

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE

Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme du
Docteur vétérinaire

Sous thème :

**L'activité antibactérienne des huiles essentielles
de Syziguin Aromaticum et Mentha Spicata contre trois souches
E.coli responsables des diarrhées néonatales du veau**

Présenté par :

*-TOUATI HAYAT
*-CHHAIRI OUISSEM

Encadré par :

Dr SELLES
MOHAMMED

Année universitaire
2014/2015

Dédicace I HAYAT

Je dédie ce travail à mes parents (DENJA et KOUJDER) qui je les aime beaucoup et je leur dis qu'aucune chose dans ce monde je fais pour vous, ne rend le quart du quart de ce que vous faites pour moi.

A mes sœurs : Khadidja et son petit fils ABDELRAH, Souad, Iman, Fazia, Ismahan, Safia, Djamila, Fatima, Khaldia, Ikram.

A mes deuxièmes parents : MISSOUM et KHEIRA.

A mes frères : Mohamed et Abdelkader.

A mes oncles : Karim, Arbi, Djilai et Rafik.

A ce que je le nomme mon fils BJLAL

A mes chères amies qu'on était ensemble à tous les moments : Halima, Ouissem, Hanan et Kheira.

A notre encadreur qui nous aide beaucoup dans ce travail, je lui remercie pour sa patience et son sérieux Mr Dr SELLES MOHAMMED.

A tous ce qui me connaître de près ou de loin.

Dédicace I OUISSSEM

Tous d'abord, nous remercions le Dieu notre créateur de nous avoir donné les forces, la volonté afin d'accomplir ce travail modeste.

Je dédie ce travail à mes chers et respectueux parents pour tous l'amour dont vous m'avez entourés, pour tous ce que vous avez fait pour moi et que dieu leur préserve une longue vie et bonne santé afin que je puisse à mon tour vous combler.

A mon cher frère MOHAMMED, vraiment aucun dédit n'exprime assez profondément mon attachement, mon affection, je vous dirais tous simplement un grand merci. Et aussi à sa femme Houaria.

A mon cher frère Ali qui vit loin de nos yeux mais près de notre cœur.

A mon cher frère Khaled, je te souhaite un avenir plein de joie et de réussite.

A ma sœur Khadidja et sa petite famille.

A ma chère sœur Rachida qui n'a pas cesse de m'encourager et de prier pour moi.

A mon ange gardien et ma fidèle accompagnante dans tous les moments de ma vie : ma proche sœur Sabrina.

Aux anges de la famille : Samir, Fasnim, Walid, Fatima, Khawla, Hala et tous mes neveux et mes nièces.

A mes chères amies : Hayat, Halima, Kheira, Hanan, en souvenir de nos éclats de rire de tous ce qu'on a vécu ensemble, j'espère que notre amitié durera éternellement.

A notre mètre et encadreur : SELLES MOHAMMED, je vous remercie pour votre estimable participation dans l'élaboration de ce travail.

A tous ce qui m'ont enseigné au long de ma vie scolaire et universitaire.

A tous les membres de ma famille et toutes les personnes que j'aime et qui m'aiment.

Sommaire

Pages

1. Introduction.....	7.
----------------------	----

Première partie : Etude bibliographique

Chapitre I : les huiles essentielles

1. Définition.....	10.
2. Extraction des huiles essentielles.....	11.
3. Méthodes d'extraction.....	12.
3.1. Distillation.....	12.
3.1.1. Hydro distillation.....	12.
3.1.2. Distillation par entrainement à la vapeur d'eau.....	12.
3.2. Hydro diffusion.....	13.
3.3. Extraction à froid.....	13.
3.4. Extraction assistée par micro ondes.....	13.
3.5. Extraction par les solvants et les graisses.....	13.
3.6. Extraction par fluides supercritiques.....	14.
4. Composition chimique des huiles essentielles.....	14.
5. Caractéristiques et propriétés physiques.....	15.
6. Emploi et propriétés pharmacologiques.....	16.
7. Toxicité des huiles essentielles.....	17.
8. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne.....	18.
8.1. Méthode de diffusion en puits.....	19.
8.2. Méthode de dilution.....	19.
8.3. Méthode de micro atmosphère.....	19.

Chapitre II : l'antibiorésistance

1. Définition de la résistance bactérienne aux antibiotiques.....	21.
1.1. Définition microbiologique.....	21.
1.2. Définition clinique.....	21.
2. Origine de l'antibiorésistance.....	21.
2.1. La résistance naturelle.....	22.
2.2. La résistance acquise.....	22.
2.2.1. L'acquisition verticale.....	22.
2.2.2. L'acquisition horizontale.....	22.
2.2.2.1. La transformation.....	22.
2.2.2.2. La transduction.....	22.
2.2.2.3. La conjugaison.....	22.
3. Types de mécanisme de l'antibiorésistance.....	24.
3.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique.....	25.
3.2. Modification ou remplacement des cibles des antibiotiques.....	26.
3.3. Pompe à efflux.....	26.
3.4. Protection de la cible de l'antibiotique.....	27.
3.5. Piégeage de l'antibiotique.....	27.

Deuxième partie : Etude expérimentale

1. Matériel.....	29.
2. Extraction de l'huile essentielle par hydro distillation.....	29.
2.1. Mode opératoire.....	29.
2.2. Traitement de l'extrait.....	30.
3. Etude de l'activité antibactérienne.....	30.
3.1. Les souches bactériennes.....	30.
3.2. Préparation de l'inoculum.....	30.
3.3. Antibiogramme.....	31.

4. Test du pouvoir antimicrobien des HE.....	32.
4.1. Test préliminaire in vivo.....	32.
4.2. Principe de la méthode.....	32.
4.3. Protocole expérimental.....	32.
4.4. Dépôt de disque.....	33.
4.5. Lecture.....	33.
5. Détermination de la CMI.....	33.

Résultats

1. Rendement.....	36.
Tableau.....	37.
2. photos et Aromatogramme.....	38.
3. Tableau 3.....	39.
Photos appartenant au travail.....	40.
4. Concentration de la CMI.....	41.

Discussion :

1. Rendement, antibiorésistance et aromatogramme.....	43.
2. Activité antibactérienne.....	44.

Conclusion.....	46.
-----------------	-----

Résumé.....	48.
-------------	-----

Références

Introduction :

Les bactéries résistantes aux antibiotiques constituent un sérieux problème pour la santé publique. Cette résistance est considérée non seulement comme étant un problème majeur dans les hôpitaux, mais aussi elle est constatée dans les différents groupes de la communauté, tels que les éleveurs des bovins (Kwakman et al., 2011).

L'un des problèmes critiques face à la médecine moderne est l'émergence de nombreuses souches de bactéries résistantes aux antibiotiques (Wang et al., 2012). Le problème de la résistance aux médicaments ne se limite pas à des bactéries pathogènes, mais il implique aussi la flore bactérienne commensale, qui peut devenir un important réservoir de souches résistantes (Erb et al., 2007).

Toutefois, le traitement des entérites causées par *E. coli* est basé sur l'administration des antimicrobiens par voie orale et/ou par voie générale. La connaissance de la sensibilité est nécessaire pour l'élaboration de directives sur l'utilisation prudente des antimicrobiens (de Verdier et al., 2012).

Akam et al (2007) en Algérie rapporté la résistance de *E. coli* F5 + à la tétracycline, ticarcilline, ampicilline. Alors que De Verdier et al (2012) en Suède a montré que 61% des *E. coli* testés pour la sensibilité aux antimicrobiens sont résistants à un ou plusieurs substances et 28% sont multi-résistants.

Les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêts comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet de multiples études pour leur éventuelle utilisation comme alternative dans le traitement des maladies infectieuses.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antimicrobienne de deux huiles essentielles à savoir *Mentha spicata* et *Syzygium aromaticum* sur trois souches *E.coli* responsables des diarrhées néonatales du veau.

Première partie

Etude bibliographique

Chapitre 1

Les huiles essentielles

Les huiles essentielles :**1. Définition :**

En complément aux constituants de base de la plante (minéraux, glucides, lipides et protides) ; il existe de nombreuses autres substances, dont certaines interviennent directement dans le métabolisme de la plante et contribuent à donner à chaque individu son caractère spécifique. Ainsi, les huiles essentielles (essences volatiles) et les résines (gouttelettes colloïdales), qui sont en réalité des produits résiduels ou produits d'excrétion, s'expriment par une odeur ou un arôme et donne à la plante son cachet particulier.

Les huiles essentielles, essences ou huiles volatiles sont : « des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation; Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits (Burt, 2004), mais également à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres. Pour extraire ces principes volatils, il existe des procédés. Deux seulement sont utilisables pour la préparation des essences officinales : celui par distillation dans la vapeur d'eau de plantes à essence ou de certains de leurs organes ; et celui par expression » ; le second procédé est recommandé pour obtenir les essences de fruits du genre citrus d'après la pharmacopée française 1965, 8ème édition. Depuis la 9ème édition 1972, la pharmacopée n'utilise plus que le terme : huiles essentielles. Le terme « essence » est utilisé pour désigner des produits odorants qui ne préexistent pas dans le végétal mais qui résultent, après l'altération des tissus, de la dégradation enzymatique d'un substrat, comme le cas des moutardes et des alliums.

Plus récemment, la norme AFNOR NFT75-006 (février 1998) a donné la définition suivante d'une huile essentielle : « produit obtenu à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention ; elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (par exemple : redistillation ; aération...

En plus des huiles essentielles naturelles il y a des huiles essentielles ou synthétiques. Les initiations sont parfois comme odeur mais les corps composants sont habituellement fort différents du produit naturel végétal. Leur emploi est souvent destiné à la parfumerie, à la droguerie, à l'industrie, mais rarement à la thérapeutique, qui pour usage interne ou externe, n'est pratiquement faite qu'avec des essences extraites des végétaux.

