; Rodríguez et al., 2006).

Les huiles essentielles de *Croton sonderianus* (Barros, 2003; Oliveira et al., 2004), *Amomum sublatum* (Jafri et al., 2001), *Nigella sativa* (El-Abhar et al., 2003) et *Croton cajucara* (Hiruma-Lima et al., 2000) ont présenté des activités protectrices de la muqueuse.

Dans ces modèles, la cytoprotection est évaluée par la réduction ou l'absence des lésions macroscopiquement visibles. Les résultats confirment que l'agent nécosant, éthanol, produit de graves lésions gastriques. L'extension et la gravité des dommages gastriques induits par l'éthanol sont liées à une action oxydante, à l'augmentation de la peroxydation lipidique et à la génération de radicaux libres. La guérison des ulcères gastriques est un événement très complexe et implique la migration des cellules épithéliales et la prolifération, de la reconstruction des glandes gastriques, l'angiogenèse, ....

L'effet gastro-protecteur ou anti-ulcérogène de l'huile essentielle de *P. lentiscus* serait dû à l'action de ses composés majoritaires ou leurs synergies avec les autres composés. Il a été signalé que le limonène et  $\beta$ -myrcène présentent une action des agents antiulcéreux

classiques, leurs actions antiulcéreuses et cicatrisantes sur les ulcères préexistants est peut être une alternative prometteuse dans le traitement des processus ulcératifs. Leur action sur les ulcères préétablis était similaire à l'omeprazole, un médicament largement utilisé pour le traitement des ulcères gastriques. Ces données suggèrent que la production de mucus est impliquée dans l'effet gastro-protecteur du limonène et de la  $\beta$ -myrcène, qui peut être dû à une stimulation de la production de PGE2 (Moraes et *al.*, 2009 ; Bonamin et *al.*, 2014).

En plus de cet effet, le limonène peut agir en stimulant la production des éléments protecteurs contre les agents agressifs à la barrière épithéliale. Par exemple, il rétablit le niveau de réduction de la glutathion-peroxydase, de la catalase, du glutathion et de la réductase (Chaudhary et *al.*, 2012 ; Bouyahya et *al.*, 2016). La glutathion-S-transférase est parmi les enzymes les plus importants, dont l'activité est augmentée de 30 % par l'action des terpénoïdes tels que le limonène (Chaudhary et *al.*, 2012 ; Bouyahya et *al.*, 2016), et c'est le composé majoritaire retrouvé dans l'huile essentielle de *P. lentiscus*.

L'interaction d' *H. pylori* avec la muqueuse gastrique est suivie par plusieurs événements clés liés à la pathogenèse, (1) une réponse inflammatoire à la libération de diverses cytokines et les espèces réactives à l'oxygène, (2) l'atrophie glandulaire après l'infection à long terme et l'interaction de l'hôte et (3) les changements de la prolifération cellulaire tels que la dysplasie et la métaplasie (Holian et *al.*, 2002).

Parmi les cytokines inflammatoires, l'interleukine-8 (IL-8) est une des cytokines les plus critiques induisant une réponse inflammatoire de l'hôte induite par l'infection à *H. pylori*, qui est également un chimiotactique puissant des neutrophiles (Crabtree, 1996; Foryst-Ludwig et *al.*, 2004). La sécrétion de l'IL-8 à partir de cellules épithéliales gastriques infectées peut conduire à la production et la libération d'enzymes protéolytiques affectant finalement l'intégrité de la muqueuse (Yoshida et *al.*, 1993).

Le stress oxydatif est une autre caractéristique induite par l'infection à *H. pylori*. Des niveaux amplifiés d'espèces réactives de l'oxygène ont été détectés dans les cellules épithéliales gastriques qui pourraient conduire à la prolifération épithéliale altérée et des dommages oxydatifs à l'ADN (Ding et *al.*, 2007).

Parmi les ERO, l'anion superoxyde a été considéré comme un facteur important dans le déclenchement des réponses des cellules de la muqueuse gastrique contre *H. pylori* (Yoshida et *al.*, 1993; Teshima et *al.*, 1998).

L'éradication d' *H. pylori* est considérée comme importante dans l'accélération de la guérison et la prévention de la récurrence de maladies gastro-intestinales, particulièrement l'ulcère gastro-duodéal.

Les principaux obstacles de la réussite du traitement sont le manque de respect des schémas thérapeutiques, les effets secondaires indésirables, les contre-indications, les coûts importants et le développement de souches d' *H. pylori* résistantes aux antibiotiques (Ali et al., 2005). Une augmentation de la résistance à la clarithromycine a été observée dans des souches d' *H. pylori* infectants des sujets jeunes et âgés (Vega et al., 2010).

L'infection par *H. pylori* est associée à une augmentation de la production d'espèces réactives à l'oxygène à la muqueuse gastrique. Ceci peut expliquer en partie la capacité d' *H. pylori* à induire des lésions de la muqueuse, ce qui, à long terme, peut conduire à un cancer gastrique par les étapes intermédiaires de la gastrite atrophique et la métaplasie intestinale. La capacité de promouvoir le stress oxydatif semble surtout liée à l'état de CagA+, ce qui est cohérent avec l'idée que les souches d' *H. pylori* CagA + sont responsables d'inflammation gastrique plus grave et de risque du cancer d'estomac supérieur (Wong et al., 2004 ; Matsumoto et al., 2007).

Ainsi, un agent qui pourrait moduler ces événements clés pourrait proposer une stratégie efficace pour prévenir les troubles pathologiques induites par *H. pylori*. Ce qui a été réalisé dans cette étude ; caractérisation d'une source naturelle riche en molécules bioactives possédant un effet bactéricide contre de nombreuses souches d' *H. pylori*, de fortes activités anti-oxydante, anti-inflammatoire et anti-ulcérogénique.

Des études antérieures ont montré que certains composants pourraient être utiles dans l'atténuation du processus inflammatoires lié à l'infection par *H. pylori* tels que la curcumine et le resvératrol (Foryst-Ludwig et al., 2004; Zaidi et al, 2009b,).

En outre, les effets gastro-protecteurs de *Phyllanthus urinaria* et des extraits de ginseng rouge pour les cellules infectées par *H. pylori* ont été signalés (Park et al., 2007; Lai et al., 2008).

Les affections gastro-intestinales sont une des causes les plus importantes de morbidité et les produits pharmaceutiques utilisés pour ces maladies peuvent produire de nombreux

effets indésirables. Ainsi, les composés naturels qui possèdent une activité antiulcéreuse peuvent être d'une importance particulière.

Il est important de signaler que l'un des effets secondaires les plus importants de médicaments anti-inflammatoires classiques est leur activité ulcérogène.

On peut suggérer que par rapport à sa faible toxicité ainsi que ses propriétés biologiques, l'HEPL pourrait avoir un potentiel préventif et/ou thérapeutique idéal pour le traitement de maladies gastro-intestinales.

Nos résultats démontrent que l'HEPL a une très bonne tolérabilité et donne une excellente protection gastrique, le plus probablement issu du pouvoir antioxydant piègeur de radicaux par ses constituants actifs majoritaires (limonène, pinène et myrcène).

Nous avons examiné une série d'activités biologiques de l'HEPL en relation avec les perturbations induites par l'infection à *H. pylori*. Après sa colonisation de l'estomac, *H. pylori* induit une inflammation chronique pouvant évoluer vers des lésions ulcéreuses de la muqueuse gastrique ainsi qu'un stress oxydatif par la diminution des défenses anti-radicalaires et l'augmentation des espèces réactives à l'oxygène.

L'HEPL et ses composés majoritaires (limonène, pinène et myrcène) exercent un effet bactéricide contre les souches d'*H. pylori* dû à leur interférence avec les composés de la membrane plasmique; une activité anti-oxydante résultante de sa haute teneur en monoterpènes et leur effet piègeur de radicaux libres ; un effet anti-inflammatoire exercé par  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, et myrcène par l'inhibition de la COX-2 et par le limonène grâce à son effet anti-angiogénique ; une activité antiulcéreuse par la protection physique de la muqueuse gastrique, la stimulation de la synthèse de prostaglandines (PGE2) exercée par le  $\beta$ -myrcène et le limonène qui agit aussi en stimulant la production des éléments protecteurs contre les agents agressifs de la barrière épithéliale.

L'ulcère est associé à une situation de stress oxydatif et à un état inflammatoire. L'huile essentielle agit contre l'ulcère non seulement par son effet gastro-protecteur mais aussi par ses activités anti-oxydante et anti-inflammatoire. Nous avons ainsi caractérisé une source naturelle locale de molécules bioactives d'un intérêt potentiel contre l'infection par *H. pylori*.



### Conclusion et perspectives

La haute prévalence mondiale, variant en fonction des populations même au sein d'un même pays, les taux de morbidités et de mortalités associées inquiétantes orientent les attentions vers la recherche d'une meilleure compréhension des aspects épidémiologiques afin de garantir une amélioration de la prise en charge des patients infectés par *H. pylori*.

Les résultats de cette étude mentionnent une forte prévalence de patients infectés par *H. pylori* au sein de la population étudiée à 70.5%, cette prévalence a varié selon l'âge et la pathologie sans l'être pour le sexe et l'origine des patients.

Cette importante prévalence est fortement associée à la résistance aux antibiotiques, 71.42% de nos isolats étaient résistants à un antibiotique au minimum particulièrement au métronidazole (58.87%). 23.01% et 2.38% des isolats étaient résistants à deux antibiotiques au minimum et trois antibiotiques au minimum respectivement. Ce taux considérable de l'infection par des souches résistantes ou encore multi-résistantes représente un vrai défi pour les cliniciens pour le choix du traitement à prescrire.

Le test de génotypage « genotype Helico DR » a permis de détecter l'infection à *H. pylori* ainsi que les résistances aux fluorquinolones et à la clarithromycine en identifiant des mutations ponctuelles responsables de ces résistances dans notre population par un seul test et sans avoir recours à la culture bactérienne lente et fastidieuse.

Le test de génotypage CagA a indiqué que 40% de nos isolats cliniques d'*H. pylori* portent le facteur de virulence CagA+. Le taux d'association de ce facteur de virulence avec la résistance aux antibiotiques était plus important chez la population de Sidi Bel Abbes (57.14%) que celle d'Alger (28.57%).

Les chiffres de la prévalence de l'infection à *H. pylori* et de la propagation des bactéries résistantes ou encore multi-résistantes sont alarmants. De plus, son association à des pathologies nécessitant l'éradication d'*H. pylori* avec la triple thérapie conventionnelle est souvent couronnée d'échec.

De nombreuses études s'intéressent à la recherche d'alternatives à la triple thérapie pour l'éradication d'*H. pylori*. Mais à ce jour, aucune thérapie n'est apparue comme une alternative claire aux régimes d'antibiotiques classiques.

## Conclusion et perspectives

---

La deuxième phase de ce travail est consacrée à la recherche de sources des molécules bioactives impliquées dans l'activité anti-*H. pylori*. Parmi les différents extraits testés contre *H. pylori*, notre choix s'est basé sur l'huile essentielle de *P. lentiscus* car son pouvoir d'inhibition était largement supérieur aux autres extraits testés notamment l'huile essentielle d'*O. majorana* et les extraits alcooliques de *C. nobile*, *G. glabra* d'*O. majorana* et de *P. lentiscus*.

L'huile essentielle de *P. lentiscus* présente une activité antioxydante importante estimée par le test au DPPH et le test de blanchissement de la  $\beta$ -carotène et présente ainsi un outil de détoxification et de protection contre les radicaux libres. Les monoterpènes oxygénés prédominants dans l'huile essentielle de *P. lentiscus* sont les molécules responsables de l'activité anti-oxydante sachant que le stress oxydant est l'une des principales causes du développement de pathologies.

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *P. lentiscus* indique sa richesse en molécules bioactives notamment les monoterpènes majoritairement représentés par l' $\alpha$ -Pinène (5.47%), le Limonène (14.7%), le  $\beta$ -Myrcène (9.93%) et le  $\beta$ - Pinène (7.31%).

L'huile essentielle de *P. lentiscus* est dotée d'une forte activité anti-*H. pylori* avec une moyenne des diamètres de la zone d'inhibition de  $32 \pm 01.00$  mm pour les 22 souches testées. Les valeurs de la CMI et de la CMB indiquent son effet bactéricide à l'encontre des 22 souches cliniques d'*H. pylori* même celles résistantes aux antibiotiques. Cette activité est particulièrement attribuée à l'action du limonène, de l' $\alpha$ -pinène et du  $\beta$ -pinène présents dans l'huile essentielle de *P. lentiscus* et qui peuvent provoquer une déstabilisation, une augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne et la perte de son matériel cytoplasmique entraînant ainsi la mort cellulaire.

Compte tenu de la pathogénicité, la vulnérabilité, la haute prévalence de l'infection à *H. pylori* et son pouvoir croissant à développer des mécanismes de résistances aux antibiotiques, cet effet anti-*H. pylori* de l'huile essentielle de *P. lentiscus* représente à lui seul un bon résultat.

De plus, les résultats de la toxicité ont indiqué l'absence de signes cliniques graves et de mortalité chez les souris à la dose de 500 mg/kg; ce qui exprime sa tolérabilité.

## Conclusion et perspectives

---

L'effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *P. lentiscus* est exprimé par la diminution de l'œdème induit par un agent tumorigène (TPA). L'huile essentielle de *P. lentiscus* réduit considérablement l'inflammation induite par le TPA de manière dose dépendante avec des pourcentages de 35.26% et 45.93 % pour les doses de 1 et 10 mg respectivement. Ce potentiel anti-inflammatoire implique de nombreux mécanismes interdépendants notamment l'inhibition des espèces réactives à l'oxygène (ERO), l'inhibition de cytokines et de l'angiogenèse par le limonène ainsi que l'inhibition de la COX-2 par  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, et le myrcène.

Nos résultats indiquent également une activité antiulcéreuse dose-dépendante estimée à 41.66%, 45.83%, et 58.33% pour les doses de 50, 100 et 200 mg/ kg respectivement. L'activité antiulcéreuse (58.33%) de l'huile essentielle de *P. lentiscus* à 200 mg/kg est comparable à l'activité du médicament de référence l'oméprazole (58.40 %).

Les paramètres histo-pathologiques ont été nettement améliorés par l'huile essentielle de *P. lentiscus* à 200 mg/kg ; la diminution de l'inflammation est exprimée par l'inhibition de l'œdème et de l'infiltration des leucocytes comparant à l'oméprazole. En plus l'huile essentielle de *P. lentiscus* a assuré la protection du tissu épithélial et des glandes et elle a inhibé l'hémorragie même à la dose de 100 mg/kg de l'huile essentielle de *P. lentiscus*.

Le limonène et la  $\beta$ -myrcène sont des agents anti-ulcéreux impliqués dans la production du mucus et de la stimulation de la production de PGE2 responsables de l'effet gastro-protecteur de l'huile essentielle de *P. lentiscus*. Les actions anti-oxydantes et anti-inflammatoires de l'huile essentielle de *P. lentiscus* contribuent à son effet gastro-protecteur en renforçant la barrière de défense de la muqueuse gastrique.

Les extraits des végétaux et les huiles essentielles constituent d'importantes sources de composés biologiquement actifs. Dans ce travail, nous démontrons les potentiels anti-inflammatoire et gastro-protecteur *in vivo*, ainsi que l'effet antibactérien (*H. pylori*) *in vitro* de l'huile essentielle de *P. lentiscus*; sa sécurité testée dans le modèle *in vivo* a également été démontrée.

Nous concluons que l'huile essentielle de *P. lentiscus* et ses molécules bioactives présentent des propriétés poly-pharmacologiques validant l'usage traditionnel de cette espèce.

Bien que les données sur l'efficacité de la plante testée aient été obtenues, d'autres investigations sont nécessaires:

## Conclusion et perspectives

---

- ✓ l'isolement de ses composés majoritaire ( $\alpha$ -Pinène, Limonène,  $\beta$ -Myrcène,  $\beta$ - Pinène) et l'évaluation de leurs effets respectifs contre *H. pylori*,
- ✓ la détermination du mode d'action de l'huile essentielle de *P. lentiscus* et de ses composés majoritaires par microscopie électronique et cytométrie en flux,
- ✓ l'évaluation de l'inhibition d'*H. pylori* par des études sur des modèles animaux.

## Références bibliographique

### A

1. **Abdel-Massih RM, Fares R, Bazzi S, El-Chami N, Baydoun E. (2009).** The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on Human leukemic cell line. *Leukemia Research*, **34(8)**:1052-1056.
2. **Abdo J, Uscanga L, Sobrino, S, Rivera J, Huerta F, Tamayo J. (2007).** III Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Rev Gastroenterol Méx*, **72**: 322–338.
3. **Adams RP. (2001).** Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. IL, USA, 456pp.
4. **Adams RP. (2003).** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA.
5. **Adams RP. (2007).** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. IL, USA, 804pp
6. **Adjoungoua AL, Koffi A, Traore F, Diafouka F. (2008)** .Etude Phytochimique et Toxicologique de *Ziziphus mauritiana*, (RHAMNACEAE), Une Plante Anti-hypertensive. *Med Pharm Afr*, **21** :73-82
7. **AFSSAPS. (2007)** .recommandations de bonnes pratiques : les antisécrétoires gastriques chez l'adulte.
8. **Agte V et Tarwadi K. (2010).** The importance of nutrition in the prevention of ocular disease with special reference to cataract. *Ophthalmic Res*, **44**: 166-172.
9. **Akgul A et Bayrak A. (1987).** Constituents of Essential Oils from *Origanum* Species Growing Wild in Turkey. *Planta Med*, **53**, 114
10. **Akowauh, G A, Zhari I, Norgyati I, Sadikun A, Khamsah SM. (2004).** The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon*

## Références bibliographiques

---

- stamineus and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*, **87**: 559-566.
11. **Al Sayed A, Anand PS, Kamath KP, Patil S, Preethanath RS, Anil S. (2014).** Oral cavity as extragastric reservoir of helicobacter pylori. *ISRN Gastroenterology*, **2014**: 1-16.
  12. **Albenque M, Tall F, Dabis F et Mégraud F. (1990).** Epidemiological study of *Helicobacter pylori* transmission from mother to child in Africa. *Rev Enferm Dig.* **78**(1): 48.
  13. **Al-Habbal MJ, Al-Habbal Z, Huwez FU. (1984).** A double-blind controlled clinical trial of mastic and placebo in the treatment of duodenal ulcer. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **11**: 541-544.
  14. **Ali M, Khan AA, Tiwari SK, Ahmed N, Rao LV, Habibullah CM. (2005).** Association between cag-pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer, gastric carcinoma, and non-ulcer dyspepsia subjects with histological changes. *World J Gastroenterol.***11**: 6815–6822.
  15. **Allaker RP, Young KA, Hardie JM, Domizio P, Meadows NJ. (2002).** Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *J Med Microbiol* .**51**:312–317.
  16. **Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC. (1999).** Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* **397**:176-80.
  17. **Amaral JA, Ekins A, Richards SR, Knowles R. (1998).** Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 520– 525.
  18. **Amessis-Ouchemoukh N, Madani K, Falé PL, Serralheiro ML, Araújo MEM. (2014).** Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1and acetylcholinesterase activities. *Ind Crops Prod,* **53**: 6–15.

## Références bibliographiques

---

19. **Amhamdi H, Aouinti F, Wathelet J, Elbachiri A. (2009).** Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus L.* from Eastern Morocco. *Re Nat Prod.* **3** (2): 90–95.
20. **Amir ZC. (2006).** Pathologies gastriques et infection à *Helicobacter pylori*. *Office des publication universitaires d'Alger.*
21. **Amro B, Aburjai T et Al-Khalil S. (2002).** Antioxydative and radical scavenging effects of olive cake extract. *Fitoterapia*, **73**: 456-461.
22. **Andoulo F, Noah Noah D, Tagni-Sartre M. (2013).** Epidémiologie de l'infection à *Helicobacter pylori* à Yaoundé : de la particularité à l'énigme africaine. *Pan Afr Med J*, **16**:115.
23. **Andreson H, Lõivukene K, Sillakivi T, Maaros HI, Ustav M, Peetsalu A, Mikelsaa M. (2002).** Association of cagA and vacA genotypes of *Helicobacter pylori* with gastric diseases in Estonia. *J Clin Microbiol*, **40** (1): 298–300.
24. **Annibale B, Capurso G, Lahner E, Passi S, Ricci R, Maggio F, Delle Fave G. (2003).** Concomitant alterations in intragastric pH and ascorbic acid concentration in patients with *Helicobacter pylori* gastritis and associated iron deficiency anemia. *Gut.* **52**: 496-501.
25. **Aouinti F, Imelouane B, Tahri M, Wathelet J P, Amhamdi H , Elbachiri A. (2013).** New study of the essential oil, mineral composition and antibacterial activity of *Pistacia lentiscus L.* from Eastern Morocco. *Res Chem Intermed*, **40** (8): 2873-2886.
26. **Apfelbaum M et Roman M. (2009).** Diététique et nutrition. Edition Marian, Paris, pp: 251.
27. **Armanini D, Fiore C, Mattarello MJ, Bielenberg J, Palermo M. (2002).** History of the endocrine effects of licorice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, **110**: 257–261.
28. **Armuzzi A, Cremonini F, Ojetti V, Bartolozzi F, Canducci F, Candelli M, Santarelli L, Cammarota G, De Lorenzo A, Pola P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. (2001).** Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on antibiotic-associated

## Références bibliographiques

---

- gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: a pilot study. *Digestion*, **63**:1-7.
29. **Atherton JC et Blaser MJ. (2009).** Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest* .**119**: 2475-2487.
30. **Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, BlaserMJ. (1997).** Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **112**: 92–99
31. **Attaf N, Cherkaoui N, Choulli MK, Ghazali L, Mokhtari A, Soulaymani A. (2004).** Profil épidémiologique de l'infection à *Helicobacter pylori* dans la région du Gharb-Chrarda-Beni Hssen. *Biologie & Santé*, **4(1)**:25–34.
32. **Ayala G, Escobedo-Hinojosa WI, de la Cruz-Herrera CF, Romero I. (2014).** Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*, **20(6)**: 1450-1469.
33. **Ayala G, Galvan-Portillo M, Chihu L, Fierros G, Sanchez A, Carrillo B, Roman A, Lopez-Carrillo L, Silva-Sa´nchez J. (2011).** Resistance to Antibiotics and Characterization of *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Antrum and Body from Adults in Mexico. *Microbial Drug Resistance*, **17(2)** : 149-155
34. **Aydin A, Ersoz G, Tekesin O, Akçiçek E, Tuncyürek M. (2000).** Garlic oil and *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*, **95(2)**: 563-564.
35. **Azevedo NF, Guimaraes N, FigueiredoC, Keevil CW, Vieira M J. (2007).** A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. *Crit Rev Microbial*, **33** (3): 157-169.
- B**
36. **Bacanli M, Bařaran A, Bařaran. (2015).** The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food and Chemical Toxicology*, **81**:160-170.
37. **Bae EA, Han MJ, Kim DH. (1999).** In vitro anti- *Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Med*, **65**: 442-443.



## Références bibliographiques

---

38. **Bahorun T. (1997).** Substances Naturelles actives : La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research Councils*, 83-94.
39. **Baik SC, Youn HS, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, Park CK, Kasai H, Rhee KH. (1996).** Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res*, **56** (6): 1279-1282.
40. **Balan KV, Prince J, Han Z, Dimas K, Cladaras M, Wyche GH, Sitaras NM, Pantazis P (2007).** Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. *Phyto Med*, **14**: 263–272
41. **Bani-Hani KE et Hammouri SM. (2001).** Prevalence of *Helicobacter pylori* in Northern Jordan. Endoscopy based study. *Saudi Med J*, **22** (10): 843-847.
42. **Baranauskiene R, Venskutonis PR, Demyttenaer JCR. (2005).** Sensory and instrumental evaluation of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Aroma Flavour Fragr J*, **20**: 492–500.
43. **Baranauskiene R, Venskutonis PR, Dewettinck K and Verhe R. (2006).** Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk proteinbased matrices. *Food Research International*, **39**: 413–425.
44. **Baratto MC, Massimiliano T, Carlotta Gc, Patrizia P, Annalisa R, Francesco V, Riccardo B, Rebecca P. (2003).** Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* Leaves. *Free Radic Res*, **37** (4) : 405–412.
45. **Bardhan K, Bayerdörffer E, Veldhuyzen Van Zanten SJ, Lind T, Mégraud F, Delchier JC, Hellblom M, Stubberöd A, Burman CF, Gromark P, Zeijlon L. (2000).** The HOMER Study: the effect of increasing the dose of metronidazole when given with omeprazole and amoxicillin to cure *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. **5**:196-201.
46. **Barel S, Segal R, Yashphe J. (1991).** The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. *Journal of Ethnopharmacology*, **33**: 187-191.

