

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun-Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Infectiologie

Présenté par :

M^{elle} BAITICH IKram

M^{elle} HENNI Fafa Amira

M^{elle} RABEHI Rania

Thème

**ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE
DES HUILES ESSENTIELLES DU THYM
ET DE LA LAVANDE**

Soutenu publiquement le 04/07/2019

Jury:

Grade

Président:	Dr. TABAK Souhila	MCA
Encadreur:	Dr. BOUMEZRAG Assia	MCB
Co-encadreur:	Dr. SELLES Sidi Mohammed Ammar	MCB
Examineur :	M. BENBELKACEM Idir	MAA

Année universitaire 2018/2019

Remerciements

❖ Nous avons eu la chance d'effectuer ce travail minutieux dans deux laboratoires de recherche, au laboratoire de pharmacologie de l'institut vétérinaire de Tiaret sous la direction de Dr SELLES S.M.A, MCB au niveau de l'ISV-Tiaret ainsi qu'au laboratoire de microbiologie sous la direction de Dr BOUMEZRAG Assia, MCB au niveau de l'ISV – Tiaret.

❖ Notre infinie gratitude et nos remerciements vont à l'endroit de Dr BOUMEZRAG Assia, qui nous a fait l'honneur d'encadrer ce travail et lequel elle n'a ménagé aucun effort malgré ses nombreuses responsabilités.

❖ Nous tenons tout particulièrement à adresser nos plus vifs remerciements, à notre co-promoteur, Dr. SELLES Sidi Mohammed Ammar, d'avoir nous co-encadrer et de nous avoir laissé la liberté nécessaire à l'accomplissement de notre travail.

❖ Nous exprimons nos sincères remerciements et notre profonde reconnaissance à Dr. TABAK Souhila, qui nous a honoré de sa présence en acceptant de présider le jury de cette soutenance.

❖ Nos remerciements et nos profondes considérations vont à l'endroit de Dr. Benbelkacem Idir., qui a accepté de donner des critiques sur ce mémoire et de nous éclairer avec ses commentaires.

❖ Au responsable du laboratoire, Mme BENASLA Amel qui a accepté de nous accueillir, et de nous faciliter notre intégration dans le milieu de la pratique, nous exprimons nos gratitude.

❖ Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à Melle AIT Namane Karima, laborantine au niveau du laboratoire de Microbiologie. Nous la remercions pour sa disponibilité, son aide, sa gentillesse et ses conseils précieux.

❖ Enfin, nos remerciements vont au vers toutes les personnes qui, de près ou de loin nous ont apportés leur soutien, leur conseil et leur contribution dans l'édification de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Ma mère et mon père

Mes sœurs : Nadjat, Rihab et mon adorable petit frère Hamicha

Mon oncle HENNI Adda et ma tante Khadîdja qui m'ont toujours soutenu

Ma tante Zoulikha

Mes oncles et mes tantes

Mon meilleur ami Ramine

Mon trinôme Ikram et Rania

A toute la promotion Infectiologie 2018/2019.

Fafa Amira

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à:

Mes chers parents : Tayeb, Fatima qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras.

Ma sœur Bochra.

Mes frères : Amine, Zakaria et Walid.

Mon fiancé Rabah, qui a su de loin m'encourager et me soutenir.

Mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université : Ikram ; Marame; Fatiha; Wafaa.

Mon trinôme Ikram et Amira

A tous qui me connaisse de près ou de loin.

Rania

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chères parents **Abdelkader** et **NAIMA** ceux qui ont toujours sacrifié pour me voir réussir, et sont la source de mon joie et mon bonheur, puisse Dieu le tout puissant vous accorder la bonne santé et le bonheur.

je remercie mes sœurs «AHLEM , FATIMA, ISMAHANNE ,GHANIA , HADJER ,AYA » et mes frères « NASSIM, ILYESS CHAFIK et REDOUAN » pour toute l'aide et la patience dont ils font preuve et toute ma famille proche et mes cousins et cousines ou éloignée pour leur soutien moral.

A mes proches amies « Fatiha, Rania, Wafa, khadra » et mon ami «**ABDELHAK** » Vous encouragements dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance, et toute la confiance que vous m'accordez.

Merci à **HENNI** et **RABEHI**, mon trinôme. Je n'oublierai jamais notre souffrance.

Tout le respect à toutes les personnes

En fin Je dédie ce travail a toute la promotion infectiologie 2018/2019.

Ikram

Sommaire

Liste des abréviations	i
Liste des tableaux.....	ii
Liste des figures.....	iii
Liste des annexes.....	iv
Introduction	

Partie bibliographique

Chapitre I : Résistance bactérienne aux antibiotiques

I.1. Définition	3
I. 2. Modes d'émergence de la résistance bactérienne	3
I. 2.1. Résistance naturelle ou intrinsèque	3
I.2.2. Résistance acquise	3
I.2.2.1. Les mécanismes génétiques de la résistance acquise	3
I.2.2.1.1. Résistance chromosomique	3
I.2.2.1.2. Résistance extra-chromosomique	4
I.2.2.2. Mécanismes biochimiques de la résistance acquise	4
I.2.2.2.1. Inactivation enzymatique.....	5
I.2.2.2.2. Modification de la cible	5
I. 2 .2 .2. 3. Diminution de la perméabilité membranaire	6
I. 2 .2 .2. 4. Excrétion par les pompes d'efflux	6
I.2.3.La multi-résistance.....	6
I.2.3.1. Impact de la multi-résistance	6

Chapitre II : Généralités sur les huiles essentielles

II. 1. Définition	7
II. 2. Localisation des huiles essentielles dans la plante	7
II. 3. Activités biologiques des huiles essentielles	7
II. 3. 1. Activité anti microbienne	7
II. 3.1.1. Activité anti bactérienne	7
II. 3.1.2. Activité antifongique	9
II. 3. 2. Activité antioxydante	9
II. 3. 2. Activité anti-oxydante	9
II. 4. Caractéristiques physiques des huiles essentielles	9
II. 5. Composition chimique des huiles essentielles	10
II. 6. Toxicité des huiles essentielles	10
II. 7. Techniques d'extraction des huiles essentielles	10

II. 7. 1. Extraction par entrainement à la vapeur d'eau	10
II. 7.2. Extraction par hydro distillation	11
II. 7. 3. Extraction par expression à froid	11
II. 7.4. Extraction par solvants organiques	11

Chapitre III : Généralités sur le Thym et la Lavande

III.1. <i>Thymus fantanesii</i>	12
III.1.1. Nomenclature	12
III.1.2. Taxonomie	12
III.1.3. Description botanique	12
III.1.4. Huile essentielle du Thym	12
III.1.5. Propriétés	13
III. 2. <i>Lavandula</i> sp.	13
III.2.1. Nomenclature	15
III.2.2. Taxonomie	15
III.2.3. Description botanique	15
III.2.4. Composition chimique	16
III.2.5. Propriétés	16

Partie expérimentale

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV. 1. Objectifs du travail.....	18
IV. 2. Lieu et durée de l'étude	18
IV.3. Matériel	18
IV.3.1. Matériel végétal	18
IV.3.3. Matériel biologique	19
IV.3.3. Matériel de laboratoire	19
IV. 4. Méthodes	20
IV. 4. 1. Extraction des huiles essentielles	21
IV. 4. 1.1. Calcul du rendement d'extraction	22
IV. 4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne <i>in vitro</i>	22
IV. 4.2.1 Repiquage et revivication des souches	22
IV.4. 2.2. Tests de confirmation des souches.....	22
IV.4. 2.3. Identification biochimique des isolats cliniques par galerie API .	24

IV.4. 2.4. Etude de l'activité antibactérienne.....	24
IV. 4. 3. Antibiogramme standard	24
IV. 5. Activité antibactérienne des huiles essentielles	25
IV.5.1 Aromatogramme	26
IV.5.2. Détermination des CMI des huiles essentielles par Microdilution	26
IV.5.3. Détermination des CMB	27

Chapitre V : Résultats et discussions

V.1. Rendements en huile essentielle	28
V.1.1. <i>Thymus fontanesii</i>	28
V.1.2. <i>Lavandula</i> sp.	28
V.2. Activité antibactérienne	29
V.2.1. Identification des isolats cliniques	29
V.2.2. Antibiogramme standard	30
V.2.2.1. Test de sensibilité des staphylocoques aux antibiotiques	30
V.2.2.2. Test de sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques.....	31
V.2. 3. Effet antibactérien des huiles essentielles de <i>Thymus fontanesii</i> et <i>Lavandula</i> sp.	31
V.2. 3. 1. Sélection des souches cliniques multi-résistantes	31
V.2.3.2. Aromatogramme	32
V.2.3.2.1.. Effet de l'huile essentielle de <i>Thymus fontanesii</i> sur les souches étudiées	32
V.2.3.2.2.. Effet de l'huile essentielle de <i>Lavandula</i> sp. sur les souches étudiées	33
V. 2. 4. Concentrations minimales inhibitrices de l'HE de <i>T. fontanesii</i>	34
V. 2. 5. Détermination de la nature de l'effet antibactérien de l'HE de <i>T.fontanesii</i>	36
Conclusion	37
Références bibliographiques	38
Annexes	

LISTE DES ABREVIATIONS

API : Analytical Profile Index.

ATB : Antibiotique.

ATCC: American Type Culture Collection.

BMR : bactérie multirésistante.

CG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse tandem.

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

E. coli : *Escherichia coli*

HE : Huile essentielle.

MH: Mueller-hinton.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

TTC: Chlorure de 2, 3, 5-Triphényl-Tétrazolium.

Liste Des Tableaux

Tableau 01 : Principaux composants actifs du genre <i>Lavandula</i>	16
Tableau 02 : Matériel de laboratoire et produits utilisés.....	19
Tableau 03 : Tests de pré-identification des souches bactériennes.....	29
Tableau 04 : Sensibilité des staphylocoques aux antibiotiques.....	30
Tableau 05 : Sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques.....	31
Tableau 06 : Diamètres des zones d'inhibition (moyenne \pm écart type) induites par l'HE de <i>Thymus fontanesii</i> vis-à-vis des souches testées.....	32
Tableau 07 : Diamètres des zones d'inhibition (moyenne \pm écart type) induites par l'HE de <i>Lavandula</i> sp. vis-à-vis des souches testées.....	33
Tableau 08 : Rapports CMB/CMI et la de l'H.E de <i>Thymus fontanesii</i> vis-à-vis des souches bactériennes testées.....	36

Liste Des Figures

Figure 01. Différents modes d'acquisition des gènes de résistances aux antibiotiques chez les bactéries	4
Figure 02. Efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme mode de résistance	5
Figure 03. Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne	8
Figure 04. Principales espèces de <i>Lavandula</i>	14
Figure 05. Matériel végétal utilisé; <i>Lavandula</i> sp. (A) et <i>Thymus fontanesii</i> (B)	18
Figure 06. Organigramme du protocole expérimental	20
Figure 07. Dispositif de l'hydrodistillation utilisée pour l'extraction des HEs.....	21
Figure 08. Rendements en huiles essentielles de <i>Thymus fontanesii</i> et <i>Lavandula</i> sp.	28
Figure 09. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'HE de <i>T. fontanesii</i> sur les deux souches d' <i>Escherichia coli</i> étudiées	34
Figure 10. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'HE de <i>T. fontanesii</i> sur les deux souches de <i>Staphylococcus aureus</i> étudiées.	35

Liste Des Annexes

Annexe 01. Composition des milieux de culture utilisés.

Annexe 02. Profils biochimiques des bactéries étudiées sur galerie API 20 E et API Staph.

Annexe 03. Tableau de Lecture de la galerie API 20 E.

Annexe 04. Tableau de Lecture de la galerie API Staph.

Annexe 05. Table de lecture de l'antibiogramme.

Annexe 06. Effet de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* sur les différentes souches bactériennes étudiées.

Annexe 07. Effet de l'huile essentielle de *Lavandula* sp. sur les différentes souches bactériennes étudiées.

Introduction

Depuis leur découverte au début du XX^{ème} siècle, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et ont contribué à l'essor de la médecine moderne. L'utilisation des premières classes d'antibiotiques en clinique a considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables. De même, l'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle de la propagation des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence de bactéries résistantes a mis un terme à cette vague d'optimisme. La prescription massive et souvent probabiliste de ces molécules a abouti à l'émergence du phénomène d'antibiorésistance. En effet, les antibiotiques administrés à titre curatif ou préventif favorisent l'élimination des bactéries sensibles et sélectionnent les plus résistantes **(Li et Webster, 2018)**.

En devenant insensibles à tout traitement, ces bactéries résistantes limitent la gamme d'antibiotiques disponibles en thérapeutique médicale. La situation est d'autant plus alarmante que les infections causées par ces agents pathogènes entraînent souvent une prolongation de l'état pathologique et un accroissement du taux de mortalité. L'acquisition de ces multiples résistances a engendré une perte d'efficacité de l'antibiothérapie pour conduire finalement à une impasse thérapeutique **(Pan et al., 2013)**.

Aussi, au vu de la propagation du phénomène de résistance bactérienne et du nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, la découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue plus qu'indispensable **(Li et Webster, 2018)**.

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 notamment les huiles essentielles **(Bouyahya et al., 2017)**.

Produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, les huiles essentielles sont toujours utilisées comme substances aromatisantes et parfumantes en parfumerie, industries alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire, en aromathérapie et en industrie alimentaire. Différentes études récentes ont confirmé, *in vitro*, l'activité antimicrobienne de certaines huiles essentielles **(Hammer et al., 1999)**.

Le thym et la lavande sont des plantes aromatiques caractéristiques de la flore méditerranéenne, utilisées en médecine traditionnelle comme antispasmodiques, antiseptiques et dans le traitement de certaines infections (**Chevallier, 2001**).

Dans le but de continuer à exploiter les plantes poussant en Algérie et réputées pour leurs vertus médicinales, nous avons étudié le pouvoir antibactérien des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et *Lavandula* sp.

Ce manuscrit est structuré en deux parties :

1. Une étude bibliographique qui présente un premier chapitre sur la résistance bactérienne aux antibiotiques, un deuxième chapitre sur les huiles essentielles et un troisième chapitre sur lavande et le thym.
2. Une étude expérimentale portant sur l'évaluation de l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Lavandula* sp. et *Thymus fontanesii* sur des souches bactériennes multi-résistantes isolées à partir des infections uro-génitales.