2. Extraction des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont obtenues des épices, herbes aromatiques, fruits ou fleurs. Elles s'extraient par distillation (hydro-distillation simple ou distillation à vapeur saturée), pression, fleurage ou au moyen d'un solvant, selon la partie utilisée et la fragilité de l'huile. La méthode pratiquée est très importante pour rapporter une huile essentielle capable de produire la saveur et l'odeur de la plante la plus naturelle, avec un changement chimique minimal des composés présents dans l'huile obtenue. Il y a aussi d'autres procédés plus développés : hydro-distillation par micro-ondes sous vide et hydro-diffusion. Mais la composition des huiles essentielles est qualitativement différente de celles obtenues par les procédés classiques.

La méthode la plus commune est la distillation, qui est employée pour les plantes les moins sensibles à la chaleur, comme la lavande, ainsi qu'avec la plupart des feuilles, des graines et des bois.

L'enfleurage, ou un corps gras absorbe le parfum, est pratiqué pour les pétales fragiles, comme ceux du jasmin. Cette dernière technique n'est qu'un cas particulier de l'extraction par un solvant (le solvant ici, soit des huiles soit des graisses). Ce procédé met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. L'extraction se fait par diffusion à froid vers le corps gras, alors que l'enfleurage à chaud ou « digestion » se pratique à chaud par immersion des organes végétaux dans le corps gras fondu. Mais les procédés utilisés pour l'obtention des huiles essentielles peuvent influencer sur la composition de ces dernières. Dans le cas de l'hydro-distillation qui est la méthode la plus utilisée, la composition du produit obtenu, le plus souvent, est différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Cela est dû à la labilité des constituants des huiles essentielles. Au cours de l'hydro-distillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent

induire l'hydrolyse des esters-par exemple- mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations...etc.

Il est à mentionner que d'autres facteurs comme le climat, le sol et les conditions de croissance influent sur la qualité et la concentration des composés dans les huiles essentielles, et par conséquent leurs pouvoirs thérapeutiques.

3. Méthodes d'extraction :

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général, le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (par exemple : flavonoïdes, les HE, les tanins), le rendement en huiles et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées.

3.1. Distillation :

Selon PIOCHON (2008) ; il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydro-distillation, l'hydro-diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

3.1.1. Hydro-distillation :

Il s'agit de la méthode la plus simple ; il semble donc que cette technique soit très ancienne. Son principe est porté à ébullition un mélange eau+végétal : les cellules de végétal éclatent et libèrent alors les espèces chimiques odorantes qui (non solubles dans l'eau) sont entraînées par la vapeur d'eau puis récupérées dans un autre récipient après condensation dans le réfrigérant.

L'hydro-distillat obtenu contient une phase aqueuse ainsi qu'une phase organique constituée par l'huile essentielle. Lorsque les densités de ces deux phases sont proches, on peut observer une émulsion. Cependant, l'hydro-distillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et très puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (LUCCHESI ; 2005).

3.1.2. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau :

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'HE en minimisant les altérations hydrolytiques.

3.2. Hydro-diffusion :

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas, et à pression réduite la vapeur d'eau au travers la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc, moins dommageable pour les composés volatils.

3.3. Extraction à froid :

Elle constitue le plus simple des procédés, mais n'applique qu'aux agrumes dans l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches à fin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (ROUX, 2008).

3.4. Extraction assistée par micro-ondes :

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui a été présentée pour la première fois par GANZLER et qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont en suite récupérés à l'aide des procédés classiques : condensation, refroidissement et décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain du temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvants, et un rendement d'extraction élevé (HEMMWIMON et al, 2007).

3.5. Extraction par les solvants et les graisses :

Il s'agit d'extrait de plantes obtenu au moyen de solvant non aqueux (hexane, éther de pétrole etc.), mais aussi de graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par les corps gras). Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également un bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras. Un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé « absolu » et sa composition se rapproche de celle d'une HE. L'extraction à l'aide des solvants organiques pose de problème de toxicité et de solvant résiduel (HERNANDEZ-OCHPA, 2005).

3.6. Extraction par fluides supercritiques :

Extraction par fluides supercritiques a pris ces dernières années, beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. REVERCHON et De MARCO ont montré que le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides perdant le processus d'extraction. En outre, tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps de l'extraction y'est réduit. Toutefois, cette technique d'extraction présente un inconvénient la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique qui est le solvant d'extraction le plus employé. Au-delà du point critique ($P=73,8$ bars, $T^{\circ}=31,1^{\circ}\text{C}$), le CO_2 possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (PIOCHON, 2008).

4. Composition chimique d'une huile essentielle :

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents et éminemment de variables constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe de

terpénoïde (les plus volatils c'est-à-dire à masse moléculaire peu élevée), spécialement mono terpènes : (C10) cinéol, menthol...qui constituent parfois plus de 90°/° de l'huile essentielle, et sesquiterpènes : (C15) caryophyllène, humulène...Exceptionnellement des diterpènes (C20) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles. Le groupe des composés aromatiques : des dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquent, comme le safrol, l'apiol, l'anisaldéhyde, l'eugéol, la vanille et le cinnamaldéhyde. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (qui contribuent souvent aux arômes des fruits) (COWAN MM (1999) *Plants products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews*).

Il peut exister aussi, une variété d'hydrocarbures aliphatiques à faible poids moléculaire (linéaire, ramifié, saturé et non saturé), acides, alcools, aldéhydes, esters ou lactones acycliques et exceptionnellement des composants contenant de l'azote, du soufre ou des coumarines, et de quelques autres, dont certains indéfinis, tous en proportions variées en fonction de chaque essence, et ne contiennent ni acides gras, ni vitamines, ni sels minéraux.

Les dérivés phénylpropanoïques et les terpénoïdes sont associés en nombre et en proportions très variables de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont biosynthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs où ils forment l'essence naturelle. Enfin, il existe un nombre non négligeable de composés volatils issus de la dégradation, de terpènes non volatils (c'est le cas par exemple des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petites odorantes, comme par exemple le (3Z)-hexén-1-ol ou le décanal, qui sont obtenues à partir des acides linoléique et α -linoléiques) (MEBARKI NOUDJOUR, thèse magister, 2010).

L'étude chimique des huiles essentielles est compliquée par la difficulté d'obtenir ces produits purs du mélange complexe dans lequel ils sont présents et les réarrangements qu'ils peuvent subir. Il faut savoir que les huiles essentielles, qui sont obtenues à partir des épices et aromates par entraînement à la vapeur d'eau, contiennent les produits volatils constitutifs de l'arôme, mais non ceux responsables de la sapidité, en particulier saveur piquante ou chaude, qui ne sont pas entraînés par la vapeur. Par contre, les oléorésines, extraites par les solvants organiques, contiennent la totalité des produits aromatiques et sapides (BENZEGGOUTA NAIROUZ, thèse de magister, 2004/2005).

5. Caractéristiques et propriétés physiques :

On trouve généralement les HE incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire. Toutes les HE sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HE de cannelle, de girofle et de saffras.

Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation (BRUMNES L (1998) Les plantes aromatiques et médicinales. Bordas Editions).

6. Emploi et propriétés pharmacologiques :

L'intérêt pour les huiles essentielles s'est accru, et la demande est de plus en plus forte tant pour l'enseignement de l'aromathérapie que pour les traitements. Beaucoup d'autres elles sont utilisées pour assaisonner et aromatiser les aliments. Elles ont aussi une grande importance économique comme saveurs, parfums et solvants, il est fabriqué aussi des désodorisants, de l'encens et des produits pour le bain. L'emploi des huiles essentielles est en particulier dans le domaine des antiseptiques externes, mais peuvent être destinées à l'aromatisation des médicaments administrés par voie orale. Elles constituent aussi le support d'une pratique de soins particuliers : l'aromathérapie. De même qu'elles sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme conservateurs, et dans l'industrie chimique (BRUNETON J (1999), pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentations de Lavoisier).

Sachant que les essences n'ont pas les mêmes composants que les plantes dont elles sont issues, elles ne peuvent donc pas avoir les mêmes actions ni être employées à leur place. Par exemple, la feuille d'eucalyptus, en infusion exerce un effet favorable certain chez les diabétiques, alors que l'essence de cette plante est absolument sans effet antidiabétique. Mais cette dernière est plus assainissante de l'atmosphère dans certains cas, que les vapeurs de décoction des feuilles.

Cependant plusieurs activités sont attribuées aux huiles essentielles : cholérétique, cicatrisante, neurosédative, spasmolytique, digestive, stomachique, antimicrobien, anti-

inflammatoire, désinfectante du système respiratoire, anti-oxydante, acidifiante, tonocardiaque, oxydante des déchets du métabolisme, fluidifiante du sang, anti vermineuse, antispasmodique, pour la conservation tissulaire (ebaumement vivant), pouvoir de protéolyse rapide, sédation épidermique locale, revitalisation par oxygénation et défloculation du sang. Ce sont les terpènes, parmi les constituants chimiques qui sont responsables de ces vertus et par conséquent, usages médicaux des plantes aromatiques et médicinales. La propriété la plus importante des huiles essentielles est l'osmose facile au travers des tissus et leur élimination complète et rapide (LOZA-TAVERA HERMINIA (1999), Monoterpenes in essential oils : biosynthesis and properties).

Les qualités des plantes aromatiques et médicinales et de leurs extraits ont été reconnues depuis l'antiquité, tandis que les essais pour caractériser ces propriétés en laboratoire datent de 1900. L'utilisation alors des huiles essentielles comme agents antimicrobiens a été décrite qualitativement, initiée par le coefficient phénol de plusieurs huiles essentielles par Martindale 1910.

Le pouvoir antiseptique des huiles essentielles, s'exerce à l'encontre de bactéries pathogènes variées, y compris de souches habituellement antibiorésistantes. Certaines huiles sont également actives sur des champignons responsables de mycoses et sur des levures (par exemple candida), et d'autres micro-organismes. Les huiles essentielles les plus antiseptiques, sont celles de : la cannelle, le thym, le girofle, la lavande et l'eucalyptus.