## Références bibliographiques

---

47. **Barros AS. (2003).** Caracterizac, ~ao do Efeito Antiulcera do ´oleo Essencial de *Croton Sonderianus* (Muell. Arg). Monografia apresentada ao Curso de Graduaç, ~ao em Nutric, ~ao da Universidade Estadual do Cear´a, Fortaleza-Ce, Brasil, p110.
48. **Basso D, Zambon C F, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, Schiavon S, Guariso G, Ceroti M, Nitti D, Rugge M, Plebani M , Atherton JC. (2008).** Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology*, **135** (1): 91-99.
49. **Baudière A, Monange Y, Gauquelin Th. (2002).** Le Monde des Plantes; Intermédiaire des Botanistes. *Toulouse*, **477** : 2-5.
50. **Baudoux D. (2003).** L'aromathérapie : Se soigner par les Huiles Essentielles, *édition Amyris*, 145-146.
51. **Bebb JR, Bailey-Flitter N, Ala Aldeen D et Atherton JC. (2003).** Mastic gum has no effect on *Helicobacter pylori* load *in vivo*. *J Antimicrob Chemother*, **52**:522–523.
52. **Belhattab R. (2007).** Composition chimique et activité antioxydante, antifongique et anti aflatoxinogène d'extraits d' *Origanum glandulosum* Desf. et *Marrubium vulgare* L (famille des Lamiaceae). Thèse de doctorat en Biologie, Université de Ferhat Abbas Setif, p10.
53. **Ben Douissa F, Hayder N, Chekir-Ghedira L, Hammami M, Ghedira K, Mariotte AM, Dijoux-Franca MG. (2005).** New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour Fragr* , **20**: 410–414.
54. **Benajah DA, Lahbabi M, Alaoui S, El Rhazki, El Abkari M, Nejjari C, Amarti A, Bennani B, Mahmoud M, Ibrahim SA. (2013).** Prevalence of *Helicobacter pylori* and its recurrence after successful eradication in a developing nation (Morocco). *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, **37**: 519-526
55. **Benyoussef E H, Charchari S, Nacer-Bey N, Yahiaoui N, Chakou A , Bellatreche M. (2005) .** The essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. *J. Essent. oil Res*, **17**: 642-644.
56. **Berroterán A, Perrone M, Correnti M, Cavazza M, Tombazzi C, Goncalvez R. (2002).** Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal

## Références bibliographiques

---

- system of a Venezuelan population. *Journal of Medical Microbiology*, **51(9)**: 764–769.
57. **Bhatia SJ, Kochar N, Abraham P, Nair NG, Mehta AP. (1989).** *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* in vitro. *J. Clin. Microbiol*, **27**: 2328-2330.
58. **Blaser M J. (1996).** The bacteria behind ulcers. *Scientific American Inc.* 104–107.
59. **Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. (2000).** Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs. *American Botanical Council: Newton*, 233–236.
60. **Bogaerts P, Berhin C, Nizet H, Glupczynski Y. (2006).** Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *H. pylori* strains from patients living in Belgium. *Helicobacter*, **11**: 441–445.
61. **Bona S, Bono L, Daghetta L et Marone P. (2001).** Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* gum mastic against *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol*, **96**:S49.
62. **Bonamin F, Moraes TM, Dos Santos RC, Kushima H, Faria FM, Silva MA. (2014).** The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: the role of  $\beta$ -myrcene in preventing peptic ulcer disease, *Chem Biol Interact*, **212**: 11-19.
63. **Bonnet R, Caron F, Cavallo JD, Chardon H, Chidiac C, Courvalin P, Drugeon H, Dubreuil L, Jarlier V, Jehl F, Lambert T, Leclercq R, Nicolas-Chanoine MH, Plesiat P, Ploy MC, Quentin C, Soussy CJ, Varon E, Weber P. (2012).** Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie recommandations 2012.
64. **Bouyahya A, Abrini J, Bakri Y, Dakka N. (2016).** Les huiles essentielles comme agents anticancéreux : actualité sur le mode d'action. *Aromathérapie expérimentale*.
65. **Boyanova L et Mitov I (2010).** Geographic map and evolution of primary *Helicobacter pylori* resistance to antibacterial agents. *Expert Rev Anti Infect Ther*, **8**: 59-70.
66. **Brater DC. (2002).** Anti-inflammatory agents and renal function. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **32**: 33–42.

## Références bibliographiques

---

67. **Broutet N et Mégraud F. (1996).** Épidémiologie de l'infection à *Helicobacter pylori*. Paris Elsevier, 79-100.
68. **Brown LM, Thomas TL, Ma JL, Chang YS, You WC, Liu WD, Zhang L, Gail MH. (2001).** *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. *Scand J Infect Dis*, **33**: 686–691.
69. **Brown LM, Thomas TL, Ma JL, Chang YS, You WC, Liu WD, Zhang L, Pee D, Gail MH. (2002).** *Helicobacter pylori* infection in rural China: demographic, lifestyle and environmental factors. *Int J Epidemiol*, **31**: 638–645.
70. **Brown LM. (2000).** *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*, **22**: 283-297.
71. **Buil P, Garnerio J, Guichard G. (1975).** Contribution à la connaissance de la composition chimique de l'essence de lentisque de Provence. *Riv Ital EPPOS Cosmet Aerosol*, **56**: 245–252.
72. **Bures J, Kopáčová M, Skodová Fendrichová M, Rejchrt S. (2011).** Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Vnitr Lek*; **57**: 993-999.
73. **Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods ,a review. *Int J Food Microbiol* , **94**: 223-253.
74. **Burucoa C, Garnier M, Silvain C, Fauchere JL. (2008).** Quadruplex real-time PCR assay using allele-specific scorpion primers for detection of mutations conferring clarithromycin resistance to *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* ,**46**: 2320–2326.

### C

75. **Calabro G et Curro P. (1974).** Costituenti degli oli essenziali Nota IV. Essenza di lentisco. *Essence Deriv Agrum*, **44**: 82–92.
76. **Cambau E , Allerheiligen V, Coulon C, Corbel C, Lascols C, Deforges L, Soussy CJ, Delchier JC, Megraud F. (2009).** Practical use of GenoType Helico, a molecular test for *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **70**: 557–560.
77. **Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A, Akpulat HA. (2003).** Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol

## Références bibliographiques

---

- extracts of *Achillea millefolium* sp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J Ethnopharmacol*, **87**: 215-220
78. **Cañizares P, Gracia I, Gómez L A, García A , De Argila CM , Boixeda D, Rafael L. (2004).** Thermal degradation of allicin in garlic extracts and its implication on the inhibition of the in-vitro growth of *Helicobacter pylori*. *Biotechnol Prog* , **20**: 32–37.
79. **Capelle L G, De Vries A C. (2008).** Gastric MALT lymphoma: epidemiology and high adenocarcinoma risk in a nation-wide study. *EurJ Cancer*, **44** (16): 2470-2476.
80. **Capurso G, Lahner E, Marcheggiano A, Caruana P, Carnuccio A, Bordi C, Delle Fave G , Annibale B. (2001).** Involvement of the corporal mucosa and related changes in gastric acid secretion characterize patients with iron deficiency anaemia associated with *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*, **15**:1753-1761.
81. **Carson CF, Cookson BD, Farrelly HD, Riley TV. (1995).** Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Antimicrob Chemoth*, **35**: 421-424.
82. **Carson CF, Mee BJ, Riley TV. (2002).** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother*, **46** : 1914–1920.
83. **Castola V, Bighelli A, Casanova J. (2000).** Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*, **28**: 79-88.
84. **Cattoir V, Nectoux J, Lascols C, Deforges L, Delchier JC, Megraud F, Soussy CJ, Cambau E. (2007).** Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a gyrA polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int J Antimicrob Agents*, **29**: 389-396.
85. **Cellini L, Di Campli E, Masuli M , Di Bartelomeo S. (1996).** Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *Immunology and Medical Microbiology*, **13**: 273–277.

## Références bibliographiques

---

86. **Chao LK, Hua KF, Hsu HY, Cheng SS, Liu JY, Chang ST. (2005).** Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 7274-7278.
87. **Chaudhary SC, Siddiqui MS, Athar M. (2012).** D-Limonene modulates inflammation, oxidative stress and Ras-ERK pathway to inhibit murine skin tumorigenesis. *Hum Exp Toxicol*, **31**:798–811
88. **Chaurasia SC et Vyas KK. (1977).** In vitro effect of some volatile oil against *Phytophthora parasitica* var. *piperina*. *J Res Indian Med Yoga Homeopath*, **1977**: 24–26.
89. **Chen S, Li Y, Yu C. (2008).** Oligonucleotide microarray: a new rapid method for screening the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* for single nucleotide polymorphisms associated with clarithromycin resistance. *J Gastroenterol Hepatol*, **23**: 126–131.
90. **Cheon JH, Kim N, Lee DH, Kim JM, Kim JS, Jung HC et Song IS. (2006).** Long-term outcomes after *Helicobacter pylori* eradication with second-line, bismuth-containing quadruple therapy in Korea. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **18**:515-9.
91. **Chey WD et Wong BCY. (2007).** American College of Gastroenterology guideline on management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*, **102**:1-18.
92. **Choe Y, Kim S, Son B. (1999).** Randomized placebo-controlled trial of *Helicobacter pylori* eradication for iron-deficiency anemia in preadolescent children and adolescents. *Helicobacter*, **4**:135-139.
93. **Chomvarin C, Kulsantiwong P, Chantarasuk Y, Chantrakooptungool S, Kanjanahareutai S. (2006).** Comparison of media and antibiotic supplements for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **37**:1163-1169.
94. **Chow TK, Lambert JR, Wahlqvist ML, Hsu-Hage BH. (1995).** *Helicobacter pylori* in Melbourne Chinese immigrants: evidence for oral-oral transmission via chopsticks. *J Gastroenterol Hepatol*, **10**: 562-569.

## Références bibliographiques

---

95. **CLSI. (2007).** Clinical and Laboratory Standards Institute-Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests methods for antimicrobial susceptibility testing for bacteria isolated from animals. Approved standard, Third edition –CLSI document M11-A7- Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
96. **Cogo LL, Monteiro CLB, Miguel M D, Miguel OG, Cunico MM , Ribeiro ML, Camargo ER , Kussen GMB, Nogueira KS, Costa LMD. (2010).** Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. *Braz J Microbiol* , **41**: 304–309.
97. **Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti G A, Uzunov D, Tubaro, A Menichini F, Della Loggia R (2008).** In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of mediterranean dietary plants. *J Ethnopharmacol*, **116**: 144–151.
98. **Correa P et Piazuolo MB. (2012).** The gastric precancerous cascade. *J Dig Di*, **13** (Suppl.1): 2-9.
99. **Correa P, Fontham ET, Bravo JC, Bravo LE, Ruiz B, Zarama G, Realpe JL, Malcom GT, Li D, Johnson WD, Mera R. (2000).** Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. *J Natl Cancer Inst*, **92**:1881-1888.
100. **Correa P. (1992).** Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. First american cancer society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res* , **52**: 6735-6740.
101. **Correa P. (1995).** *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *AmerJ Surg Pathol*, **19**(1): 37-43.
102. **Coste H. (1937).** Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. Second Tirage, Paris - Librairie des Sciences et des Arts.
103. **Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. (1999).** *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, **284**:1328–1333.

## Références bibliographiques

---

104. **Cover TL et Blanke SR. (2005).** *Helicobacter pylori vacA*, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol*, **3** (4): 320–332
105. **Crabtree JE. (1996).** Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **10** (Suppl. 1) : 29–37.
106. **Craveiro AA et Queiroz DC. (1993).** Óleos essenciais em química fina. *Quím Nova*, **16**: 224–228.
107. **Crozier A, Del Rio D, Clifford MN. (2010).** Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, **31**(6) : 446-467.

### D

108. **Dabiri H, Maleknejad P, Yamaoka Y, Feizabadi MM, Jafari F, Rezadehbashi M, Zali MR, Nakhjavani FA, Mirsalehian A. (2009).** Distribution of *Helicobacter pylori cagA*, *cagE*, *oipA* and *vacA* in different major ethnic groups in Tehran, Iran. *J Gastroenterol Hepatol*, **24**:1380–1386.
109. **Dabrii H, Bolfion M, Mirsalehian A. (2010).** Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes in Afghani and Iranian isolates. *Polish journal of microbiology*, **59**: 61.
110. **Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. (2000).** GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J Agric Food Chem*, **48**: 2576 – 2581.
111. **Dangou JM, Mbengue M, Ba A, Ndiaye MF, Moriera-Diop T, Bao O, Ndiaye PD. (1997).** Infection Gastrique à *H. pylori* au service de Medecine Interne du CHU de Dakar. *Arch Anat Cytol Path*, **45**(6): 339-343.
112. **Datta S, Chattopadhyay S, Nair GB, Mukhopadhyay AK, Hembram J, Berg DE, Saha DR, Khan A, Santra A, Bhattacharya SK. (2003).** Virulence genes and neutral DNA markers of *Helicobacter pylori* isolates from different ethnic communities of West Bengal, *India J Clin Microbiol*, **41**: 3737–3743.
113. **Daugule I, Rumba I, Alksnis J, Ejderhamn J. (2007).** *Helicobacter pylori* infection among children with gastrointestinal symptoms: a high prevalence of infection among patients with reflux oesophagitis. *Acta Paediatr*; **96**:1047-1049.



## Références bibliographiques

---

114. **De Carvalho PM, Rodrigues RF, Sawaya AC, Marques MO, Shimizu MT. (2004).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC. *J Ethnopharmacol*, **95**: 297–301.
115. **De Francesco V, Giorgio F, Hassan C, Manes G, Vannella L, Panella C, Ierardi E, Zullo A. (2010).** Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. *J Gastrointestin Liver Dis*, **19**: 409-414.
116. **De Korwin JD. (2007).** *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin Biol*, **31**:1110-1117.
117. **De Martel C et Parsonnet J. (2006).** *Helicobacter pylori* infection and gender: a meta-analysis of population-based prevalence surveys. *Dig Dis Sci*, **51**: 2292-22301.
118. **De Sousa AC, Alviano DS, Blank AF, Alves PB, Alviano CS, Gattass CR. (2004).** *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J Pharm Pharmacol*, **56**: 677-681
119. **Delaporte RH, Sarragiotto MH, Takemura OS, Sánchez GM, Filho BP, Nakamura CV. (2004).** Evaluation of the antioedematogenic, free radical scavenging and antimicrobial activities of aerial parts of *Tillandsia streptocarpa* Baker-Bromeliaceae. *J Ethnopharmacol*, **95**: 229–233.
120. **Delaquis J, Stanich K, Girard B, Mazza G. (2002).**Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int J Food Microbiol*, **74**: 101-109.
121. **Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G. (2000).**Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int J Food Microbiol*, **74**: 101–109.
122. **Delchier JC. (2003).** Le lymphome gastrique du MALT, une infection maligne potentiellement curable par l'éradication de *Helicobacter pylori*. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, **27(3)**:453–458.
123. **Delchier JC. (2006).** Quelles recommandations pour le management de l'infection à *Helicobacter pylori* après la troisième conférence de consensus européenne (Maastricht 3) ? *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, **30 (12)** : 1361–1364.

## Références bibliographiques

---

124. **Denning F. (2004).** Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**: 1141–1146.
125. **Denyer SP et Hugo WB. (1991).** Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. Mechanisms of action of chemical biocides: their study and exploitation. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom, 171-187.
126. **DePooter HL, Schamp NM, Aboutabl EA, El Thoamy SL, Doss SL. (1991).** Essential oil of the leaves of three *Pistacia* species grown in Egypt. *Flavour Fragr J*, **6**: 229–232.
127. **Derache R. (1986).** Toxicologie et Sécurité des Aliments. Edition Lavoisier, Paris, 65-85.
128. **Deriu A, Branca G, Molicotti P, Pintore G, Chessa M, Tirillini B, Peglietti B, Mura A, Sechi LA, Fadda G, Zanetti S. (2007).** In vitro activity of essential oil of *Myrtus communis* L. against *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Ag*, **30**: 562–563.
129. **Diaz MN, Frei B, Vita JA et Keaney JF. (1997).** Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med*, **337**: 408-416.
130. **Ding SZ, Minohara Y, Fan XJ, Wang J, Reyes VE, Patel J, Dirden-Kramer B, Boldogh I, Ernst PB, Crowe SE. (2007).** *Helicobacter pylori* infection induces oxidative stress and programmed cell death in human gastric epithelial cells. *Infect Immun*, **75**(8): 4030-4039.
131. **Do MY, Lee YC, Choi CH, Kim SJ, Mun CS, Moon HJ, Lee HW, Oh HC, Kim HJ, Kim JW, Do JH, Kim JG, Chang SK. (2009).** The changes in prevalence and the related factors of *Helicobacter pylori* infection in Korean health check-up subjects during 8 years. *Korean J Gastroenterol*, **53**:76-83
132. **Dob T, Dahmane D, Chelghoum C. (2006).** Chemical composition of the essential oils of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. *J Essent oil Res*, **18**: 335-338.
133. **Dong S, Inoue A, Zhu Y, Tanji M, Kiyama R. (2007).** Activation of rapid signaling pathways and the subsequent transcriptional regulation for the proliferation of breast cancer MCF-7 cells by the treatment with an extract of *Glycyrrhiza glabra* root. *Food Chem Toxicol*, **45**: 2470-2478.

134. **Dordevic S, Petrovic S, Dobric S, Milenkovic M, Vucicevic D, Zizic S, Kukic J. (2007).** Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J Ethnopharmacol*, **109**: 458-463
135. **Dore MP, Sepulveda AR, El-Zimaity H, Yamaoka Y, Osato MS, Mototsugu K, Nieddu AM, Realdi G, Graham DY. (2001).** Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep implications for transmission to humans. *Am J Gastroenterol*, **96**:1396–1401.
136. **Drouin E. (1999).** *Helicobacter pylori*: Novel therapies. *Can J Gastroenterol*, **13**:581-583.
137. **Drumm B, Perez-Perez GI, Blaser MJ et Sherman PM. (1990).** Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *The New England Journal of Medicine*, **322(6)**: 359–363.
138. **Duck WM, Sobel J, Pruckler JM, Song Q, Swerdlow D, Friedman C, Sulka A, Swaminathan B, Taylor T, Hoekstra M, Griffin P, Smoot D, Peek R, Metz DC, Bloom PB, Goldschmidt S, Parsonnet J, Triadafilopoulos G, Perez-Perez GI, Vakil N, Ernst P, Czinn S, Dunne D et Gold BD. (2004).** Antimicrobial resistance incidence and risk factors among *Helicobacter pylori*- infected persons, United States *Emerg Infect Dis*, **10**: 1088-1094.

**E**

139. **Ebrahimi-Dariani N, Mirmomen S, Mansour-Ghanaei F, Noormohammadpoor P, Sotodehmanesh R, Haghpanah B, Bahrami H .(2003).** The efficacy of furazolidone-based quadruple therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection in Iranian patients resistant to metronidazolebased quadruple therapy. *Med Sci Monit*, **9**:105–108.
140. **Eidt S, Stolte M, Fischer R. (1994).** *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol*, **47(5)**: 436-439.
141. **El-Abhar HS, Abdallah DM, Saleh S. (2003).** Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *J Ethnopharmacol*, **84(2–3)**:251–258.

## Références bibliographiques

---

142. **Elmanama A, Mokhallalati M, Abu-Mugesieb R. (2008).** Risk factors associated with *Helicobacter pylori* infection in Gaza, Palestine. *The Islamic University Journal*, **16(2)**: 97–110.
143. **El-Omar EM, Oien K, El-Nujumi A, Gillen D, Wirz A, Dahill S, Williams C, Ardill JE, McColl KE. (1997).** *Helicobacter pylori* infection and chronic gastric acid hyposecretion. *Gastroenterology*, **113(1)**: 15-24.
144. **El-Omar EM, Penman ID, Ardill JE, Chittajallu RS, Howie C, McColl KE. (1995).** *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology*, **109**: 681-691.
145. **Elviss N, Owen R, Xerry J, Walker A, Davies K. (2004).** *Helicobacter pylori* antibiotic resistance patterns and genotypes in adult dyspeptic patients from a regional population in North Wales. *J Antimicrob Chemother*, **54** : 435–440
146. **El-Zaatari FA, Nguyen AM, Genta RM, Klein PD, Graham DY. (1995).** Determination of *Helicobacter pylori* status by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparison with urea breath test. *Dig Dis Sci*, **40**:109-113.
147. **Erenler R, Sen O, Aksit H, Demirtas I, Yaglioglu AS, Elmastas M, Telci İ. (2016).** Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities. *J Sci Food Agric*, **96(3)**:822-833.
148. **Ernst E. (1999).** Is garlic an effective treatment for *Helicobacter pylori* infection? *Arch Intern Med*, **159**: 2484-2485.
149. **Essawi T et Srour M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharm*, **70**: 343-349.
150. **Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991).** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxy nonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, **11**: 81–128.
151. **Etukudo OM, Ikpeme EE, Ekanem EE. (2012).** Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection among children seen in a tertiary hospital in Uyo, southern Nigeria. *Pan Afr Med J*, **12**:39.

## Références bibliographiques

---

152. **Evans FJ, Edwards MC. (1987).** Activity correlations in the phorbol esters series. *Bot J Linean Soc*, **94** (1-2): 231-246.
153. **Everhart JE. (2000).** Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*, **29** (3):78–559.
154. **Exarchou V, Nenadis N, Tsimidou M, Gerothanassis LP, Troganis D et Boskou D. (2002).** Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage and summer savory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 5294-5299.

### F

155. **Faik M. (2000).** Mise au point sur l'infestation gastrique par l'*Helicobacter pylori*. *Med Maghreb*, **79**:17-9.
156. **Fallone CA. (1999).** Determinants of ethnic or geographical differences in infectivity and transmissibility of *Helicobacter pylori*. *Can J Gastroenterol*, **13**:251-255.
157. **Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard J. K, Stephens M, Kidd M. (2003).** Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, **299**: 1582 – 1585.
158. **Fang YZ, Yang S et Wu G. (2002).** Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **18**: 872–879.
159. **Farinati F, Cardin R, Degan P, Rugge M, Mario F.D, Bonvicini P et Naccarato R. (1998).** Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut*, **42**(3): 351-356.
160. **Farshad S, Japoni A, Alborzi A et Hosseini M. (2007).** Restriction fragment length polymorphism of virulence genes *cagA*, *vacA* and *ureAB* of *Helicobacter pylori* strains isolated from Iranian patients with gastric ulcer and nonulcer disease. *Saudi Med J*, **28** (4): 529–34.
161. **Fauchère JL. (1999).** Caractéristiques bactériologiques et diagnostic de *Helicobacter pylori*. *Option Bio*, supplément aux numéros **230-232** : 5-9.
162. **Felter HW. (1992).** Monographs extracted from: The Eclectic Materia Medica. *Pharmacology and Therapeutics*, 28.

## Références bibliographiques

---

163. **Ferguson DA Jr, Jiang C, Chi DS, Laffan JJ, Li C et Thomas E. (1999).** Evaluation of two string tests for obtaining gastric juice for culture, nested-PCR detection, and combined single- and double-stranded conformational polymorphism discrimination of *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci*, **44**: 2056–2062.
164. **Ferguson DA, Li C, Patel NR, Mayberry WR, Chi DS et Thomas E. (1993).** Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J. Clin. Microbiol*, **31**: 2802–2804.
165. **Ferguson LR. (2001).** Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, **475**: 89–111.
166. **Fernandez F, Rush JS, Toke DA, Han GS, Quinn JE, Carman GM, Choi JY, Voelker DR, Aebi M, Waechter CJ. (2001).** The CWH8 gene encodes a dolichyl pyrophosphate phosphatase with a lumenally oriented active site in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 276(44):41455-64
167. **Ferreria A, Proenca, C, Serralheiro LML, Arango MEM. (2006).**The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, **108**: 31-37.
168. **Fiedorek SC, Malaty HM, Evans DL, Pumphrey CL, Casteel HB, Evans Jr. (1991).** Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatrics*, **88**: 578-82.
169. **Flejou JF. (1994).** Par quels mécanismes une infection à *H. pylori* peut-elle favoriser le développement d'un cancer gastrique? *Gastrographies*. Janv : 29-30.
170. **Fock KM, Graham DY, Malfertheiner P. (2013).** *Helicobacter pylori* research: historical insights and future directions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **10**:495–500.
171. **Foddai M, Kasabri, V, Affi FU, Azara E, Petretto GL, Pintore G. (2015).** In vitro inhibitory effects of Sardinian *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia terebinthus* L. on metabolic enzymes pancreatic lipase, amylase, and glucosidase. *Starch-Stärke*, **6**: 204–212.
172. **Forceville XP et Van Antwerpen. (2008).** Seleno compounds and selenium: Diagnostic and therapeutic roles in ICU. *Réanimation*, **17**: 442-453.

173. **Ford AC, Delaney BC, Forman D et Moayyedi P. (2004).** Eradication therapy in *Helicobacter pylori* positive peptic ulcer disease: systematic review and economic analysis. *Am. J. Gastroenterol*, **99**:1833-1855.
174. **Foryst-Ludwig A, Neumann M, Schneider-Brachert W et Naumann M. (2004).** Curcumin blocks NF-kappaB and the motogenic response in *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research and Communications*, **316**: 1065–1072.
175. **Franchini M, Cruciani M, Mengoli C, Pizzolo G. et Veneri D. (2007).** Effect of *Helicobacter pylori* eradication on platelet count in idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, **60**: 237-246.
176. **Frier G, Pimpo MT, Palombieri A, Melideo D, Marcheggiano A, Caprilli R, D'Alessandro A et Seri S. (2000).** Polyunsaturated fatty acid dietary supplementation: an adjuvant approach to treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Nutr Res*, **20**: 907-916.
177. **Fujioka T et Kashiwada Y. (1994).** Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *J Nat Prod*, **57**: 243–247.
178. **Fukai T, Marumo A, Kaitou K, Kanda T, Terada S et Nomura T. (2002).** Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life Sciences*, **71**: 1449–1463.
179. **Fukuda-Parr S. (2004).** Human development report: Cultural liberty in today's diverse world. United Nations Development Programme, New York.
180. **Fukushima T, Strauss RM et Waring JP. (2000).** Male predominance of *H. pylori* associated hypertrophic gastritis is explained by tobacco and alcohol use: an evidence for host-mediated inflammatory response to *H. pylori* gastritis. *American Journal of Gastroenterology*, **95**:2452.