Enfin les résultats obtenus de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles sont interprétés à la lumière de la littérature. Le travail est clôturé par une conclusion et des perspectives.

Partie
bibliographique

Chapitre I :
***Résistance bactérienne aux
antibiotiques***

I.1. Définition

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique donné, quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration significativement plus élevée que celle habituellement active sur les souches de cette espèce (**Leclerc et al., 1995**).

I.2. Modes d'émergence de la résistance bactérienne

On distingue deux types de résistance bactérienne :

I. 2.1. Résistance naturelle ou intrinsèque

C'est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance car elle a pour support génétique le chromosome bactérien mais elle n'est pas transmissible sur un mode horizontal; d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes.

L'expression de ce caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend l'utilisation de certains antibiotiques inappropriée (**Normak et Normak, 2002**).

I.2.2. Résistance acquise

Elle survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance résulte d'une modification du capital génétique de la bactérie, lui permettant de tolérer une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce (**Goossens et al., 2006**).

I.2.2.1. Mécanismes génétiques de la résistance acquise

Une bactérie peut acquérir une résistance aux antibiotiques par deux grands mécanismes génétiques : L'un a pour support le chromosome et définit une résistance chromosomique, l'autre a pour support les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons qui définissent une résistance extra-chromosomique (**Lozniewski et al., 2010**).

I.2.2.1.1. Résistance chromosomique

Elle résulte d'une mutation. C'est un phénomène rare et indépendant. Elle n'est pas provoquée par la présence de l'antibiotique mais ce dernier révèle la mutation de résistance en sélectionnant les bactéries mutantes résistantes. Elle est transmissible et permanente et a donc un caractère héréditaire.

Toutes les mutations ont pour conséquence la perte ou la modification d'une protéine structurale ou enzymatique et une bactérie mutée est souvent contre-sélectionnée en l'absence d'antibiotique (Lozniewski *et al.*, 2010).

I.2.2.1.2. Résistance extra-chromosomique

Cette résistance est liée à l'introduction dans la bactérie d'un élément génétique non chromosomique (plasmide ou transposon) codant pour des protéines. Ces dernières peuvent conférer une résistance au nouvel hôte en diminuant la concentration intracellulaire en antibiotique, en modifiant sa cible ou en l'inactivant (**figure 01**).

La résistance plasmidique est liée à la synthèse de protéines additionnelles et non à une modification des constituants normaux de la bactérie. (Lozniewski *et al.*, 2010).

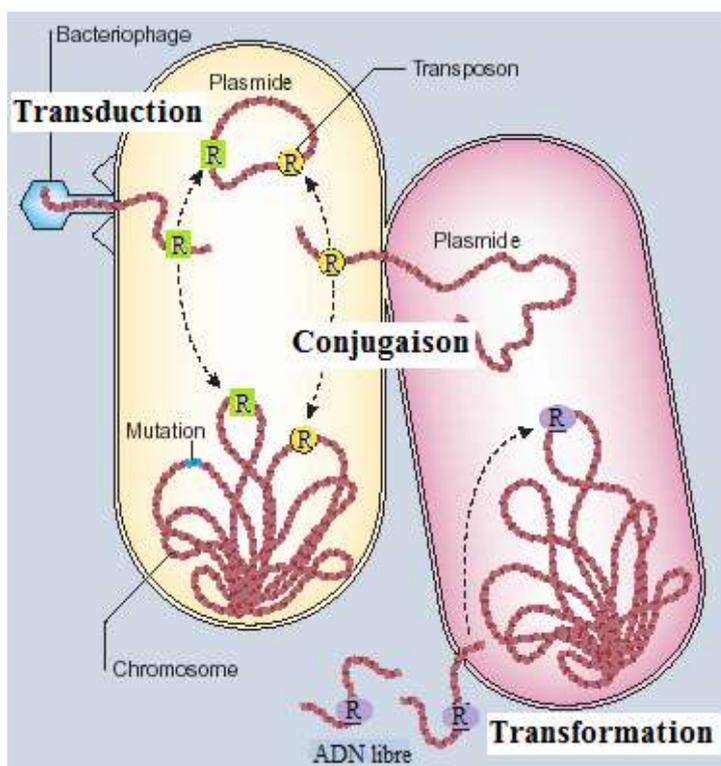


Figure 01. Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries (Levy et Marshall, 2004)

I.2.2.2. Mécanismes biochimique de la résistance acquise

Les principaux mécanismes de résistance élucidés sont l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la modification de la cible de l'antibiotique, la diminution de la perméabilité membranaire et l'excrétion de l'antibiotique (**figure 02**).

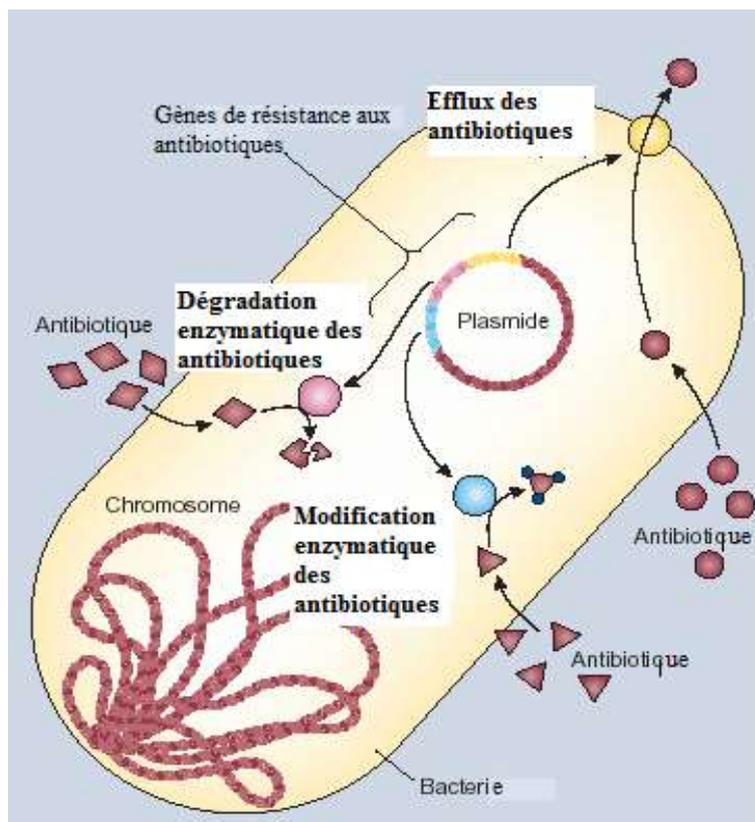


Figure 02 : L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance (Levy et Marshall, 2004)

I.2.2.2.1. Inactivation enzymatique

Certaines bactéries sécrètent des enzymes, spécifiques d'un antibiotique ou d'une famille d'antibiotiques, capables d'inactiver ou de détruire l'antibiotique. L'interaction de l'antibiotique avec sa cible est alors supprimée. C'est un mode de résistance très fréquent qui touche essentiellement deux familles d'antibiotiques, les bêta-lactamines et les aminosides (Wright, 2005).

I.2.2.2.2. Modification de la cible

La résistance par modification de la cible d'un antibiotique est un mécanisme commun de résistance. Elle est la conséquence d'une mutation spontanée au niveau d'un gène bactérien ou de l'acquisition du gène de résistance, par conjugaison, transduction ou transformation. Les changements occasionnés doivent inhiber l'action des antibiotiques tout en maintenant la fonction cellulaire de la cible (Lambert, 2005).

I.2.2.2.3. Diminution de la perméabilité membranaire

Les changements de la membrane externe des bactéries à Gram négatif peuvent gêner la pénétration de l'antibiotique en l'empêchant d'atteindre sa cible. Ce type de résistance est généralement attribué à la perte ou à la modification des porines. Celui-ci est très répandu chez *Pseudomonas aeruginosa* (Maiti et al., 2006).

I.2.2.2.4. Excrétion par les pompes d'efflux

Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la résistance aux antibiotiques par exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire. Ces pompes peuvent être des transporteurs « drogue-spécifiques » et conférer une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques (Markham et Neyfakh, 2001).

I.2.3. La multi-résistance

Il s'agit d'une terminologie très couramment utilisée même si elle ne répond pas à une définition univoque. Les bactéries sont dites multirésistantes aux antibiotiques (BMR) lorsqu'elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique (Jarlier et al., 2010). De ce fait, la multirésistance conduit à l'impasse thérapeutique, qui combinée à la fréquence élevée des BMR, à leur potentiel pathogène, au risque élevé de diffusion des germes ainsi qu'au transfert relativement aisé de leurs mécanismes de résistance, place la lutte contre les BMR comme une priorité nationale.

I.2.3.1. Impact de la multi-résistance

L'impact de cette multi-résistance aux antibiotiques est important au niveau clinique, en termes de morbidité et de mortalité, mais aussi sur le plan économique car les infections liées aux bactéries multi-résistantes engendrent des coûts d'hospitalisation élevés (Cosgrove et al., 2005).

Les infections causées par les bactéries résistantes et multi-résistantes, autrefois cantonnées au milieu hospitalier, deviennent communautaires (extra-hospitalières) (Crum, 2005).

Chapitre II :
***Généralités sur les huiles
essentielles***

II. 1. Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés lipophiles volatiles et odorants souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés (**Bruneton, 2009**). Le terme “huile” vient de son caractère hydrophobe et de sa propriété de se solubiliser dans les graisses, alors que le terme “essentielle” fait référence à l’odeur dégagée par la plante productrice. Les huiles essentielles sont biosynthétisées comme métabolites secondaires par des plantes odorantes dites aromatiques (**Bruneton, 1993**).

II. 2. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles sont largement répandues dans différentes familles du règne végétal à haute teneur en matières odorantes ; elles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante. Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules et se rassemblent sous forme de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles (**Chambon, 1984**).

Dans certaines plantes, l’essence est produite par des tissus sécréteurs tandis que dans d’autres, elle se trouve en liaison glucosidique à l’intérieur des tissus et ne se manifeste que lorsqu’on froisse, écrase, sèche ou distille la plante (**Schauemberg et Paris, 2010**).

II. 3. Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés biologiques à savoir des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydantes et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancérigènes (**Valnet, 2005**).

L’activité biologique d’une huile essentielle semble être influencée par la structure chimique des molécules aromatiques et les possibles effets synergiques entre ses composants (**Lahlou, 2004**).

II.3. 1. Activité anti microbienne

II.3.1.2. Activité antibactérienne

La première mise en évidence de l’action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (**Boyle, 1955**). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (**Burt, 2004**).

La multiplication des bactéries et leur sporulation ainsi que la synthèse des toxines sont limitées par l’effet des huiles essentielles qui arrêtent leur croissance et agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d’une huile essentielle à l’autre et d’une souche bactérienne à l’autre (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (**figure 03**) (**Burt, 2004**).

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases (**Goetz et Ghedira, 2012**) :

1. Attaque de la paroi bactérienne (augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires).
2. Acidification de l'intérieur de la cellule (la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines, ce qui bloque la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure).
3. Destruction du matériel génétique, ce qui entraîne la mort de la bactérie.

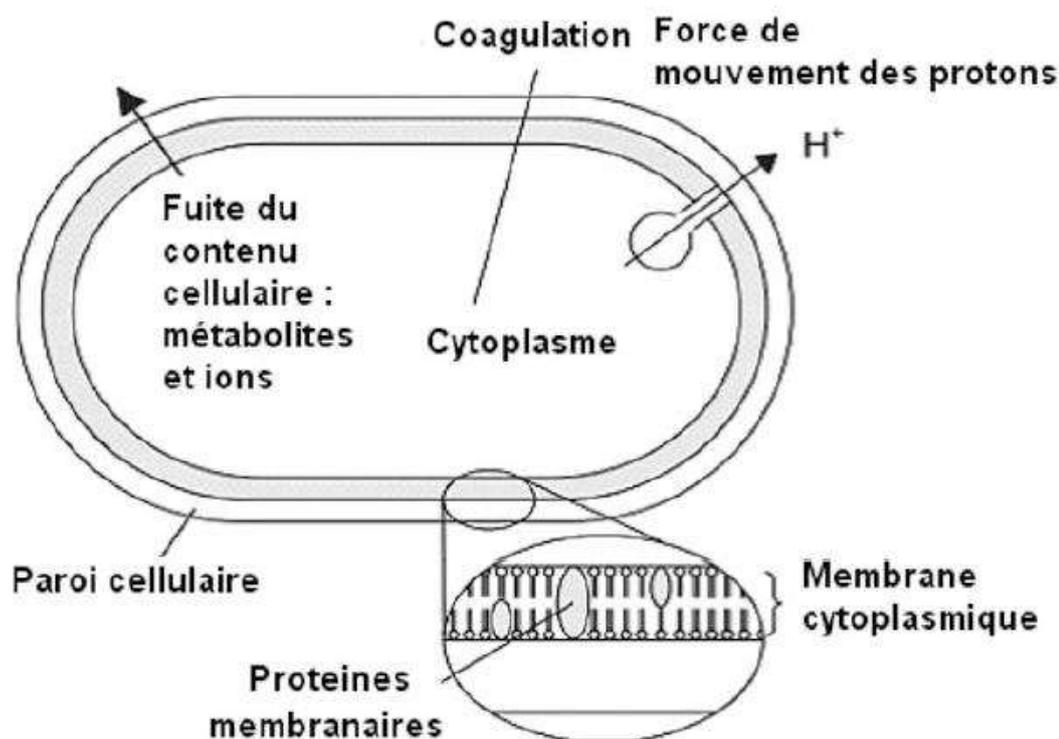


Figure 03 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (**Burt, 2004**).

II.3.1.2. Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (**Lis-Balchin, 2002**)

Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons : *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum* (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

II. 3. 2. activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les poly phénols qui sont responsables de ce pouvoir (**Richard, 1992**).

L'activité antioxydant d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydrox phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH⁻) et super oxydes (O₂⁻) (**Barus, 2008**).

II. 4. Caractéristiques physiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent en commun un certains nombres de propriétés physiques (**Roux et Catier, 2007**).

- ✓ Elles sont solubles dans : l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la pluparts des solvants organiques.
- ✓ La densité est généralement inférieure à celle de l'eau.
- ✓ Elles ont un indice de réfraction élevé.
- ✓ Elles sont très altérables et sensibles à l'oxydation.
- ✓ Elles sont liquides à température ambiante..
- ✓ Elles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes.