En employant les essences sous forme de parfums, par la respiration directe ou en évaporation dans la vapeur d'eau, il est possible d'agir sur certains centres nerveux (hypothalamus) en vue d'obtenir des actions psychophysiologiques, il s'agit alors d'olfactothérapie ou usage olfactif. Ces substances merveilleuses peuvent éveiller, rafraîchir ou calmer l'esprit et le corps, relâcher les muscles et embellir la peau. Le mécanisme d'action des terpènes n'est pas complètement compris, mais il est spéculé qu'ils entraînent la rupture des membranes par les composants lipophiles (BENZEGGOUTA NAIROUZ, thèse de magister, 20042005).

7. Toxicité des huiles essentielles :

Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe, en ignorant que certaines sont plus rapidement dangereuses que les autres : absinthe, armoise, chénopode, sauge officinale, hysope, tanaïsie, aneth... . D'autres sont à éviter durant la gestation, ou interdites aux individus souffrant d'épilepsie, d'hypertension ou d'affections dermatologiques (BERNADET M (2000), *Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles*, Edition Dangles).

Cet aspect de la connaissance des huiles essentielles est d'autant plus important que le développement de pratiques telles que l'aromathérapie et autres conduisent à une utilisation souvent abusive. L'automédication est dangereuse, souvent favorisée par le fait que bon nombre de ces produits sont distribués en dehors du secteur pharmaceutique. En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible : une DL50 comprise entre 2 et 5g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées : anis, eucalyptus, girofle... ou le plus fréquemment supérieure à 5g/kg (camomille, citronnelle, 'inhide, majolaine, vétiver). D'autres ont une DL50 inférieure à 1g/kg : l'huile essentielle de baldo (0,13g/kg, convulsions apparaissent dès 0,07g/kg) ; l'essence de moutarde (0,34g/kg) ; l'origan et la sarriette (1,37g/kg) ; le basilic, l'estragon et l'hysope (1,5ml/kg) (BREMNES L (1998), *Les plantes aromatiques et médicinales*. Bordas Editions).

Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue. Reste à savoir que dans leur emploi externe, les risques de toxicité sont fortement réduits. Les huiles essentielles peuvent provoquer : agitation, tremblement généralisé, coma, hématurie, néphrite aiguë, ivresse, congestion cérébrale et pulmonaire, dépression du tonus sympathique, spasme musculaire. Dans certains cas la neurotoxicité de quelques huiles peut nécessiter l'hospitalisation (BRENETON J (1999) *pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Techniques et Documentations de Lavoisier).

En ce qui concerne leur cancérogénicité, il faut noter la présence de constituants « allyl et propénylphénol » de certaines huiles qui sont capables d'induire l'apparition de cancers. Mais actuellement, l'apiol, le dillapiol, l'eugénol et la myristicine ne sont pas considérés

comme cancérogènes. Ainsi le cinnamaldéhyde n'induit pas l'apparition de tumeurs, dans certaines conditions (BENZEGGOUTA NAIROUZ, thèse de magister, 2004/2005).

8. Méthode de détermination de l'activité antibactérienne :

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des HE. Le choix de la méthode est conditionné par l'insolubilité des HE dans les milieux, leur volatilité et la nécessité de la tester à de faibles concentrations.

8.1. Méthode de diffusion en puits :

Méthode proposée par COOPER & WOODMAN en 1946 et, reprise par SHROEDER et MESSING en 1949. Elle assure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'HE de concentration connue. L'HE diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée par la solution bactérienne.

8.2. Méthode de dilution :

Les HE à tester peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de micro-organismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture. La lecture peut être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (ROBERT DEMUET, 1995).

8.3. Méthode de micro-atmosphère :

Cette technique consiste à cultiver les micro-organismes à tester dans des boîtes de pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'HE qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de pétri, renversé après fixation de l'HE sur le disque. Celui-ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les micro-organismes testés (PIBIRI, 2005).

Chapitre II

L'antibiorésistance

1- Définition de la résistance bactérienne aux antibiotiques :

La résistance aux antimicrobiens est un terme tout à fait relatif. En effet, il existe un grand nombre de définitions pour l'expression « résistance bactérienne aux antibiotiques », qui sont basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques) et qui ne se recoupent pas forcément. Les définitions les plus fréquemment employées se fondent sur les critères microbiologiques (résistance *in vitro*) et sur les critères cliniques (résistance *in vivo*) (Muylaert et Mainil, 2012).

1-1 Définition microbiologique : une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle dispose d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la concentration minimale inhibitrice (Bonnet, 2014). Autrement ; une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées (Muylaert et Mainil, 2012).

1-2 Définition clinique : une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à la thérapie antibiotique mise en place (Muylaert et Mainil, 2012 ; Bonnet, 2014).

2- Origine de l'antibiorésistance :

On cite classiquement deux types de résistance : résistance naturelle et la résistance acquise.

2-1 La résistance naturelle :

La résistance naturelle ou intrinsèque correspondant à la capacité de résister à la présence d'un antibiotique pour toutes les souches d'une espèce ou d'un genre bactérien. Habituellement le support de cette résistance est chromosomique (Schwarz et Chaslus-Dancla, 2001).

Ces mécanismes de résistance sont spontanés et assez constants. L'absence ou la réduction de sensibilité à un antibiotique peut être due à (Muylaert et Mainil, 2012) :

- 1- Un manque d'affinité du composé pour la cible bactérienne (par exemple, la faible affinité de l'acide nalidixique pour la gyrase des entérocoques) ;
- 2- Une inaccessibilité de la molécule à la cellule bactérienne (impermeabilité de la membrane externe des bactéries Gram négatives aux glycopeptides comme la vancomycine) ;
- 3- Une expulsion de l'antibiotique par des pompes à efflux chromosomiques (résistance aux tétracyclines, au chloramphénicol et aux quinolones chez *Pseudomonas aeruginosa*, ou encore ;
- 4- Une inactivation enzymatique innée de l'antibiotique (la production d'une bêta-lactamase AmpC chez certains membres de la famille *Enterobacteriaceae*).

2-2 La résistance acquise :

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes (**Guinoiseau, 2010**). C'est une propriété de souche. Cette résistance correspond à la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches de la même espèce (**Schwarz et Chalus-Dancla, 2001**). On décrit deux phénomènes majeurs à la base de l'acquisition de résistances par modifications du génome bactérien, à savoir, les mutations responsables des résistances endogènes, et l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes (**Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Muylaert et Mainil, 2012**).

2-2-1 L'acquisition verticale : Une bactérie peut devenir résistante à un antibiotique par mutation survenant au niveau du gène codant pour la cible de l'antibiotique au sein du chromosome (**Muylaert et Mainil, 2012**). Elle représente 10 à 20% de la résistance clinique rencontrée chez les bactéries isolées en clinique (**Ferron, 1994**).

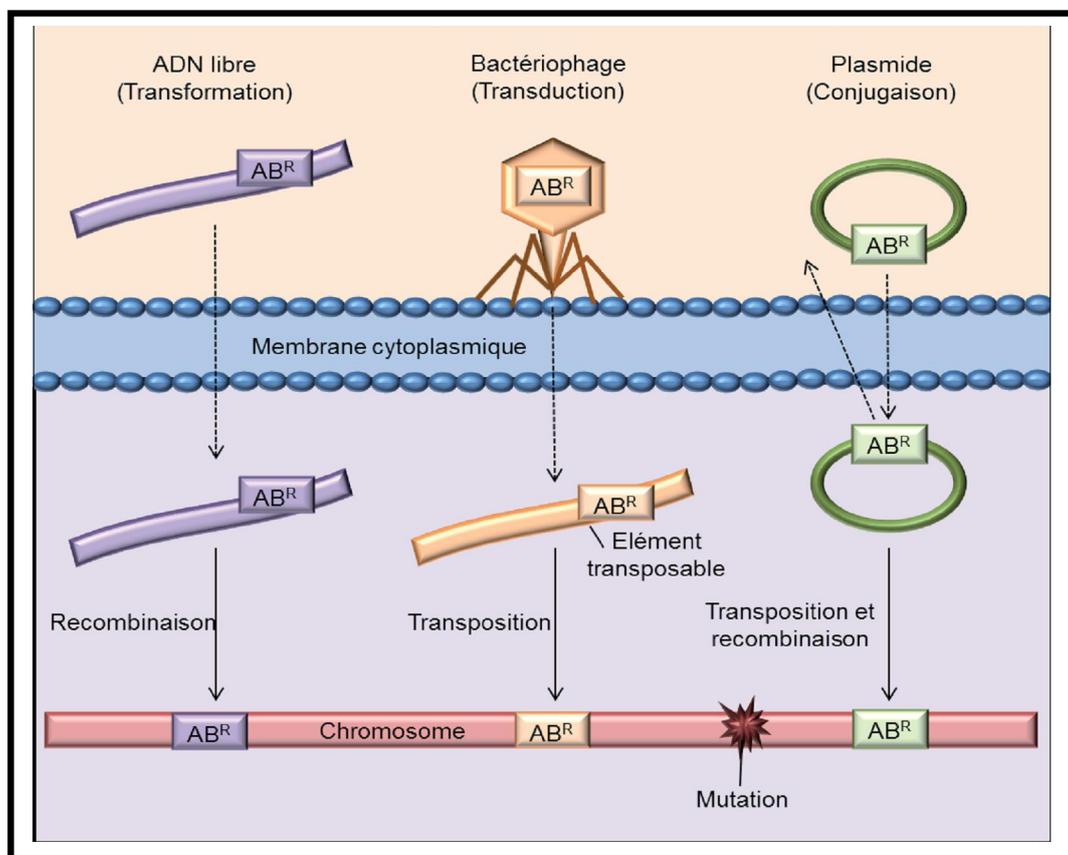
2-2-2 L'acquisition horizontale : est basée sur La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries (**Guinoiseau, 2010**). Elle représente de 80 à 90% des résistances rencontrées chez les bactéries isolées en clinique (**Ferron, 1994**).