## Références bibliographiques

---

181. **Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli. (2007).** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosemarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, **102**: 898-904.
182. **Garcia MD, Saenz MT, Gomez MA and Fernandez MA. (1999).** Topical Antiinflammatory Activity of Phytosterols Isolated from *Eryngium foetidum* on Chronic and Acute Inflammation Models. *Phytother Res*, **13**: 78–80.
183. **Gardeli C, Papageorgiou V, Mallouchos A, Theodosis K et Komaitis M. (2008).** Essential oil composition of *Pistacia lentiscus L.* and *Myrtus communis L.*: evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, **107**: 1120-1130.
184. **Germano MP, De Pasquale R, Iauk L, Galati EM, Keita A et Sanogo R. (1996).** Antiulcer activity of *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. *Phytomedicine*, **2 (3)**: 229-233.
185. **Geronikaki AA et Gavalas AM. (2006).** Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **9**: 425-442.
186. **Ghosh D et Scheepens A. (2009).** Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*, **53**: 322 – 331.
187. **Ghoshal S, Krishna Prasad BN et Lakshmi V. (1996).** Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol*, **50**:167–170.
188. **Ghotaslou R, Milani M, Akhi MT, Hejazi MS, Nahaei MR, Hasani A, Sharifi Y. (2013).** Relationship between drug resistance and *cagA* gene in *Helicobacter pylori*. *J Microbiol*, **6** : 80–84.
189. **Gisbert JP et Morena F. (2006).** Systematic review and meta-analysis: levofloxacinbased rescue regimens after *Helicobacter pylori* treatment failure. *Aliment Pharmacol Ther*, **23**:35-44.
190. **Gisbert JP et Pajares JM. (2002).** Review article: *Helicobacter pylori* “rescue” regimen when proton pump inhibitor-based triple therapies fail. *Aliment. Pharmacol Ther*, **16**:1047–1057.



## Références bibliographiques

---

191. **Gisbert JP, Arata IG, Boixeda D et al. (2002).** Role of partner's infection in reinfection after *Helicobacter pylori* eradication. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **14**:865-71.
192. **Gisbert JP, Luna M, Gomez B, Herrerias JM, Mones J, Castro- Fernandez M. (2006).** Recurrence of *Helicobacter pylori* infection after several eradication therapies: long-term follow-up of 1000 patients. *Aliment Pharmacol Ther*, **23**: 713-9.
193. **Gisbert JP. (2005).** The recurrence of *Helicobacter pylori* infection: incidence and variables influencing it. A critical review. *Am J Gastroenterol*, **100**:2083-99.
194. **Glauert HP, Calfee-Mason K, Stemm DN, Tharappel JC et Spear BT. (2010).** Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: A review. *Mol Nutr Food Res*, **54**: 875-896.
195. **Glupczynski Y. (1991).** Prevalence of *H. pylori* on a rural kiwi eastern Zaire: a prospective endoscopic study. *Gastroenterol Hepatol*, **3** : 449-455.
196. **Glupczynski Y, Labbé M, Delmée M. (1987).** Détection et identification de *Helicobacter pylori* à partir de biopsies gastriques obtenues par endoscopie. *Acta Endoscop*, **17**: 293-298.
197. **Goel G, Makkar HPS, Francis G et Becker K. (2007).** Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *Int J Toxicol*, **26**(4): 279-288.
198. **Goh KL. (1997).** Prevalence of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in a multi-racial dyspeptic Malaysian population undergoing endoscopy. *J Gastroenterol Hepatol*, **12**: S29-35.
199. **Gonny M, Bradesi P et Casanova J. (2004).** Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Flavour Fragr J*, **19**: 424-433
200. **Goodwin C et Worsley B. (1993).** Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*, **22**(11): 5-19.
201. **Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins D, Sly L, McConnell W et Harper WES. (1989).** Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter*

## Références bibliographiques

---

- mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. and *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively. *Syst Bacteriol*, **39**: 397-405.
202. **Gotz V, Romankiewicz JA, Moss J et Murray HW. (1979).** Prophylaxis against ampicillin-associated diarrhea with a lactobacillus preparation. *Am J Hosp Pharm*, **36**:754-757.
203. **Graham DY, Lee YC et Wu MS. (2014).** Rational *Helicobacter pylori* therapy: evidence-based medicine rather than medicine-based evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **12**:177–86.
204. **Graham DY, Opekun AR, Osato MS, El-Zimaity HM, Lee CK, Yamaoka Y, Qureshi WA, Cadoz M et Monath TP. (2004).** Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut*, **53(9)**: 1235-1243.
205. **Graham DY. (1989).** *Campylobacter pylori* and peptic ulcer disease. *Gastroenterology*. **96 (2)**: 615-625.
206. **Guerre JH. (1994).** *H. pylori* et pathologie gastro-duodénale. *Sem Hôp*, (Paris). **70 (1-2)**: 49-53.
207. **Guimaraes N, Azevedo NF, Figueiredo C, Keevi, CW et Vieira MJ. (2007).** Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol*, **45**: 3089–3094.
208. **Guimarães R, Barros L, Dueñas M, Calhella RC, Carvalho AM, Santos-Buelga C, Queiroz MG, Ferreira IC, Carvalho AM et Santos-Buelga C. (2001).** Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild Roman chamomile: a comparison between the herb and its preparations. *Food Chemistry*, **136(2)** :718-725.
209. **Gupta VK, Fatima A, Faridi U, Negi AS, Shanker K, Kumar JK, Rahuja N, Luqman S, Sisodia BS, Saikia D, Darokar MP, Khanuja SP. (2008).** Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. *J Ethnopharmacol*, **116**: 377-380.

## H

210. **Haji-mahmoodi M, Shams-Ardakani M, Saniee P, Siavoshi F, Mehrabani M, Hosseinzadeh H, Foroumadi P, Safavi M, Khanavi M, Akbarzadeh T, Shafiee T,**

- Foroumadi A. (2011).** *In vitro* antibacterial activity of some Iranian medicinal plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Nat Prod Res*, **25**: 1059–1066.
211. **Hamad H, Ibrahim H, Mariam H, Mojahidul G. (2011).** Comparative phytochemical and antimicrobial investigation of some plants growing in al jabal al-akhdar. *J Nat Prod Plant Resour*, **1** (1): 15-23.
212. **Hamasaki N, Ishii E, Tominaga K, Tezuka Y, Nagaoka T, Kadota S, Kuroki T et Yano I. (2000).** Highly selective antibacterial activity of novel alkyl quinolone alkaloids from a Chinese herbal medicine, Gosyuyu [Wu-Chu-Yu], against *Helicobacter pylori* in vitro. *Micribiol Immunol*, **44**: 9– 15.
213. **Hamouda T et Baker JR. (2000).** Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. *J Applied Microbiol*, **89**: 397-403.
214. **Han SL, Li XX, Mian QH, Lan W, Liu Y. (2013).** Comparison of antioxidant activity between two species of chamomiles produced in Xinjiang by TLC-bioautography. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **38**(2):193-8.
215. **Han YM, Park JM, Jeong M, Yoo JH, Kim WH, Shin SP, Ko WJ et Hahm KB. (2015).** Dietary, non-microbial intervention to prevent *Helicobacter pylori*-associated gastric diseases. *Ann Transl Med*, **3** (9):122.
216. **Hansen S, Melby KK, Aase S, Jellum E et Vollset SE. (1999).** *Helicobacter pylori* infection and risk of cardia cancer and non-cardia gastric cancer. A nested case-control study. *Scand J Gastroenterol*, **34**(4): 353-360.
217. **Haruma K. (2000).** Trend toward a reduced prevalence of *Helicobacter pylori* infection, chronic gastritis, and gastric cancer in Japan. *Gastroenterology Clinics of North America*, **29**(3):31–623.
218. **Hayashi H. (2009).** Molecular biology of secondary metabolism: case study for Glycyrrhiza plants. In *Recent Advances in Plant Biotechnology* (Kirakosyan, A. and Kaufman, P.B., eds). New York, NY: Springer US, pp. 89– 103.
219. **Hayes AJ et Markovic B. (2002).** Toxicity of australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food Chem Toxicol*, **40**: 535-543.

## Références bibliographiques

---

220. **He ML, Li A, Xu CS, Wang SL, Zhang ML, Gu H, Yang YQ et Tao HH. (2007).** Mechanism of antiprostata cancer by gum mastic: NF kappa B signal as target. *Acta Pharmacol Sin*, 28: 446-462
221. **Heath HB. (1981).** Source book of flavors. AVI, Westport, CT.
222. **Heep M, Scheibl K, Degrell A, Lehn N. (1999).** Transport and storage of fresh and frozen gastric biopsy specimens for optimal recovery of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 37:3764-3766.
223. **Herbarth O, Krumbiegel P, Fritz G. J, Richter M, Schlink U, Muller DM et Richter T. (2001).** *Helicobacter pylori* prevalences and risk factors among school beginners in a German urban center and its rural county. *Environ. Health Perspect*, 109: 573–577.
224. **Hertog MGL, Ferkeens EJM, Hollman CH, Katan MB et Kromhout D. (1993).** Dietary antioxidants Dietary antioxidants flavonoids and risk of coronary heart disease: de Zupen elderly study. *Lancet.*, 342(8878):1007-1011.
225. **Hildebrand P, Bardhan P, Rossi L, Parvin S, Rahman A, Arefin MS. (2001).** Recrudescence and reinfection with *Helicobacter pylori* after eradication therapy in Bangladeshi adults. *Gastroenterology*, 121:792-8.
226. **Hildebrand P, Meyer-Wyss BM, Mossi S et Beglinger C. (2000).** Risk among gastroenterologists of acquiring *Helicobacter pylori* infection: case-control study. *British Medical Journal*, 321: 149-149.
227. **Hillemann D, Rusch-Gerdes S et Richter E. (2007).** Evaluation of the GenoType MTB DR plus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 45:2635–2640.
228. **Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E et Niemann S. (2005).** Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol*, 43:3699–3703.
229. **Hiruma–Lima CA, Gracioso JS, Rodriguez JA, Haun M, Nunes DS, Brito AR MS. (2000).** Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *Journal Ethnopharmacol*, 69: 229–234.

## Références bibliographiques

---

230. **Holcombe C. (2001).** *H. pylori*, the most common bacteria infection in Africa: a serological study random. University of Maiduguru, Nigeria. *Am J Gastroenterol Hepatol*, **16 (7)**: 734-739.
231. **Holian O, Wahid S, Atten MJ et Attar BM. (2002).** Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. **282**: 809–816.
232. **Hopkins WG. (2003).** Physiologie végétale. Université des Sciences et Technologie de Lille. *Edition de Boeck*. p99 – 120.
233. **Hu FL. (1993).** Comparison of acid and *Helicobacter pylori* in ulcerogenesis of duodenal ulcer disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **73(4)**:217-219, 253.
234. **Huwez FU et Al-Habbal MJ. (1986).** Mastic in treatment of benign gastric ulcers. *Gastroenterol Jpn*, **21**:273-274.
235. **Huwez FU, Thirlwell D, Cockayne A. et Ala'Aldeen DA. (1998).** Mastic gum kills *Helicobacter pylori*. *N Engl J Med*, **339**:1946.

### I

236. **IARC. (1994).** Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 61: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon: IARC.
237. **Ierardi E, Giorgio F, Losurdo G, Di Leo A, Principi M. (2013).** How antibiotic resistances could change *Helicobacter pylori* treatment: A matter of geography. *World J Gastroenterol*, **19**: 8168-8180.
238. **Institut Européen Des Substances Végétales, 2012**
239. **Isbrucker RA et Burdock GA. (2006).** Risk and safety assessment on the consumption of licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regul Toxicol Pharmacol*, **26**: 167–192.
240. **Iserin P. (2001).** Encyclopédie des Plantes Médicinales, Identification, Préparation, Soin. 2ème édition, Ed. Larousse/VUEF, 13-16; 250; 291-296.

### J

## Références bibliographiques

---

241. **Jafarzadeh A, Rezayati MT, Nemati M. (2007).** Specific serum immunoglobulin G to *H. pylori* and *CagA* in healthy children and adults (south-east of Iran). *J Gastroenterol*, **13**: 3117–3121.
242. **Jafri MA, Javed K, Singh S. (2001).** Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum Roxb*). *J Ethnopharmacol*, **75**: 89-94.
243. **Jafri NS, Hornung CA, Howden CW. (2008).** Meta-analysis: sequential therapy appears superior to standard therapy for *Helicobacter pylori* infection in patients naive to treatment. *Ann Intern Med*, **148**: 923–931.
244. **Jagannath P, Madhusudana GSI, Gopal JG. (2011).** Vitamin-C as anti-*Helicobacter pylori* agent: More prophylactic than curative- Critical review. *Indian J Pharmacol*, **43(6)**: 624–627.
245. **Jang S, Jones KR, Olsen CH, Joo YM, Yoo YJ, Chung IS, Cha JH et Merrell DS. (2010).** Epidemiological link between gastric disease and polymorphisms in *VacA* and *CagA*. *J Clin Microbiol*, **48(2)**: 559-567.
246. **Janzon A, Bhuiyan T, Lundgren A, Qadri F, Svennerholm AM et Sjöling A. (2009).** Presence of high numbers of transcriptionally active *Helicobacter pylori* in vomitus from Bangladeshi patients suffering from acute gastroenteritis. *Helicobacter*, **14(4)**: 237-247.
247. **Jeen YT, Lee SW, Kwon SI. (2001).** Differentiation between reinfection and recrudescence of *Helicobacter pylori* strains using PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Yonsei Med J*, **42**:41-5.
248. **Jonkers D, Van den Broek E, Van Dooren I, Thijs C, Dorant E, Hageman G et Stobberingh E. (1999).** Antibacterial effect of garlic and omeprazole on *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*, **43**:837–839.
249. **Joutei HA, Hilali A, Fechtali T, Rhallabi N, Benomar H. (2010).** *Helicobacter pylori* infection in 755 patients with digestive complaints: Pasteur Institute, Morocco, 1998-2007]. *East Mediterr Health J*, **16**:778-782.

## Références bibliographiques

---

250. **Juliani HR, Biurrun F, Koroch AR, Oliva MM, Demo MS, Trippi VS et Zygadlo JA. (2002).** Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana xenica*. *Planta Med*, **68**: 762–764.
251. **Jung SW, Sugimoto M, Graham DY et Yamaoka Y. (2009).** homB status of *Helicobacter pylori* as a novel marker to distinguish gastric cancer from duodenal ulcer. *J Clin Microbiol*, **47(10)**: 3241-3245.

### K

252. **Kabir AM, Aiba Y, Takagi A, Kamiya S, Miwa T et Koga Y. (1997).** Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut*, **41(1)**: 49-55.
253. **Kabir S. (2004).** Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter*, **9**:115–123.
254. **Kalemba D et Kunicka A. (2003).** Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, **10** : 813-829.
255. **Kalpoutzakis E, Aligannis N, Mentis A, Mitaku S, Charvala C. (2001).** Composition of the essential oil of two *Nepeta* species and *in vitro* evaluation of their activity against *Helicobacter pylori*. *Planta Med*, **67**: 880–883.
256. **Kamangar F, Dores GM et Anderson WF. (2006).** Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*, **24**:2137–2150.
257. **Kanizaj TF et Kunac N. (2014).** *Helicobacter pylori*: future perspectives in therapy reflecting three decades of experience. *World J Gastroenterol*, **20**:699-705.
258. **Karioti A, Vrahimi-Hadjilouca T, Droushiotis D, Rancic A, Hadjipavlou, Litina DS. (2006).** Analysis of the Essential Oil of *Origanum dubium* Growing Wild in Cyprus. Investigation of its Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. *Planta Med*, **72(14)**:1330-1334.

## Références bibliographiques

---

259. **Kartalis C et Chios Gum Mastic Growers Association. (2003).** Mastic Oil – Mastiha Oil. Safety Data Sheet (In conformity with the directive 91|155 CE). Greece, 1-4.
260. **Kataoka M, Hirata K, Kunikata T, Ushio S, Iwaki K, Ohashi K, Ikeda M et Kurimoto M. (2001).** Antibacterial action of tryptanthrin and kaempferol, isolated from the indigo plant (*Polygonum tinctorium Lour.*), against *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *J. Gastroenterol*, **36(1)**: 5-9.
261. **Kaur C et Kapoor HC. (2002).** Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Food Sci Technol*, **37**: 153-161.
262. **Keenan JI, Salm N, Wallace AJ et Hampton MB. (2012).** Using food to reduce H. pylori-associated inflammation. *Phytother Res*, **26 (11)**:1620-1625.
263. **Khandaker K, Palmer KR, Eastwood MA, Scott AC, Desai M et Owen RJ. (1993).** DNA Fingerprints of *Helicobacter-Pylori* from Mouth and Antrum of Patients with Chronic Ulcer Dyspepsia. *Lancet*, **342**:751-751.
264. **Kim HP, Son KH, Chang HW, kong SS. (2004).** Antiinflammatory plant flavonoids and cellular action mechanism. *J Pharmacol Sci*, **96**: 229-254
265. **Kim J, Marshall MR, Wei CI. (1995).** Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**: 2839-2845.
266. **Kim K, Kim Y, Yu H, Jeong S, Cha J, Kil B. et You Y. (2003).** Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Chrysanthemum boreale*. *Plant Med*, **69**: 274–277.
267. **Kim SY, Joo YM, Lee HS, Chung IS, Yoo YJ, Merrell DS, Cha JH. (2009).** Genetic analysis of *Helicobacter pylori* clinical isolates suggests resistance to metronidazole can occur without the loss of functional rdxA. *J Antibiot (Tokyo)*, **62**: 43-50.
268. **Kimbaris C, Siatis NG, Daferera DJ, Tarantilis PA, Pappas CS et Polissiou MG. (2006).** Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the



## Références bibliographiques

---

- isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonic Sonochemistry*, **13**: 54-60.
269. **Kivçak B et Akay S. (2005)**. Quantitative Determination Of alpha-Tocopherol In *Pistacia Lentiscus*, *Pistacia Lentiscus* Var. Chia, and *Pistacia Terebinthus* by Tlc-Densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*, **76**: 62–66.
270. **Kivçak B, Akay S, Demirci B et Baser K.H.C. (2004)**. Chemical composition of essential oils from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus var. chia*, and *Pistacia terebinthus* from Turkey. *Pharm Biol*, **42**: 360-366.
271. **Kivi M et Tindberg Y. (2006)**. *Helicobacter pylori* occurrence and transmission: a family affair. *Scand J Infect Dis*, **38**: 407-417.
272. **Knippig C, Arand F, Leodolter A. (2002)**. Prevalence of *H. pylori* infection in family members of *H. pylori* positive patients and its influence on the reinfection rate after successful eradication therapy: a two-year follow-up. *Z Gastroenterol*, **40**:383-7.
273. **Knobloch K, Pauli A, Iberi B, Weignad H et Weis N. (1989)**. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Essent Oil Res*, **1**: 119–128.
274. **Koehlin RC. (2006)**. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutr Clin Métabol*, **20**:165–77.
275. **Koletzko S, Richy F, Bontems P, Crone J, Kalach N, Monteiro ML. (2006)**. Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. *Gut*, **55**:1711–1716.
276. **Konturek PC, Konturek SJ et Starzyska T, Marlicz K, Bielanski W, Pierzchalski P, Karczewska E, Hartwich A, Rembiasz K, Lawniczak M, Ziemniak W et Hahn EC. (2000)**. *Helicobacter pylori* gastric link in MALT lymphoma. *Aliment Pharmacol Ther*, **14**: 1311-1318.
277. **Kosar M, Dorman HJD, Bachmayer O, Baser KHC, Hiltunen R. (2003)**. An improved on-line HPLC-DPPH method for the screening of free radical scavenging compounds in water extracts of lamiaceae plants, *Chemistry of Natural Compounds*, **39**: 161-166.

## Références bibliographiques

---

278. **Kovats E. (1965).** Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System. *Adv Chromatogr*, **1**: 229.
279. **Krejs GJ. (2010).** Gastric cancer: epidemiology and risk factors. *Dig Dis*, **28(4-5)**: 600-603.
280. **Kubo A, Corley DA, Jensen CD et Kaur R. (2010).** Dietary factors and the risks of oesophageal adenocarcinoma and Barrett's oesophagus. *Nutr Res Rev*, **23**: 230-246.
281. **Kuipers EJ. (1993).** Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, **13 (1)**:3-11.
282. **Kumaran A et Karunakaran RJ. (2006).** Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, **97**: 109–114.
283. **Kunicka-Styczyńska A. (2011).** Activity of essential oils against food-spoiling yeast. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, **26**: 326-328.
284. **Kusters JG, van Vliet AH et Kuipers EJ. (2006).** Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*, **19(3)**: 449-490.

### L

285. **Lai CH, Fang SH, Rao YK, Geethangili M, Tang CH, Lin YJ, Hung CH, Wang WC and Tzeng YM. (2008).** Inhibition of *Helicobacter pylori*-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells by *Phyllanthus urinaria* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. **118**: 522–526.
286. **Laine L, Estrada R, Trujillo M. (1998).** Effect of proton-pump inhibitor therapy on diagnostic testing for *Helicobacter pylori*. *Ann Intern Med*, **129**:547-50.
287. **Lambert JR, Lin SK, Sievert W, Nicholson L, Schembri M and Guest C. (1995).** High prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in an institutionalized population: evidence for person-to-person transmission. *Am. J. Gastroenterol*. **90**: 2167–2171.
288. **Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas JG. (2001).** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, **91**: 453-462.
289. **Lapointe G. (2004):** Notions de Toxicologie. 2<sup>nd</sup> ed. Commission de la santé et de la sécurité du travail, Québec, Canada, 16-20.

## Références bibliographiques

---

290. **Lascols C, Lamarque D, Costa JM, Copie-Bergman C, Le Glaunec JM, Deforges L, Soussy CJ, Petit JC, Delchier JC and Tankovic J. (2003).** Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4573–4577.
291. **Lattaoui N et Tantaoui-Elaraki A. (1994).** Individual and combined antibacterial activity of the main components of three thyme essential oils. *Rivista Italiana EPPOS*, **13**: 13–19.
292. **Leal YA, Flores LL, García-Cortés LB, CedilloRivera R et Torres J. (2008).** Antibody-based detection tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: A meta-analysis. *PLoS One*, **3(11)** : 3751.
293. **Leal-Herrera Y, Torres J, Monath TP. (2003).** High rates of recurrent and of transient reinfections of *Helicobacter pylori* in a population with high prevalence of infection. *Am J Gastroenterol*, **98**:2395-402.
294. **Lee A et Mégraud F. (1999):** *Helicobacter pylori*: techniques for clinical diagnosis and basic research. WB Saunders Company LTD. London, United Kingdom.
295. **Leung WK, Siu KL, Kwok CK, Chan SY, Sung R et Sung JJ. (1999).** Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. *Am. J. Gastroenterol.* **94**: 2881– 2884.
296. **Leung WK, Sung JJ, Ling TK, Siu KL and Cheng AF. (1999b).** Use of chopsticks for eating and *Helicobacter pylori* infection. *Dig. Dis. Sci.* **44**:1173-1176.
297. **Lewis DA et Hanson PJ. (1991).** Anti-ulcer drugs of plant origin. In: Ellis GP, West, London, 2001–2031.
298. **Li XQ, Andersson TB, Ahlstrom M et Weidolf L. (2004).** Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome activities. *Drug Metabolism and Disposition*, **32**: 821–827.
299. **Limburg P, Qiao Y, Mark S, Wang G, Perez-Perez G, Blaser M, Wu Y, Zou X, Dong Z, Taylor P and Dawsey S. (2001).** *Helicobacter pylori* seropositivity and

## Références bibliographiques

---

- subsitespecific gastric cancer risks in Linxian, China. *J. Natl. Cancer Inst.* **93(3)**: 226-233.
300. **Lin SK, Lambert JR, Schembri MA, Nicholson L and Korman MG. (1994).** *Helicobacter pylori* prevalence in endoscopy and medical staff. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **9**: 319-324.
301. **Linda S, Einbonda, Kurta Reynertsona, Xiao-Dongluoa, Margaretj Basileb, Edward J, Kennelly J. (2004).** Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem*, **84**: 23–28.
302. **Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P et al. (2007).** An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*. **445**: 915 – 918.
303. **Liu R. (2004).** Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention. Mechanism of action. *Journal of Nutritional*, **134**:3479-85.
304. **Liu RH. (2003).** Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin. Nutr*, **78**: 517-520.
305. **Lo Presti M, Sciarrone D, Crupi ML, Costa R, Ragusa S, Dugo G and Mondello L. (2008).** Evaluation of the volatile and chiral composition in *Pistacia lentiscus L.* essential oil. *Flavour Fragr. J.* **23**: 249- 257.
306. **Lottspeich C, Schwarzer A, Panthel K, Koletzko S and Russmann H. (2007).** Evaluation of the novel *Helicobacter pylori* ClariRes real-time PCR assay for detection and clarithromycin susceptibility testing of *H. pylori* in stool specimens from symptomatic children. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 1718– 1722.
307. **Loutrari H, Magkouta S, Pyriochou A, Koika V, Kolisis FN, Papapetropoulos A et Roussos C. (2006).** Mastic oil from *Pistacia lentiscus* var. chia inhibits growth and survival of human K562 leukemia cells and attenuates angiogenesis. *Nutr Cancer*, **55**: 86- 93.
308. **Loza-Tavera H. (1999).** Monoterpenes in essential oils: biosynthesis and properties. *Adv Exp Med Biol*, **464**: 49–62.