II.5. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles volatiles sont les mélanges très complexes, les constituants sont principalement des composés appartenant à des deux familles chimiques en fonction de leur voie de biosynthèse:

- ✓ Les composés terpéniques (la voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique).
- ✓ Les composés aromatiques dérivés de phénylpropane (la voie de l'acide shikimique).

II. 6. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont certainement les produits les plus prises dans domaine de la médecine douce. Bien qu'elles soient bénéfiques pour la santé, elles peuvent être toxiques. Cette intoxication est connu par la cause d'un surdosage car leur accumulation dans l'organisme crée des affections dégénératives et même des effets secondaires plus banales (vomissements, vertiges, syncopes) (**Valnet, 1984**).

Ces molécules peuvent provoquer de sévères irritations sur les peaux sensibles ou les muqueuses. De plus, les cellules du foie peuvent se trouver altérées, lorsque les doses prises sont élevées et que la durée de la cure est longue (**Schauemberg et Paris, 2010**)

II.7. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. Cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants (**Legrand, 1993**) :

II. 7. 1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

C'est une forme de distillation à la vapeur (à la différence de l'hydrodistillation) qui ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau - huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (**Perfumer et al., 1984**).

II. 7.2. Extraction par hydro distillation :

Ce mode d'extraction a été proposé par **Garnier** en **1891**. Son principe correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau qui est ensuite porté à ébullition, la chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (**Bruneton, 1993**).

II. 7. 3. Extraction par expression à froid :

C'est une technique d'extraction des huiles essentielles d'agrumes qui ont une très grande importance dans l'industrie des parfums et des cosmétiques. Le principe de cette technique est basé sur la rupture ou la dilacération des parois des sacs oléifères contenus dans l'écorce des fruits et sur la pression du contenu de ces sacs sur les parois (**Dugo et DiGiacomo., 2002**).

Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en Cellules sécrétrices (**Basil et al., 1998**).

II.7.4. Extraction par solvants organiques :

L'extraction par solvant consiste à séparer les constituants d'un mélange à l'aide d'un solvant qui s'évapore facilement et qui ne se mélange pas avec l'eau. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol et moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone (**Legrand, 1993**).

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient (**AFNOR, 2000**) :

- **Des hydrolysats** : extraction par solvant en présence d'eau
- **Des alcoolats** : extraction avec de l'éthanol dilué, traitées par l'éthanol ou des mélanges éthanol/eau.

Chapitre III :
Généralités sur le Thym
et la Lavande

III.1. *Thymus fantanesii*

Le nom de thym provient du mot latin «*Thymus*» qui signifie "Parfumé", et aussi à partir du mot grec "*Thumos*", venant du mot «*Theo*» signifiant : parfum ou plante odoriférante à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (Guy, 2005).

Le thym est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne. Ses feuilles sont riches en huiles essentielles dont les propriétés sont mises à profit en phytothérapie et en médecine (Rasooli et al., 2006).

III.1.1. Nomenclature

Nom français: Thym

Nom anglais: Thyme

Nom arabe: زعتر

Nom vernaculaire: Zaatat

III.1.2. Taxonomie

La classification botanique de *Thymus fantanesii* d'après Quezel et Santa (1963) est la suivante :

Règne : Plantes

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus fantanesii*.

III.1.3. Description botanique

Le *Thymus* est un petit sous arbrisseau érigé et prostré, il forme des touffes bien étalées et ramifiées entre 10 à 40 cm au-dessus du sol.

Thymus fantanesii pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocailleux et dans les garrigues. Cette espèce est constituée d'une tige ligneuse portant de nombreuses feuilles opposées, recourbées sur les bords, de couleur verte foncée et sont couvertes de poils et de glandes ; riches en huiles essentielles; appelées trichomes (Iserin, 2001).

Les fleurs sont petites et groupées en en glomérules, leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose (Martini et Seiller, 1999).

III.1.4. Huile essentielle du Thym

L'huile essentielle du thym est extraite principalement à partir des feuilles et des sommités fleuries. La tige fleurie du thymus contient en plus de l'huile essentielle des flavonoïdes (thymonine, cirsilinéol et 8-methoxy- cirsilinéol) et des acides phénols (notamment caféïque et rosmarinique), des tanins et une résine.

L'HE du thym est une huile susceptible de présenter de grandes variations, qui sont principalement d'origine génétique et climatique, elle dépend également de la saison de cueillette (stade végétatif) (**Chikhoun, 2007**).

III.1.5. Propriétés

Thymus fontanesii est une plante aromatique très utilisée en médecine traditionnelle comme antispasmodique, carminatif, antitussif, expectorant et antiseptique (**Alireza et al., 2019**).

Ces propriétés biologiques et pharmaceutiques du thym sont en grande partie dues à la présence de substances actives telles que thymol et à carvacrol (**Benjilali, 2004**).

➤ Propriétés médicinales

- Traitements des affections respiratoires (rhume, grippe, angine)
- Utilisé en bain de bouche en cas de gingivite et en gargarisme en cas d'irritation de la gorge.
- Traitement des troubles gastriques (dyspepsies, indigestion) (**Beloud, 2001**).
- Traitement des infections urinaires (**Jiminez-Arellanes et al., 2006**).
- Vermifuge contre les ascaris et les oxyures (**Paul, 2008**).

➤ Propriétés antiseptiques

- Pommades antiseptiques et cicatrisantes.

➤ Propriétés Industrielles

- Le thym est utilisé dans la préparation alimentaire pour la saveur et pour empêcher le développement de la contamination alimentaire (**Mebarki, 2010**).

III. 2. *Lavandula sp.*

La lavande est définie comme plante vivace de la famille des Labiées, dont le nom vient de latin "lavare", qui signifie laver (**Chu et Kemper, 2001**).

Le genre de *Lavandula* regroupe de nombreux hybrides et une trentaine d'espèces dont les trois principales sont :

- *Lavandula latifolia* (lavande aspic ou lavande à larges feuilles)

C'est un arbuste à feuillage persistant peu élevé (jusqu'à 35 cm de hauteur) produisant des tiges longues (jusqu'à 1,25 m de hauteur). Cette espèce se développe dans le sous-sol de forêts mixtes ouvertes sur des sols calcaires à moyenne altitude dans l'est et le sud-est de la péninsule ibérique (**Herrera 2001**).

- *Lavandula angustifolia* (lavande vraie ou lavande à feuilles étroites).

C'est un sous-arbrisseau de la famille des *Labiatae*, composée d'environ 28 espèces presque d'origine méditerranéenne. Les propriétés naturelles de ses huiles essentielles en font des agents de conservation prometteurs pour l'industrie alimentaire (**Fennane et al., 2016**).

- *Lavandula stoechas*

C'est une plante tendre, qui préfère les endroits ensoleillés et les sols riches. Les tiges étroites sont quadrangulaires à feuilles opposées, tendent à être plus vertes que grises, à son extrémité une inflorescence terminée par un toupet de longues bractées violettes (**Chu et Kemper, 2001**).

- **Le lavandin**

Dans les lieux où les aires de répartition de la lavande aspic et de lavande vraie se chevauchent, on assiste souvent à des croisements de deux espèces et par conséquent à l'apparition d'hybrides qui produisent une huile essentielle très appréciée dans la parfumerie industrielle (**Kothe, 2007**).



Lavandula angustifolia



Lavandula latifolia



Lavandula stoechas



Lavandin

Figure 04 : Les principales espèces de *Lavandula* (D'après Couplan, 2012)**III.2.1. Nomenclature**

Nom français: Lavande

Nom anglais: Lavanda

Nom arabe: خزامى

Nom vernaculaire: Khzama

III.2.2. Taxonomie

Suivant la classification classique des plantes à fleurs, la lavande est classée comme selon **Dupont et Guignard (2007)** comme suit:

Embranchement: Spermaphytes

Division: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sous- classe: Asteridae

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiacées

Genre : *Lavandula*

III.2.3. Description botanique

Ce sous-arbrisseau est à tige et feuilles persistantes, il peut atteindre une longueur de 1 mètre (**Hicham, 2017**). La floraison s'épanouit de Juillet à Aout, en dégageant un parfum agréable, frais, léger et fleuri (**Vialard, 2008**). Les feuilles sont étroites, sans pétiole disposées en paires opposées avec une couleur vert bleuté et des petites feuilles souvent blanchâtres, ce qui donne à la plante sa teinte gris argenté caractéristique (**Vialard, 2008**).

III.2.4. Composition chimique

Les constituants chimiques potentiellement actifs du genre *Lavandula* sont présentés dans le **tableau 01**

Tableau 01 : Principaux composants actifs du genre *Lavandula* (Belmont, 2013).

Classe	Exemple
Monoterpènes	α -pinene, β -pinene, β -ocimene, camphre, limonene, p-cymene, sabinene, terpinen
Monoterpène alcools	α -terpineol, borneol, lavandulol, linalool, p-cymen-8-ol, transpivocarveol
Monoterpène aldéhyde	aldéhyde de cumin
Monoterpène étherè	1,8-cineole
Monoterpènes esters	acetate de linalyl, acetate de terpenyl
Monoterpènes cétones	carvone, coumarine, cryptone, fenchone, methylheptenone, noctanone, nopinone, p-methylacetophenone
Benzenoïdes	eugenol, coumarine, carvacrol, acide hydroxycinnamique, aciderosmarinique, thymol
Sesquiterpènes	caryophyllène, oxide de caryophyllène, α -photosantanol, α -santalal, norsantalenone

III.2.5. Propriétés

➤ Propriétés médicinales

- **Antalgiques** : les principes actifs majeurs de la lavande tels que le linalol, l'acétate de linalyle, les terpinènes-1 et 4-ol ont des effets antalgiques démontrés (action sur les récepteurs muscariniques, opioïdes et dopaminergiques).
- **Antispasmodiques** : les principes actifs ont également des propriétés spasmolytiques et myorelaxants par l'action médiée par l'AMP cyclique.
- **Cicatrisation cutanée** : la présence de camphre dans l'huile stimule la nutrition des tissus et améliore l'activité circulatoire, ce qui favorise la cicatrisation et la régénérescence de la peau.
- **Sédation** : le linalol est une molécule aux propriétés hypotensives, antalgiques, relaxantes et sédatives. Il réduit le temps d'ouverture des canaux ioniques de la jonction neuromusculaire par un blocage des canaux Na⁺ et/ou Ca²⁺.

- **Traitement des troubles ORL et respiratoires :** Grâce aux propriétés anti-catarrhales et expectorantes de la Lavande vraie, les infections ORL figurent parmi les indications de l'huile (otite, rhinite, rhino-pharyngite, bronchite)

➤ **Propriétés industrielles**

La lavande a été traditionnellement utilisée comme plante aromatique et cosmétique dans la préparation des parfums, les savons, les poudres de talc et les bougies parfumées (Chu et Kemper, 2001).

*Partie
expérimentale*

Chapitre IV :
Matériel et Méthodes

IV. 1. Objectifs du travail

Les principaux objectifs de la présente étude se résument dans les volets suivants :

- Extraction des huiles essentielles de deux plantes aromatiques (*Thymus fontanesii* et *Lavandula sp.*).
- Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites par des tests de sensibilité *in-vitro* vis-à-vis des bactéries pathogènes isolées chez des patients souffrant d'infections urinaires ou génitales.

IV. 2. Lieu et durée de l'étude

Notre étude expérimentale qui s'est étalée de Février à Mai 2019 a été réalisée au niveau des laboratoires de Pharmacologie et de Microbiologie de l'institut des sciences vétérinaire de Tiaret.

IV.3. Matériel

IV.3.1. Matériel végétal

Nous avons utilisé une espèce de thym (*Thymus fontanesii*) identifiée par Dr AIT HAMMOU, botaniste au niveau du département d'Agronomie, Faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université de Tiaret et une espèce non identifiée de lavande (*Lavandula sp.*)

La récolte de *Thymus fontanesii* a été effectuée dans la région de G'boube au niveau de la wilaya de Tiaret pendant le mois de janvier 2019. *Lavandula sp.* par contre provient du sud Algérien et elle a été achetée dans une épicerie à Tiaret.

Les deux plantes ont été séchées à l'air libre à l'abri de la lumière et de l'humidité puis conservées dans des sacs propres jusqu'au moment de l'extraction.

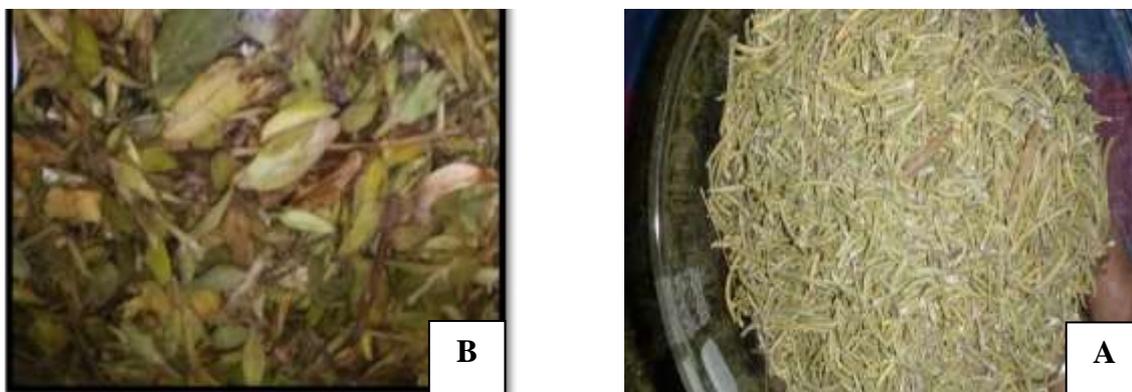


Figure 05. Matériel végétal utilisé; *Lavandula sp.* (A) et *Thymus fontanesii* (B)

IV. 3.2. Matériel biologique

Au total, huit (08) souches bactériennes fournies aimablement par deux Laboratoires d'analyses médicales privés situés dans la wilaya de Tiaret ont été utilisées dans ce travail. Il s'agit de cinq (05) souches bactériennes isolées à partir de prélèvements urinaires (*Staphylococcus aureus* (02), *Escherichia coli* (2), *Klebsiella* sp.) et trois (03) souches d'origine génitale (*Escherichia coli* (02) et *Staphylococcus xylosus*).