2-2-2-1 La transformation : c'est acquisition d'un matériel génétique étranger par incorporation de segments d'ADN libre dans leur chromosome (**Muylaert et Mainil, 2012**).

2-2-2-2 La transduction : c'est le transfert lors d'une infection par un bactériophage ; qui utilise son équipement moléculaire spécialisé ; pour insérer de l'ADN bactérien dans les bactéries receveuses (**Bonnet, 2014**).

2-2-2-3 La conjugaison : est la méthode de transmission la plus fréquente. Ce transfert nécessite un contact physique entre deux bactéries. Un pont cytoplasmique se met alors en place et les bactéries peuvent échanger leur plasmide porteur de résistance (**Ferron, 1994 ; Bonnet, 2014**).

En outre, certaines résistances résultent de l'association d'une mutation et d'un transfert horizontal de gène, comme par exemple les événements conduisant à l'élargissement du spectre des bêta-lactamases ou qui leur confèrent une résistance aux inhibiteurs de bêta-lactamases (**Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Muylaert et Mainil, 2012**).



AB^R : gène de résistance à un antibiotique.

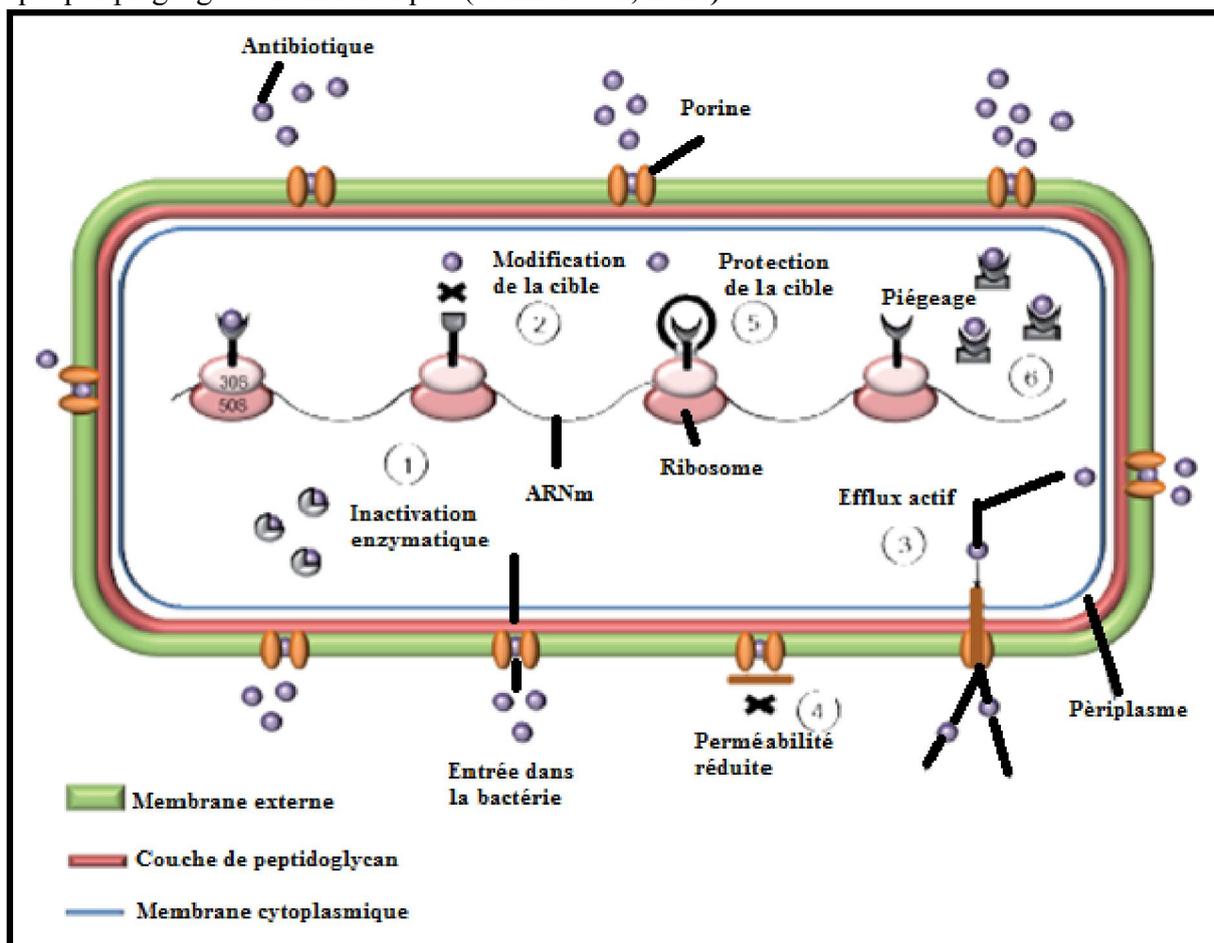
Figure 1: Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques, d'après (**Alekshun et Levy, 2007**).

La dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques peut s'effectuer au sein d'une même espèce mais aussi d'une espèce bactérienne à l'autre. Ainsi, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique de l'opéron *vanA*, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (Noble et al., 1992 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Guinoiseau, 2010).

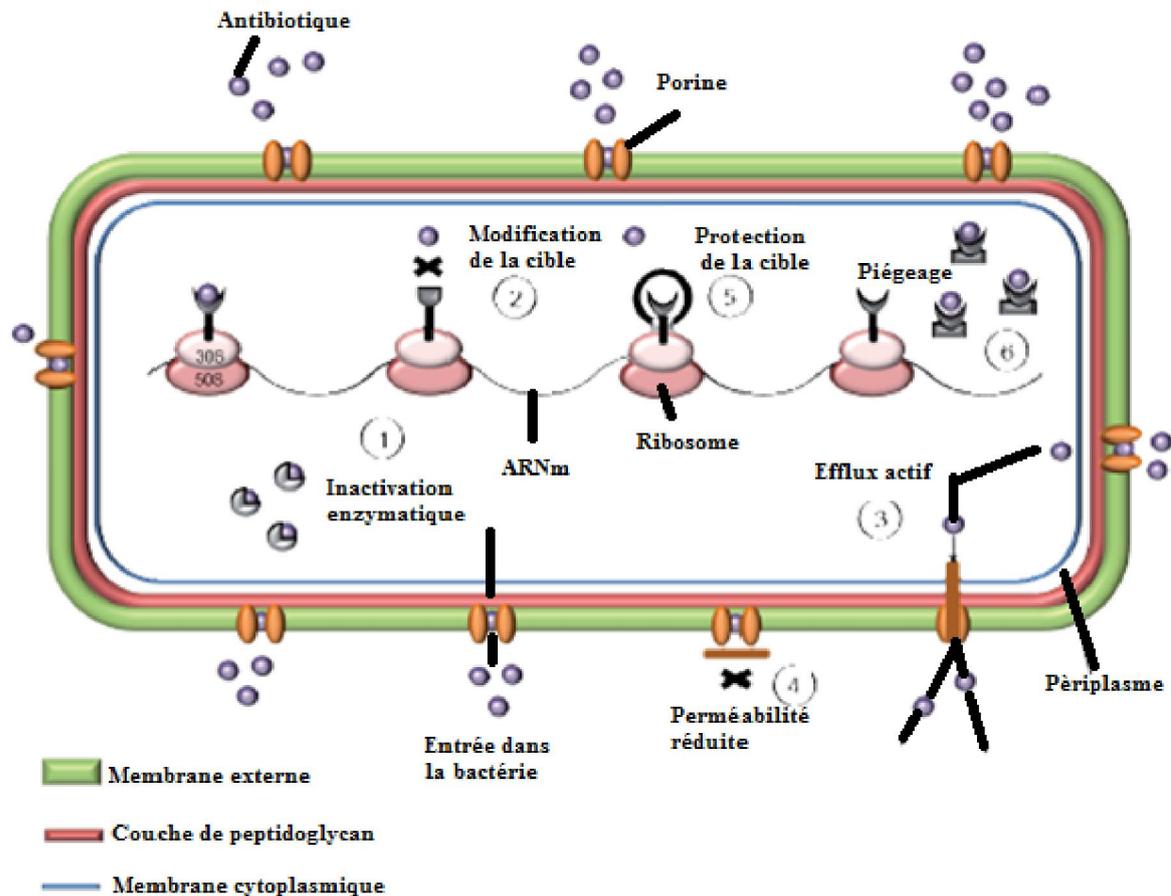
3-Type mécanismes de l'antibiorésistance :

Pour lutter contre l'action des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies. Certaines ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigées contre les mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances (figure.2) (Guinoiseau, 2010 ; Muylaert et Mainil, 2012).

Aux niveaux physiologique et moléculaire, la résistance bactérienne est la résultante de trois phénomènes : la diminution de la concentration intracellulaire en antibiotique par diminution de la perméabilité membranaire et/ou sur-activation de l'efflux bactérien, l'inactivation des antibiotiques par dégradation ou modification enzymatique et l'altération de leurs cibles cellulaires par modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique ainsi que par piégeage de l'antibiotique. (Guinoiseau, 2010).