309. **Lu XG, Zhan LB, Feng BA. (2004).** Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene. *World J Gastroenterol*, **10**: 2140–2144.
310. **Luigia L, Francesca P, Anna S, Oscar A, Giuseppe V, Luciana T. (2008).** Autophagy inhibition enhances anthocyanin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther*, **7**: 2476-2485.

*M*

311. **MacNaughton WK et Cushing K. (2000).** Role of constitutive cyclooxygenase-2 in prostaglandin-dependent secretion in mouse colon in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, **293**: 539-544.
312. **Magiatis P, Melliou E, Skaltsounis A, Chinou JB and Mitaku S. (1999):** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* Var. Chia. *Planta Med.* **65(8)**: 749–752.
313. **Malaty HM, Graham DY, Wattigney WA, Srinivasan SR, Osato M, Berenson GS. (1999).** Natural history of *Helicobacter pylori* infection in childhood: 12-year follow-up cohort study in a biracial community. *Clin Infect Dis.* **28**:279–282.
314. **Malfertheiner P, Chan FK, McColl KE. (2009).** Peptic ulcer disease. *Lancet*, **374**:1449-1461.
315. **Malfertheiner P, Mégraud F, O’Morain CA, Atherton J, Axon ATR, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ and The European Helicobacter Study Group. (2012):** Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht IV/Florence consensus report. *Gut.* **61**:646-64.
316. **Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. (2007).** Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*, **56**:772-781.
317. **Malfertheiner P, Selgrad M. (2014).** *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Gastroenterol*, **30**: 589-595.

## Références bibliographiques

---

318. **Manach C, Mazur A, Scalbert A. (2005).** Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, **16**: 1–8.
319. **Manian R, Anusuya N, Siddhuraju P, Manian S. (2008).** The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry*, **107**:1000–1007.
320. **Mantle D, Anderton JG, Falkous G, Barnes M, Jones P, Perry EK. (1998).** Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol*, **21**: 385-391.
321. **Mariod AA, Ibrahim RM, Ismail M, Ismail N. (2009).** Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, **116**: 306–312.
322. **Marone P, Bono L, Leone E, Bona S, Carretto E, et Perversi L. (2001).** Bactericidal activity of Pistacia lentiscus mastic gum against *Helicobacter pylori*. *J Chemother*, **13**:611–61
323. **Marshall BJ et Warren JR. (1984).** bacilles incurvées non identifiées dans l'estomac des patients souffrant de gastrite et ulcère gastro-duodéal. *Lancet*. **1 (8390)**: 1311-1315.
324. **Marshall BJ, Royce H, Annear DI, Goodwin CS, Pearman JW, Warren JR et Armstrong JA. (1984).** Original isolation of Campylobacter pyloridis from human gastric mucosa. *Microbios Lett*. **25**: 83-88.
325. **Marshall BJ. (1983).** Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. **1**:1273-1275.
326. **Marshall BJ. et Goodwin CS. (1987).** Revised nomenclature of Campylobacter pyloridis. *Int. J. Systemat. Bacteriol*. **37**: 68.
327. **Martin S et Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*.

## Références bibliographiques

---

328. **Martins N, Barros L, Duenas M, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. (2015a).** Characterization of phenolic compounds and antioxidant properties of *Glycyrrhiza glabra* L. rhizomes and roots. *RSC Adv*, **5** : 26991–26997
329. **Matsuda H, Morikawa T, Ando S, Toguchida I, Yoshikawa M. (2003).** Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **11**: 1995–2000.
330. **Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, Azuma T, Okazaki IM, Honjo T and Chiba T. (2007).** *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med*. **13**: 470–476.
331. **Mbarek LA, Mouse HA, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A, Kamal M, Dalal A, Zyad A. (2007).** Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz J Med Biol Res*, **40**: 839-847
332. **McMahon BJ, Bruce MG, Hennessy TW, Bruden DL, Sacco F, Peters H . (2006).** Reinfection after successful eradication of *Helicobacter pylori*: a 2-year prospective study in Alaska Natives. *Aliment Pharmacol Ther*, **23**:1215-1223.
333. **Mecherara-Idjeri S., Hassani A., Castola V. and Casanova J. (2008):** Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria: leaf oil. *J. Essent. Oil Res.* **20**: 32–38.
334. **Meena AK, Yadav MM, Niranjana US, Singh B, Nagariya AK, Sharma K, Gaurav A, Sharma S and Rao MM. (2010).** A review of *Calotropis procera* Linn and its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. *Drug Invent Today*, **2(2)**: 185-190.
335. **Megraud F and Lehours P. (2007).** *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* **20**: 280-322.
336. **Megraud F et Lamouliatte H. (2003).** Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **17**: 1333–1343.
337. **Mégraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdörffer E, O'Morain C, Spiller R, Unge P, van Zanten SV, Wrangstadh M, Burman CF. (1999).** Antimicrobial susceptibility

## Références bibliographiques

---

- testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**: 2747-2752.
338. **Megraud F. (2003)**. When and how does *Helicobacter pylori* infection occur? *Gastroenterol Clin Biol*. **27(3 Pt 2)**: 374-379.
339. **Megraud F. (2004)**. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*, **53**:1374-1384.
340. **Megraud F. (2007)**: *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut*. **56**: 1502.
341. **Megraud F. (2013)**. Current recommendations for *Helicobacter pylori* therapies in a world of evolving resistance. *Gut Microbes*, **4**:541–8.
342. **Mehenni C, Kilani-Atmani D, Dumarcay S, Perrin D, Gérardin P, Atmani D. (2016)**. Hepatoprotective and antidiabetic effects of *Pistacia lentiscus* leaf and fruit extracts. *J. Food Drug Anal*, **24 (3)**: 653–669.
343. **Meunier O, Walter P, Chamouard P, Piemont Y, Monteil H. (1997)**. Isolation of *Helicobacter pylori*: necessity of control of transport conditions. *Pathol Biol (Paris)*, **45**: 82-85.
344. **Michel FO, Fabiana VL, Angela M, Rosendo AY, Joao BC. (2005)**. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium Kleinii* and a-amyrin pentacyclic triterpene. *Eur J Pharmacol*, **507**: 253–259.
345. **Miendje Deyi VY, Vanderpas J, Bontems P, VAN DEN Borre C, De Koster E, Cadranel S, Burette A. (2011)**. Marching cohort of *Helicobacter pylori* infection over two decades (1988-2007): combined effects of secular trend and population migration. *Epidemiol Infect*. **139**:572-580.
346. **Mignon M. (1992)**. Gastro-Enterologie : Précis des maladies de l'appareil digestif, Edition Ellipses, Paris, p703.
347. **Miguel MG. (2010)**. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*, **15**, 9252-9287.



## Références bibliographiques

---

348. **Milman N, Rosenstock S, Andersen L, Jorgensen T et Bonnevie O. (1998).** Serum ferritin, hemoglobin, and *Helicobacter pylori* infection: A seroepidemiologic survey comprising 2794 Danish adults. *Gastroenterol*, **115 (2)**: 268-274.
349. **Min Kim J, Mei Zheng H, Yong Lee B, Kyu Lee W, Haeng Le D. (2013).** Anti-*Helicobacter pylori* Properties of GutGard™. *Prev Nutr Food Sci*, **18(2)**: 104-110.
350. **Mitcheh A. (1986).** Tous les Arbres de nos Forêts. édition Bordas, 319.
351. **Mitchell HM, Hu P, Chi Y et al. (1998).** A low rate of reinfection following effective therapy against *Helicobacter pylori* in a developing nation (China). *Gastroenterology*, **114**:256-61.
352. **Mitchell HM, Lee A and Carrick J. (1989).** Increased incidence of *Campylobacter pylori* infection in gastroenterologists: further evidence to support person-to-person transmission of *C. pylori*. *Scand J Gastroenterol*, **24**: 396-400.
353. **Mitchell HM, Li YY, Hu PJ, Liu Q, Chen M, Du GG, Wang ZJ, Lee A and Hazell SL. (1992a).** Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. *J Infect Dis*, **166**:149-153.
354. **Mitchell HM. (2001).** Epidemiology of infection in *Helicobacter pylori*: physiology and genetics". *Mobley HL, Mendz GL and Hazell SL (ed.)*, ASM Press, Washington, D. C, 7-18.
355. **Miyamoto T, Okimoto T, Kuwano M. (2014).** Chemical Composition of the Essential Oil of Mastic Gum and their Antibacterial Activity Against Drug-Resistant *Helicobacter pylori*. *Natural Products and Bioprospecting*, **4 (4)**: 227–231.
356. **Moaddeb A, Fattahi MR, Firouzi R, Derakhshandeh V and Farshad S. (2016).** Genotyping of the *Helicobacter pylori cagA* Gene Isolated From Gastric Biopsies in Shiraz, Southern Iran: A PCR-RFLP and Sequence Analysis Approach. *Jundishapur J Microbiol*, **9(4)**: 30046.
357. **Moghtader M. (2009).** Chemical composition of the essential oil of *Teucrium polium* L. from Iran. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, **5(6)**: 843–846.

## Références bibliographiques

---

358. **Mohamed M, Sahar Y, Al-Okbi K, Ramadan S, Doha A and Mohammed SE. (2009).** Potential beneficial effect of functional food components in alzheimer disease, *Academia Arena*. **2 (1):** 55-68.
359. **Molina-Infante J, Shiotani A. (2015).** Practical aspects in choosing *Helicobacter pylori* therapy. *Gastroenterol Clin North Am*, **44:**519–35.
360. **Monti D, Chetoni P, Burgalassi S, Najarro M, Sætton MF, Boldrini E. (2002).** Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. *Int J Pharm*, **237:** 209-214
361. **Moraes TM, Kushima H, Moleiro FC, Santos RC, Rocha LR, Marques MO. (2009).** Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chem Biol Interact*, **180:** 499-505.
362. **More D et White J. (2005).** Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde, *Flammarion*, 18-79.
363. **Mujumdar AM et Misar AV. (2004).** Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats. *J Ethnopharmacol*. **90:** 11–15.
364. **Mukhopadhyay M. et Panja P. (2008).** A novel process for extraction of natural sweetener from licorice (*Glycyrrhiza glabra*) roots. *Separation Science and Technology*, **63:** 539–545.
365. **Murakami M, Masuda S, Shimbara S, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. (2005).** Cellular distribution, post-translational modification, and tumorigenic potential of human group III secreted phospholipase A (2). *J Biol Chem*, **280:** 24987-24998.
366. **Murray MT. (1995).** The Healing Power of Herbs. Rocklin, CA: *Prima Publishing*, 165.

## N

367. **Nascimento PFC, Nascimento ALC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Junior AMB and Trindade RC. (2007).** Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn*, **17:**108–113.

## Références bibliographiques

---

368. **NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997).** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Sixth ed. Approved Standard M2-A6, Wayne, PA.
369. **Ndip RN, Malange AE, Akoachere JF, MacKay WG, Titanji VP and Weaver LT. (2004).** *Helicobacter pylori* antigens in the faeces of asymptomatic children in the Buea and Limbe health districts of Cameroon: a pilot study. *Trop Med Int Health*, **9**: 1036-1040.
370. **Ndip RN, Malange Takang AE, Ojongokpoko JE, Luma HN, Malongue A, Akoachere JF, Ndip LM, MacMillan M et Weaver LT. (2008).** *Helicobacter pylori* isolates recovered from gastric biopsies of patients with gastro-duodenal pathologies in Cameroon: current status of antibiogram. *Trop Med Int Health*, **13**:848–854.
371. **Newall CA, Anderson LA and Phillipson JD. (1996).** Herbal medicines: a guide for health-care professionals. *London Pharmaceutical Press*, **72**.
372. **Ninfali P, Mea G, Giorgini S, Rocchi M, Bacchiocca M. (2005).** Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings. *British Journal of Nutrition*, **93**: 257–66.
373. **Niv Y et Hazazi R. (2008).** *Helicobacter pylori* recurrence in developed and developing countries: meta-analysis of <sup>13</sup>C-urea breath test follow-up after eradication. *Helicobacter*, **13**: 56-61.
374. **Nozaki K, Shimizu N, Ikehara Y, Inoue M, Tsukamoto T, Inada K, Tanaka H, Kumagai T, Kaminishi M et Tatematsu M. (2003).** Effect of early eradication on *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Cancer Sci*, **94**: 235-239.

## O

375. **Obst B, Wagner S, Sewing KF and Beil W. (2000).** *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis*, **21(6)**: 1111-1115.
376. **Ohno T, Kita M, Yamaoka Y, Imamura S, Yamamoto T, Mitsufuji S, Kodoma T, Kashima K, Imanishi J. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, **8**:207–215.
377. **Okimoto T, Murakami K, Sato R. (2003).** Is the recurrence of *Helicobacter pylori* infection after eradication therapy resultant from recrudescence or reinfection, in Japan. *Helicobacter*, **8**: 186-91.

378. **Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P and Megraud F. (2003).** Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, **41**: 397–402.
379. **Oliveira APR, Wum MEM, Freitas MC, Falanga DCS, Oliveira AC, Santos CF, Coelho-de-Souza AN. (2004).** Efeito Gastroprotetor do Óleo Essencial de Croton Sonderianus em Modelo de Indometacina. I Feira de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil, Abstracts.
380. **Oona M, Utt M, Nilsson I, Uibo O, Vorobjova T and Maaros HI. (2004).** *Helicobacter pylori* infection in children in Estonia: decreasing seroprevalence during the 11-year period of profound socioeconomic changes. *Helicobacter*, **9(3)** :233–241.
381. **Orellana V et Poniachik J. (2003).** Infection with *Helicobacter pylori*. *Actas De Reuniones Clínicas Medwave*, **3(4)**: 2337.
382. **Otha R, Yamada N, Kaneko H, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T and Suzuki A. (1999).** *In vitro* inhibition of the growth of *Helicobacter pylori* by oil-macerated garlic constituents. *Antimicrob. Agents Chemother*, **43**: 1811–1812.
383. **Owen RJ. (2002).** Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut*, **50**: 285-289.
384. **Oyedeji KS, Smith SI, Coker AO et Arigbabu AO. (2009).** Antibiotic susceptibility patterns in *Helicobacter pylori* strains from patients with upper gastrointestinal pathology in western Nigeria. *Br J Biomed Sci*, **66**:10–13.

**P**

385. **Pal J, Sanal MG, and Gopal GJ. (2011).** Vitamin-C as anti-*Helicobacter pylori* agent: More prophylactic than curative- Critical review. *Indian J Pharmacol*, **43(6)**: 624–627.
386. **Pan YN, Liang XX, Niu LY, Wang YN, Tong X, Hua HM, Zheng J, Meng DY, Liu XQ. (2015).** Comparative studies of pharmacokinetics and anticoagulatory effect in rats after oral administration of Frankincense and its processed products. *J Ethnopharmacol*, **172** : 118–123.
387. **Pan ZJ, Berg DE, Van Der Hulst RWM, Su WW, Raudonikiene A, Xiao SD, Dankert J, Tytgat GNJ, Van Der Ende A. (1998).** Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct *vacA* alleles in *Helicobacter pylori* from China. *J Infect. Dis*, **178**: 220–226.

## Références bibliographiques

---

388. **Panthong A, Kanjanapothi D, Taesotikul T, Phankummoon A, Panthong K, Reutrakul V. (2004).** Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from *Ventilago harmandiana* Pierre. *J Ethnopharmacol*, **91**: 237–242.
389. **Papastergiou V, Georgopoulos SD, Karatapanis S. (2014).** Treatment of *Helicobacter pylori* infection: meeting the challenge of antimicrobial resistance. *World J Gastroenterol*, **20**: 9898.
390. **Paraschos S, Magiatis P, Mitaku S, Petraki K, Kaliaropoulos A, Maragoudakis P, Mentis A, Sgouras D and Skaltsounis AL. (2007).** *In vitro* and *in vivo* activity of chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**: 551-559.
391. **Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J. (2002).** Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*, **50 (23)**: 6882-90.
392. **Park S, Yeo M, Jin JH, Lee KM, Kim SS, Choi SY and Hahm KB. (2007).** Inhibitory activities and attenuated expressions of 5-LOX with red ginseng in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Digestive Diseases and Sciences*, **52**: 973–982.
393. **Parsonnet J, Shmueli H and Haggerty T. (1999).** Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA*, **282 (23)**:2240–2245.
394. **Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. (2014).** Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World J Gastroenterol*, **20**, 12847–12859.
395. **Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M and Kole CR. (1997).** Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, **89**: 39-46.
396. **Peek RM et Blaser M J. (2002).** *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*, **2**:28-37.

## Références bibliographiques

---

397. **Peixoto PM , Lue JK , Ryu SY , Wroble BN , Sible JC , Kinnally KW . (2011).** Mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) function triggers a Bax/Bak-dependent bystander effect. *Am J Pathol*, **178(1)**: 48-54.
398. **Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, Lunet N. (2015).** Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. *Dig Dis Sci*, **59**:1698-1709.
399. **Perez Gutierrez RM. (2012).** Inhibition of Advanced Glycation End-Product Formation by *Origanum majorana* L. In Vitro and in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*.
400. **Perry S, de la Luz Sanchez M, Yang S, Haggerty TD, Hurst P, Perez-Perez G and Parsonnet J. (2006).** Gastroenteritis and transmission of *Helicobacter pylori* infection in households. *Emerg Infect Dis*, **12**: 1701–1708.
401. **Picci V, Scotti A, Mariani M and Colombo E. (1987).** Composition of the volatile oil of *Pistacia lentiscus* L. of Sardinian origin. *Flavour Science and Technology*, 107–110.
402. **Piccolomini RG, DeBonaventura D, Festi G, Catamo F, Laterza M and Neri M. (1997).** Optimal combination of media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol*, **35**:1541-1544.
403. **Poms RE and Tatini SR. (2001).** Survival of *Helicobacter pylori* in ready to eat foods at 4 degrees C. *Int J Food Microbiol*, **63(3)**:281–286.
404. **Pongpiriyadacha Y, Matsuda H, Morikawa T, Asao Y, Yoshikawa M. (2003).** Protective effects of polygodial on gastric mucosal lesions induced by necrotizing agents in rats and the possible mechanisms of action. *Biol Pharm Bull*, **26(5)**:651-657.
405. **Pounder RE et Ng D. (1995).** The Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Different Countries. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **9 (Suppl.2)**:33-39.
406. **Prasad G, Jamkhande S, Gattani G, Farhat SA. (2016).** *Helicobacter pylori* and cardiovascular complications: a mechanism based review on role of *Helicobacter pylori* in cardiovascular diseases. *integr med res*, **5**: 244–249.

## Références bibliographiques

---

407. **Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. (2003).** Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem*, **51(11)**:3273-9.

### Q

408. **Queralt N, Bartolome R And Araujo R. (2005).** Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *J Appl Microbiol*, **98**: 889-895.
409. **Quezel P et Santa S. (1962).** Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. Tome I, Centre Nationale de la Recherche Scientifique. P611

### R

410. **Rafsanjani FN, Shahrani M, Ardakani ZV and Ardakani MV. (2007).** Marjoram increases basal gastric acid and pepsin secretions in rat Department of Physiology, Tehran University of Medical Sciences, *Tehran Phytother Res*, **21(11)**.
411. **Rahman M, Mukhopadhyay AK, Nahar S. (2003).** DNA-level characterization of *Helicobacter pylori* strains from patients with overt disease and with benign infections in Bangladesh. *J Clin Microbiol*, **41**: 2008–2014.
412. **Rahman S, Ansari RA, Rehman H, Parvez S. (2011).** Raisuddin, nordihydroguaiaretic acid from creosote bush (*Larrea Tridentata*) mitigates 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammatory and oxidative stress responses of tumor promotion cascade in mouse skin. *Evid Based Complement Alternat Med*, Epub.
413. **Ramadana G, El-Beih MN and Zahraa MM. (2012).** Egyptian sweet marjoram leaves protect against genotoxicity, immune suppression and other complications induced by cyclophosphamide in albino rats. *British Journal of Nutrition*, **108 (06)**: 1059-1068.
414. **Ramanampamonjy RM, Randria MJD, Razafimahefa SH, Ratsimandisa R, Rajaonarivelo P et Rajaona HR. (2007).** Séroprévalence de l'infection due à *Helicobacter pylori* dans un échantillon de population malgache. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **100 (1)**:57–60.

## Références bibliographiques

---

415. **Raymond J, Lamarque D, Kalach N, Chaussade S, Burucoa C. (2010).** High level of antimicrobial resistance in French *Helicobacter pylori* isolates. *Helicobacter*, **15**: 21-27.
416. **Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi MK, Kawachi M, Eslamifar A, Schmidt OJ, Schmidt A, Allameh A, Yoshinari T. (2006).** Ultrastructural evidences of growth inhibitory effects of a novel biocide, Akacids ®plus, on an aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Toxicon*, **48**: 1075-1082.
417. **Reichl F X. (2004).** Guide Pratique de Toxicologie, 11<sup>ème</sup> édition, *De Boeck & Larcier, Bruxelles*, 03-08.
418. **Repetto MG et Llesuy SF. (2002).** Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med Biol Res*, **35(5)**:523-34.
419. **Rezaie A, Jafari B, Mousavi G, Nazeri M, Ebad A, Ahmadeh C and Habibi E. (2011)** .Comparative Study of Sedative, Pre-Anesthetic and Anti-Anxiety Effect of *Origanum majorana* Extract with Diazepam on Rats. *Research Journal of Biological Sciences*, **6(11)**: 611-614.
420. **Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Hosseini ME and Atherton JC. (2007).** A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*, **133(3)**: 926-936.
421. **Roberts SE, Morrison-Rees S, Samuel DG, et al. (2016).** Review article: the prevalence of *Helicobacter pylori* and the incidence of gastric cancer across Europe. *Aliment Pharmacol Ther*, **43**: 334–45.
422. **Rodriguez-Amaya DB, Kimura M, Godoy HT, Amaya-Farfan J. (2008).** Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *J Food Compos Anal*, **21**: 445-463.
423. **Rollan A, Giancaspero R, Fuster F, Acevedo C, Figueroa C, Hola K. (2000).** The long-term reinfection rate and the course of duodenal ulcer disease after eradication of *Helicobacter pylori* in a developing country. *Am J Gastroenterol*, **95**:50-56.



## Références bibliographiques

---

424. **Romani P, Pinelli C, Galardi N, Mulinacci M et Tattini. (2002).** Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia Lentiscus* L. *Phytochem Anal*, **13(2)**: 79-86.
425. **Rossi PG, Berti L, Panighi J, Maury J, Muselli A, de Rocca Serra D, Gonny M, Bolla JM. (2007a).** Antibacterial action of essential oils from Corsica. *J Essent. Oil Res*, **19**: 176-182.
426. **Rothenbacher D, Bode G, Adler G, Brenner H. (1998).** History of antibiotic treatment and prevalence of *H. pylori* infection among children: results of a population based study. *J Clin Epidemiol*, **51**:267-271.
427. **Rowland M, Kumar D, Daly L. (1999).** Low rates of *Helicobacter pylori* reinfection in children. *Gastroenterology*, **117**:336-41.
428. **Rozza AL et Pellizzon CL. (2012).** Essential oils from medicinal and aromatic plants: a review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. *Fundam Clin Pharmacol*, **27**:51–63.
429. **Rozza AL, Moraes TM, Kushima H, Tanomoto A, Marques MOM, Bauab TM, Hiruma-Lima CA, Pellizzon CH. (2011).** Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and pinene: involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. *Chem Biol Interact*, **189**: 82–89.
430. **Ruberto G et Baratta MT. (2000).** Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem*, **69** : 167–174.
431. **Rudi J, Rudy A, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Stremmel W. (1999).** Direct determination of *Helicobacter pylori* vacA genotypes and cagA gene biopsies and relationship to gastrointestinal diseases. *Am J Gastroenterol*, **94 (6)**: 1525–1531.
432. **Russo F, Notarnicola M, Di Matteo G, Leoci C, Caruso ML, Pirrelli M, Caradonna M, Morandi L and Di Leo A. (1999).** Detection of *Helicobacter pylori* cagA gene by polymerase chain reaction in faecal samples. *Eur J Gastroenterol. Hepatol*, **11**: 251-256.