Deux souches de référence ont été ainsi utilisées comme contrôle. Il s'agit d'*Escherichia coli* ATCC 25922 fournie gracieusement par le laboratoire de recherche "Amélioration et Valorisation des productions animales locales" de l'institut des Sciences Vétérinaire de Tiaret et de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 fourni gracieusement par le laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine vétérinaire de l'université Jordanienne des Sciences et de Technologie.

IV.3.3. Matériel de laboratoire

Le matériel et les produits nécessaires à la réalisation de ce travail sont résumés dans le tableau 02 :

Tableau 02 : Matériel de laboratoire et produits utilisés.

Appareillage, verrerie et autres	Produits et réactifs	Milieux de culture
- Agitateur magnétique (VELP scientifica)	- Tween 20	- Gélose nutritive
- Autoclave (DSX-280B)	- Peroxyde d'hydrogène	- Gélose Hektoen
- Bain marie (GFL)	- Chlorure de sodium	- Milieu de Chapman
-Vortex (Dragon Lab)	- Fuschine.	-Bouillon Mueller-Hinton
- Balance de précision (Sauter RE2021)	- Violet de gentiane	- Gélose Mueller-Hinton
-Spectrophotomètre (Pharmacia Biotech)	- Lugol.	
- Etuve (Mettler)	- Trichlorure de Tétrazolium	
- Four Pasteur (Heraeus)	-Na ₂ SO ₄	
- Microscope photonique (Optika)	. VP1 et VP2	
- Ballons, béchers, entonnoirs	- Zym A et Zym B	
- Boîtes de Pétri, lames, tubes à essai	- réactif de Kovacs	
- Pipettes pasteur et micropipettes	- Nit 1 et Nit 2	
-Cuves spectrophotométriques, Ecouvillons stériles, pince	- Disques d'oxydase	

N.B : la composition des milieux de culture est donnée dans l'**annexe 01**

VI. 4. Méthodes

La démarche expérimentale globale est illustrée dans l'organigramme ci-dessous :

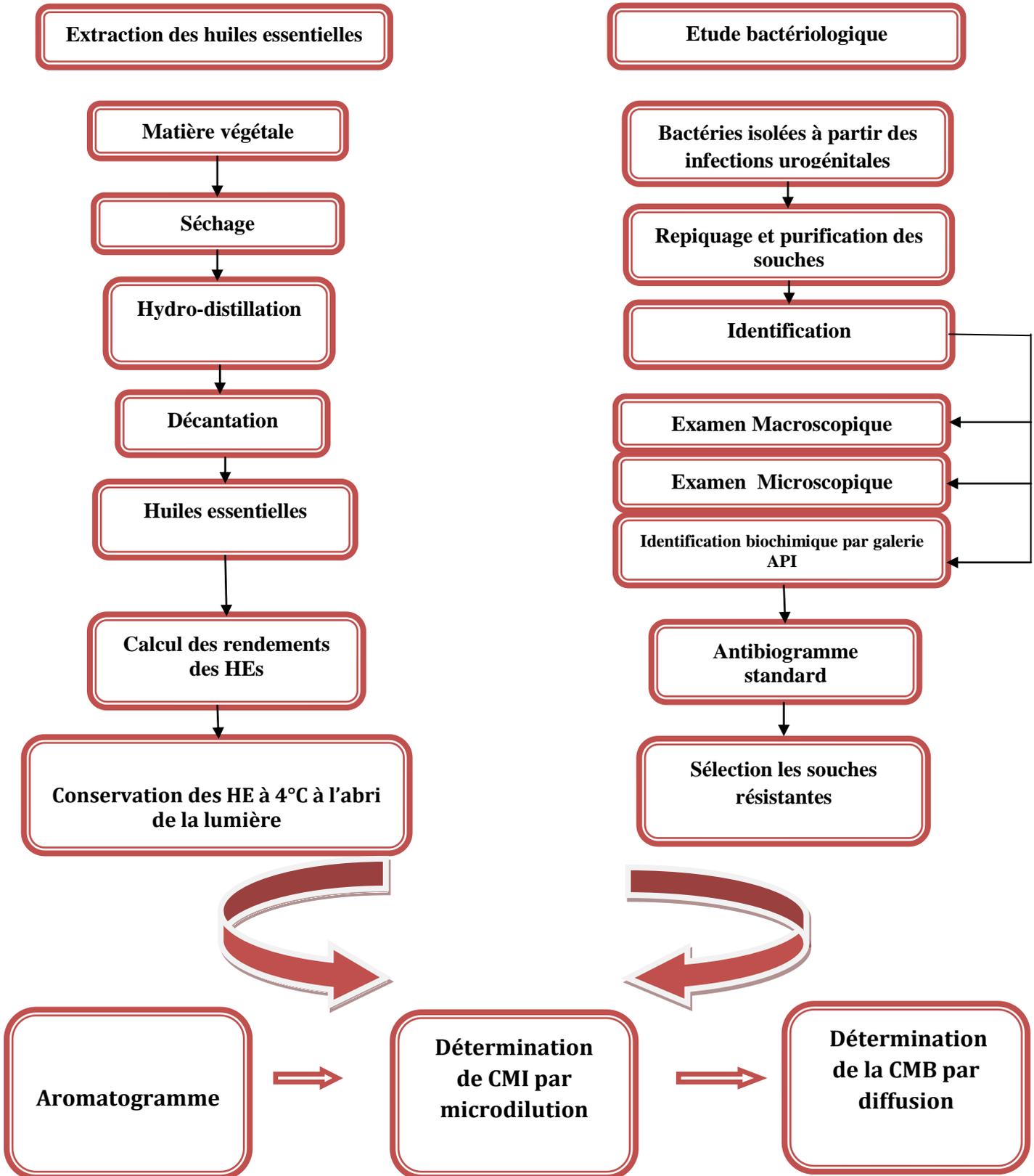


Figure 06. Organigramme du protocole expérimental

IV. 4. 1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif d'hydrodistillation de type Clevenger (**figure 07**).

La méthode consiste à introduire la matière végétale (40 g de feuilles de *Thymus fantanesii* et 60 g de feuilles de *Lavandula sp.*) dans un ballon de 1000 ml et à ajouter ensuite 500ml d'eau distillée puis le mélange est porté à ébullition pendant une heure et demi (1h30) à deux heures (2h) (**ISO 6571, 2008**).

La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes contenues dans ces cellules. Les vapeurs chargées d'huiles essentielles sont condensées dans un réfrigérant puis chutent dans une ampoule à décanter.

L'huile et l'eau se séparent par différence de densité. L'huile qui se trouve en surface est ensuite récupérée dans un tube puis séchée dans le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4).

L'huile essentielle extraite de chaque plante est conservée à +4°C dans des flacons en verre opaques fermés hermétiquement jusqu'à utilisation ultérieure.



Figure 07. Dispositif de l'hydrodistillation de type Clevenger (**Clevenger, 1928**).

IV. 4. 1.1. Calcul du rendement d'extraction

Le calcul du rendement est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse du matériel végétal mise à l'extraction.

Le rendement d'extraction est exprimée en pourcentage (Sangun et al., 2007). Il est calculé par la formule suivante :

$$R_{HE}(\%) = \frac{m_{HE}}{m_s} \times 100$$

Où :

R_{EH} : Rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage.

M_{EH} : Masse de l'huile essentielle en gramme

M_s : Masse de la matière végétale sèche en gramme.

IV. 4. 2. Evaluation l'activité antibactérienne *in vitro*

IV. 4. 2. 1. Repiquage et Revivication des souches

Les isolats cliniques obtenus sur milieu chromogène (Chromagar) ou sur milieux sélectifs et les souches de référence conservées dans le glycérol à -20°C ont été repiquées sur des milieux sélectifs adéquats (milieu de Chapman pour *Staphylococcus aureus* et gélose Hecktœn pour les entérobactéries). Les boîtes de pétriensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h

IV. 4. 2. 2. Tests de confirmation des souches

➤ Etude des caractères morphologiques

Afin de déterminer la forme des bactéries et la nature de leur paroi (Gram positif ou Gram négatif), un frottis bactérien a été préparé à partir de chaque souche puis coloré par la coloration de Gram (Annexe 02) et examiné enfin sous microscope au grossissement (100X).

➤ **Etude des caractères biochimiques**

Deux tests biochimiques (Test de la catalase et Test de l'oxydase) ont été réalisés :

1. Test de la catalase

➤ **Principe**

D'après **Marchal *et al.*, (1982)**, la catalase est une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène selon la réaction suivante :



➤ **Technique**

Une parcelle de culture prélevée à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette pasteur est émulsionnée dans une goutte d'eau oxygénée à 3% préalablement déposée sur une lame propre. Une réaction positive se traduit par la formation immédiate de bulles de gaz, par contre l'absence de bulles indique un résultat négatif (**Marchal *et al.*, 1982**).

2. Test de l'oxydase

➤ **Principe**

Ce test permet de déterminer si la bactérie possède le système enzymatique cytochrome C oxydase lui permettant d'utiliser l'oxygène libre comme accepteur final d'électrons dans sa chaîne respiratoire. La présence de cette enzyme oxyde certains composés chimiques comme l'oxalate de N-diméthyl paraphénylène diamine (**Marchal *et al.*, 1982**).

➤ **Technique**

Un disque d'oxydase imprégné de l'oxalate de N-Diméthyl Paraphénylène Diamine est déposé sur une lame propre puis imbibé avec une goutte d'eau. Une colonie bactérienne prélevée à l'aide de la pipette pasteur est ensuite déposée sur la surface du disque.

La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit par l'apparition immédiate d'une couleur violette foncée.

IV. 4. 2. 3. Identification biochimique des isolats cliniques par galerie API

Deux galeries (API Staph et API 20 E) ont été utilisées pour confirmer l'identité des souches testées.

➤ Principe

Les galeries API Staph et API 20 E sont des systèmes standardisés pour l'identification du genre *Staphylococcus* et des *Enterobacteriaceae*, respectivement. Elles comprennent des tests biochimiques miniaturisés et se présentent sous forme de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests sont reconstitués en inoculant les microtubes avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph medium pour les staphylocoques ou dans l'eau physiologique stérile pour les entérobactéries.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

➤ Technique

Une suspension bactérienne préparée et standardisée à l'échelle 0.5 McFarland est inoculée dans la galerie en remplissant les microtubes uniquement, les microtubes et les cupules pour les tests encadrés et en ajoutant l'huile de paraffine dans les cupules pour les tests soulignés. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 24heures.

➤ Lecture et identification

Après incubation, la lecture des profils biochimiques (**Annexe 03**) a été faite en se référant aux tableaux de lecture de la galerie API 20E (**Annexe 04**) et la galerie API Staph (**Annexe 05**) puis l'identification des profils numériques a été réalisée à l'aide d'un logiciel **Apiweb™**.

IV. 4. 3. Antibiogramme standard

Après identification bactérienne, toutes les souches ont fait l'objet d'un test de sensibilité aux antibiotiques selon la méthode préconisée par le comité de la standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale.

Nous avons réalisé un antibiogramme standard (méthode de diffusion) selon la technique préconisée par le **CLSI (2006)**.

a. Préparation et standardisation des suspensions bactériennes

Une suspension bactérienne de chaque souche à tester est préparée à partir d'une culture jeune de 18 heures : des colonies isolées et parfaitement identiques sont prélevées à l'aide d'une anse de platine et placées dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile.

La suspension ainsi obtenue est ajustée à l'échelle 0.5 McFarland par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

b. Ensemencement des boîtes

Les suspensions bactériennes obtenues sont étalées par écouvillonnage à la surface de la gélose Mueller-Hinton coulée sur une épaisseur de 4 mm dans des boîtes de pétri de 90 mm.

c. Application des disques d'antibiotiques

Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface de la gélose Mueller-Hinton préalablement ensemencée avec une suspension bactérienne de chaque souche étudiée.

Pour les entérobactéries, nous avons testé les antibiotiques suivants: Ampicilline (**AM**¹⁰), Amoxicilline (**AX**²⁵), Amoxicilline-acide clavulanique (**AUG**³⁰), Ceftriaxone (**CTX**³⁰), Gentamicine (**CN**¹⁰), Amikacine (**AK**³⁰), Colistine (**CT**¹⁰), Acide nalidixique (**NA**³⁰) et Sulfaméthoxazole-Triméthoprime (**SXT**²⁵).

Pour les Staphylocoques, nous avons utilisé les antibiotiques suivants: Oxacilline (**OX**⁵), Cefoxitine (**FOX**³⁰), Gentamicine (**CN**¹⁰), Amikacine (**AK**³⁰), Kanamycine (**K**³⁰), Vancomycine (**VA**³⁰), Chloramphénicol (**C**³⁰), Erythromycine (**E**¹⁵), Ofloxacine (**OFX**⁵) et Sulfaméthoxazole-Triméthoprime (**SXT**²⁵).

Les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 heures et après incubation, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés puis interprétés en se référant à la table de lecture de l'antibiogramme (**Annexe 06**).

IV. 4. 5. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Les résultats de l'antibiogramme ont permis de sélectionner deux souches multi-résistantes ; *Escherichia coli* d'origine génitale et *Staphylococcus aureus* d'origine urinaire.

Ces dernières ont fait ensuite l'objet d'un test de sensibilité aux huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et *Lavandula* sp. en utilisant la méthode de diffusion sur milieu solide (Aromatogramme).

IV.4.5.1. Aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles (Benkherara et al., 2011). Elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné d'huile essentielle (Kheyar et al., 2014).

- **Technique**

Deux suspensions bactériennes ont été préparées puis standardisées à l'échelle 0.5 McFarland comme décrit précédemment.

Chaque suspension est ensemencée par écouvillonnage sur des boîtes de pétri contenant la gélose de Mueller-Hinton.

Des disques de papier Wattman N°1 de 6mm de diamètres imprégnés de 5µl de chaque huile essentielle ont été appliqués ensuite à la surface du milieu de culture préalablement ensemencé. Des disques imprégnés de 5 µl d'eau distillée stérile ont été utilisés comme témoins négatifs. L'essai est répété trois fois pour chaque huile et chaque souche.

Les boîtes ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

- **Lecture**

La lecture se fait par mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque. Selon Mutai et al. (2009) ; l'huile essentielle est considérée :

- ✚ Très fortement inhibitrice si le diamètre d'inhibition est de 30mm.
- ✚ Fortement inhibitrice si le diamètre d'inhibition est compris entre 21mm et 29mm.
- ✚ Modérément inhibitrice si le diamètre d'inhibition est compris entre 16mm à 20mm.
- ✚ Légèrement inhibitrice si le diamètre d'inhibition est compris entre 11mm à 16 mm.
- ✚ Non inhibitrice si le diamètre d'inhibition est inférieur à 10mm.