1 : inactivation enzymatique de l'antibiotique, 2 : modification de la cible de l'antibiotique,



3-1 Inactivation enzymatique de l'antibiotique :

Les bactéries peuvent synthétiser des enzymes capables de détruire ou de modifier les antibiotiques (Wright, 2005 ; Guinoiseau, 2010). Les réactions enzymatiques, conduisant à l'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bêta-lactames, des aminoglycosides et des phénicolés. On décrit également ce type de résistance pour macrolides, lincosamides, streptogramines, les tétracyclines et plus récemment pour les fluoroquinolones, bien que cette inactivation ne représente pas le mécanisme de résistance qui prévaut pour ces molécules. L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité. Parmi les réactions biochimiques catalysées par ces enzymes bactériennes, on peut citer des hydrolyses, des acétylations, des

phosphorylations, des nucléotidylations, des estérifications, des réductions et des réactions d'addition d'un glutathion. Ces enzymes sont généralement associées à des éléments génétiques mobiles (**Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009 ; Muylaert et Mainil, 2012**).

3-2 Modifications ou remplacement des cibles cellulaires des antibiotiques :

La modification de la cible d'un antibiotique est un mécanisme commun de résistance (**Lambert, 2005 ; Guinoiseau, 2010**). Elle est décrite pour presque tous les antibiotiques, est particulièrement importante pour les résistances aux pénicillines, aux glycopeptides, aux macrolides, aux lincosamides et aux streptogramines chez les bactéries Gram positives, et pour les résistances aux quinolones chez les bactéries Gram positives et Gram négatives (**Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009 ; Muylaert et Mainil, 2012**). C'est la conséquence d'une mutation spontanée au niveau d'un gène bactérien ou de l'acquisition d'un 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 (**Guinoiseau, 2010**).

Le remplacement de la cible de l'antibiotique est, quant à lui, un mécanisme décrit pour les sulfamidés, les diaminopyrimidines (triméthoprim) et les bêta-lactames dont les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) ainsi qu'à toutes les bêtalactames d'usage vétérinaire sont un exemple remarquable par la synthèse d'une nouvelle PBP (*Penicillin Binding Protein*) possédant une affinité moindre pour la méthicilline (**Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Alekshun et Levy, 2007 ; Nikaido, 2009 ; Muylaert et Mainil, 2012**).

3-3 Pompes à efflux :

Connues sous le terme de pompes à efflux ou transporteurs actifs. C'est un mécanisme nécessitant de l'énergie. Il est utilisé par les bactéries pour expulser à l'extérieur des métabolites et des composés toxiques étrangers tels que des antibiotiques et d'autres médicaments. Ces pompes à efflux ont généralement une spécificité de substrats assez large, et seulement certaines d'entre elles confèrent une résistance aux antibiotiques. La résistance provient de la réduction de concentration en antimicrobien dans le cytoplasme de la bactérie, ce qui prévient et limite l'accès de l'antibiotique à sa cible. On classe ces pompes à efflux sur la base de leur spécificité de substrats et de la source d'énergie employée. Certains de ces

transporteurs sont très spécifiques et on les appelle pompes SDR (pour *specificdrug-resistance*), alors que d'autres agissent sur une multitude de molécules et on les nomme pompes MDR (pour *multiple-drug-resistance*) (Muylaert et Mainil, 2012).

3-4 Protection de la cible de l'antibiotique :

La protection de la cible de l'antibiotique est un mode de résistance bien connu pour la famille des tétracyclines et plus récemment décrit pour les quinolones et les fluoroquinolones. Ainsi, on ne dénombre pas moins de huit protéines de protection ribosomiale qui confèrent une résistance aux tétracyclines en les déplaçant de leur site de fixation par la création d'un encombrement stérique au niveau du ribosome. Les résistances aux fluoroquinolones sont dues à la présence de gènes plasmidiques qnr (pour quinolone resistance) dont 5 groupes existent. Ce mécanisme a été rapporté parmi différentes bactéries Gram négatives à travers le monde, et des analogues de ces gènes ont également été décrits chez des bactéries Gram positives (Rodriguez-Martinez et al., 2008). Les protéines qnr en se fixant sur les topoïsomérasés, cible des fluoroquinolones, réduisent l'affinité de la famille d'antibiotiques pour leurs cibles (Robiczek et al., 2006a ; Cavaco et al., 2009 ; Wang et al., 2009; Muylaert et Mainil, 2012).

3-5 Piégeages de l'antibiotique :

La modification peut toucher la structure de la cible mais aussi sa concentration. Les cibles de la vancomycine sont les sous-unités constitutives du peptidoglycane. L'épaississement de la paroi, observé chez des souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine (SARV), serait responsable de l'inactivation de cet antibiotique. En effet, l'augmentation du nombre de cibles piégerait les molécules de vancomycine, les rendant ainsi inefficaces contre ce type de bactéries (Cui et al., 2003 ; Guinoiseau, 2010).

deuxième partie

Etude expérimentale

Notre étude a été réalisée dans le laboratoire de valorisation et d'amélioration de production des races locales, institut des sciences vétérinaires, Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

Matériel végétal :

Les plantes utilisées dans ce travail se trouvent sur le marché tout au long de l'année, pour leur importance majeure et leur usage quotidien dans la cuisine Algérienne.

Les espèces : *Mentha spicata* (menthe vert) et *Syzygium aromaticum* (clou de girofle) ont été utilisées dans cette étude.

Mentha spicata (menthe vert) provient d'une exploitation agricole privée, située dans la région de Dahmouni dans la wilaya de Tiaret. La récolte de parties aériennes de notre espèce de menthe a été réalisée durant le mois de Juin, Juillet, Aout et Septembre des années 2014. Elles ont été ensuite séchées au laboratoire à l'air libre à l'abri de la lumière et de l'humidité, puis conservées jusqu'au moment de l'extraction.

Les boutons de *Syzygium aromaticum* ont été achetés dans un magasin d'épices à Tiaret.

Justifier le choix de ces plantes

Extraction de l'huile essentielle par hydro distillation

Mode opératoire

Les feuilles sèches de menthe ont été broyées, les tuyaux de cannelle et les boutons de clou de girofle ont été concassés à l'aide d'un mortier et d'un pilon afin d'éclater les cellules et permettre la libération des molécules volatiles. L'huile a été extraite par hydro distillation, à l'aide du dispositif d'hydro distillation (figure 1). Le procédé consiste à introduire la matière première végétale (Menthe : 25g et clou de girofle : 20g) dans un ballon de un litre, imprégné 500 ml d'eau distillée. L'ensemble est ensuite porté à ébullition à pression atmosphérique et l'hydro distillation se fait pendant 1 heure et 30 minutes; la chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs chargées d'huile essentielle; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.



Photo 01: Dispositif d'hydro-distillation

Traitement de l'extrait

L'eau est rejetée et la phase huileuse est récupérée par une micropipette. La phase huileuse récupérée est séchée par le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) (Eyob et al, 2008). L'huile essentielle extraite [Menthe: $2.06 \pm 0,18\%$ (p/p), clou de girofle: $11.6 \pm 0,97\%$ (p/p)] est conservée à 4 °C dans des fioles scellées hermétiquement et couvertes de papier aluminium jusqu'à utilisation ultérieure (effet antibactérienne).

Etude de l'activité antibactérienne

Les souches bactériennes

Les souches utilisées dans les tests ont été isolées des diarrhées néonatales du veau (E. coli F17 et E. coli F5) ainsi qu'une souche de référence E. coli ATCC 25922 obtenu au près du laboratoire de valorisation et d'amélioration de production des races locales, institut des sciences vétérinaires, Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

Préparation de l'inoculum :

Les suspensions d'inoculum ont été obtenues en prenant cinq colonies à partir des cultures de 24 h. Les colonies ont été mises en suspension dans 5 ml de solution d'eau physiologique

stérile (0,85 % de NaCl) et on agite pendant 15 secondes. La densité a été ajustée à la turbidité de un standard McFarland 0,5 (ce qui équivaut à $1-5 \times 10^8$ cfu/ml). La densité optique de chaque suspension a été confirmée sur un spectrophotomètre.

Antibiogramme :

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture (Guérin-Faubleé et Carret, 1999).

Application : Dans des boîtes de 16 cm de diamètre contenant 10^6 à 10^8 cfu de culture bactérienne effectuée à la surface de 20 ml de gélose Muller Hinton, des disques imprégnés d'antibiotique de dose connues sont appliqués à la surface à des distances déterminés (tableau 1). Les boîtes sont incubées à température ambiante pendant 30 min, ensuite dans une étuve à 37°C pendant 18 à 20 heures. La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autours de chaque disque où aucune croissance n'est observée. Les valeurs sont comparées avec celles établi par la commission de standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire (OMS, 2008 et 2011).

Tableau 1 : liste des Antibiotiques à tester.

Nom d'antibiotique	dose
Ampicilline (Bioanalyse, lot : 101123)	10 mg
Amoxicilline + acide clavulanique (Bioanalyse, lot : 101124)	20/10 mg
Tetracycline (Bioanalyse, lot : 101108)	30 mg
Colistin (Bioanalyse, lot :100506)	10 mg
Gentamicin (?????)	10 µg
Trimethoprim/sulfamethoxazole (?????)	1.25/23.75 µg
Ofloxacin (?????)	5 µg
Cifotaxime (?????)	30 µg

Test du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

Test préliminaire « in vitro »

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des H.Es, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose : appelée aromatoگرامme. Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques (BENJELALI et al., 1986).

Le principe de la méthode

Il repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

Protocole expérimental

Couler aseptiquement le milieu de culture gélosé Mueller Hinton (M.H) en surfusion dans des boîtes de Pétri à raison de 10 ml par boîte. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse. 100µl de chaque suspension, contenant approximativement 1×10^6 cfu à été étaler à la surface du milieu Mueller Hinton à l'aide d'un râteau.

Dépôt de disques

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque de cellulose stérile et l'imbiber avec l'H.E à tester en mettant seulement en contact le bout du disque, celui-ci va absorber progressivement l'H.E jusqu'à l'imprégnation totale du disque (5 μ l), puis déposer sur la gélose. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 mn, et mises à l'étuve à la température de 37°C pendant 24 heures. Dans les boîtes de contrôle, les disques sont trempés dans de l'eau physiologique stérile. L'expérience est répétée trois fois pour chaque H.E et pour chaque souche bactérienne.

Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches

vis-à-vis des HEs.

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

Détermination des CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) des huiles essentielles:

La méthode de micro dilution a été utilisée pour la détermination des activités antimicrobiennes des huiles essentielles, selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2006). La détermination de concentration minimum inhibitrice (CMI) a été réalisée par la méthode de dilution en série sur des microplaques en matière plastique comportant 96 puits à fond « U » (8 rangées de 12 puits numérotés de 1 à 12) en bouillon Mueller- Hinton.

Les concentrations de départ des solutions d'huiles essentielles étaient de 10 μ l/ml pour chacune des trois huiles essentielles à testées (*Mentha spicata* et *Syzygium aromaticum*). Les solutions mères des huiles essentielles ont été préparées dans le Tween 20 puis double dilution en série des huiles ont été faites. L'inoculum a été ajouté à tous les puits de façon à obtenir une concentration finale de bactéries d'environ 1- 5 x 10⁵ CFU / ml, les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Pour chaque expérience, un contrôle positif (milieu inoculé) et

un contrôle négatif (milieu stérile) a été introduit. La croissance bactérienne a été visualisée en ajoutant un révélateur du développement bactérien. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la concentration la plus faible des huiles qui ont inhibé la croissance visible, tandis que la concentration minimale bactéricide (CMB) a été définie comme la plus faible concentration de l'huile qui a tué 99,9% des cellules bactériennes. Pour déterminer le CMB, 20 μ L de bouillon a été prise de chaque puits sans croissance visible et inoculé sur une gélose nutritive pendant 24 h à 37 °C. La croissance des souches bactériennes testées correspondant à l'activité bactériostatique, tandis que l'effet bactéricide est révélé par une gélose claire après incubation (DRAMANE, 2010). Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires.

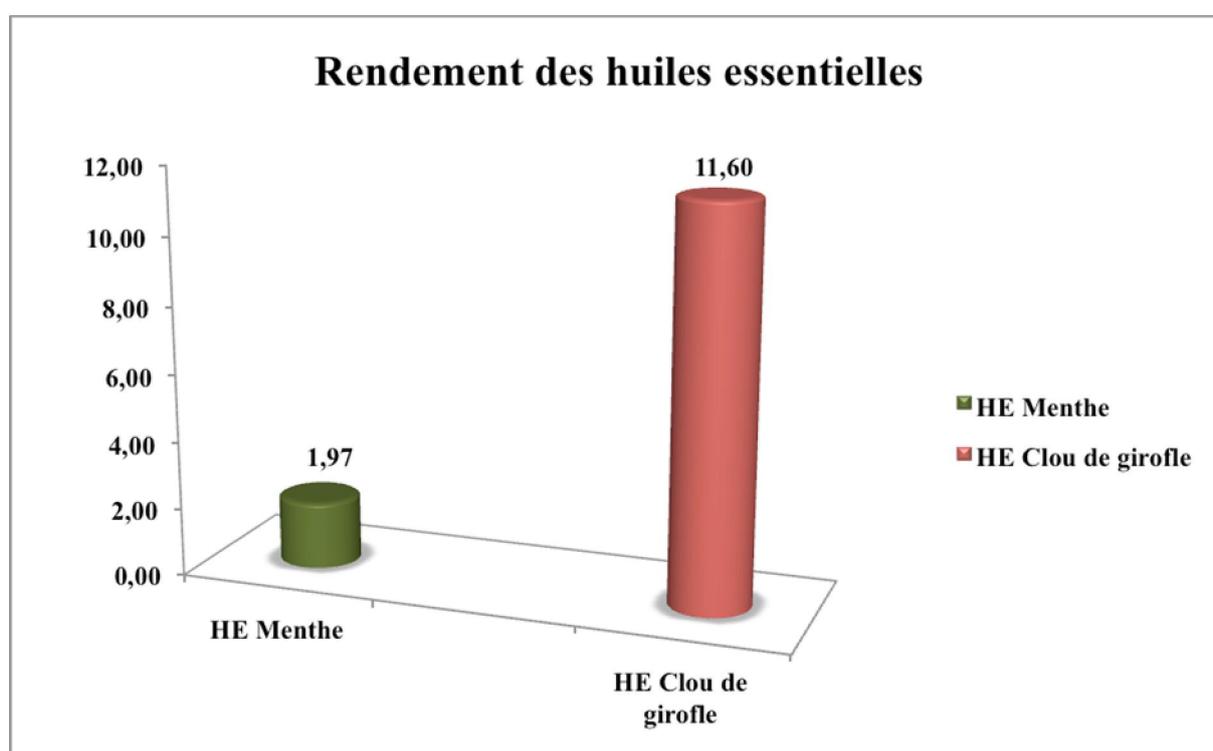
résultats

Rendement :

Les huiles essentielles ont été extraites des matériaux végétaux secs de deux plantes : *Mentha spicata* et *Syzygium aromaticum* placées dans un hydrodistillateur avec un rapport végétale/eau. Le tableau 1 résume les rendements moyens en huiles essentielles extraites (moyen \pm écart type).

Tableau 1:

	HE <i>Mentha spicata</i> (%)	HE <i>Syzygium aromaticum</i> (%)
Rendement	1,97 \pm 0,09	11,6 \pm 0,97



La figure et le tableau 1 montrent les rendements moyens en huiles essentielles, qui ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la plante. Les échantillons de *Syzygium aromaticum* ont fourni un taux d'environ 11,6% \pm 0,97 plus élevé que celui obtenu à partir de *mentha spicata* qui a été de 1,97 \pm 0,09.

Tableau 2 : La sensibilité aux antibiotiques des souches testées.

Antibiotiques	<i>E.coli F5</i>	<i>E.coli F17</i>	<i>E.coli ATCC</i> 25922
Ampicilline (10 µg)	R	R	R
Amoxicilline+ acide clavulanique (20/10 µg)	R	R	R
Gentamicine (10 µg)	S	S	S
Tetracycline (10 µg)	R	R	R
Colistine (10 µg),	S	S	S
Trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg)	R	R	S
Ofloxacin (5 µg)	S	S	S
Cifotaxime (30 µg)	S	S	S

R: résistante, **S:** sensible, **I:** intermédiaire.

Le tableau 2 montre la sensibilité des souches a testées envers les antibiotiques conventionnels. On constate que les trois souches sont résistantes à l'ampicilline, amoxicilline+ acide clavulanique et la tetracycline. Alors que *E.coli F5* et *E.coli F17* sont résistantes à la Trimethoprim/sulfamethoxazole. Cependant la totalité des souches sont sensibles à gentamicine, colistine, ofloxacin et cifotaxime (photo 01).

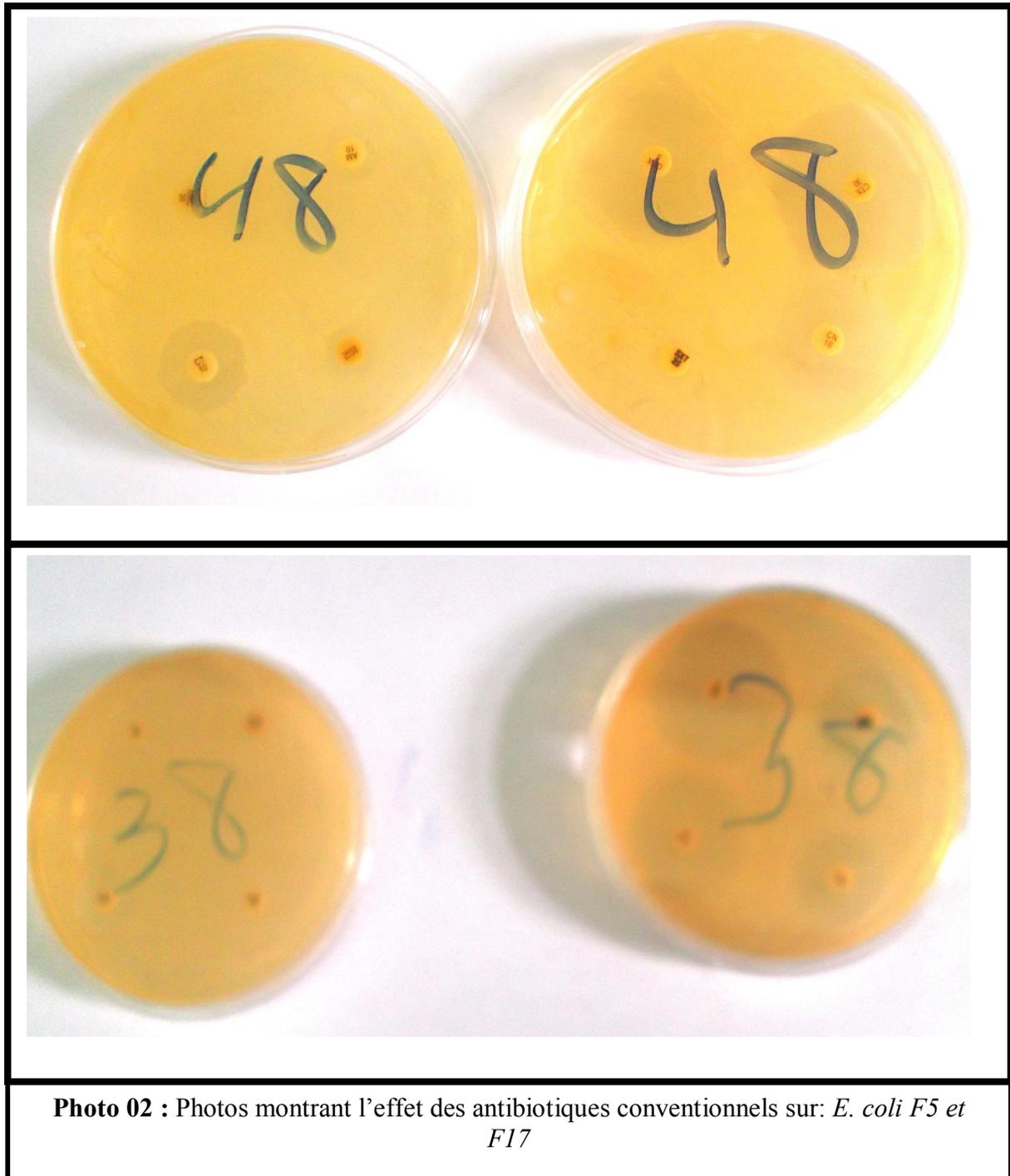


Photo 02 : Photos montrant l'effet des antibiotiques conventionnels sur: *E. coli F5* et *F17*