S

433. **Safaei HG, Rahim E, Rashidipour R. (2011).** *Helicobacter pylori* as a zoonotic infection: the detection of *H. pylori* antigens in the milk and the faeces of cows. *J Res Med Sci*, **16**:184–7.
434. **Salonen A, Janne Nikkilä, Jonna Jalanka-Tuovinen, Outi Immonen, Mirjana Rajilić-Stojanović, Riina A. Kekkonen, Airi Palva, Willem M de Vos.(2010).** Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *Journal of Microbiological Methods*, **81** : 127–134.
435. **Salzer UJ. (1977).** The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings: a critical review. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*, **9**: 345-373.
436. **Sánchez-Guijo A, Hartmann MF, Wudy SA. (2013).** Introduction to Gas Chromatography-Mass Spectrometry *in: Hormone Assays in Biological Fluids: Second Edition, Methods in Molecular Biology, Michael J. Wheeler (ed).* New York. P. 27-44.
437. **Sanchez-Moreno C. (2002).** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int*, **8**: 121–137.
438. **Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibañez E, Señoráns FJ et Reglero G. (2005).** Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, **68**: 790-795.
439. **Sato H, Taketomi Y, Isogai Y, Masuda S, Kobayashi T, Yamamoto K, Murakami M. (2009).** Group III secreted phospholipase A<sub>2</sub> transgenic mice spontaneously develop inflammation. *Biochem J*, **421**: 17-27.
440. **Sayyah M, Saroukhani G, Peirovi A, Kamalinejad M. (2003).** Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. *Phytotherapy Research*, **17**: 733-736.
441. **Scalbert A, Manach C, Morand C et Rémésy C. (2005).** Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**: 287–306.

## Références bibliographiques

---

442. **Schmidt A, Hall MN, Koller A. (1994).** Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae*, TAT1 and TAT2, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan uptake. *Mol Cell Biol*, **14(10)**: 6597-606.
443. **Selling JA, Hogan H, Aly DL, Koss MA, Isengerg JL. (1987).** Indometacin inhibits duodenal bicarbonate secretion and endogenous prostaglandin E2 output in human subjects. *Annals of internal medecin*, **106**: 368-371.
444. **Senatore F. (1996).** Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J Agric Food Chem*. **44**: 1327-1332
445. **Seo M, Okada M, Shirotani T, Nishimura H, Maeda K, Aoyagi K. (2002).** Recurrence of *Helicobacter pylori* infection and the long-term outcome of peptic ulcer after successful eradication in Japan. *J Clin Gastroenterol*, **34**:129-34.
446. **Sepulveda B, Astudillo L, Rodríguez JA, Yáñez T, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G. (2005).** Gastroprotective and cytotoxic effect of dehydroabietic acid derivatives. *Pharmacol Res*, **52**: 429–437.
447. **Sertié JAA, Woisky RG, Wiesel G, Rodrigues M. (2005).** Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. *Phytomedicine*, **12**: 338-344.
448. **Sezikli M, Çetinkaya ZA, Güzelbulut F, Yeşil A, Coşgun S et Kurdaş OÖ. (2012).** Supplementing vitamins C and E to standard triple therapy for the eradication of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pharm Ther*, **37(3)**: 282-285.
449. **Sgouras DN, Trang TT et Yamaoka Y. (2015).** Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, **20 (Suppl. 1)**:8-16.
450. **Sharafzadeh S et Alizadeh O. (2001).** German and Roman Chamomile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **1(10)**: 1-5.
451. **Sherwood. (2006).** Physiologie humaines : 2ème édition. De Boeck, Paris, 452-462.
452. **Siani AC, Ramos MF, Menezes-de-Lima OJR, Ribeiro-dos-Santos R, Fernadez-Ferreira E, Soares RO. (1999).** Evaluation of anti-inflammatory-related activity of

## Références bibliographiques

---

- essential oils from the leaves and resin of Rosas EC, Susunaga GS, Guimaraes AC, Zoghbi MG, Henriques MG species of *Protium*. *J Ethnopharmacol*, 66: 57-69.
453. **Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. (1994).** Intercalations of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem*, **269** : 8022–8028.
454. **Silva HG, de O Pires, AJV, Silva FF, daVelooso CM, Carvalho GGP, deCezario AS, Santos CC. (2005).** Effects of feeding cocoa meal (*Theobroma cacao* L.) and palm kernel cake (*Elaeis guineensis*, Jacq) on milk intake and yield for lactating goats. *Rev Bras Zootec*, **34 (5)**: 1786-1794.
455. **Siman JH, Forsgren A, Berglunda G et Florén CH. (1997).** Association between *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma in the city of Malmo, Sweden. A prospective study. *Scand J Gastroenterol*, 32 (12): 1215-1221.
456. **Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, Schramm Y, Dieu LH, Huwyler J, Chaboz S, Hoener MC, Liechti ME. (2013).** Pharmacological characterization of designer cathinones *in vitro*. *Br J Pharmacol*, 168 (2):458-70.
457. **Simões CM, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA et Petrovick PR. (2007).** Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. revisada e ampliada. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 1102.
458. **Simsek IS, Menevse S et Sahin FI. (2000).** PCR and RFLP analysis for identification and typing of *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric biopsy specimens. *Tohoku J Exp Med*, **190**:213-22.
459. **Sinha SK, Martin B, Gold BD, Song Q, Sargent M, et Bernstein CN. (2004).** The incidence of *Helicobacter pylori* acquisition in children of a Canadian First Nations community and the potential for parentto-child transmission. *Helicobacter*, **9**: 59–68.
460. **Siqueira JS. (2007).** Aspectos Gerais nas Infecções por *Helicobacter pylori*. *Revisão RBAC*, **39(1)**: 9-13.
461. **Sivam GP, Lampe JW, Ulness B, Swanzy SR et Potter JD. (1997).** *Helicobacter pylori in vitro* susceptibility to garlic (*Allium sativum*) extract. *Nutr Cancer*, **27(2)**:118-121.

## Références bibliographiques

---

462. **Sivam GP. (2001).** Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. *J Nutr*, **131**:1106–1108.
463. **Skirrow MB. (1983).** Taxonomy and biotyping. In: “Campylobacter II. Proceedings of the Second International Workshop on Campylobacter infections”. *Pearson A.D, Skirrow M.B, Rowe B, Davies J, Jones D.M. Eds.* London: Public Health Laboratory Service. pp 33-38.
464. **Skliar MI et Bucciarelli A. (2007).** Medicinal plants from Argentina with gastro protective activity. *Ars Pharmaceutica*, **48**: 361–369.
465. **Smith SI, Kirsch C, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Coker AO, Bayerdöffer E, Miehleke S. (2002).** Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA* and *iceA* genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *J Med Microbiol*, **51**: 851–854.
466. **Sobhani IH. (1994).** *H. pylori*, lymphome et adénocarcinome gastriques. *Gastroenterol Clin Biol*, **18** : 232-235.
467. **Soltani E, Cerezuela R, Charef N, Mezaache-Aichour S, Esteban MA et Zerroug MM. (2017).** Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and *in vitro* effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, **62**: 57-67.
468. **Song MJ et Kim NM. (2003).** Antimicrobial action of p-hydroxyphenyl acrylate. *Int Biodeterior Biodegradation*, **52**: 107-113.
469. **Song Q, Spahr A, Schmid R, Adler G, Bode G. (2000a).** *Helicobacter pylori* in the oral cavity: high prevalence and great DNA diversity. *Dig Dis Sci*, **45(11)**: 2162–2167.
470. **Soto G, Bautista CT, Roth DE, Gilman RH, Velapatiño B, Ogura M. (2003).** *Helicobacter pylori* reinfection is common in Peruvian adults after antibiotic eradication therapy. *J Infect Dis*, **188**:1263-75.
471. **Soxhlet F. (1879).** Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dingler's Polytechnisches Journal*, **232**: 461–465.
472. **Stahl W, Schwarz W, Sundquist AR, Sies H. (1992).** *Cis-trans* isomers of lycopene and  $\beta$ -carotene in human serum and tissues. *Arch Biochem Biophys*, **294**:173-177.

473. **Stasi R, Sarpatwari A, Segal JB, Osborn J, Evangelista ML, Cooper N, Provan D, Newland A, Amadori S, Bussel JB. (2009).** Effects of eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review. *Blood*, **113**:1231-1240.
474. **Storskrubb T, Aro P, Ronkainen J, Wreiber K, Nyhlin H, Bolling-Sternevald E, Talley NJ, Engstrand L. (2006).** Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains in a random adult Swedish population. *Helicobacter*, **11**: 224-230.
475. **Suerbaum S et Michetti P. (2002).** *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*, **347(15)**: 1175-1186.
476. **Sugimoto M et Yamaoka Y. (2009).** Virulence factor genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradication therapy. *Arch Immunol*, **57**: 45–56.
477. **Sun HD, Qiu SX, Lin LZ, Wang ZY, Lin ZW, Pengsuparp T, Pezzuto JM, Fong HH, Cordell GA. et Farnsworth NR. (1996).** Nigranoic acid, a triterpenoid from *Schisandra sphaerandra* that inhibits HIV-1 reverse transcriptase. *J Nat Prod*, **59**:525–527.
478. **Suresh B, Sriram S, Dhanaraj S. A, Elango K. et Chinnaswamy K. (1997).** Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *J Ethnopharmacol*, **55**:151–159.
479. **Sweeney G, Henderson JN, Goers J, Wreden C, Hicks KG, Foster JK, Parthasarathy R, Remington SJ et Guillemin K. (2012).** Structure and Proposed Mechanism for the pH-Sensing *Helicobacter pylori* Chemoreceptor TlpB, *Structure*, **20 (7)**: 1177–1188.

**T**

480. **Tahraoui A, Israili ZH, Lyoussi B. (2010).** Acute and sub-chronic toxicity of lyophilized aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents. *J Ethnopharmacol*, **132**: 48-55.
481. **Takeuchi H, Trang VT, Morimoto N. (2014).** Natural products and food components with anti-*Helicobacter pylori* activities. *World J. Gastroenterol*, **20**:8971-8978.

## Références bibliographiques

---

482. **Talebkhani Y, Mohammadi M, Mohagheghi MA, Vaziri HR, Hosseini ME, Mohajerani N, Oghalaei A, Esmaceli M, Zamaninia L. (2008).** *CagA* gene and protein status among Iranian *Helicobacter pylori* strains. *Dig Dis Sci*, **53**:925–932.
483. **Tan PV, Nyasse B, Dimo T et Mezui C. (2002).** Gastric cytoprotective anti-ulcer effects of leaf methanol extract of *Ocimum suave* (Lamiaceae) in rats. *J. Ethnopharmacol*, **82**: 69-74.
484. **Tan S, Tompkins LS, Amieva MR. (2009).** *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. *PLoS Pathog*, **5**(5): e1000407.
485. **Tanih NF, McMillan M, Naidoo N, Ndip LM, Weaver LT, Ndip RN. (2010b).** Prevalence of *H. pylori vacA*, *cagA* and *iceA* genotypes in South African patients with upper gastrointestinal diseases. *Acta Tropica*, **116**: 68-73.
486. **Tassou CC et Nychas GJE. (1995).** Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. chia) on gram positive and gram negative bacteria in broth and model food system. *Int Biodeter Biodegradation*, **36**:411–420.
487. **Taylor RSL, Edel F, Manandhar NP, Towers GHN. (1996).** Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, **50**:97–102.
488. **Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissou M. (2005).** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem*, **90**: 333-340.
489. **Terpinc P, Bezjak M, Abramovic H. (2009).** A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*, **115**: 740-744.
490. **Teshima S, Rokutan K, Nikawa T, Kishi K. (1998).** Guinea pig gastric mucosal cells produce abundant superoxide anion through an NADPH oxidase-like system. *Gastroenterology*, **115**: 1186–1196.
491. **The EUROGAST Study Group. (1993).** Epidemiology of, and risk factors for, *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut*, **34**:1672–1676.

## Références bibliographiques

---

492. **Thompson L, Cockayne A, Spiller RC. (1994).** Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on the growth of *Helicobacter pylori*: a possible explanation of the effect of diet on peptic ulceration. *Gut*, **35**:1557-1561.
493. **Tim Cushnie TP and Lamb AJ. (2011).** Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Ag*, **38**:99–107.
494. **Tkachenko MA, Zhannat NZ, Erman LV, Blashenkova EL, Isachenko SV, Isachenko OB, Graham DY, Malaty HM. (2007).** Dramatic changes in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection during childhood: a 10-year follow-up study in Russia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **45**: 428–432.
495. **Tomi F, Bradesi P, Bighelli A, Casanova J. (1995).** Computer-aided identification on individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy. *J Magn Reson Anal*, 1: 25-34.
496. **Tummuru MK, Sharma SA, Blaser MJ. (1995).** *Helicobacter pylori* pic B, a homologue of the Bordetella pertussis toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol*, **18**: 867-876.
497. **Turner RA. (1965).** Screening Methods in Pharmacology, vol. 1. *Academic Press, New York*, pp232.

### U

498. **Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N et Schlemper RJ. (2001).** *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*, **345**:784-789.
499. **Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. (2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 68 : 1561–1568.
500. **Umezu T. (1999).** Anticonflict effects of plant-derived essential oils. *Pharmacol Biochem Behav*, **64**: 35-40
501. **UNEP-WCMC. (2002).** Biodiversity data sourcebook. United nation environment programme-World conservation monitoring center, Cambridge, England.



## Références bibliographiques

---

502. **Unlu M, Daferera D, Donmez E, Polissiou M, Tepe B, Sokmen A (2002).** Compositions and the *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). *J Ethnopharmacol*, **83**: 117–121.
503. **Upile T, East C, Paun S, Patel N, Battacharyya A. (2002).** *Helicobacter pylori* infection in surgical personnel. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, **27**:310-313.
504. **USDA, ARS.** National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network-(GRIN). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, 2013.
- V**
505. **Vakil N et Mégraud F. (2007).** Eradication therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **133**: 985-1001
506. **Vale FF. et Vítor JM. (2010).** Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: does food play a role in rural and urban areas? *Int J Food Microbiol*, **138**:1-12.
507. **Van Der Ende A, Van Doorn L. J, Rooijackers S, Feller M, Tytgat GN. et Dankert J. (2001).** Clarithromycin-susceptible and -resistant *Helicobacter pylori* isolates with identical randomly amplified polymorphic DNA-PCR genotypes cultured from single gastric biopsy specimens prior to antibiotic therapy. *J Clin Microbiol*, **39**: 2648–2651.
508. **Van der Hulst RW, Rauws EA, Koycu B, Keller JJ, ten Kate FJ, Dankert. (2001).** *Helicobacter pylori* reinfection is virtually absent after successful eradication. *J Infect Dis*, **176**:196-200.
509. **Van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, Queiroz DM, Nouhan N et Quint WG. (2001).** Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**: 1500-1504.
510. **Van Doorn LJ, Scheneberger PMN, Nouhan AP, Plaisier WG, Quint V, Boer WA, (2000).** Importance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. *Gut*, **46**: 321–326.

## Références bibliographiques

---

511. **Van Zwet A, Thijs J, Roosendaal R, Kuipers EJ, Peña S et De Graaff J. (1996).** Review: Practical diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **8(5)**: 501-507.
512. **Vane JR. (1971).** Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol*, **231**: 232–235.
513. **Vankar PS. (2004).** Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance*, **9(4)**: 30–41.
514. **Vécsei A, Kipet A, Innerhofer A, Graf U, Binder C, Gizci H, Hammer K, Bruckdorfer A, Huber WD, Hirschl AM, Makristathis A. (2010).** Time trends of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in children living in Vienna, Austria. *Helicobacter*, **15**: 214-220.
515. **Vega AE, Cortinas TI, Puig ON et Silva HJ. (2010).** Molecular characterization and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* strains isolated in western Argentina. *Int J Infect Dis*, **14 (Suppl. 3)**: 85-92.
516. **Velasco Elizalde C, Fernández Ferrer MA et Rodríguez Muñoz N. (2007).** Serologic diagnosis of *Helicobacter pylori* in endoscopy personnel. Serology in endoscopists. *Rev Esp Enferm Dig*, **99**:88-93.
517. **Vera RR et Chane-Ming J. (1999).** Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. *Food Chemistry*, **66** :143-145.
518. **Vidrich V, Graziano PFA, Silvestrini E, Marco Michelozzi M et Marco F. (2004).** Chemical Composition of the Essential Oil of *Pistacia lentiscus* L. *J Essent Oil Res*, **16**: 223-226.
519. **Vincent P. (1994).** Quels sont les modes de contamination possibles de l'infection à *H. pylori* ? *Gastrographies*, **16**.
520. **Vishwakarma RA. (1990).** Stereoselective synthesis of a-artether from artemisinin. *J Nat Prod*, **53**: 216–217.
521. **Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J et Rissanen TH. (2006).** Carotenoids and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr*, **83**: 1265-1271.

W

522. **Wald NJ, Law MR, Morris JK et Bagnall AM. (1997).** *Helicobacter pylori* infection and mortality from ischaemic heart disease: negative result from a large, prospective study. *Bmj*, **315 (7117)**: 1199-1201.
523. **Wang F, Herzmark P, Weiner OD, Srinivasan S, Servant G, and Bourne HR. (2002).** Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nat Cell Biol*, **4** :513–518.
524. **Wang W, Wu N, Zu, YG, Fu YJ. (2008).** Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil compared to its main components. *Food Chem*, **108**: 1019–1022.
525. **Wang WH, Huang JQ, Zheng GF, Lam SK, Karlberg J et Wong BC. (2003).** Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, **95**:1784-1791.
526. **Watanabe Y, Kurata JH, Mizuno S, Mukai M, Inokuchi H, Miki K, Ozasa K et Kawai K. (1997).** *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. A nested case-control study in a rural area of Japan. *Dig Dis Sci*, **42(7)**: 1383- 1387.
527. **Weseler A, Geiss HK, Saller R, Reichling JA. (2005).** Novel colorimetric broth microdilution method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics and essential oils against *Helicobacter pylori*. *Pharmazie*, **60**:498–502.
528. **Wheeldon TU, Hoang TT, Phung DC, Björkman A, Granström M, Sörberg M. (2005).** Long-term follow-up of *Helicobacter pylori* eradication therapy in Vietnam: reinfection and clinical outcome. *Aliment Pharmacol Ther*, **21**:1047—53.
529. **Whittle B R. (1997).** Mechanism underlying gastric mucosal damage induced by indomatacin and bile salts, and the action of prostaglandins. *British Journal of Pharmacology*, **60**: 455-460.
530. **Wichtl M et Anton R. (2001).** Plantes thérapeutiques. 1ère ed. Ed TEC et DOC.
531. **Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, Lai KC, Hu WH, Yuen ST, Leung SY, Fong DY, Ho J, Ching CK, Chen J S et China Gastric Cancer Study Group. (2004).** *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric

## Références bibliographiques

---

- cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA*, **291**:187-194.
532. **Woo HY, Park DI, Park H, Kim MK, Kim DH, Kim IS. et Kim YJ. (2009).** Dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin resistance with gastric biopsy specimens. *Helicobacter*, **14(1)**: 22–28.
533. **Wu DC, Hsu PI, Wu JY, Opekun AR, Kuo CH, Wu IC, Wang SS, Chen A, Hung WC, Graham DY. (2010).** Sequential and concomitant therapy with four drugs is equally effective for eradication of *H. pylori* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **8**:36-41.
534. **Xia HX, Talley NJ, Keane CT, O’Morain CA. (1997).** Recurrence of *Helicobacter pylori* infection after successful eradication: nature and possible causes. *Dig Dis Sci*, **42**:1821-34.
535. **Xing JZ, Clarke C, Zhu L et Gabos S. (2005).** Development of a microelectronic chip array for high-throughput genotyping of *Helicobacter* species and screening for antimicrobial resistance. *J Biomol Screen*, **10**: 235–245.
- X-Y-Z**
536. **Yahia M. (1992).** La Thérapeutique par les Plantes Communes en Algérie. *Ain Taya*, 59.
537. **Yamaoka Y. (2010).** Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. **7(11)**: 629–641.
538. **Yang J, Guo J et Yuan J. (2008).** *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT*, **41**:1060- 1066.
539. **Yanishlieva NVI et Marinova EM. (1995).** Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry*, **54**: 337- 382.
540. **Yaron Niv. (2008).** *H pylori* recurrence after successful eradication. *World J Gastroenterol*, **14 (10)**: 1477-8.

## Références bibliographiques

---

541. **Yoshida N, Granger DN, Evans DJ, Evans DG, Graham DY, Anderson DC, Wolf RE et Kviety PR. (1993).** Mechanisms involved in *Helicobacter pylori* induced inflammation. *Gastroenterology*, **105**: 1431–1440.
542. **Young JM et De Young LM. (1989).** Pharmacological Methods in the Control of Inflammation. In: Spector J, Back, N. (Eds.), Alan R Liss Inc, New York. p 215.
543. **Zaidi SF, Ahmed K, Yamamoto T, Kondo T, Usmanghani K, Kadowaki M et Sugiyama T. (2009b).** Effect of resveratrol on *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 secretion, reactive oxygen species generation and morphological changes in human gastric epithelial cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **32**: 1931–1935.
544. **Zaidi SF, Muhammad JS, Usmanghani K et Sugiyama T. (2015).** Review: Pharmacological ins and outs of medicinal plants against *Helicobacter pylori*: A review. *Pak J Pharm Sci*, **28 (Suppl. 03)**:1171-1176.
545. **Zhang HM, Wakisaka N, Maeda O et Yamamoto T. (1997).** Vitamin C inhibits the growth of a bacterial risk factor for gastric carcinoma: *Helicobacter*. *Cancer*, **80**:1897-1903.
546. **Zhao RJ, Koo BS, Kim GW, Jang EY, Lee JR, Kim MR, Kim SC, Kwon YK, Kim KJ, Huh TL, Kim DH, Shim I, Yang CH. (2005).** The essential oil from *Angelica gigas* NAKAI suppresses nicotine sensitization. *Biol Pharm Bull*, **28**: 2323-2326.

## Liste des communications et publication :

- Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* contre des isolats cliniques d'*Helicobacter pylori* ; journées scientifiques à l'occasion du 40<sup>ème</sup> anniversaire de l'USTHB du 20 au 24 avril 2014: présentation d'une communication orale.

**Auteurs:** MEDJKANE Meriem, ALLEM Rachida.

- Activité antibactérienne de certaines plantes médicinales contre *Helicobacter pylori* ; 4<sup>ème</sup> salon national de l'association des sciences de la vie « Bi-A-V » 05 et 06/05/2014.

**Auteurs:** MEDJKANE Meriem, ALLEM Rachida.

- Development of a new test; Genotype HelicoDR; for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*; Premier Séminaire National en Biologie et Santé (SNBS 2015) 14 décembre 2015.

**Auteurs:** MEDJKANE Meriem, ALLEM Rachida.

- Gastroprotective effect of *Pistacia lentiscus* essential oil; International seminair on the valuation of aromatic and medicinal plants of the Mediterranean, Blida 11 and 12 november 2015.

**Auteurs:** MEDJKANE Meriem, ALLEM Rachida, MEDJAHED Housseyn, MOUHI Lilya, NAIT BACHIR Yacine.

## Publication Internationale:

- **MEDJKANE Meriem, ALLEM Rachida, MEDJAHED Housseyn, TALEB Farida, MEROUANE Abdelaziz & MOUFFOK Fouzia. (2016).** Antimicrobial Activity of the Essential Oil Isolated from *Pistacia lentiscus* Leaves Against *Helicobacter pylori* Algerian Clinical Isolates, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **19:2**: 466-474. <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2015.1119659>.



## Antimicrobial Activity of the Essential Oil Isolated from Pistacia lentiscus Leaves Against Helicobacter pylori Algerian Clinical Isolates

Medjkane Meriem, Allem Rachida, Medjahed Housseyn, Taleb Farida, Merouane Abdelaziz & Mouffok Fouzia

To cite this article: Medjkane Meriem, Allem Rachida, Medjahed Housseyn, Taleb Farida, Merouane Abdelaziz & Mouffok Fouzia (2016) Antimicrobial Activity of the Essential Oil Isolated from Pistacia lentiscus Leaves Against Helicobacter pylori Algerian Clinical Isolates, Journal of Essential Oil Bearing Plants, 19:2, 466-474

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2015.1119659>



Published online: 30 Mar 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

**Antimicrobial Activity of the Essential Oil Isolated from *Pistacia lentiscus* Leaves Against *Helicobacter pylori* Algerian Clinical Isolates**

**Medjkane Meriem <sup>1\*</sup>, Allem Rachida <sup>1</sup>, Medjahed Housseyn <sup>2</sup>,  
Taleb Farida <sup>3</sup>, Merouane Abdelaziz <sup>4</sup>, Mouffok Fouzia <sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Laboratory of Natural Bio-Resources, Department of Biology, Faculty of Science, Hassiba Benbouali University Chlef, BP. 151, Chlef 02000, Algeria

<sup>2</sup> National Institute of Agricultural Sciences (ENSA), El-Harrach, Algiers 16000, Algeria

<sup>3</sup> Laboratory of Enterobacteriaceae, Pasteur Institute, Algiers, Algeria

<sup>4</sup> Institute of Agricultural Sciences (ISA), Hassiba Benbouali University Chlef, Ouled Fares, Chlef 02010, Algeria

Received 04 April 2015; accepted in revised form 11 November 2015

**Abstract:** *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection plays a crucial role in the pathogenesis of gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. The current treatment for the eradication of *H. pylori* is unwieldy as relapses may occur. As *H. pylori* continues to resist the present antibiotic treatments, we are challenged in attempting to find alternative treatment methods; one treatment method may be the utilization of extracted oils from plants such as *Pistacia lentiscus* (*P. lentiscus*) leaves which are widely used in Mediterranean folk medicine to treat various infectious diseases, including stomach-associated diseases. Thus, this study aimed to evaluate the anti-*H. pylori* activity of *Pistacia lentiscus* essential oil (PLEO) obtained from leaves by hydro-distillation and analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometry (GC-MS). *H. pylori* strains were isolated from Algerians symptomatic patients' gastric biopsies and characterized for their susceptibility to PLEO using both disc diffusion and agar dilution methods. Results revealed 65 components of PLEO dominated by monoterpenes, principally were  $\alpha$ -pinene (15.47%), limonene (14.7%) and  $\beta$ -myrcene (9.93%). Twenty two *H. pylori* strains were isolated and their antibiotic characterization revealed that 18.18% of the tested isolates were resistant to at least two of the three antibiotics belonging to the main groups of antibiotics used in therapy to eradicate *H. pylori*. In contrast, PLEO showed anti-*H. pylori* activity against all the tested strains (100%). The inhibition diameters (32 mm, 26.66 mm, 19.67 and 12.33 for the pure and diluted oil to 1/2, 1/4 and 1/8) and minimum inhibitory concentration (1/5000, v/v) affirm the strong antimicrobial activity of PLEO against *H. pylori*.