IV. 4. 5. 2. Détermination des CMI par Microdilution

La détermination de la concentration minimale inhibitrice l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* vis-à-vis des deux souches multirésistantes aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de dilution en série sur des microplaques comportant 96 puits à fond «U» selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2006 et NCCLS, 1999).

La solution mère de l'huile essentielle a été préparée à 10% (v/v) dans le Tween 20 puis des doubles dilutions en série ont été réalisées dans le bouillon Mueller-Hinton. Neuf (09) concentrations ont été utilisées dont la concentration initiale était de 10 µl/ml.

L'inoculum bactérien était ajusté à 1.5×10^8 UFC/ml. Un contrôle positif (milieu inoculé) et un contrôle négatif (milieu stérile) étaient utilisés pour chaque test. Les plaques ont été ensuite scellées et incubées à 37°C pendant 24h.

La croissance bactérienne a été visualisée en ajoutant La croissance bactérienne a été visualisée en ajoutant une solution aqueuse de chlorure de 2, 3, 5-triphényl-tétrazolium (TTC) dans chaque puits (**Radulovic et al., 2011**). La Concentration Minimale Inhibitrice est définie comme étant la concentration la plus faible de la substance antibactérienne qui empêche toute croissance visible après 18heures de culture à 37°C, comme l'indique la coloration au TTC (les cellules mortes ne sont pas colorées par le TTC) (**Morais et al., 2011**).

IV. 4. 5. 3. Détermination des CMB

La CMB est définie comme étant la plus faible concentration de l'agent inhibiteur ne laissant subsister que 0.01% de l'inoculum initial après 18heures d'incubation à 37°C (**Morais et al., 2011**).

Pour déterminer la CMB, 10 µl de bouillon ont été pris de chaque puits sans croissance visible et ensemencés sur une gélose Mueller-Hinton puis incubés pendant 24h à 37°C.

Après incubation, la croissance des souches bactériennes testées correspondent à l'activité bactériostatique tandis que l'effet bactéricide est révélé par une absence de croissance (**Dramane, 2010**).

Les ratios CMB/ CMI ont été calculés pour déterminer la nature de l'effet antibactérien de l'huile essentielle. Cette dernière est considérée comme bactéricide si le rapport CMB / CMI est inférieur à 4. L'effet bactériostatique par contre, correspond à un ratio CMB/CMI supérieur à 4 et inférieur à 32 (**Cutler et al., 1994**).

Chapitre V :
Résultats et Discussion

V.1. Rendements en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est exprimé par la quantité d'huile (en ml) obtenue pour 100g de matière végétale sèche.

La figure 08 résume le rendement moyen en huile essentielle extraite de *Thymus fontanesii* et *Lavandula sp.*

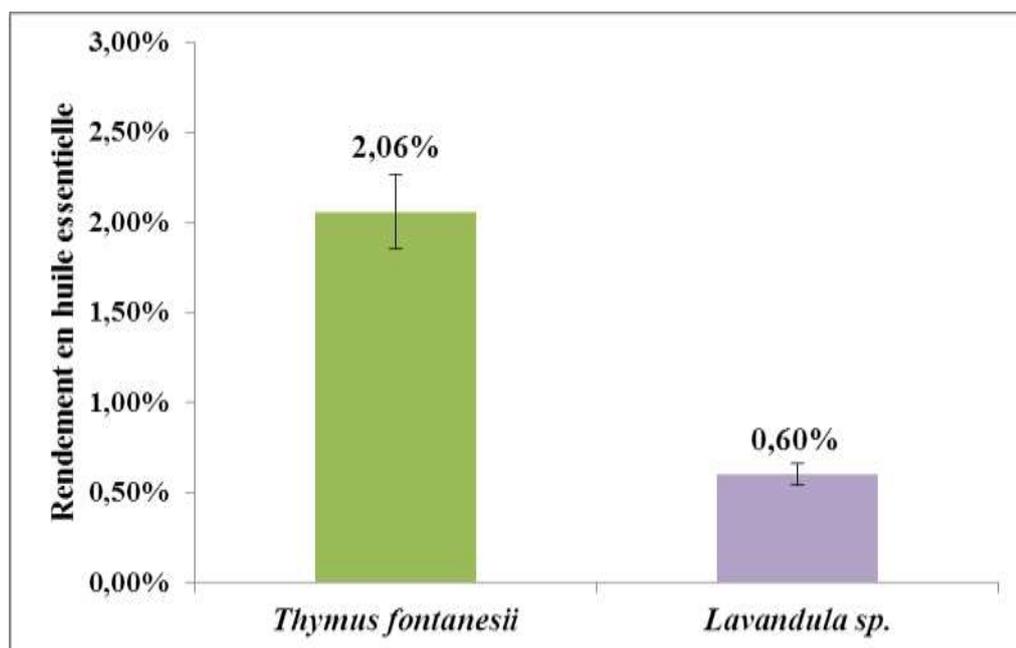


Figure 08. Rendements (\pm écartype) en huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et *Lavandula sp.*

V.1. 1. *Thymus fontanesii*

Un rendement de 2.06 % (p/p) a été obtenu au cours de cette étude. Ce rendement est similaire à celui obtenu par **Haddouchi et al. (2009)** avec un taux de 2%.

Des rendements supérieurs en huiles essentielles de *Thymus fontanesii* récoltée de quatre stations au niveau de la wilaya de Tlemcen ont été enregistrés par **Bekhiche (2009)** avec des taux allant de 5.2% à 5.46%. Cependant, **Dob et al. (2006)** ont signalé un rendement plus faible de 0,9% pour la même plante récoltée dans la région de Djelfa.

V.1. 2. *Lavandula sp.*

Le rendement moyen en huile essentielle obtenu à partir des feuilles de *Lavandula sp.* est de 0.6% (p/p). Des rendements plus élevés en huile essentielle ont été enregistrés respectivement pour *Lavandula stoechas* et *Lavandula dentata* avec des taux de 2.5% et 2.9% (p/p) (**Bachiri et al., 2016**).

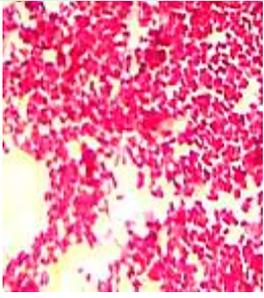
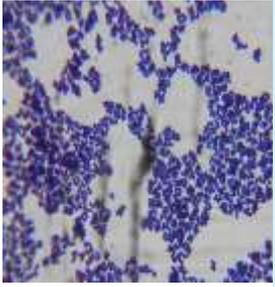
Cette divergence dans les rendements en huiles essentielles entre les différentes études pourrait être attribuée à plusieurs facteurs tels que l'origine géographique de la plante (la région de récolte), le climat, l'altitude et le stade de développement de la plante (Dob et al., 2006 ; Mouhi et al., 2016).

V.2. Activité antibactérienne

V.2.1. Identification des isolats cliniques

Les résultats des examens macroscopique, microscopique et biochimique sont présentés dans le tableau 03.

Tableau 03 : Tests de pré-identification des souches bactériennes

Souche	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Tests biochimiques	
			Catalase	Oxydase
Entéro-bactéries	Colonies arrondies, bombées, brillantes, jaunes orangées (lactose+) dépourvues de centre noir (H ₂ S-) sur gélose Hektœn	Coccobacilles à Gram négatif	Positive	Négative
				
Staphylo-coques	Colonies arrondies, brillantes, à bords réguliers, bombées, jaunes doré sur le milieu de chapman	Coques à gram positif, groupés en amas sous forme de grappe de raisin	Positive	Négative
				

L'identification biochimique des cinq (05) souches appartenant à la famille des *Enterbacteriaceae* par la galerie API 20 E a permis de mettre en évidence la présence de quatre (04) souches d'*Escherichia coli* dont deux d'origine génitale et deux d'origine urinaire et une souche appartenant au genre *Klebsiella* (**Annexe 02**).

V.2. 2. Antibiogramme standard

V.2. 2.1. Test de sensibilité des staphylocoques aux antibiotiques

Les résultats relatifs à l'étude de la sensibilité des souches de *Staphylococcus* aux différents antibiotiques utilisés sont résumés dans le tableau 04.

Tableau 04 : Sensibilité des staphylocoques aux antibiotiques.

Souche et origine du prélèvement	β -lactamines			Aminosides			Polypeptide	Macrolide	Quinolones	Sulfamides
	FOX	OX	C	CN	K	AK	VA	E	OFX	SXT
<i>S. aureus</i> (urinaire 1)	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R
<i>S. aureus</i> (urinaire 2)	S	NT	S	S	S	NT	S	R	S	S
<i>S. xylosus</i> (génitale)	NT	S	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R

NT : non testé, **S**: sensible, **R**: résistante, **(FOX)** : Céfoxitime, **(OX)** : Oxacilline, **(C)** : Chloramphénicol, **(CN)** : Gentamicine, **(K)** : Kanamycine, **(AK)** : Amikacine, **(VA)** : Vancomycine, **(E)** : Erythromicine, **(OFX)** : Ofloxacine, **(SXT)** : Sulfaméthoxazole-Triméthoprime.

Parmi les trois isolats cliniques testés, *S. xylosus* était sensible à tous les antibiotiques à l'exception de la kanamycine ; un antibiotique de la famille des aminosides.

Les deux souches de *S. aureus* ont montré des résultats variables vis-à-vis des antibiotiques testés. En effet, une seule souche était sensible à tous les antibiotiques et résistante uniquement à un seul antibiotique de la famille des macrolides (Erythromycine). La deuxième souche, par contre était résistante à des antibiotiques appartenant à cinq classes différentes (β -lactamines, aminosides, macrolides, quinolones et sulfamides).

La souche de référence était résistante à la kanamycine et aux sulfamides et sensible aux autres antibiotiques testés.

V.2.2.2. Test de sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques

Le tableau 05 résume les résultats de la sensibilité des différentes souches de la famille des *Enterobacteriaceae* aux antibiotiques testés.

Tableau 05 : Sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques.

Souche et origine du prélèvement	β-lactamines				Aminosides		Polypeptide	Quinolone	Sulfamide
	AM	AX	AUG	CTX	CN	AK	CT	NA	SXT
<i>E. coli</i> (urinaire 1)	R	R	R	S	S	S	S	S	R
<i>E. coli</i> (urinaire 2)	R	R	R	I	S	S	S	S	S
<i>E. coli</i> (génitale1)	R	R	R	S	S	S	R	S	S
<i>E. coli</i> (génitale 2)	R	R	R	S	R	S	S	R	R
<i>E. coli</i> ATCC25922	R	R	NT	S	S	S	NT	R	R
<i>Klebsiella</i> sp.	R	R	R	S	S	S	S	S	R

NT: non testé, **S**: sensible, **R**: résistante, **I**: intermédiaire, **(AM)** : Ampicilline, **(AX)** : Amoxicilline, **(AUG)** : Amoxicilline+ acide clavulanique, **(CTX)** : Céftriaxone, **(CN)** : Gentamicine, **(AK)** : Amikacine, **(CT)** : Colistine, **(NA)** : Acide nalidixique, **(SXT)** : Sulfaméthoxazole- Triméthoprime.

Les résultats du tableau ci-dessus montrent une résistance de la souche N°2 d'*Escherichia coli* d'origine génitale vis-à-vis de quatre familles d'antibiotiques différentes (β-lactamines, aminosides, quinolones et sulfamides).

Les autres souches d'*E.coli* ont montré une résistance à une ou deux classes d'antibiotiques seulement et la souche de référence était résistante à des antibiotiques appartenant à trois familles (β-lactamines, quinolones et sulfamides).

Klebsiella sp. était résistante aux trois antibiotiques utilisés de la famille des β-lactamines et au sulfamide.

V.2.3. Effet antibactérien des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et *Lavandula* sp.

V.2.3.1. Sélection des souches cliniques multi-résistantes

Pour l'étude de l'activité antibactérienne des HE de *Thymus fontanesii* et de *Lavandula* sp., nous avons sélectionné uniquement les isolats cliniques ayant révélé une multi-résistance. Il s'agit d'une souche de *Staphylococcus aureus* isolée chez un patient souffrant d'une infection urinaire et une souche d'*Escherichia coli* isolée chez une patiente souffrant

d'une infection vaginale. Parallèlement, deux souches de référence ont été utilisées comme contrôle: *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

V. 2. 3. 2.Aromatogramme

V.2.3.2.1. Effet de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* sur les souches étudiées

Les résultats des de l'activité antibactérienne de l'HE de *Thymus fontanesii* par la méthode des disques vis-à-vis des quatre souches testées sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 06 : Diamètres des zones d'inhibition (moyenne \pm écart type) induites par l'HE de *Thymus fontanesii* vis-à-vis des souches testées.

	Souche	Diamètre d'inhibition (mm)	Activité de l'HE
Bactéries à Gram -	<i>E.coli</i> (isolat)	23 \pm 01	Fortement inhibitrice
	<i>E.coli</i> ATCC 25922	26 \pm 3.6	Fortement inhibitrice
Bactéries à Gram +	<i>S.aureus</i> (isolat)	33 \pm 01	Très fortement inhibitrice
	<i>S.aureus</i> ATCC 6538	49 \pm 01	Très fortement inhibitrice

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. fontanesii* par la méthode des disques sur milieu gélosé a montré un effet inhibiteur contre toutes les souches étudiées avec une sensibilité extrême des bactéries à Gram positif. En effet, une activité très fortement inhibitrice a été observée vis-à-vis des deux souches de *Staphylococcus* avec des zones d'inhibition de 33 \pm 01 mm et 49 \pm 0 mm contre l'isolat clinique et la souche de référence, respectivement.

Par ailleurs, l'HE de *T. fontanesii* a montré une activité fortement inhibitrice contre les bactéries à Gram négatif avec une zone d'inhibition de 23 \pm 01 mm pour la souche clinique d'*E. coli* et un diamètre d'inhibition de 26 \pm 3.6 mm pour *E. coli* de référence.

Les résultats obtenus corroborent en partie ceux de **Haddouchi et al., (2009)** qui ont rapporté une activité modérément inhibitrice de l'HE de *Thymus fontanesii* vis-à-vis d'*Escherichia coli* et une activité très fortement inhibitrice vis-à-vis de *S. aureus*.