Aromatogramme :

Les observations effectuées sur l'effet des H.Es *Mentha spicata* et *Syzygium aromaticum* sur la croissance des souches bactériennes testées: *E.coli F5*, *E.coli F17* et *E. coli ATCC 25922* sont représentées dans le tableau 3 et la photo 2

Tableau 3: Halos d'inhibition en (mm) (moyenne±écart type) provoqués par l'H.E d'*Eugenia caryophyllus* et du *Mentha spicata*

Souches	<i>Mentha spicata</i> (mm)	<i>Syzygium aromaticum</i> (mm)	Témoin (mm)
<i>E.coli F17</i>	10 ± 1	15 ± 1	6
<i>E. coli F5</i>	10,33 ± 1,15	15,33 ± 0,58	0
<i>E. coli ATCC 25922</i>	10,33 ± 0,58	16 ± 2, 65	0
Appréciation	Sensible	Très sensible	Résistante

La sensibilité des bactéries aux H.Es est déterminée selon le diamètre de l'halo d'inhibition par la méthode de diffusion sur gélose (Photo 03).

Les résultats ci-dessus concernant l'activité antimicrobienne « in vitro » obtenue à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme) montrent que l'activité antibactérienne des H.Es testées est en fonction de la bactérie cible.

Un fait saillant pourrait être dégagé de ces résultats. En effet, les différentes souches d'*E.coli* ont manifestées une certaine sensibilité variable à ces H.Es. L'H.E de *Mentha spicata* a montré une activité antibactérienne la plus faible, avec un diamètre d'inhibition moyen de 10.22 ± 0.19 mm. Quant à l'H.E de *Syzygium aromaticum* a présenté une activité antibactérienne modérée dont le diamètre de la zone d'inhibition est situé à 15.44 ± 0.5 mm.

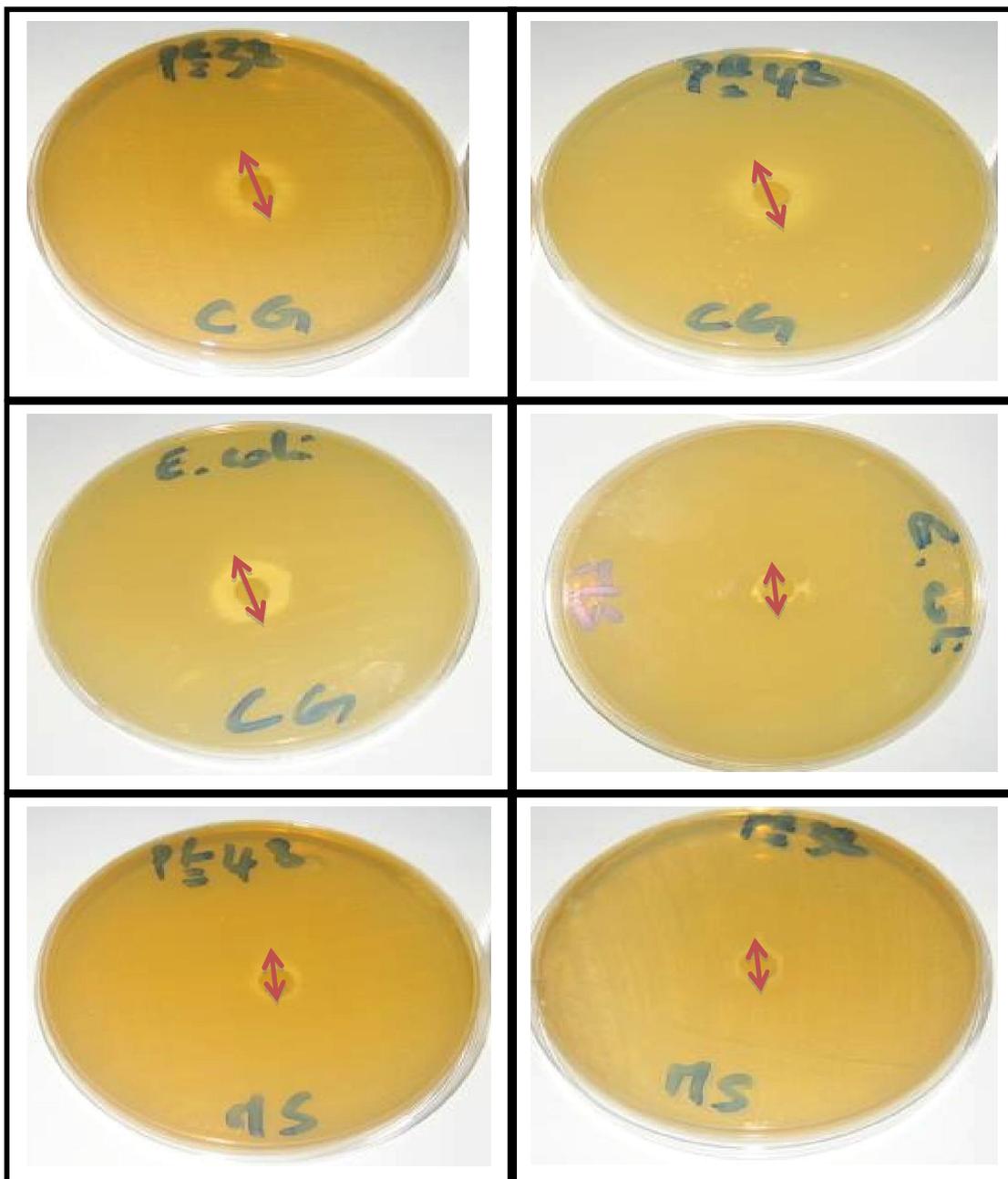


Photo 03: Photos montrant l'effet de l'H.E de *Syzygium aromaticum* et du *Mentha spicata* sur: *E. coli* F5, F17 et ATCC 25922

Concentrations minimales inhibitrices (CMI) :

Les résultats des CMI des H.Es testées sont représentés dans (le tableau 04)

Tableau 04 :

Souches	Mentha Spicata		Clou de Girofle	
	CMI $\mu\text{l/ml}$	CMB $\mu\text{l/ml}$	CMI $\mu\text{l/ml}$	CMB $\mu\text{l/ml}$
<i>E.coli F17</i>	5	> 10	1,25	10
<i>E. coli F5</i>	2,5	> 10	0,625	>10
E. coli ATCC 25922	2,5	> 10	1,25	> 10

Les résultats de la micro dilution ont montré que parmi les H.Es testées, l'H.E de Mentha spicata est caractérisée par une faible activité antimicrobienne avec un CMI compris entre 2,5 à 5 $\mu\text{l/ml}$. En revanche les H.Es de *Eugenia caryophyllus* a révélé une activité antibactérienne intéressante avec un CMI qui varie de 0,625 à 1,25 $\mu\text{l/ml}$.

Discussion

Le rendement en huiles essentielles:

Les rendements moyens en huiles essentielles ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la plante. Les échantillons de *Mentha spicata* et *Eugenia caryophyllus* ont fourni un taux d'environ $1,97 \pm 0,09$ % et $11,6 \pm 0,97$ % respectivement.

Des résultats similaires pour le rendement en huiles essentielles de *Mentha spicata* ont été rapportés par Soković et al (2007) avec 1,5%. Cependant les études de Chowdhury et al (2007), Roldàn et al (2010), Boukhebt et al (2011) et Martins et al (2012) ont affichés des taux très inférieure avec 0,33%, 0,08%, 0,87% et 0,1% respectivement. Tandis que Bruneton (2009) rapport que *Mentha spicata* contient au minimum 10 ml/kg d'huile essentielle.

L'échantillon *Eugenia caryophyllus* fourni un taux de $11,6\% \pm 0,97$. Bruneton (2009), note que le clou de girofle contient au minimum 150 ml/kg d'huile essentielle.

Le résultat obtenu dans cette étude par la méthode d'hydro-distillation est proche de celui cité par Guan et al., 2007 avec un rendement de 11.5% pour la même méthode. Toutefois ce rendement est inférieur a celui rapporté par ces mêmes auteurs par la méthode d'extraction par fluide supercritique ainsi que l'extraction au Soxhlet avec un taux de 19.6% et 41.8% respectivement. Alors qu'il est supérieur à celui obtenu par Guan et al, 2007 à l'aide de la méthode de distillation par entrainement à la vapeur d'eau qui est de l'ordre de 10.1%.

Antibiorésistance :

Cette étude a mis en évidence une résistance des souches à testée pour l'ampicilline, l'amoxicilline +acide clavulanique, Trimethoprime/sulfamethoxazole et la tétracycline. Cependant ces souches montrent une sensibilité à la colistine, la gentamicine, l'ofloxacine et la cifotaxime.

Des constatations similaires sont rapportés par Akam et al. (2007). Le problème de la résistance aux médicaments n'est pas limité aux bactéries pathogènes, il implique également la flore bactérienne commensal, qui peut devenir un important réservoir de souches résistantes (Erb et al., 2007).