**Key words:** *Pistacia lentiscus*, *Helicobacter pylori*, monoterpenes.

### Introduction

*Helicobacter pylori*, a Gram-negative bacterium, is an infection that approximately blights 50% of the world's population <sup>1</sup>. The majority of *H. pylori*'s infections occur in developing nations where it can be found that 100% of the population is infected <sup>2</sup>. *H. pylori* infection is the main

cause of peptic ulceration and gastric MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lymphoma and is a major risk factor for development of gastric adenocarcinoma <sup>3</sup>. The only way to stop the evolution of these pathologies is the eradication of *H. pylori* which is difficult to achieve as it requires at least two antibiotics and an acid sup-

\*Corresponding author (Medjkane Meriem)  
 E-mail: <medjkanemeriem@yahoo.fr>



pressant<sup>4</sup>. Some common side effects, particularly the antibiotic resistance, of these heavy treatments justify the search for new alternatives. One of the major issues that is being observed with regards to the antibiotic treatment is *H. pylori*'s increased resistance to metronidazol as well as *clarithromycin* treatments. With the hindrance in effectiveness of both of these antibiotics treatments comes the plight to formulate an unconventional treatment method. Nature's generosity within North African and Mediterranean region provides a plethora of plants that may very well be utilized for medicinal purposes. In the rural regions alternative folk medicine is a valuable tool that is widely preserved by the elders. Unfortunately there have been only few studies that focus on these traditional practices to either confirm or refute effectiveness. In Algeria, there is no work on the inhibitory activity of traditional herbal medicines against *H. pylori*.

*Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae), characteristic of the Mediterranean region, is dispersed along the entire Algerian coast. It is widely used in folk medicine<sup>5</sup>. Fruits, galls, resin and leaves of *P. lentiscus* have been greatly used in traditional medicine since the time of the ancient Greeks. *P. lentiscus* is used to treat some forms of eczema, paralysis, diarrhea, throat infection, renal stones, jaundice, asthma and stomach-ache, as well as astringent, anti-inflammatory, antipyretic, antibacterial, antiviral, pectoral and stimulant<sup>6-7</sup>.

The objective of this study is to confirm and prove the effectiveness of utilizing the oil extracted from the leaves of *P. lentiscus* in the treatment of abdominal pain, diarrhea and ulcers often associated with *H. pylori* infection. The extracted essential oil is tested against different *H. pylori* clinical strains. The ingenuity of this study lays in the use of wild, local and natural source of bioactive molecules against clinical isolates strains of *H. pylori*, until now no work has been focused on the Algerian strains in this research framework.

## Experimental

### *Plant material and essential oil extraction*

2 kg of growing wild *P. lentiscus* leaves were collected at the flowering stage in the mountains

of Bouderbala in Bouira at the altitude of 17.5 m, the longitude of 3°30'32.70"E and the latitude of 36°34'49.68"N. The plant samples were divided into five portions (400 g) and dried at room temperature for a week prior to the hydro-distillation on a Clevenger type apparatus for 3 hours. The oil yield was calculated relative to the dry matter. The essential oil samples were stored in dark glass bottles at -20°C until its analysis or its use in bioassays.

### GC-MS analysis

The gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis was performed Hewlett-Packard 6890 series GC systems (Agilent Technologies) coupled to a quadruple mass spectrometer (model HP 5973) equipped with an HP5 MS capillary column (5 % phenyl methylsiloxane, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness) in CRAPC, Algiers, Algeria. Analytical conditions were: injector temperature 250°C, oven temperature: isothermal 60°C, 8 min, to 250°C at 2°C/min then, isothermal, 30 min; carrier gas, He, 0.5 mL/min; split 1/20; ionization voltage, 70 eV; scan range, 35-500 uma.

Identification of compounds was based on comparison of the retention time with those of authentic samples, comparing their linear retention indices relative to the series hydrocarbons and on computer library.

### Bacterial strains, isolation and growth conditions

All procedures in this section were conducted as described by Adrian Lee and Francis Mégraud<sup>8</sup>. 48 endoscopic specimens received systematically at *Helicobacter pylori* laboratory at Enterobacteriaceae service's in Pasteur Institute of Algiers from April 2012 to December 2013 for diagnostic and antimicrobial susceptibility. Isolations were performed on Columbia agar supplemented with 10 % horse blood and *Helicobacter* selective supplement (SR147E, Oxoid, England). Under microaerophilic atmosphere (5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> and 85 % N<sub>2</sub>) in an anaerobic jar using BD GasPak EZ Pouch Systems at 37°C for 2-14 days. Bacterial growth was monitored every 48 hours to control the growth of typical colonies.

When curved Gram-negative bacilli were observed by light microscopy, tests for the presence of urease, cytochrome oxidase, catalase and nalidixic acid resistance were performed. All the isolated strains were characterized for their susceptibility to clarithromycin, metronidazole, levofloxacin, ciprofloxacin and erythromycin. *H. pylori* isolates were stored in brain heart infusion broth (BHIB) supplemented with 20 % glycerol at -80°C until use.

#### Assays for anti- *H. pylori* activity

PLEO was tested for antimicrobial activity by disk diffusion method<sup>9</sup>. Briefly, *H. pylori* suspensions were prepared in BHIB to opacity of 3 to 4 McFarland standard (ca. 109 CFU/ml) and spread on Mueller Hinton agar supplemented with 10 % horse blood by cotton swab. Filter paper discs (Whatmann n° 3, 6 mm in diameter) were soaked with 20 µl of the different concentrations of oil (pure, 1/2, 1/4 and 1/8 v/v in DMSO) and placed on the seeded plates. DMSO saturated disks were used as negative control. The plates were incubated for 48 H at 37°C under microaerophilic conditions as described in the preceding paragraph. Zones of inhibition appearing around disks were measured and recorded in cm.

For the MIC test, a serial of dilutions (1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500 and 1/1000 v/v) was prepared and added to the medium to obtain final concentrations of 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/

2000, 1/5000 and 1/10000 (v/v), after cooling and solidification, the Petri dishes were automatically inoculated with the bacterial suspensions with a STEERS apparatus. Plates were incubated in microaerophilic environment for 48 hours. Control plates contained no drug. The lowest concentration showing no growth was identified as the MIC. All experiments were performed in triplicates.

#### Results and discussion

##### *The chemical composition of the essential oil*

The yield of the essential oil of dried leaves of *P. lentiscus* was 1.28 % ± 0.08 (w/w). CG-MS analysis revealed sixty five components; Fig.1 shows the chromatographic profile. The identified compounds of the essential oil, as well as the percentages and retention index (RI) of each component are reported in Table 1. The major constituents of the essential oil were particularly monoterpenes: α-pinene (15.47 %), limonene (14.7 %), β-myrcene (9.93 %), β-pinene (7.31 %). Other components were present in amounts equal or less than 5 %.

These results are consistent with some studies and differ from others. All the samples PLEO from different Mediterranean areas were characterized by the occurrence of one of the following monoterpenes as major components: α-pinene (17 %, Tunisia)<sup>10</sup>, (16 %, France)<sup>11</sup>, (16.1-25.3 %, Italy)<sup>12</sup>, myrcene (25 %, Spain and Sicily)<sup>13</sup> and

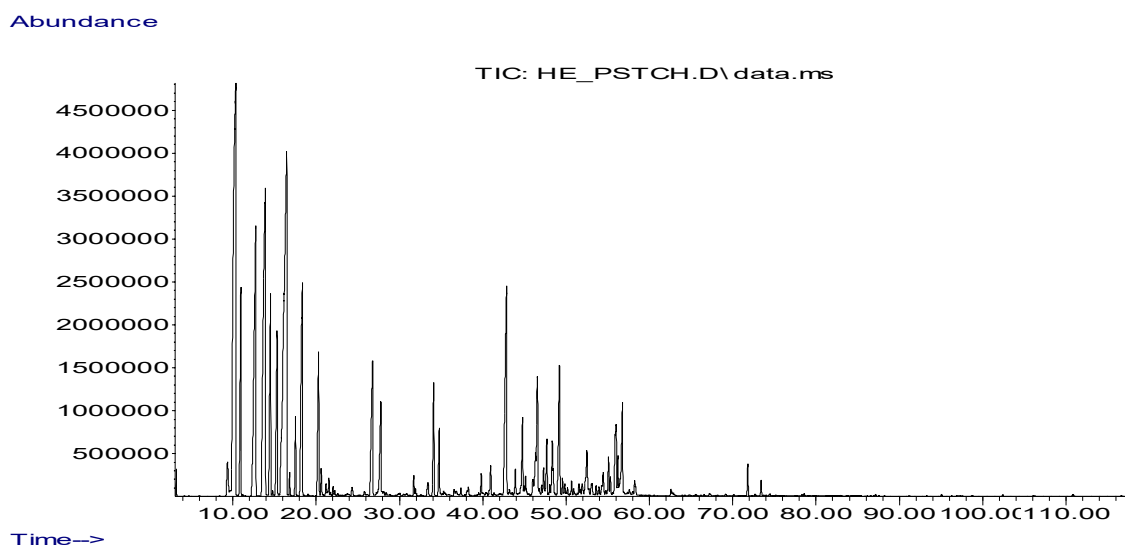


Figure 1. GC/MS chromatogram of *Pistacia lentiscus* essential oil

**Table 1. Chemical composition of *Pistacia lentiscus* essential oil as determined by Gas Chromatography-Mass Spectrometry**

No.	Compounds <sup>a</sup>	%	RI <sup>b</sup>
1	Tricyclene	0.73	927
2	$\alpha$ -Thujene	0.11	935
3	$\alpha$ -Pinene	15.47	939
4	Camphene	2.94	954
5	$\beta$ -Pinene	7.31	979
6	$\beta$ -Myrcene	9.93	991
7	$\alpha$ -Phellandrene	3.21	1003
8	$\delta$ -3-Carene	0.08	1011
9	$\alpha$ -Terpinene	2.81	1018
10	Limonene	14.7	1029
11	<i>trans</i> -Ocimene	0.11	1033
12	(Z)- $\beta$ -Ocimene	0.23	1037
13	(E)- $\beta$ -Ocimene	0.9	1049
14	$\gamma$ -Terpinene	4.49	1060
15	p-mentha-3,8-diene	0.14	1072
16	2-Nonanone	0.31	1079
17	$\alpha$ -Terpinolene	2.4	1089
18	Linalool	0.16	1097
19	1-Methyladamantane	0.09	1100
20	Isoamyl isovalerate	0.19	1104
21	n-Amyl isovalerate	t <sup>c</sup>	1108
22	Fenchol	0.1	1115
23	<i>cis</i> -p-Menth-2-en-1-ol	0.08	1121
24	Isopinocarveol	T	1148
25	4-Terpineol	2.99	1176
26	Cryptone	t	1187
27	$\alpha$ -Terpineol	1.8	1189
28	Borneol	0.09	1196
29	Isoamyl caproate	0.33	1250
30	Vitispirane	0.26	1277
31	Bornyl acetate	1.63	1285
32	2-Undecanone	0.93	1293
33	$\alpha$ -Cubebene	0.07	1340
34	$\gamma$ -Pyronene	0.05	1345
35	Ylangene	0.13	1371
36	$\alpha$ -Copaene	0.76	1377
37	$\beta$ -Bourbonene	t	1388
38	$\beta$ -Elemene	0.43	1391
39	Benzyl isovalerate	0.05	1395
40	$\beta$ -Caryophyllene	5.03	1421
41	Aromadendrene	0.28	1441
42	$\alpha$ -Amorphene	1.44	1442
43	Geranyl acetone	0.12	1455

table 1. (continued).

No.	Compounds <sup>a</sup>	%	RI <sup>b</sup>
44	$\alpha$ -Humulene	1.21	1457
45	<i>allo</i> -Aromadendrene	0.11	1463
46	Germacrene-D	2.13	1480
47	Valencene	0.15	1482
48	$\beta$ -Selinene	0.1	1498
49	$\alpha$ -Muurolene	0.83	1499
50	(E.E)- $\alpha$ -Farnesene	0.78	1507
51	$\delta$ -Cadinene	3.82	1523
52	Cadina-1.4-diene	0.19	1532
53	$\alpha$ -Cadinene	0.16	1539
54	$\alpha$ -Calacorene	0.13	1546
55	Elemol	0.17	1550
56	Nerolidol	0.14	1561
57	Germacrene B	0.1	1562
58	(Z)-3-Hexen-1-yl-benzoate	0.19	1568
59	Caryophyllene oxide	1.01	1583
60	T-Muurolol	0.71	1642
61	$\beta$ -Eudesmol	0.73	1651
62	$\alpha$ -Cadinol	1.68	1654
63	Benzyl Benzoate	0.06	1753
64	Hexahydrofarnesyl acetone	0.37	1844
65	Octacosane	t	2800
	Total	97.65	

<sup>a</sup> Compounds listed in order of elution from a HP-5 MS column.

<sup>b</sup> Retention Index

<sup>c</sup> t = trace. less than 0.05 %.

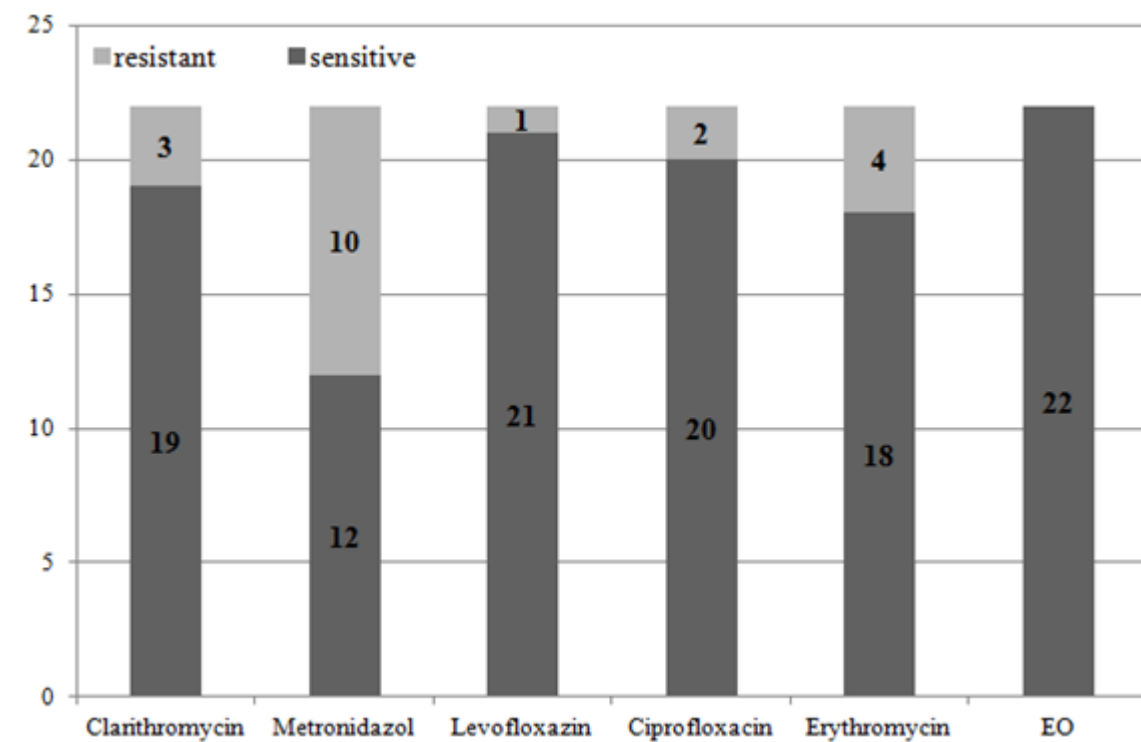
39.2 %, morocco <sup>14</sup>), and, terpinen-4-ol (22 %, Sardinia) <sup>15</sup>, and  $\delta$ -3-carene (65 %, Egypt) <sup>16</sup>. Mecherara-Idjeri *et al.*<sup>1</sup>. showed different chemical profiles of *P. lentiscus* essential oil after analyzing 17 samples from different regions of Algeria, 15 of these samples showed a predominance of monoterpenes mainly characterized by  $\alpha$ -pinene, sabinene,  $\beta$ -pinene, myrcene,  $\alpha$ -phellandrene or limonene, unlike the 2 other samples dominated by sesquiterpenes characterized by  $\beta$ -caryophyllene. Two types of Algerian PLEO were mentioned by Dob *et al.* <sup>18</sup>, longifolene and  $\alpha$ -pinene types. Another Algerian study <sup>19</sup> have reported high rates of sesquiterpenes and three types of PLEO characterized by terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol and germacrene D which is partially in agreement with other Medi-

terranean oils like turkish <sup>20</sup>, Italian <sup>21</sup> and Corsican <sup>22</sup> samples. Various factors can play a crucial role in the chemical composition, especially environmental factors such as geography, season of harvest (day length as well as temperature) and the nutritional status of the plant <sup>23</sup>.

#### Strains isolation and identification

A total of 22 *H. pylori* (46 %) were isolated from 48 endoscopic specimens. All strains were identified as described in experimental. The isolates were characterized by their antimicrobial susceptibility (figure 2).

The results from the present work revealed that 54.54 % of the gastric biopsy isolates were resistant to at least one of the five tested antibiotics, with resistance frequencies to metronidazole of



**Figure 2.** *Helicobacter pylori* strain susceptibility to antibiotics and to *Pistacia lentiscus* essential oil (MIC Metronidazol  $\leq 8 \mu$ /ml; MIC Clarithromycin  $\leq 1 \mu$ g/ml; MIC Ciprofloxacin  $\leq 1 \mu$ g/ml; MIC Levofloxacin  $\leq 1 \mu$ g/ml, MIC Erythromycin  $\leq 1 \mu$ g/ml)

45.45 %, to erythromycin of 13.13 % and to ciprofloxacin, levofloxazin or clarithromycin of 9.09 %. Additionally 18.18 % were resistant to at least two antibiotics. 9.09 % were resistant to both metronidazole and erythromycin or metronidazole and clarithromycin or levofloxazin and ciprofloxacin. 4.54 % were resistant to both metronidazol and levofloxazin or metronidazol and Ciprofloxacin or levofloxazin and ciprofloxacin.

#### Anti-*H. pylori* activity

The anti-*H. pylori* activity testing of PLEO revealed a high antimicrobial potential of this essential oil and their major components ( $\alpha$ -pinene, limonene,  $\beta$ -myrcene,  $\beta$ -pinene...etc). Unlike the five antibiotics tested, no strain was resistant to our oil (figure 2). We observed the appearance of some colonies from the  $32 \pm 1$  mm diameter for the pure oil, and from 26.66, 19.67, 12.33 the diluted oil for to 1/2, 1/4 or 1/8 in DMSO (v / v) (Table 2), and the CMI appears to the dilution 1/5000, PLEO showed a considerable activity

against numerous *H. pylori* isolated strains. These results validate the traditional use of *P. lentiscus* leaves in the treatment of stomach ache.

Aouinti *et al.*<sup>24</sup> have evaluated the anti-bacterial activity of PLEO from various regions of eastern Morocco against six bacterial strains, all the samples showed a strong to moderate activity against *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Pneumonia* and *Salmonella* sp. and moderate to no activity against *Pseudomonas* and *Streptococcus* changing from one region to another.

Generally, the major components of essential oils are found to reflect quite well antibacterial effect of the essential oil.

The monoterpenes are known to possess antimicrobial activity<sup>25,26</sup> and other considerable biological activities<sup>27,28</sup>, particularly  $\alpha$ -pinene has proven its antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*<sup>29</sup>. The enantiomers of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene and limonene have a strong antibacterial activity<sup>30</sup>. The antibacterial efficacy of essential oil of *P. lentiscus* is due to a number of its com-

**Table 2. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Pistacia lentiscus* essential oil**

	Mean zone sizes in mm <sup>a</sup> using different concentrations MIC				
	1 (v/v)	½ (v/v)	¼ (v/v)	1/8 (v/v)	
<i>Helicobacter pylori</i> isolates	32.00±1	26.66±0.57	19.67±0.57	12.33±0.57	1/5000±0.00

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation (SD) where n=3.

ponents supposed working synergistically.

Results obtained from this study indicate that PLEOs main compounds specifically  $\alpha$ -pinene and limonene, have significant antimicrobial properties against both sensitive and resistant *H. pylori* strains. This may very well be an encouraging new treatment for *H. pylori* induced disease, the usefulness of *P. lentiscus* essential oil for the treatment of gastric diseases is proven and it would be a real alternative in countries or regions where antibiotics are not readily available or where the antibiotic resistance has reduced the effectiveness of treatments. Although the antibacterial mode remains to be determined prior to its recommendation for use as safe and effective agent.

In conclusion, this study describes the essential oil of *Pistacia lentiscus* as a natural source of bioactive molecules holders for a potent antibacterial activity against different strains of *Helicobacter pylori* even resistant ones; it can be considered as an alternative anti-*H. pylori* candidate to prevent further surge in resistant antibiotics.

#### Acknowledgements

We are grateful to all the team of the Laboratory of Enterobacteriaceae of the Pasteur Institute for their valuable assistance. We express our thanks to Dr MAHMOUDI Hacene for all the supports.

#### References

1. **Suerbaum, S. and Michetti, P. (2002).** *Helicobacter pylori* infection. The New England Journal of Medicine. 347: 1175-1186.
2. **Marshal, B.J. and Gilman, R.H. (1999).** *Helicobacter pylori* infections in: Tropical Infectious Diseases. Guerrant, R.L., Walker, D. and Weller, P. (Eds.). Churchill Livingstone, Philadelphia, PA.
3. **Blaser, M.J. and Berg, D.E. (2001).** *Helicobacter* genetic diversity and risk of human disease. Journal of Clinical Investigation. 107: 767-773.
4. **Malfetrheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D., Hunt, R., Rokkas, T., Vakil, N. and Kuipers, E.J. (2007).** Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Masstricht III consensus report. Gut. 56: 772-781.
5. **Janakat, S. and Al-Merie, H. (2002).** Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. J. Ethnopharmacol. 83: 135-138
6. **Lev, E. and Amar, Z. (2000).** Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in Israel at the end of the 20th century. J. Ethnopharmacol. 72: 191-205.
7. **Said, O., Khalil, K., Fulder, S. and Azeizeh, H. (2002).** Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. J. Ethnopharmacol. 83: 251-265.
8. **Lee, A. and Mégraud, F. (1999).** *Helicobacter pylori*: techniques for clinical diagnosis and basic research. WB Saunders Company LTD. London, United Kingdom.
9. **NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (1997).** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Sixth ed. Approved Standard M2-A6, Wayne, PA.