Plusieurs auteurs ont rapporté que la majorité des huiles essentielles testées pour leurs propriétés antibactériennes ont un effet inhibiteur plus prononcé contre les bactéries à gram positif. La faible sensibilité ou la résistance des bactéries à gram négatif est attribuée principalement à la présence d'une membrane externe hydrophile qui peut empêcher la

pénétration des composés hydrophobes dans la membrane cellulaire cible (Burt., 2004 ; Ouwehand *et al.*, 2010).

Nos résultats ont montré un effet inhibiteur très puissant de l'HE de *T. fontanesii* et ceci pourrait être probablement attribué au Carvacrol et au thymol qui sont deux composés phénoliques réputés avoir une grande activité antibactérienne (Bouhdid *et al.*, 2006). En effet, le Carvacrol et le thymol semblent capables d'augmenter la perméabilité membranaire (Lambert *et al.*, 2001).

Selon Ultee *et al.* (2002), le Carvacrol pénètre dans la bicouche lipidique et entraîne la formation de canaux dans la membrane permettant la fuite des ions.

Le thymol semble aussi altérer la perméabilité de la membrane cytoplasmique et entraîner une perte du matériel intracellulaire (Guinoiseau, 2010).

V.2. 3. 2.2. Effet de l'huile essentielle de *Lavandula sp.* sur les souches étudiées

Les résultats relatifs à l'évaluation de l'effet des l'HE de *Lavandula sp.* par la méthode diffusion vis-à-vis des souches étudiées sont récapitulés dans le tableau 07:

Tableau 07: Diamètres des zones d'inhibition (moyenne \pm écart type) induites par l'HE de *Lavandula sp.* vis-à-vis des souches testées.

	Souche	Diamètre d'inhibition (mm)	Activité de l'HE
Bactéries à Gram -	<i>E.coli</i> (isolat)	7.33 \pm 0.57	Non inhibitrice
	<i>E.coli</i> ATCC 25922	6.33 \pm 0.57	Non inhibitrice
Bactéries à Gram +	<i>S.aureus</i> (isolat)	6.33 \pm 0.57	Non inhibitrice
	<i>S.aureus</i> ATCC 6538	8.66 \pm 1.53	Non inhibitrice

Les résultats du tableau ci-dessus montrent que l'huile essentielle de *Lavandula sp.* n'a exercé aucune activité inhibitrice contre toutes les souches étudiées et les diamètres d'inhibition étaient inférieurs à 10 mm.

De façon similaire, une étude de l'activité antibactérienne des HES de *lavandula stoechas* et *Lavandula angustifolia* réalisée par Chebaibi et ses collaborateurs (2016) a montré un effet antibactérien négatif de *Lavandula stoechas* contre *E. coli* et *S.aureus* avec des diamètres d'inhibition inférieurs à 10mm. Cependant, l'HE de *Lavandula angustifolia* a montré un effet légèrement inhibiteur vis-à-vis d'*E. coli* avec des zones d'inhibition de 15 mm et une absence de l'activité antibactérienne contre *S. aureus* caractérisée par des zones

d'inhibition avec des diamètres inférieurs à 10 mm.

Selon **Hussain et ses collaborateurs (2009)**, l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle peut être influencée par la famille des plantes. En effet, ces auteurs ont montré que la région et la période de la récolte ont un effet sur les plantes appartenant à la famille des *Lamiaceae* telles que *Lavandula* et *Thymus*.

Ainsi dans une étude approfondie sur l'effet inhibiteur des huiles essentielles du *Thymus*, **Bounatirou et al, (2007)** ont montré que cette plante exerce un effet inhibiteur plus important durant la période de fleuraison.

V. 2. 4. Concentrations minimales inhibitrices de l'HE de *T. fontanesii*

Le test antibactérien préliminaire (Aromatogramme) a permis d'observer un effet inhibiteur marqué de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et aucune activité inhibitrice de l'HE de *Lavandula* sp. contre toutes les souches bactériennes testées. Cependant, la méthode des disques doit être considérée comme uniquement qualitative et ne permet pas de déterminer la nature de l'activité antibactérienne (**Ganiere et al., 2004**).

Les résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'HE de *T. fontanesii* sur les souches d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* par microdilution sont illustrés dans les figures 09 et 10, respectivement.

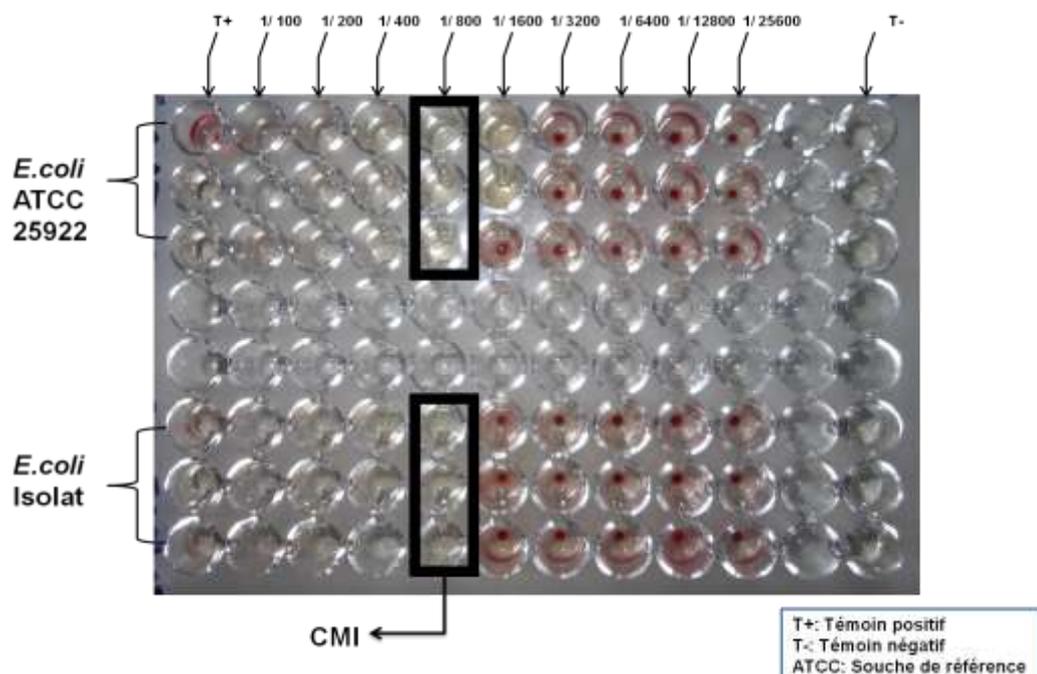


Figure 09. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'HE de *T. fontanesii* sur les deux souches d'*Escherichia coli* étudiées.

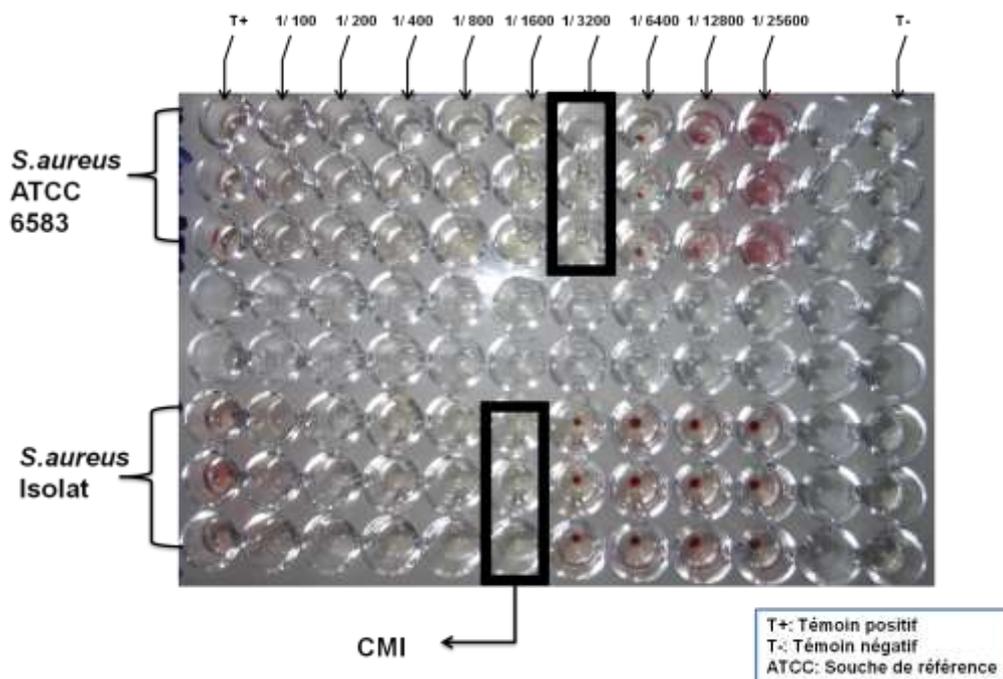


Figure 10. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'HE de *T. fontanesii* sur les deux souches de *Staphylococcus aureus* étudiées.

Les résultats des figures ci-dessus dévoilent une activité inhibitrice de l'HE de *T. fontanesii* sur l'ensemble des souches testées. Cette activité est caractérisée par une absence de la croissance bactérienne aux dilutions allant de 1/100^{ème} à 1/400^{ème} avec une CMI de 1,25 µl/ ml pour les deux souches d'*E. coli* (isolat et ATCC).

Les staphylocoques étaient plus sensibles à l'HE de *T. fontanesii* avec des valeurs de CMI plus faibles (0,625 µl/ml pour la souche clinique et 0,312 µl/ml pour la souche de référence).

Ces résultats sont différents de ceux obtenus par **Abdellah et al, (2018)** qui ont étudié l'effet de l'HE de *T. fontanesii* par la méthode d'incorporation en milieu gélosé et ont rapporté des CMI de 3,44 et 5,26 µl/ ml sur trois souches de référence de *S. aureus* et une CMI de 5,26 µl/ ml sur la même souche d' *E. coli* que nous avons utilisée (*E. coli* ATCC 25922).

L'activité de l'HE du *Thymus fontanesii* testée par la méthode de dilution en milieu solide par **Haddouchi et al, (2009)** a démontré des valeurs de CMI de 368.76 µg/ml pour *E. coli* et de 460.95 µg/ml pour *S. aureus*. Ces valeurs sont supérieures à celles que nous avons obtenues.

V. 2. 5. Détermination de la nature de l'effet antibactérien de l'HE de *T.fontanesii*

Afin de déterminer l'effet bactériostatique ou bactéricide de l'HE de *T. fontanesii* vis-à-vis de toutes les souches testées, la concentration minimale bactéricide (CMB) a été calculée pour chaque souche par la méthode de diffusion sur milieu solide puis les rapports CMB/CMI étaient calculés (Tableau 08).

Tableau 08: Rapports CMB/CMI et la de l'H.E de *Thymus fontanesii* vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Souche	CMI (µl/ml)	CMB (µl/ml)	CMB/CMI	Effet de l'HE
<i>E. coli</i> (isolat clinique)	1,25	1,25	1	Bactéricide
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,25	1,25	1	Bactéricide
<i>S. aureus</i> (isolat clinique)	0,625	0,625	1	Bactéricide
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,312	2,5	8	Bactériostatique

Le calcul des rapports CMB/CMI de l'huile essentielle de *T. fontanesii* pour les différentes souches étudiées a révélé une activité bactéricide contre les souches *d'Escherichia coli* et la souche de *S.aureus* isolée cliniquement et une activité bactériostatique a été enregistrée contre *S. aureus* ATCC 6538.

Ces résultats sont en partie en accord avec ceux de **Haddouchi et al, (2009)** qui ont signalé que l'HE de *T.fontanesii* est bactéricide contre les bactéries à Gram négatif et bactériostatique contre les Gram positif.

Conclusion
et
Perspectives

La présente étude était consacrée à l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites de deux plantes locales, *Thymus fontanesii* et *Lavandula* sp. vis-à-vis des bactéries multi-résistantes impliquées dans les infections urogénitales.

Le rendement en huiles essentielles est de 2.06% pour *Thymus fontanesii* et 0.6 % pour *Lavandula* sp.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles *in vitro* par la méthode des disques a révélé une activité fortement inhibitrice de l'HE de *T. fontanesii* et une absence d'un effet inhibiteur de l'HE de *Lavandula* sp.

La détermination des concentrations minimales inhibitrices par microdilution montre que toutes les souches présentent une sensibilité remarquable à l'HE de *T. fontanesii* même à des valeurs de CMI faibles ne dépassant pas 1,25 µl/ml pour les bactéries Gram négatif et 0,625 µl/ml pour les bactéries Gram positif qui s'avèrent plus sensibles.

L'HE de *T. fontanesii* a démontré une activité antibactérienne importante contre des souches cliniques multi-résistantes et pourrait donc être utilisée comme traitement alternatif aux antibiotiques devenant de plus en plus inactifs vis-à-vis des bactéries ayant acquis une résistance voire une multi-résistance à ces agents thérapeutiques.

Ainsi dans la continuité de ce travail, plusieurs perspectives peuvent être envisagées:

- ✚ Identifier la composition chimique de l'huile essentielle par des techniques analytiques performantes telles que la CG-SM.
- ✚ Tester séparément les différents composants de ces huiles essentielles pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques.
- ✚ Etudier d'autres activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoire et anti-oxydante.
- ✚ Etudier la toxicité des HE et réaliser des essais *in vivo* en utilisant des formulations à base de ces substances.

Références bibliographiques

A

1. **Abdellah, F., Boukraa, L., Hammoudi, S. M., Kolayli, S., Sahin, H., Can, Z., Benaraba, R. (2018).** Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential oils of Some Algerian and Turkish Medicinal Plants. *Journal of Apitherapy and Nature/Apiterapi ve Doga Dergisi*, 1(2), 8-19.
2. **AFNOR. (2000).** Huiles essentielles, *Monographies relatives aux huiles essentielles*, Tome 2, 6ème édition, AFNOR, Paris
3. **Alireza, G., Seyed Ebrahim, S., Ahmed, K., Zahia, K. (2019).** Thymus fontanesii Boiss. & Reut. ♂ A Potential Source of Thymol-Rich Essential Oil in North Africa, 188p.
4. **Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., El Ajjouri, M., Chaouch, A. (2010).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de Thymus algeriensis Boiss. & Reut et Thymus ciliatus (Desf.) Benth du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 14(1), 141-148.