Aromatogramme :

La sensibilité des souches aux différents agents antimicrobiens a été classifiée par le diamètre de la zone d'inhibition comme suit :

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

Pour les souches d'*E.coli* (F17, F5 et ATCC25922) les diamètres des zones d'inhibitions sont élevés (D compris entre 15 mm à 16 mm), elles sont très sensibles envers les huiles essentielles de *Eugenia caryophyllus* testés. Tandis que les diamètres des zones d'inhibitions sont élevés (D compris entre 10 mm à 10,33 mm) à l'égard des huiles essentielles de *Mentha spicata* qui est intermédiairement sensibles.

Activité antimicrobienne des huiles essentielles:

Dans notre étude, l'huile essentielle de clou de girofle présentait une forte activité contre les souches bactériennes testées. Elle a affiché un CMI qui a varié de qui varie de 0,625 à 1,25 µl/ml vis à vis des 3 souches d'entéropathogènes étudiés. Des valeurs similaires ont été rapportées par Prabuseenivasan et al. (2006), qui ont montré que clou de girofle exerce un CMI >1,6 mg/ml. Jagadeesh Babu et al 2010 ont affiché un CMI de l'ordre de 1/1000 à l'égard d'*E.coli*. Alors que Hamri et Rezki (2012) ont mentionnées un CMI de 1 µl/ml à l'égard d'*E.coli*.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Mentha spicata* est moins puissante que celle du clou de girofle avec un CMI qui varie de 2,5 à 5 µl/ml. Des résultats plus inférieurs ont été cité par Mantins et al 2012, qui ont rapportés un CMI de 250 µg/ml contre *E.coli*. Cependant Soković et al 2010 ont affiché un taux de 2,5 µg/ml contre *E.coli*.

Conclusion et perspectives

Les résultats de cette étude, réalisée dans le laboratoire de valorisation et amélioration des productions des races locales, université Ibn Khaldoun de Tiaret a permis de ressortir la conclusion suivante.

Les deux huiles essentielles se sont montrées actives contre les bactéries testées, mais c'est l'essence de *Syzygium aromaticum* qui a manifesté le plus grand pouvoir antimicrobien en comparaison avec celle de *Mentha spicata*.

Cette étude nous a permis aussi de prouver l'efficacité d'huile essentielle de clou de girofle contre les souches étudiées. Ceci montre que la flore naturelle peut constituer une réserve importante d'espèces végétales intéressantes, dont les principes actifs peuvent être employés dans plusieurs domaines tels que les industries agroalimentaire et pharmaceutique.

De nouvelles perspectives peuvent être envisagées par des études plus poussées :

- De la composition chimique de ces huiles essentielles par analyse chromatographique afin de déterminer leurs composants majoritaires.
- De l'activité antibactérienne, et antioxydante non seulement sur les H.Es utilisées seules, mais également en mélange, permettant ainsi de mettre en évidence une éventuelle synergie.
- Il serait intéressant de continuer ces travaux notamment sur d'autres bactéries pathogènes responsables des diarrhées néonatales du veau, afin de confirmer leur efficacité.

Résumé

Le regain d'intérêt aux plantes médicinales pour extraire les principes actifs qui s'accroît d'un jour à l'autre, laisse le chercheur des traitements naturels puiser dans les recueils traditionnels et essayer de leur donner leur vraie image.

C'est ainsi qu'une étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles, utilisées depuis des millénaires, de deux plantes alimentaires : la menthe vert et clou de girofle par rapport à d'autres extraits réputés d'avoir une activité visible contre les

Bactéries: huiles essentielles, est faite avec deux techniques: celle des disques

Ou aromatogramme, employée généralement dans les examens de routine, et celle des dilutions utilisée dans ce travail pour prouver le pouvoir antibactérien des huiles essentielles.

Les résultats obtenus à partir de ce travail ont amené à comprendre l'effet

antibactérien des huiles essentielles de ces plantes par rapport à certaines souches. C'est alors que l'huile de la menthe a montré un pouvoir anti bactérien modéré sur les souches testées, à cause de l'interaction entre extraits et milieu de culture. L'huile du clou de girofle a montré un pouvoir antibactérien puissant en vers ces souches qui lui permet d'être un excellent antibiotique naturel qui peut être utilisé dans l'approche thérapeutique de quelques maladies bactériennes.

Les résultats trouvés sont intéressants pour une étude complémentaire plus approfondie et plus détaillée.

Références

1. Akam A., Bouyoucef A., Rahal K.h., Lafri M., Kaidi R., Khelef D., Chirilă, F. 2007. Frequence d'isolement et antibioresistance des souches d'escherichia coli f5+ isolees chez les veaux de la mitidja (Algerie). Bulletin USAMV-CN .64 (1-2) : 20-25.
2. Alekshun M.N., Levy S.B. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell. 128: 1037-1050.
3. Benjelali B., Tantaoui E.A., Esmaili-Alaoui M. 1986. Méthodes d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plantes Médicinales et Phytothérapie. 20 :155-167.
4. Benzeggouta Nairouz, these magister, 2004/2005.
5. Bernadet M, 2000, phyto aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles, editions dangles.
6. Bonnet J. 2014. utilisation raisonnée des antibiotiques en élevage porcin. démarche d'accompagnement dans sept élevages. Thèse Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
7. Boukhebt H., Chaker A. N., Belhadj H., Sahli F., Ramdhani M, Laouer H., Harzallah D. 2011. Chemical composition and antibacterial activity of Mentha pulegium L and Mentha spicata L. essential oils. Der Pharmacia Lettre. 3 (4) : 267-275.
8. Breneton J, 1999, pharmagnosie, phytochimie, plantes médicinales, techniques et documentation de lavoisier.
9. Brumnes L, 1998, les plantes aromatiques et médicinales, Bordas éditions.
10. Bruneton J. 2009. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, fourth ed. Paris: Lavoisier.
11. Cavaco L.M., Hasman H., Xia S., Aarestrup F.M. 2009. qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in Salmonella enterica sérovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. Antimicrob. Agents Chemother. 53 : 603-608.
12. Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, Gemmell CG, Kim MN, Ploy MC, El-Solh N, Ferraz V, Hiramatsu K. 2003. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 41: 5-14
13. De Verdier, K., Nyman, A., Greko, C., Bengtsson, B., 2012. Antimicrobial resistance and virulence factors in Escherichia colifrom Swedish dairy calves. Acta Veterinaria Scandinavica. 54: 2

14. 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) : 307-317.
15. Erb A., Stürmer T., Marre R., Brenner H. 2007. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26:83–90.
16. Ferron A. 1994. Chapitre 76 : La résistance des bactéries aux antibiotiques. In *Bactériologie médicale*. 15th ed., Ed. C. et R., Paris, 12 pages.
17. Guan W., Li S., Yan R., Tang S., Quan C. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry* 101 :1558–1564.
18. Guardabassi L., Courvalin P. 2006. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In : Aarestrup F.M. (Ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. ASM Press : Washington. P : 1-18.
19. Guerin-Fauble V., Carret G. 1999. L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. *Journées Nationales GTV- INRA*. 5 :12.
20. Guinoiseau E. 2010. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse
21. Jagadeesh Babu A., Rupa Sundari A., Indumathi J., Srujan R.V.N., Sravanthi M. 2011. Study on the Antimicrobial activity and Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils of Spices. *Veterinary World*. 4(7): 311-316.
22. Kwakman P.H., Te Velde A.A., de Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls C.M., Zaat S.A. 2010. How honey kills bacteria. *FASEB J*. 24:2576-2582
23. Lambert PA. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 1471-1485.
24. Loza Tavera Herminia, 1999, monoterpenes in essential oils : biosynthesis and properties.
25. Martins M.R., Tinoco M.T., Almeida A.S., Cruz-Morais J. 2012. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of three essential oils from Portuguese flora. *Journal of Pharmacognosy*. 3 (1) : 39-44.
26. Mebarki Noodjoub, these magister 2010.
27. Muylaert A., Mainil J.G.2012. Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann. Méd. Vét.* 156 :109- 123.
28. Nikaido H. 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 78: 119-146.

29. Noble WC, Virani Z, Cree RG. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 72: 195-198.
30. Prabuseenivasan S., Jayakumar M., Ignacimuthu S. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine; 6: 39-47.
31. Robicsek A., Jacoby G.A., Hooper D.C. 2006. The worldwide emergence of plasmid mediated quinolone resistance. Lancet Infect. Dis. 6: 629-640.
32. Rodriguez-Martinez J.M., Velasco C., Briales A., Garcia I., Conejo M.C., Pascual A. 2008. Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 61: 1240-1243.
33. Roldán L.P., Díaz G.J., Durringer J. M. 2010. Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. Rev. Colomb. Cienc. Pecu. 23:451-461.
34. Schwarz S., Chaslus-Dancla E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. J. Vet. Res. 32: 201-25.
35. Soković M., Glamočlija J., Marin P.D., Brkić D., van Griensven L. J. L. D. 2010. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. Molecules. 15 : 7532-7546.
36. Soković M., Marin P.D., Brkić D., van Griensven L. J. L. D. 2007. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Ten Aromatic Plants against Human Pathogenic Bacteria. Food. 1(1).
37. Standardization of antimicrobial susceptibility testing in veterinary medicine at the national scale according to the WHO recommendations. Ministry of Agriculture and Rural Development, Ministry of Health, Population and Hospital Reform. Democratic and Popular Republic of Algeria. 2008.
38. Standardization of antimicrobial susceptibility testing in veterinary medicine at the national scale according to the WHO recommendations. Ministry of Agriculture and Rural Development, Ministry of Health, Population and Hospital Reform. Democratic and Popular Republic of Algeria. 2011.

39. Wang M., Guo Q., Xu X., Wang X., Ye X., Wu S., Hooper D.C. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 : 1892-1897.
40. Wang R., Starkey M., Hazan R., Rahme L. G. 2012. Honey's ability to counter bacterial infections arises from both bactericidal compounds and QS inhibition. *Frontiers in microbiology.* 3 (144): 1-8.
41. Wright GD. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 1451-1470.