10. **Ben Douissa, F., Hayder, N., Chekir-Ghedira, L., Hammami, M., Ghedira, K., Mariotte, A.M. and Dijoux-Franca, M.G. (2005).** New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour Fragr.* 20: 410-414.
11. **Buil, P., Garnero, J. and Guichard, G. (1975).** Contribution a la connaissance de la composition chimique de l'essence de lentisque de Provence. *Riv. Ital. EPPOS Cosmet. Aerosol.* 56: 245-252.
12. **Vidrich, V., Graziano, P.F.A., Silvestrini, E., Marco Michelozzi, M. and Marco, F. (2004).** Chemical Composition of the Essential Oil of *Pistacia lentiscus* L. *J. Essent. Oil Res.* 16: 223-226.
13. **Calabro, G. and Curro, P. (1974).** Costituenti degli oli essenziali Nota IV. Essenza di lentisco. *Essence Deriv. Agrum.* 44: 82-92.
14. **Amhamdi, H., Aouinti, F., Wathelet, J. and Elbachiri, A. (2009).** Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. *Rec. Nat. Prod.* 3(2): 90-95
15. **Picci, V., Scotti, A., Mariani, M. and Colombo, E. (1987).** Composition of the volatile oil of *Pistacia lentiscus* L. of Sardinian origin in *Flavour Science and Technology*, ed. by M. Martens, G.A. Dalen, M. Russwurm (Wiley, New York, 1987), pp. 107-110.
16. **DePooter, H.L., Schamp, N.M., Aboutabl, E.A., El Thoamy, S.L. and Doss, S.L. (1991).** Essential oil of the leaves of three *Pistacia* species grown in Egypt. *Flavour Fragr. J.* 6: 229-232.
17. **Mecherara-Idjeri, S., Hassani, A., Castola, V. and Casanova, J. (2008).** Composition and chemical variability of the essential oil from *Pistacia lentiscus* L. growing wild in Algeria: leaf oil. *J. Essent. Oil Res.* 20: 32-38.
18. **Dob, T., Dahmane, D. and Chelghoum, C. (2006).** Chemical composition of the essential oils of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. *J. Essent. oil Res.* 18: 335-338.
19. **Benyoussef, E.H., Charchari, S., Nacer-Bey, N., Yahiaoui, N., Chakou, A. and Bellatreche, M. (2005).** The essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. *J. Essent. Oil Res.* 17: 642-644.
20. **Kivçak, B., Akay, S., Demirci, B. and Baser, K.H.C. (2004).** Chemical composition of essential oils from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. chia, and *Pistacia terebinthus* from Turkey. *Pharm. Biol.* 42: 360-366.
21. **Lo Presti, M., Sciarrone, D., Crupi, M.L., Costa, R., Ragusa, S., Dugo, G. and Mondello, L. (2008).** Evaluation of the volatile and chiral composition in *Pistacia lentiscus* L. essential oil. *Flavour Fragr. J.* 23: 249-257.
22. **Castola, V., Bighelli, A. and Casanova, J. (2000).** Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology.* 28: 79-88.
23. **Gardeli, C., Papageorgiou, V., Mallouchos, A., Theodosis, K. and Komaitis, M. (2008).** Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry.* 107: 1120-1130.
24. **Aouinti, F., Imelouane, B., Tahri, M., Wathelet, J.P., Amhamdi, H. and Elbachiri, A. (2013).** New study of the essential oil, mineral composition and antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. *Res Chem Intermed.* 40(8): 2873-2886.
25. **Juliani, H.R., Biurrun, F., Korocho, A.R., Oliva, M.M., Demo, M.S., Trippi, V.S. and Zygadlo, J.A. (2002).** Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana xenica*. *Planta Med.* 68: 762-764.
26. **Knobloch, K., Pauli, A., Iberi, B., Weignad, H. and Weis, N. (1989).** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essent. Oil Res.* 1: 119-128.
27. **Kim, K., Kim, Y., Yu, H., Jeong, S., Cha, J., Kil, B. and You, Y. (2003).** Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Chrysanthemum boreale*. *Planta Med.* 69: 274-277.

28. **Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B. and Mazza, G. (2000).** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 101-109.
29. **Moghtader, M. (2009).** Chemical composition of the essential oil of *Teucrium polium* L. from Iran. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 5(6): 843-846.
30. **Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A., Chinou, J.B. and Mitaku, S. (1999).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* Var. Chia. *Planta Med.* 65(8): 749-752.



## ANNEXE I : Tests statistiques

\*Analyse statistiques du sexe des individus

			Présence de la bactérie		Total
			Positif	Négatif	
Sexe du Passion	Male	Count	63	31	94
		Expected Count	66.3	27.7	94.0
		% within Sexe du Passion	67.0%	33.0%	100.0%
	Femelle	Count	71	25	96
		Expected Count	67.7	28.3	96.0
		% within Sexe du Passion	74.0%	26.0%	100.0%
Total		Count	134	56	190
		Expected Count	134.0	56.0	190.0
		% within Sexe du Passion	70.5%	29.5%	100.0%

### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1.100 <sup>a</sup>	1	.294		
Continuity Correction <sup>b</sup>	.791	1	.374		
Likelihood Ratio	1.101	1	.294		
Fisher's Exact Test				.341	.187
Linear-by-Linear Association	1.094	1	.296		
N of Valid Cases	190				

\*Analyse statistiques sur la catégorie mineure des individus

**Tests du Khi-deux**

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)	Signification exacte (bilatérale)	Signification exacte (unilatérale)
Khi-deux de Pearson	,796 <sup>a</sup>	1	,372		
Correction pour la continuité <sup>b</sup>	,441	1	,506		
Rapport de vraisemblance	,834	1	,361		
Test exact de Fisher				,496	,258
Association linéaire par linéaire	,792	1	,374		
Nombre d'observations valides	190				

\* Analyse statistiques sur la catégorie majeure des individus

**Tests du Khi-deux**

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)	Signification exacte (bilatérale)	Signification exacte (unilatérale)
Khi-deux de Pearson	,191 <sup>a</sup>	1	,662		
Correction pour la continuité <sup>b</sup>	,044	1	,835		
Rapport de vraisemblance	,195	1	,659		
Test exact de Fisher				,821	,426
Association linéaire par linéaire	,190	1	,663		
Nombre d'observations valides	190				

\* Analyse statistiques sur la catégorie d'âge 06-12 ans

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	2.593 <sup>a</sup>	4	.628
Likelihood Ratio	2.683	4	.612
Linear-by-Linear Association	.059	1	.808
N of Valid Cases	10		

\* Analyse statistiques sur la catégorie d'âge 13-15 ans

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	.833 <sup>a</sup>	2	.659
Likelihood Ratio	1.185	2	.553
Linear-by-Linear Association	.563	1	.453
N of Valid Cases	5		

\* Analyse statistiques sur la catégorie d'âge 16-19 ans

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.493 <sup>a</sup>	3	.684
Likelihood Ratio	2.145	3	.543
Linear-by-Linear Association	1.181	1	.277
N of Valid Cases	11		

\* Analyse statistiques sur la catégorie d'âge 20-29 ans

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	17.132 <sup>a</sup>	9	.047
Likelihood Ratio	17.376	9	.043
Linear-by- Linear Association	1.456	1	.228
N of Valid Cases	54		

\* Analyse statistiques sur la catégorie d'âge 30-39 ans

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	4.305 <sup>a</sup>	9	.890
Likelihood Ratio	5.973	9	.743
Linear-by- Linear Association	.758	1	.384
N of Valid Cases	32		

\* Analyse statistiques sur la catégorie d'âge 40-49 ans

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	9.274 <sup>a</sup>	8	.320
Likelihood Ratio	12.254	8	.140
Linear-by- Linear Association	1.571	1	.210
N of Valid Cases	25		

\* Analyse statistiques sur la catégorie d'âge 50-59 ans

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.111 <sup>a</sup>	6	.411
Likelihood Ratio	6.662	6	.353
Linear-by- Linear Association	2.516	1	.113
N of Valid Cases	20		

\* Analyse statistiques sur la catégorie d'âge 60-69 ans

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5.278 <sup>a</sup>	4	.260
Likelihood Ratio	7.007	4	.136
Linear-by- Linear Association	.039	1	.843
N of Valid Cases	20		

\* Analyse statistiques sur la catégorie d'âge 70-79 ans

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	6.000 <sup>a</sup>	4	.199
Likelihood Ratio	7.638	4	.106
Linear-by- Linear Association	.186	1	.666
N of Valid Cases	9		

\* Analyse statistiques sur la provenance des individus

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.832 <sup>a</sup>	1	.362		
Continuity Correction <sup>b</sup>	.519	1	.471		
Likelihood Ratio	.858	1	.354		
Fisher's Exact Test				.445	.238
Linear-by- Linear Association	.828	1	.363		
N of Valid Cases	190				

\* Analyse statistiques sur les photologies associées : Gastrite

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)	Signification exacte (bilatérale)	Signification exacte (unilatérale)
Khi-deux de Pearson	,816 <sup>a</sup>	1	,366		
Correction pour la continuité <sup>b</sup>	,503	1	,478		
Rapport de vraisemblance	,803	1	,370		
Test exact de Fisher				,438	,238
Association linéaire par linéaire	,810	1	,368		
Nombre d'observations valides	148				

\* Analyse statistiques sur les photologies associées : Ulcère gastrique

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)	Signification exacte (bilatérale)	Signification exacte (unilatérale)
Khi-deux de Pearson	4,299 <sup>a</sup>	1	,038		
Correction pour la continuité <sup>b</sup>	3,269	1	,071		
Rapport de vraisemblance	5,086	1	,024		
Test exact de Fisher				,060	,029
Association linéaire par linéaire	4,270	1	,039		
Nombre d'observations valides	148				

\* Analyse statistiques sur les photologies associées : Ulcère Bulbaire

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)	Signification exacte (bilatérale)	Signification exacte (unilatérale)
Khi-deux de Pearson	,476 <sup>a</sup>	1	,490		
Correction pour la continuité <sup>b</sup>	,074	1	,786		
Rapport de vraisemblance	,451	1	,502		
Test exact de Fisher				,677	,376
Association linéaire par linéaire	,472	1	,492		
Nombre d'observations valides	148				

\* Analyse statistiques sur les photologies associées : Bulbite

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)	Signification exacte (bilatérale)	Signification exacte (unilatérale)
Khi-deux de Pearson	,799 <sup>a</sup>	1	,371		
Correction pour la continuité <sup>b</sup>	,273	1	,602		
Rapport de vraisemblance	,754	1	,385		
Test exact de Fisher				,460	,291
Association linéaire par linéaire	,793	1	,373		
Nombre d'observations valides	148				

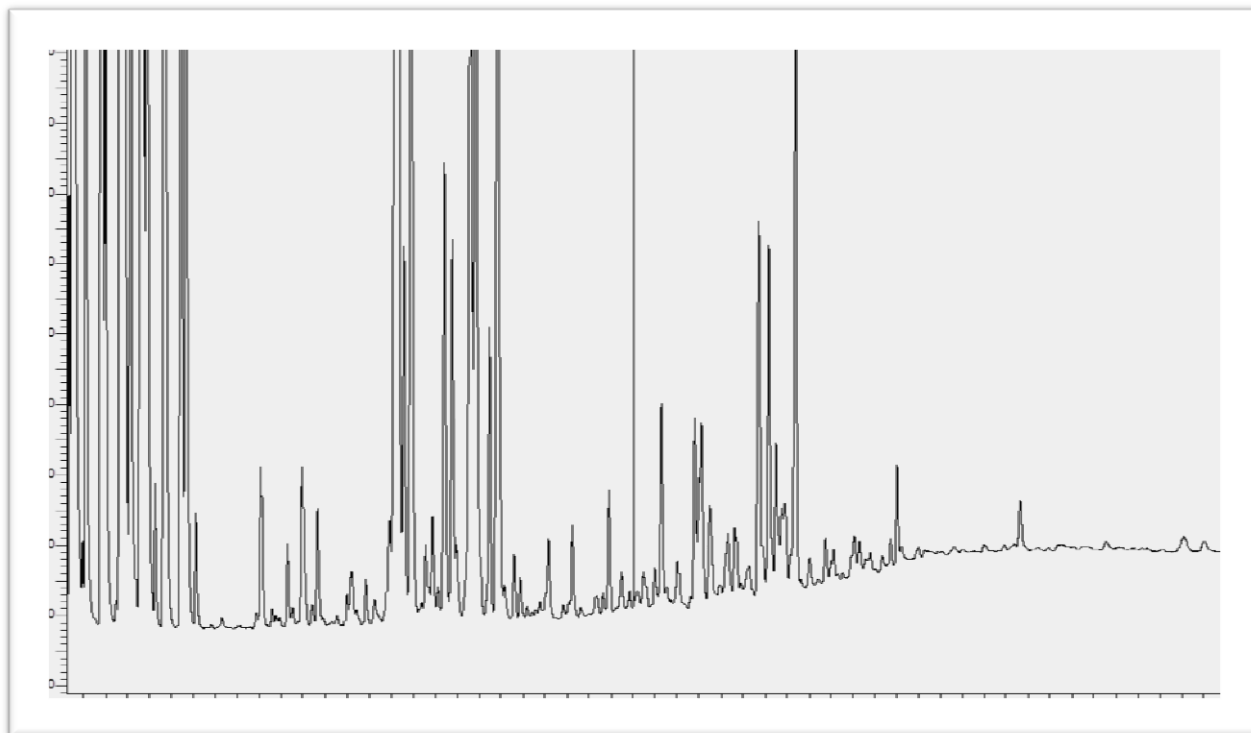
\* Analyse statistiques sur les photologies associées : Cancer gastrique

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)	Signification exacte (bilatérale)	Signification exacte (unilatérale)
Khi-deux de Pearson	,454 <sup>a</sup>	1	,500		
Correction pour la continuité <sup>b</sup>	,000	1	1,000		
Rapport de vraisemblance	,748	1	,387		
Test exact de Fisher				1,000	,689
Association linéaire par linéaire	,451	1	,502		
Nombre d'observations valides	148				

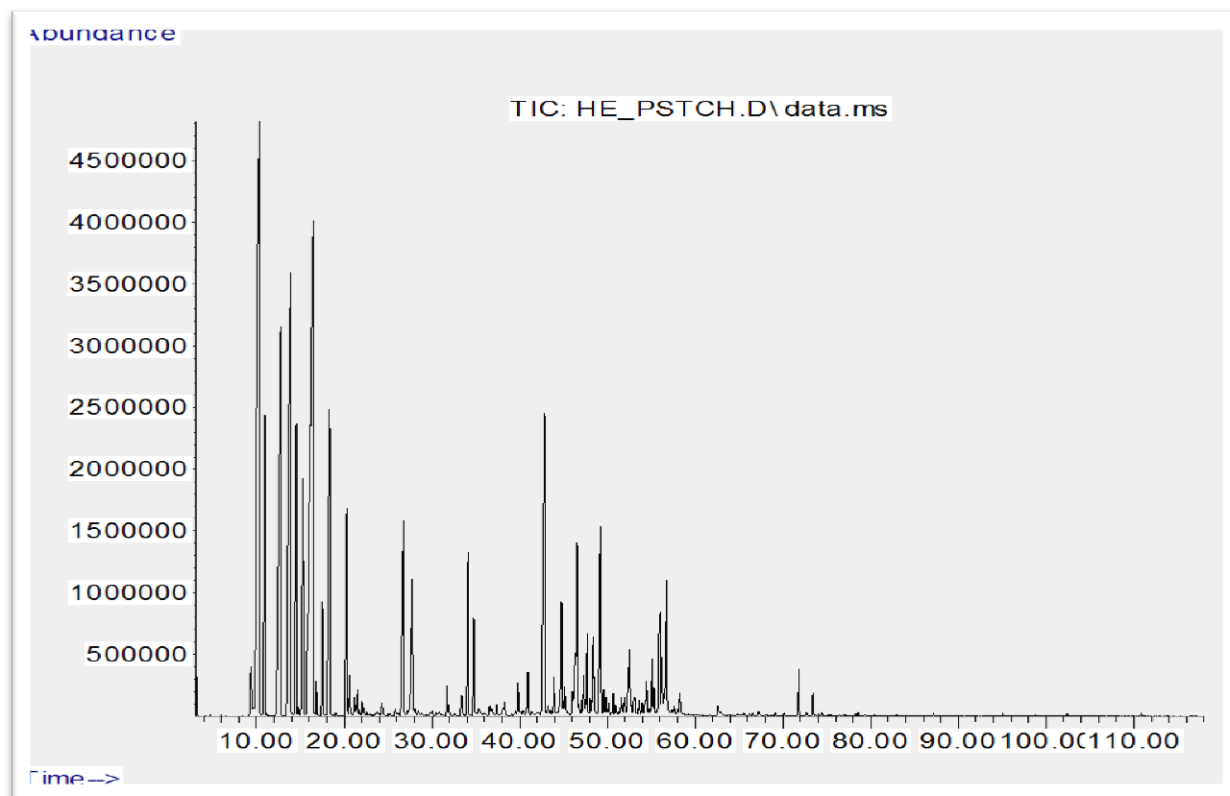


## ANNEXE II : les chromatogrammes CG et CG/SM

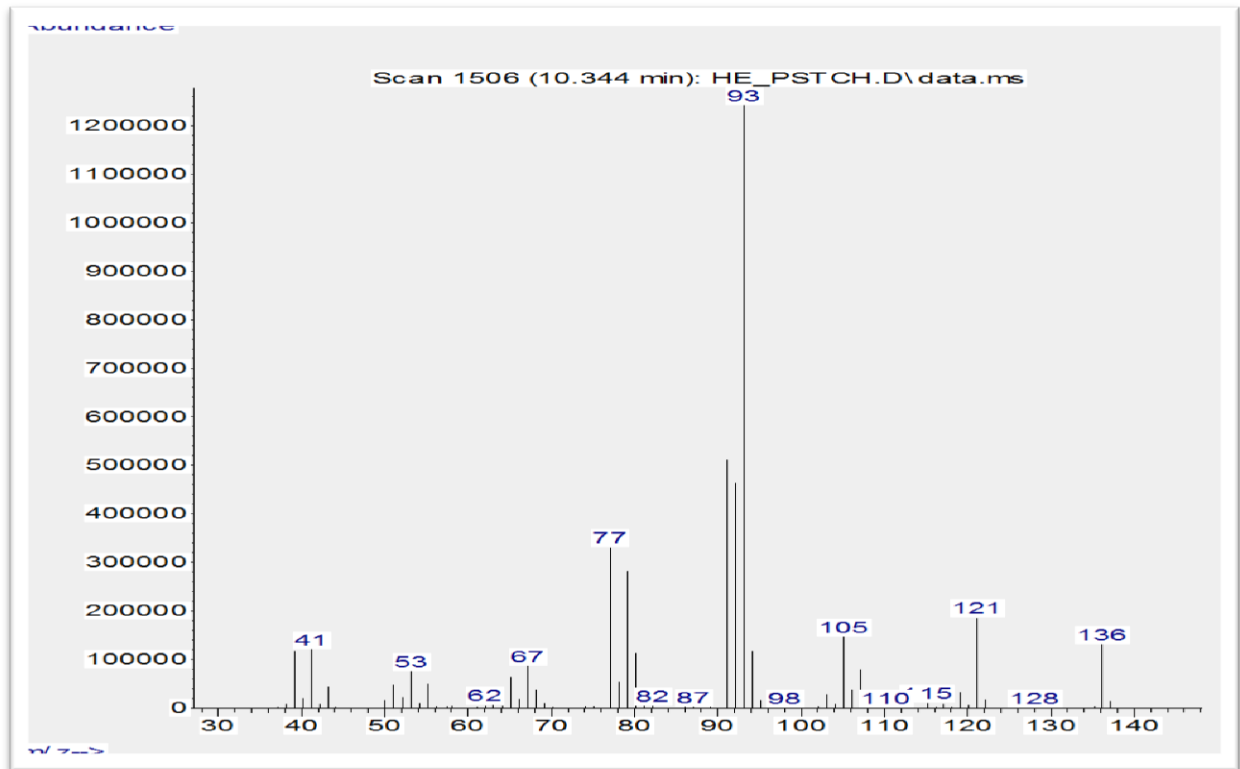
Le chromatogramme CG de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* :



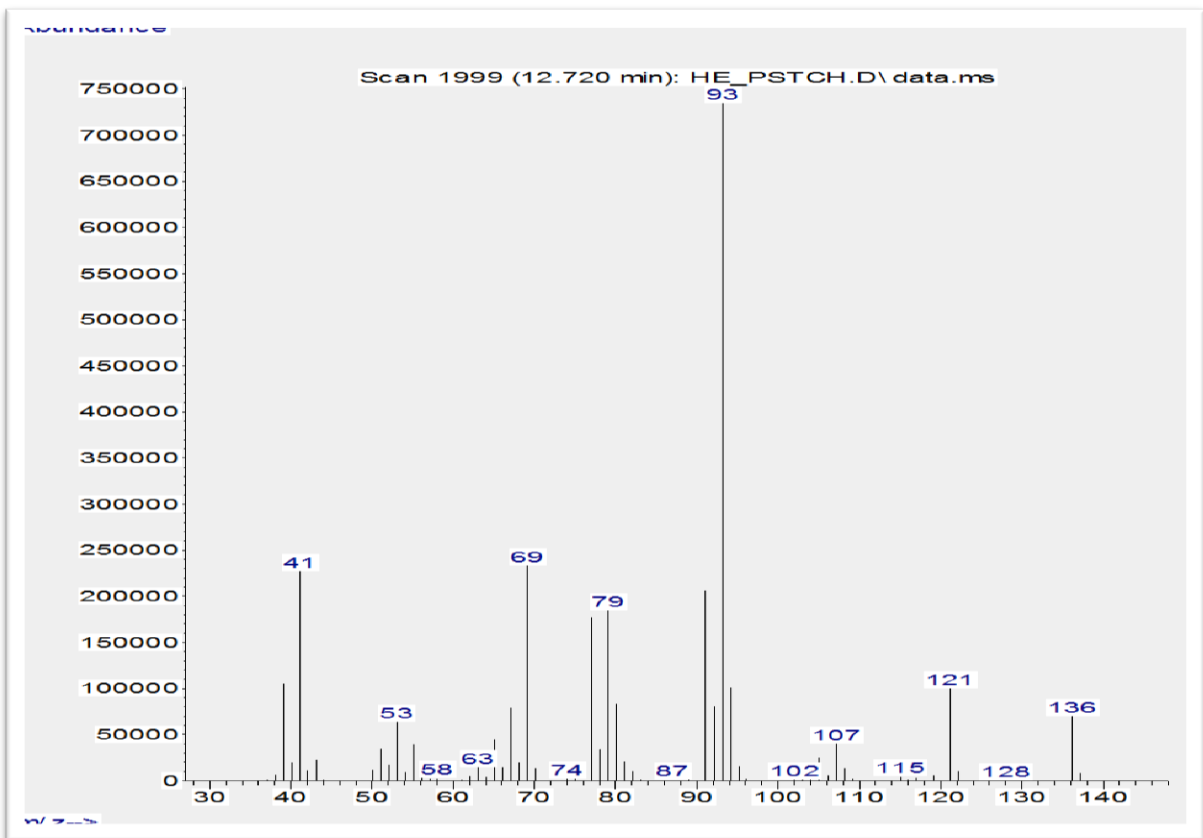
Le chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* :



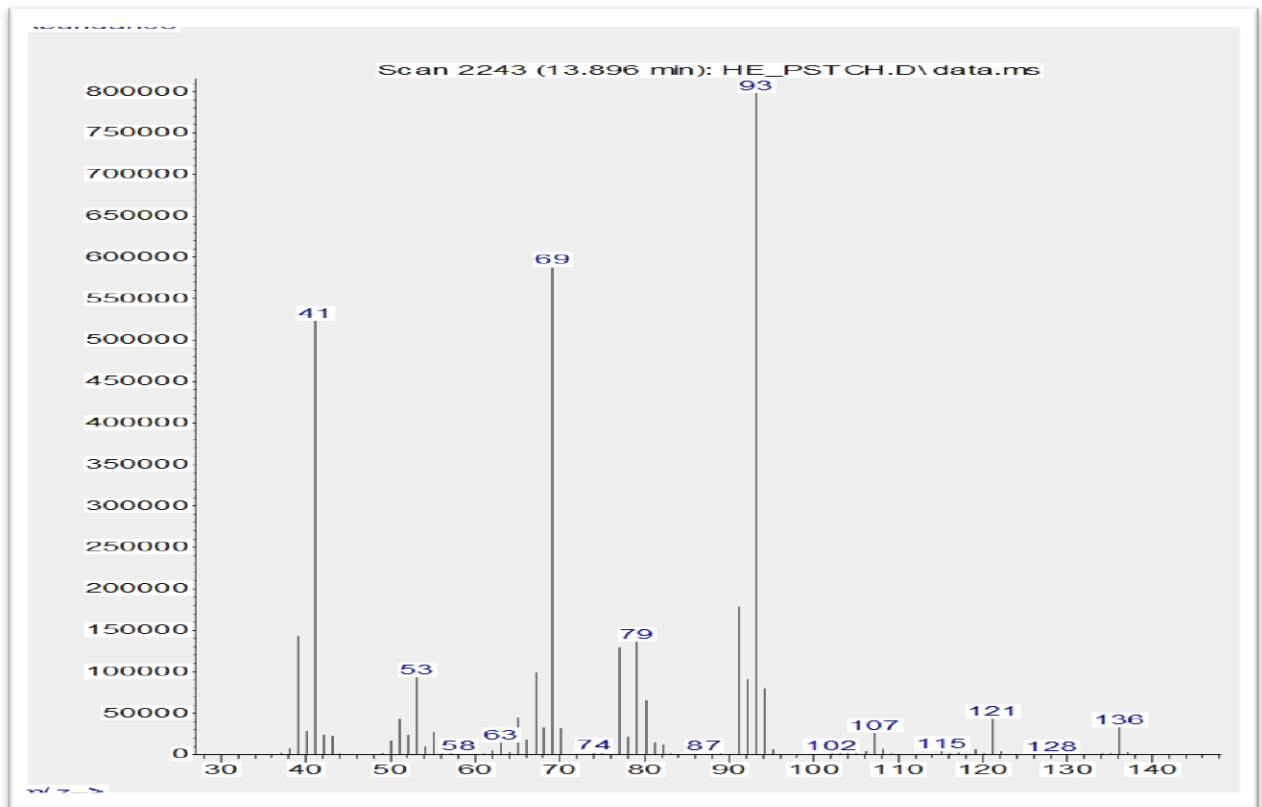
Spectre de masse de  $\alpha$ -pinene :