B

5. **Bachiri, L., Echchegadda, G., Ibijbijen, J., Nassiri, L. (2016).** Etude phytochimique et activité antibacterienne de deux especes de lavande autochtones au Maroc: Lavandula stoechas L. et Lavandula dentata L. *Européen Scientific Journal*, 12 (30): 313.
6. **Barus, C. (2008).** Etude électrochimique de molécules antioxydants et de leur association en milieux homogène et diphasique - Application aux produits cosmétiques, Thèse de Doctorat, université de Toulouse, 167p
7. **Basil, A., Jimenez-carmonna, M. M., Clifford, A. A. (1998).** Extraction of rosemary by superheated water. *Journal of food chemistry*, p: 5205-5209.
8. **Belmont, M. (2013).** lavandula angustifolia ; lavandula latifolia ;lavandula intermedia : études botaniques, chimiques et thérapeutiques. thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état université joseph fourier faculté de pharmacie de grenoble, 156p.

9. **Benjlali, B. (2004).** Extraction des plantes aromatiques et médicinales : cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Institut agronomique et vétérinaire. Maroc. Le pharmacien du maghreb, spécial N.2, 198p.
10. **Bouhdid, S., Idaomar, M., Zhiri, A., Baudoux, D., Skali, N. S., Abrini, J. (2006).** Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Biochimie, Substances Naturelles et Environnement Congrès international de biochimie, Agadir, Maroc, 9-12.
11. **Boughenbjoua, H., (2017).** Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* cultivées dans la région de Skikda. *Bulletin de la société royale des sciences de liège*, 86, 88-95
12. **Bounatirou et al. (2007).** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry*, 105: 146-155.
13. **Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J., Dakka, N. (2017).** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 1-11.
14. **Bruneton, J. (2009).** *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales.* Paris : Lavoisier, p.1269.
15. **Bruneton, J. (1993).** *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales.* Paris : Tec & Doc, Lavoisier, p: 915..
16. **Burt, S., (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbio*, 94, 223-253.

C

17. **CASFM. (2018).** Standardisation de l'antibiogramme a l'échelle nationale.
Disponible sur : https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2018/12/CASFMV2_SEPTEMBRE2018.pdf. (Consulté le 25 /04 /2019).
18. **Chambon, L. (1984).** La menthe : Etude génétique et recherche des critères de sélection : Mémoire de D.E.A. Université Claud Bernard- Lyon, 98pp

19. **Chebaibi, A., Marouf, Z., Rhazi-Filali, F., Fahim, M., Ed-Dra, A. (2016).** Évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de sept plantes médicinales récoltées au Maroc. *Phytothérapie*, 14(6), 355–362.
20. **Chikhoun, A. (2007).** Huiles essentielles de thym et d'origan : étude de la composition chimique, de l'activité antioxydant et antimicrobienne, mémoire de magister, Institut National Agronomique EL Harrach –Alger. p151.
21. **Chu, C. J., Kemper, K. J. (2001).** Lavender (*Lavandula* spp.). Longwood Herbal Task Force. Boston, p 32.
22. **Clevenger, J. F. (1928).** Apparatus for the determination of volatile oil. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 17(4), 345-349.
23. **CLSI. 2006.** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, 7th Ed.
24. **Cosgrove, S. E., Carmeli, Y. (2003).** The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. *Clin. Infect. Dis*, 36, 1433-1437
25. **Couplan, F. (2012).** Lettre d'information n°12, Rencontre avec la lavande.
26. **Crum, N. F. (2005).** The emergence of severe, community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Scand. J. Infect. Dis*, 37, 651-656.
27. **Cutler, N. R., Sramek, J. J., Narang, P. K. (Eds.). (1994).** Pharmacodynamics and drug development: Perspectives in clinical pharmacology. *John Wiley & Sons*, 491p.



28. **Dramane, S. (2010).** Evaluation des activités antimicrobiennes et antiradicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte d'ivoire ; *Euro Journal of Scientific Research* 40 (2) ; p: 307-317.
29. **Dramane, S., Mamidou, K. W., Kagoyir, K. (2010).** Evaluation des activités antimicrobiennes et antiradicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte d'Ivoire, *Euro Journal of Scientific Research*, 40 (2): 307-317.
30. **Dugo, G., Di Giacomo, A. (2002).** *The genus Citrus*. London : *Taylor & Francis Publishing*, 656p.

G

31. **Ganiere, J. P., Mangion, C., Péridy. (2004).** *Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides de la cefquinome, la marbofloxacin, la tylosine et la spiramycine en solution dans du lait vis-à-vis de bactéries isolées de mammites bovines. Revue méd. Vét, 155, 8-9,411-416.*
32. **GANSMANDEL, T. (2011).** Etude épidémiologique des résistances d'Escherichia Coli BLSE au centre hospitalier de Valenciennes en 2006. Mémoire pour le DES de biologie médicale. Lille : Université de Lille 2, 145 p.
33. **Goetz, P., Ghedira, K. (2012).** Phytothérapie anti-infectieuse. Paris: *Springer-Verlag*, Pp 4-194.
34. **Goossens, H., Guillemot, D., Ferech, M., Schlemmer, B., Costers, M., van Breda, M., Baker, L. J., Cars, O., Davey, P. G. (2006).** National campaigns to improve antibiotic use. *Eur. J. Clin. Pharmacol*, 62, 373-379.
35. **Guinoiseau, E. (2010).** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Life Sciences. mémoire magistère, Université de Corse, 98p
36. **Guy, Gilly. (2005).** Les plantes aromatique et huiles essentielles a grasse – botanique-culture - chimie-production et marché. Préface de hubert richard ; *le harmattan*, 45 ,23-33

H

37. **Haddouchi, F., Lazouni, H. A., Meziane, A., Benmansour, A. (2009).** Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de Thymus Fontanessi Boiss & Reut. *Afrique science : Revue internationale des sciences et technologie*. 5 (2), 246-259
38. **HoriKawa, M., Noro, T., Kamei, Y. (1999).** In vitro antimethicillin. resistant Staphylococcus aureus activity found in extract of marine algae in digenous to the costline of Japan. *J. Antibiot*, 52, 186-89.
39. **Hussain, A. I. (2009).** Characterization and biological activities of essential oils of some species of *Lamiaceae*. Thèse de Doctorat, University of agriculture, 249 p.

I

40. **Iserin, P. (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales. Paris : Larousse Bourdasse, P335.
41. **ISO 6571 (2008).** Epices, aromates et herbes- détermination de la teneur en huiles essentielles (méthode par hydrodistillation).

J

42. **Jarlier, V., Arnaud, I., Carbonne, A. (2010).** Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Réseau BMR-Raisin. Résultats. Disponible sur : <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2012/Surveillance-des-bacteries-multiresistantes-dans-les-etablissements-de-sante-en-France>. (page consultée le 02/04/2019).
43. **Jiménez-Arellanes. (2006).** Thymus vulagris as a potential source of antituberculosis compounds. *Pharmacologyonline.*, 3 :569-574.

K

44. **Kalemba, D., Kunicka, A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10 : 813-829.
45. **Kalemba, D., Kunicka, A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.*, 10(10), 813–829
46. **Kothe, H.W. (2007).** *1000 plantes aromatiques et médicinales*, Paris : Tec & Doc, 13 ,6-10

L

47. **Lahlou, M. (2004).** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils. *phytotherapy research*, 18(6), 435-448.
48. **Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P., Nychas, G. J. E (2001).** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 453-462

49. Lambert, P. A. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv. Drug Deliv.Rev*, 57, 1471-1485.
50. Leclerc, H., Gaillard, J. L., Simonet, M. (1995). *Microbiologie générale : La bactérie et le monde bactérien*. Paris: DOIN, 517p.
51. Legrand, G. (1993). Manuel de préparateur en Pharmacie. Paris : Masson, 89, 65-77.
52. Levy, S. B., Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance, worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med*, 10, 122-129.
53. Li, B., Webster, T. J. (2018). Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant associated orthopedic infections. *Journal of Orthopedic Research®*, 36(1), 22-32. <https://doi.org/10.1002/jor.23656>.
54. Lis-Balchin, M. (2002). Lavender: the genus *Lavandula*. London : Taylor and Francis, 37, 40-44.
55. Lozniewski, A., Rabaud, A., Nancy, C. (2010). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Infections associées aux soins .CCLIN Sud-Est.

M

56. Maiti, S. N., Kamalesh, R. P., Shan, R. (2006). Overcoming Bacterial Resistance: Role of β -Lactamase Inhibitors. *Topics in Heterocyclic Chemistry*, 2, 207-246.
57. Markham, P. N., Neyfakh, A. A. (2001). Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol*, 4, 509-514.
58. Martini, M. C., Seiller, M. (1999). *Actifs et additifs en cosmétologie*, Paris : Tec & Doc, 53,21-102
59. Mebarki, N., (2010). Extraction de l'huile essentielle de thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse – antimicrobienne, mémoire de magister, industrie pharmaceutique, université de boumerdes, 16p.
60. Meyer-Warnod, B. (1984). Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils. *Perfumer & Flavorist*, 9, 93-103.
61. Mutai, C., Bii, C., Vagias, C, Roussis, V. (2009). Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *J Ethnopharmacol*, 123(1), 143-8

N

- 62. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (1999).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test, 9th International Supplement.M100-S9, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 63. Normak, H. B., Normak, S. (2002).** Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Me*, 252, 91-106.
- 64. Ouwehand, A. C., Tiihonen, K., Kettunen, H., Peuranen, S., Schulze, H., Rautonen, N., (2010).** In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. *Vet. Med. Praha*, 55, 71-78.

P

- 65. Pan, S. Y., Zhou, S. F., Gao, S. H., Yu, Z. L., Zhang, S. F., Tang, M. K., Sun, J. N., Ma, D. L., Han, Y. F., Fong, W. F., Ko, K. M. (2013).** New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines CAMS outstanding contribution to modern therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 13, 1-25.
- 66. Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., Roura, S. I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.47.

G

- 67. Quezel, P. S., Santa, S. (1963).** Nouvelle Flore de L'Algérie et Des Régions Désertiques Méridionale. Centre national de la recherche scientifique. Paris : *Lavoisier*, 16,87-88.

R

- 68. Radulovic, N., Dekic, M., Radic, Z. S., Palic, R. (2011).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Geranium columbinum* L. and *G. lucidum* L. (Geraniaceae). *Turk J Chem*, 35: 499 – 512.
- 69. Richard, F. (1992).** *Manuel des corps gras*, Paris : *Lavoisier*, Tec& Doc., 1228 :-65 69.
- 70. Rodriguez-Villalobos, H., Struelens, M. J. (2006).** Extended spectrum β -lactamases mediated bacterial resistance: Implications for the intensivist. *Réanimation*, 15, 205-213.

- 71. Roux, D., Catier, O. (2007).** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie, France: *Wolters Kluwe*, 146 :32-34.

S

- 72. Schauenberg, P., Paris, F. (2010).** Guide des plantes médicinales : Analyse, description et Utilisation de 400 plantes. *Delachaux et Niestlé*, 396,98-99.
- 73. Smallfield, B. (2001).** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop et Food Research*, 45, 1-4.
- 74. Soto-Mendivil, E. A., Morenno-Rodríguez, J. F., Estarrón-Espinoza, M., García Fajardorj, A., Obledo-Vázquez, N. (2006).** Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *thymus vulgaris* against *alternaria citri*-E-Gnosis.P98

T

- 75. Tan, Y. T., Darren, J. (2000).** Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Mol. Med. Today*, 6, 309-314.
- 76. Ultee, A., Bennik, M. H., 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

V

- 77. Valnet, J. N. (2000).** Aromathérapie. Maloine S. A. alteration of *saccharomyces cerevisiae*. *Phytother. Res.* 19(5), 405-8.

W

- 78. Wright, G. D. (2005).** Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 1451-1470.

Annexes

Annexes

Annexe 01. Composition des milieux de culture utilisés

Milieux solides

Gélose nutritive (Parodonsia, Conda S. A, Espagne)

Formule en gramme par litre d'eau distillée

Peptone de gélatine.....	05
Extrait de viande	03
Extrait de levure.....	03
Chlorure de sodium	05
Agar	18
pH= 7.3	

Gélose Chapman (Parodonsia, Conda S. A, Espagne)

Formule en gramme par litre d'eau distillée

Peptone.....	10
Extrait de viande	01
Mannitol	10
Chlorure de sodium	75
Rouge de phénol.....	0.025
Agar	15
pH= 7.3	

Gélose Hektoen (Parodonsia, Conda S. A, Espagne)

Formule en gramme par litre d'eau distillée

Protéose-peptone	12,0
Extrait de levure :	3,0
Lactose :	12,0
Saccharose :	12,0
Salicine :	2,0
Citrate de fer III et d'ammonium	1,5
Sels biliaries :	9,0
Fuchsine acide	0,1
Bleu de bromothymol :	0,065
Chlorure de sodium :	5,0
Thiosulfate de sodium :	5,0
Agar	14,0
pH = 7,6	

Annexes

Gélose Müeller –Hinton (Parodonsia, Conda S. A, Espagne)

Formule en gramme par litre d'eau distillée

Infusion de viande de bœuf	2,00
Hydrolysate de caséine	17,5
Amidon	1.50
Agar	17.0

pH 7.4 ± 0.2.

Milieus liquides

Bouillon Mueller-Hinton (Parodonsia, Conda S. A, Espagne)

Infusion de viande bovine	02.0
Hydrolysate acide de caséine	17.5
Amidon soluble... ..	1.5

pH= 7,4± 0,2.

Annexes

Annexe 02. Coloration de Gram. (Singleton et Sainsbury, 1994)

1. Préparer un frottis bactérien en transférant un petit fragment d'une colonie dans une goutte d'eau déposée préalablement sur une lame de verre propre.
2. Disperser la colonie dans l'eau afin d'obtenir une suspension laiteuse.
3. Etaler la suspension sur une surface d'un à deux centimètres carrés.
4. La suspension est ensuite séchée de façon à obtenir le frottis. Ce dernier est fixé en le passant rapidement une ou deux fois dans la flamme du bec bunsen.
5. Recouvrir le frottis d'une solution de violet de gentiane pendant une minute.
6. Verser le lugol et laisser agir pendant 1 minute puis rincer à l'eau distillée.
7. Décolorer avec l'alcool à 95% en plaçant la lame dans une position oblique puis rincer à l'eau.
8. Recouvrir le frottis avec une solution de fuchsine pendant une minute puis rincer et sécher le frottis.
9. Observation microscopique à immersion (X100) : les bactéries à Gram- apparaissent roses et les bactéries à Gram+ se colorent en violet.