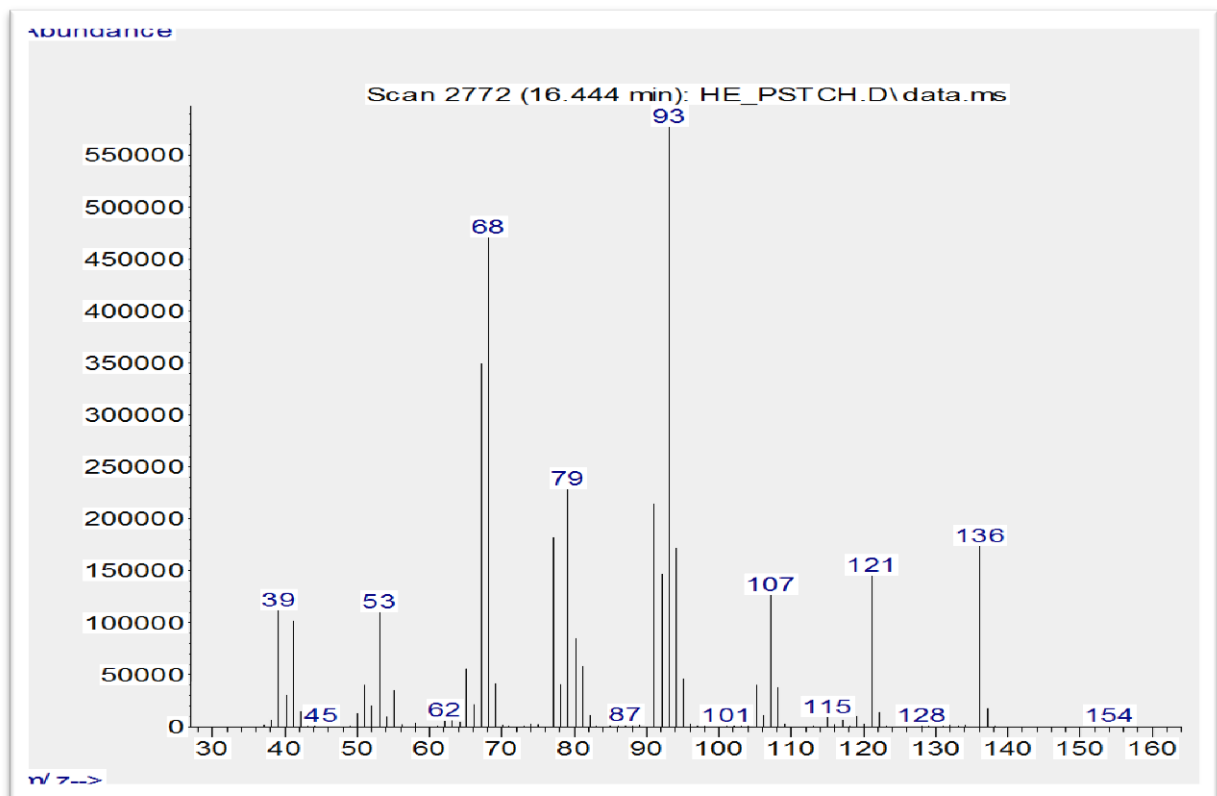
Spectre de masse de  $\beta$ -pinene:



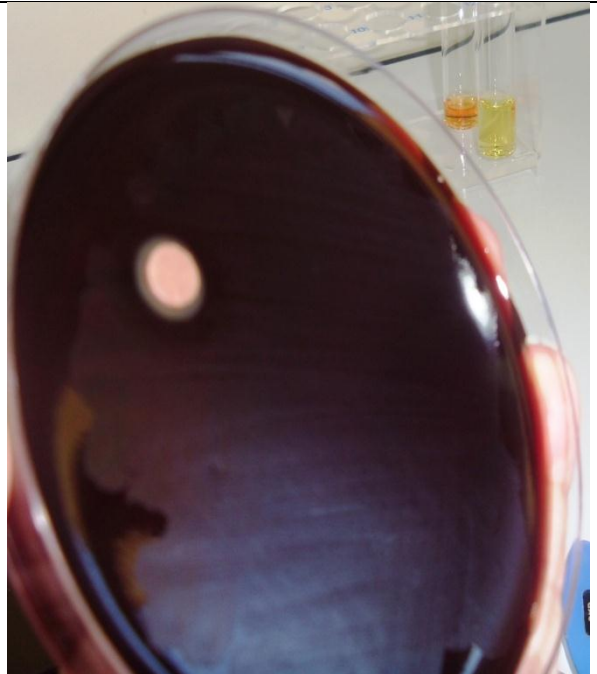
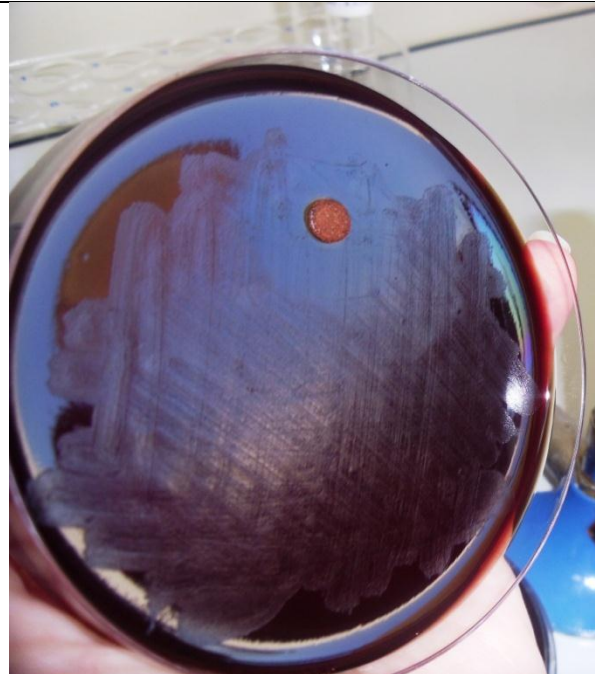
Spectre de masse de  $\beta$ -myrcene :

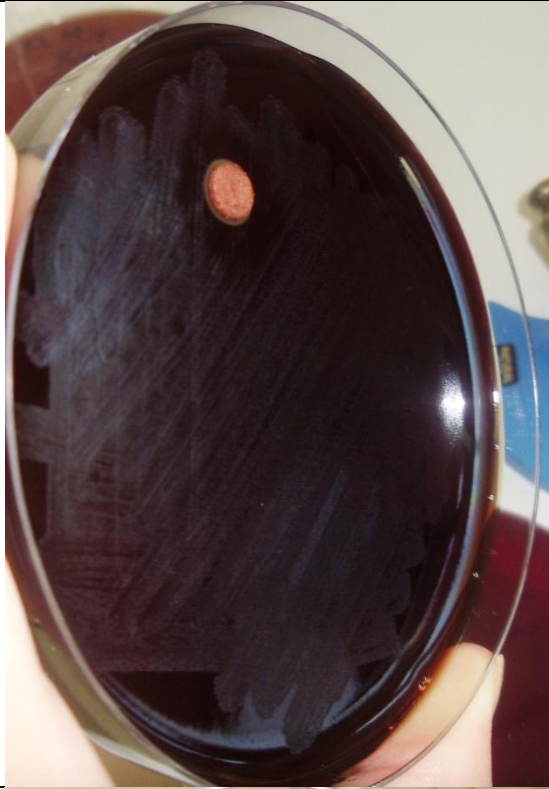


Spectre de masse de limonene.

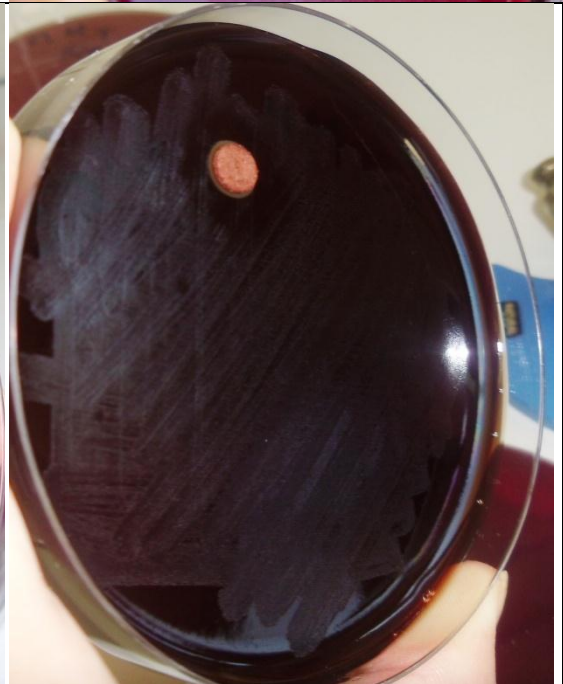
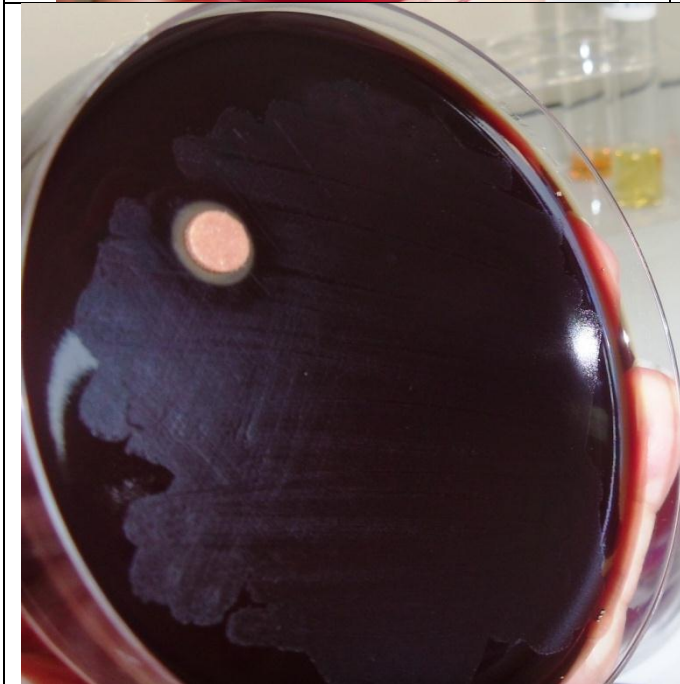


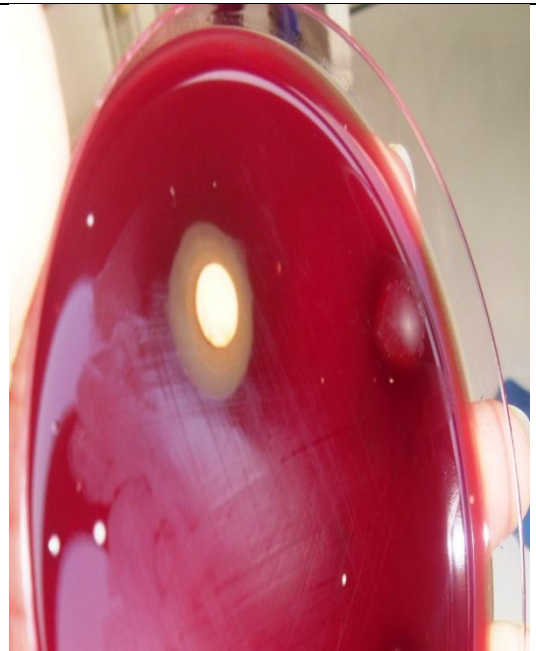
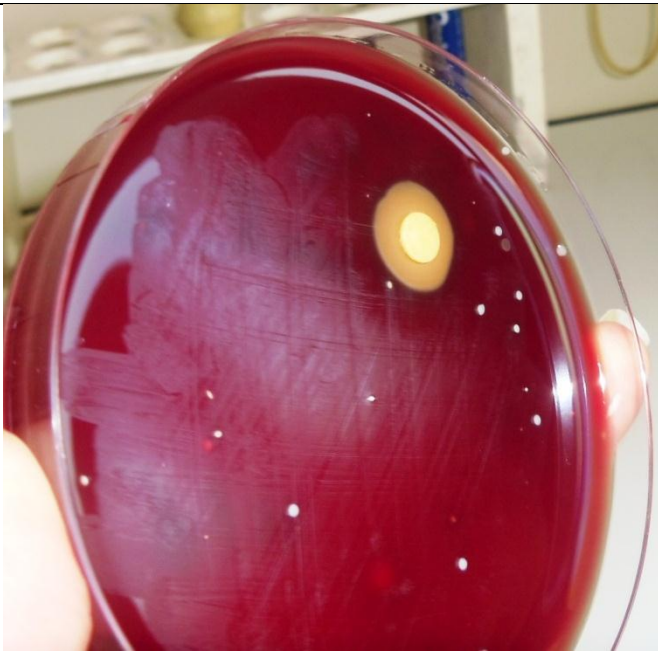
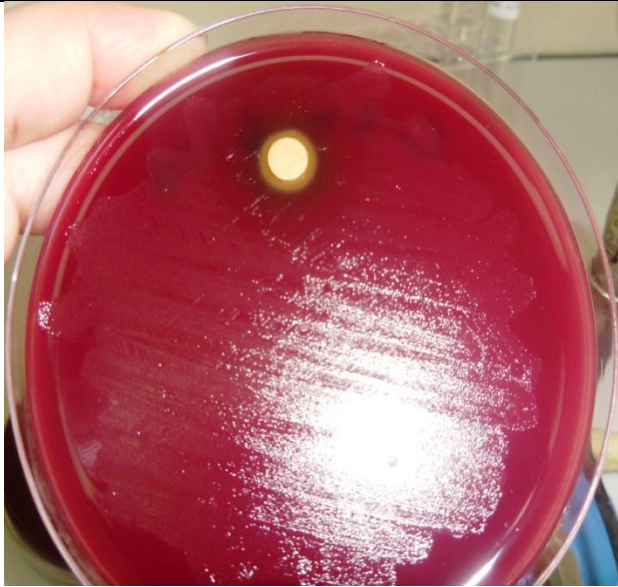
**ANNEXE III : photos des résultats représentatifs de l'activité antibactérienne des différents extraits testés.**

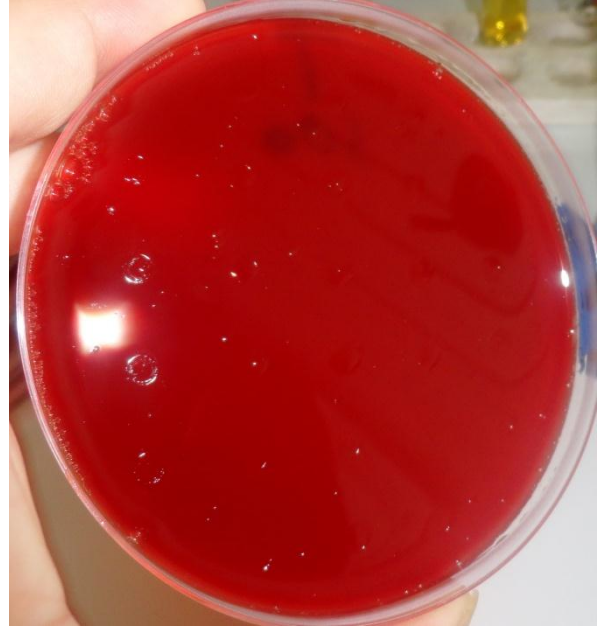
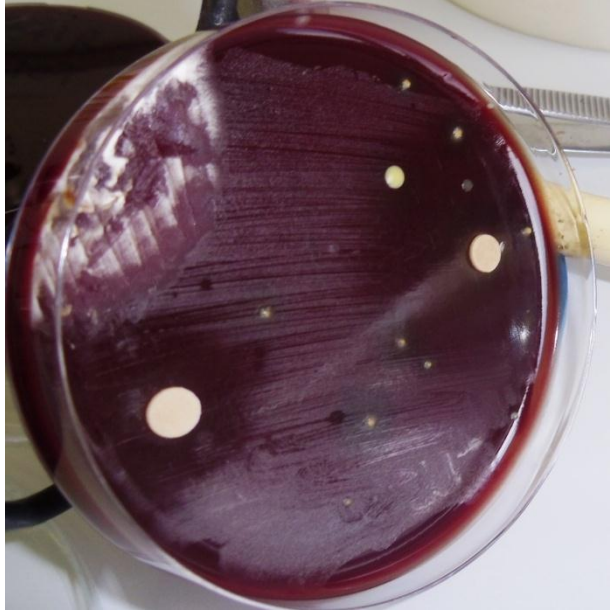






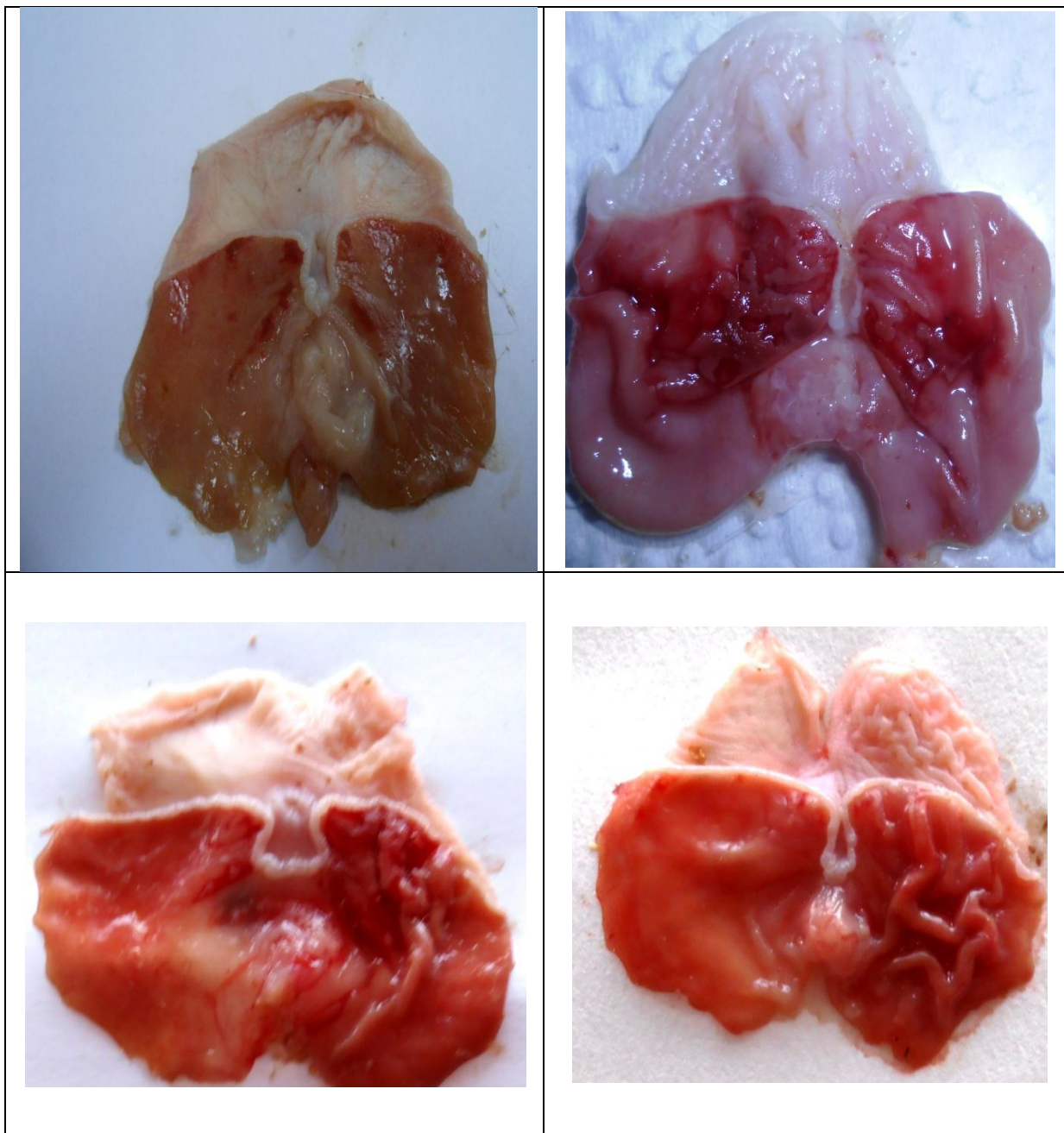


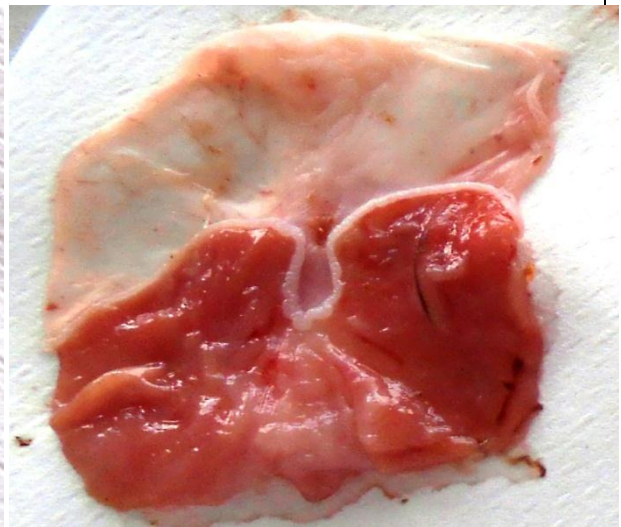
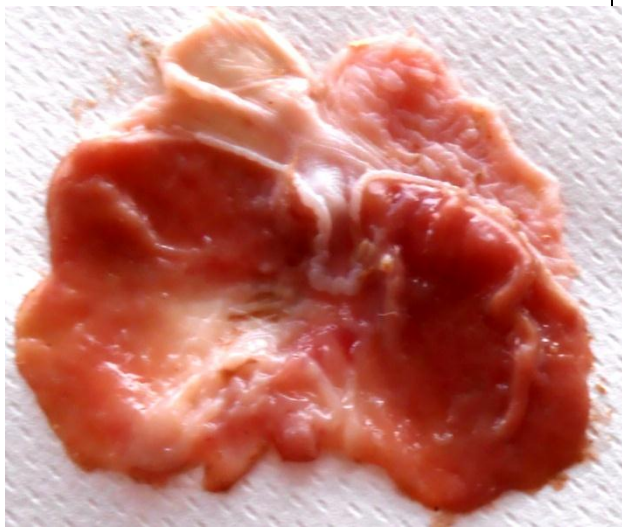
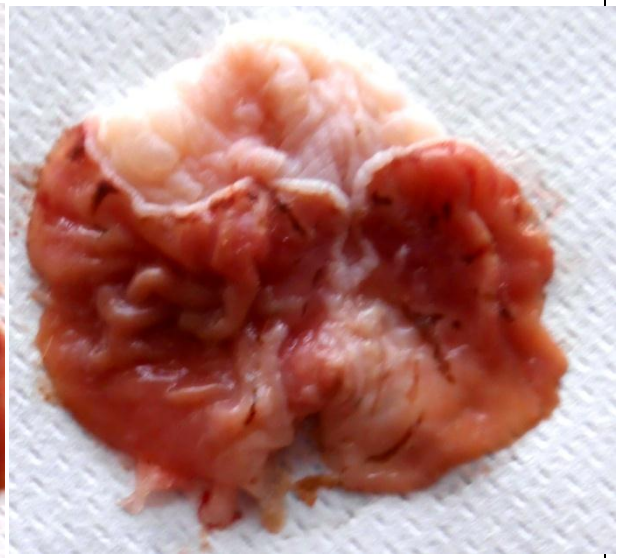
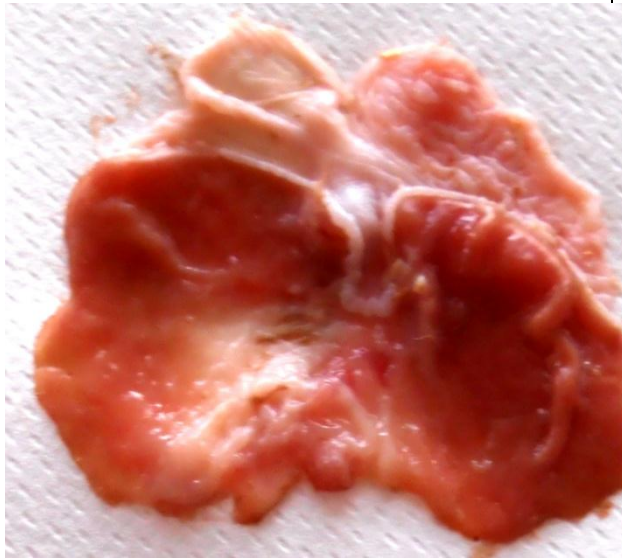






**ANNEXE IV : photos macroscopiques des résultats de l'activité antiulcéreuse de l'huile essentielle de *P. lentiscus*.**







**ANNEXE V : photos prises lors de la réalisation de l'activité anti-inflammatoire**