Annexes

Annexe 03. Profils biochimiques des bactéries étudiées sur galerie API 20 E et API Staph



Profil biochimique de *Klebsiella* sp. étudié sur galerie API 20 E



Profil biochimique d'*E. coli* étudié sur galerie API 20 E



Profil biochimique de *S. aureus* étudié sur galerie API Staph



Profil biochimique de *S. xylosus* étudié sur galerie API Staph

Annexes

Annexe 04. Tableau de Lecture de la galerie API 20 E

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/loop.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
ONPG	2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	0.223	β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-β-D-Galactopyranosidase)	colorless	yellow (1)
ADH	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	yellow	red / orange (2)
LDC	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
ODC	L-ornithine	1.9	Ornithine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
[CIT]	trisodium citrate	0.756	CITrate utilization	pale green / yellow	blue-green / blue (3)
H ₂ S	sodium thiosulfate	0.075	H ₂ S production	colorless / greyish	black deposit / thin line
URE	urea	0.76	UREase	yellow	red / orange (2)
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane DeAminase	<u>TDA / Immediate</u>	
				yellow	reddish brown
IND	L-tryptophane	0.19	INDole production	<u>JAMES / Immediate</u>	
				colorless pale green / yellow	pink
[VP]	sodium pyruvate	1.9	acetoin production (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
				colorless	pink / red (5)
[GEL]	Gelatin (bovine origin)	0.6	GELatinase	no diffusion	diffusion of black pigment
GLU	D-glucose	1.9	fermentation / oxidation (GLUcose) (4)	blue / blue-green	yellow / greyish yellow
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation / oxidation (MANnitol) (4)	blue / blue-green	yellow
INO	Inositol	1.9	fermentation / oxidation (INOsitol) (4)	blue / blue-green	yellow
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation / oxidation (SORbitol) (4)	blue / blue-green	yellow
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation / oxidation (RHAmnose) (4)	blue / blue-green	yellow
SAC	D-sucrose	1.9	fermentation / oxidation (SACcharose) (4)	blue / blue-green	yellow
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation / oxidation (MELibiose) (4)	blue / blue-green	yellow
AMY	amygdalin	0.57	fermentation / oxidation (AMYgdalin) (4)	blue / blue-green	yellow
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation / oxidation (ARAbinose) (4)	blue / blue-green	yellow
OX	(see oxidase test package insert)		cytochrome-OXidase	(see oxidase test package insert)	

Annexes

Annexe 05. Tableau de Lecture de la galerie API Staph

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULT	
				NEGATIVE	POSITIVE
0	No substrate		Negative control	red	—
GLU	D-glucose	1.56	(Positive control) (D-GLUcose)	red *	yellow
FRU	D-fructose	1.4	acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	1.4	acidification (D-ManNosE)		
MAL	D-maltose	1.4	acidification (MALtose)		
LAC	D-lactose (bovine origin)	1.4	acidification (LACtose)		
TRE	D-trehalose	1.32	acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1.36	acidification (D-MANnitol)		
XLT	xylitol	1.4	acidification (XyLITol)		
MEL	D-melibiose	1.32	acidification (D-MELibiose)		
NIT	potassium nitrate	0.08	Reduction of NITrates to nitrites		
PAL	β -naphthyl phosphate	0.0244	ALkaline Phosphatase	<u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u> yellow	violet
VP	sodium pyruvate	1.904	Acetyl-methyl-carbinol production (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u> colorless-light pink	violet-pink
RAF	D-raffinose	1.56	acidification (RAFFinose)	red	yellow
XYL	D-xylose	1.4	acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose (sucrose)	1.32	acidification (SACcharose)		
MDG	methyl- α -D- glucopyranoside	1.28	acidification (Methyl- α -D- Glucopyranoside)		
NAG	N-acetyl-glucosamine	1.28	acidification (N-Acetyl-Glucosamine)		
ADH	L-arginine	1.904	Arginine DiHydrolase	yellow	orange-red
URE	urea	0.76	UREase	yellow	red-violet

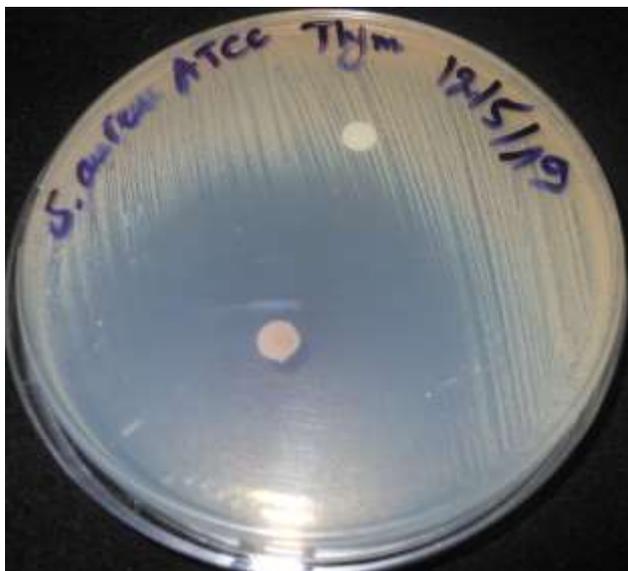
Annexes

Annexe 06. Table de lecture de l'antibiogramme (CASFM, 2018).

Antibiotique	Symbole	Concentration (μg)	Résistant	Intermédiaire	Sensible
Acide nalidixique	NA	30	≤ 13	14-18	≥ 19
Amikacine	AK	30	≤ 14	15-16	≥ 17
Amoxicilline	AX	25	< 14	15-21	≥ 22
Amoxicilline - acide clavulanique	AMC	20	≤ 13	14-17	≥ 18
Ampicilline	AM	10	≤ 11	12-13	≥ 14
Céfoxitime	FOX	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Céftriaxone	CTX	30	≤ 14	15-22	≥ 23
Chloramphénicol	C	30	≤ 12	13-17	≥ 18
Colistine	CT	10	≤ 8	9-10	≥ 11
Erythromicine	E	15	≤ 13	14-17	≥ 18
Gentamicine	CN	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Kanamycine	K	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Ofloxacin	OFX	5	≤ 14	15-21	≥ 22
Oxacilline	OX	5	≤ 10	11-12	≥ 13
Sulfaméthoxazole- Triméthoprime	SXT	25	≤ 10	11-15	≥ 16

Annexes

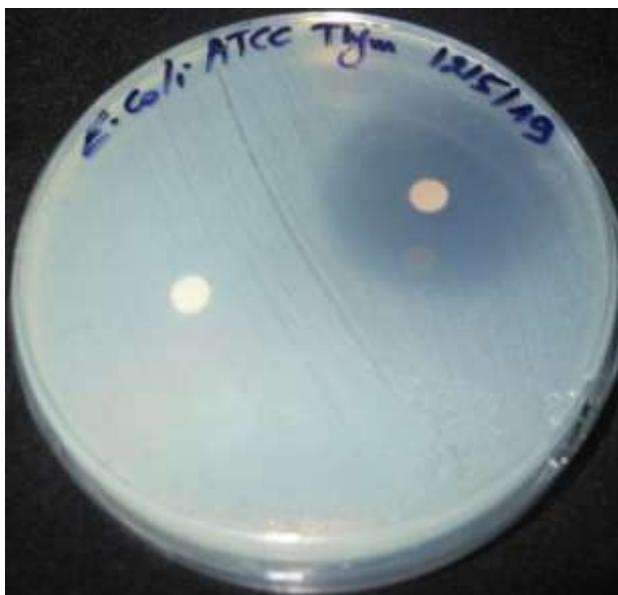
Annexe 06. Effet de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* sur les différentes souches bactériennes étudiées



Effet de l'HE de *T.fontanesii* sur *S.aureus* ATCC 6538



Effet de l'HE de *T.fontanesii* sur l'isolat clinique de *S.aureus*



Effet de l'HE de *T.fontanesii* sur *E.coli* ATCC 25922



Effet de l'HE de *T.fontanesii* sur l'isolat clinique d'*E. coli*

Annexes

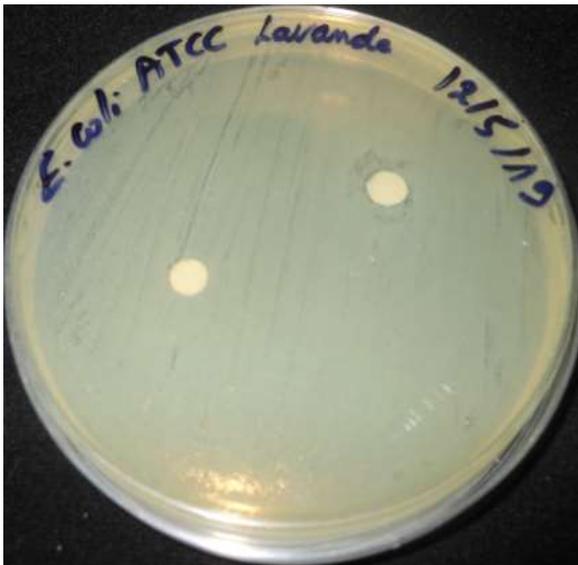
Annexe 07. Effet de l'huile essentielle de *Lavandula* sp. sur les différentes souches bactériennes étudiées



Effet de l'HE de *Lavandula* sp. sur *S. aureus* ATCC 6538



Effet de l'HE de *Lavandula* sp. sur l'isolat clinique de *S. aureus*



Effet de l'HE de *Lavandula* sp. sur *E. coli* ATCC 25922



Effet de l'HE de *Lavandula* sp. sur l'isolat clinique d'*E. coli*

Résumé

L'antibiorésistance constitue actuellement un enjeu de santé publique majeure en raison des difficultés rencontrées pour combattre les bactéries pathogènes multi-résistantes, ce qui a conduit la communauté scientifique à rechercher des solutions alternatives et de profiter des vertus thérapeutiques de certains métabolites secondaires des plantes aromatiques telles que les huiles essentielles.

La présente étude vise à étudier l'effet antibactérien des HEs extraites à partir des feuilles de *Thymus fontanesii* et *Lavandula* sp. vis-à-vis de deux bactéries multirésistantes isolées dans des infections urogénitales (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*). Les rendements en huiles essentielles obtenues par hydrodistillation sont de 2.06% pour *T. fontanesii* et 0.6% pour *Lavandula* sp. Contrairement à l'HE pure de *Lavandula* sp. qui n'a exhibé aucun effet inhibiteur sur les deux souches testées, ces dernières se sont révélées sensibles à l'HE de *Thymus fontanesii*.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) enregistrées pour l'HE de *T. fontanesii* varient entre 0.625 µl/ml pour *S. aureus* et 1.25µl/ ml pour *E. coli*. Les concentrations minimales bactéricides (CMB) enregistrées sont identiques aux CMI (0.625 µl/ml et 1.25µl/ ml pour *S. aureus* et *E. coli*, respectivement), ce qui reflète une activité bactéricide de l'HE de *T. fontanesii* vis-à-vis de ces deux bactéries multirésistantes.

Mots clés : *Thymus fontanesii*, *Lavandula* sp., HE, activité antibactérienne, bactéries multirésistantes.

Abstract

Antimicrobial resistance is a major public health of great concern because of the difficulties encountered in treating multi-resistant pathogenic bacteria, which has led the scientific community to find alternative solutions and to take advantage of the therapeutic virtues of certain secondary metabolites of aromatic plants such as essential oils.

The present study aims to investigate the antibacterial effect of EO extracted from leaves of *Thymus fontanesii* and *Lavandula* sp. against two multidrug-resistant bacteria isolated from urogenital infections (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*).

The yields of essential oils obtained by hydrodistillation are 2.06% for *T. fontanesii* and 0.6% for *Lavandula* sp. In this study, *Lavandula* sp. essential oil didn't show any inhibitory effect on the two strains tested while *T. fontanesii* showed a strong inhibitory effect against the same strains.

The minimum inhibitory concentrations (MICs) recorded for *T. fontanesii* EO vary between 0.625 µl / ml for *S. aureus* and 1.25 µl / ml for *E. coli*. The bactericidal minimal concentrations (MBC) recorded are identical to the MICs values (0.625 µl / ml and 1.25 µl / ml for *S. aureus* and *E. coli*, respectively), which reflects a bactericidal activity of *T. fontanesii* on these two multiresistant bacteria.

Key words: *Thymus fontanesii*, *Lavandula* sp., EO, antibacterial activity, multidrug-resistant bacteria.

ملخص

تعد مقاومة المضادات الحيوية من أهم المخاطر التي تهدد صحة الإنسان بسبب الصعوبات التي تواجه مكافحة البكتيريا الضارة وهذا ما دفع بالمجتمع العلمي إلى البحث عن مواد طبيعية بديلة تعتمد أساساً على استخدام المستقلبات الثانوية للنباتات العطرية مثل الزيوت الأساسية.

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم القدرة المضادة للبكتيريا لزيوتين عطريتين تم استخلاصهما عن طريق التمييع المائي من أوراق نبتتين عطريتين هما *Thymus fontanesii* و *Lavandula* sp. ضد اثنتين من البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية المعزولة من التهابات الجهاز البولي والتناسلي (*Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*)

بلغ مردود استخلاص الزيوت الطيارة قيمة 2,06% بالنسبة لـ *T. fontanesii* و 0.6% بالنسبة لـ *Lavandula* sp. عكس الزيت الطيارة لـ *Lavandula* sp. التي لم تظهر أي تأثير مثبط على السلالتين المختبريتين، أثبتت لزيت الطيارة لـ *Thymus fontanesii* فعالية كبيرة ضد البكتيريا التي تم اختبار حساسيتها. يتراوح الحد الأدنى للتراكيز المثبطة (MIC) المسجلة للزيت الأساسي *Thymus fontanesii* بين 0.625 ميكرو لتر / مل ضد *S. aureus* و 1.25 ميكرو لتر / مل ضد *E. coli*، كما بلغت التراكيز الدنيا القاتلة للبكتيريا (MCB) نفس النسب 0.625 ميكرو لتر / مل و 2.5 ميكرو لتر / مل

كلمات المفتاحية : الزيوت الطيارة، *Thymus fontanesii*, *Lavandula* sp.، البكتيريا متعددة المقاومة للمضادات الحيوية.