

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة ابن خلدون

UNIVERSITE IBN KHALDOUN TIARET

معهد علوم البيطرة

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

قسم الصحة الحيوانية

DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master complémentaire

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Vétérinaires

Présenté par :

ACHIR Hadjer

AIT AHMED LAMARA Asmaa

Thème

Etude «*In-Vitro*» de l'activité antibactérienne
de quelques huiles essentielles et leur association a la pénicilline
sur *Staphylococcus aureus* issu d'une mammite bovine.

Jury :

Président : Mr. AIT AMRANE Amar

Encadreur : Mr. BENBELKACEM Idir

Examineur : Mr. SELLES Sidi Mohammed Ammar

Grade :

MCA

MCB

MCB

Année universitaire 2018/2019



Remerciement

Qu'ALLAH soit loué, celui qui nous a appris ce que nous ne savions pas

Nos sincères remerciements vont à nos chères parents pour leur Dou'a leur soutien et leur encouragement merci d'être là.

*Nous remercions grandement **Mr. Benbelkacem** C'est de tout cœur que nous tenons à vous remercier pour nous avoir encadré. Merci pour votre disponibilité et bien sûr vos grandes qualités scientifiques*

*Nos remerciements vont aussi à **Mr. Selles** pour son accueil, son aide et son orientation*

*Un grand merci à **Mr. Aït Amrane** et **Mr. Selles** qui nous font l'honneur de juger ce travail*



Dédicaces

A mes très chères parents

A mes chères amies

Hadjer Fatima Farah Yousra Khaoula Lila et Amal

A tous du fond du cœur merci.....que Dieu vous protège

Asmaa



Dédicaces

A mes chères parents Abdelkader et Zohra

Que dieu vous garde toujours pour moi

A mes frères Mohammed et Ibrahim

A mes sœurs Fatima Assia Nafissa et Kheira

A mon petit ange Iyad

A Asmaa merci et que dieu te protège

*A mes amies Yusra Lila Khaoula Habiba Fatima Amal et
Farah*

Hadjer

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de trois plantes (*Thymus fontanesii*, *Eucalyptus sp.* Et *Lavandula sp.*) et leur association à la Pénicilline sur *Staphylococcus aureus* résistante à la Pénicilline

L'aromatogramme en milieu solide a été utilisé pour évaluer l'activité de ces huiles essentielles ainsi que les associations huiles essentielles /Pénicilline.

Les huiles essentielles de *Thymus fontanesii*, *Eucalyptus sp.* ont montré des effets plus ou moins importants sur la souche, dont l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* s'est avérée la plus efficace avec une concentration de 0,625 µl/ml.

La détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices a été effectuée par la méthode de microdilution en milieu liquide, les résultats obtenus montrent que les huiles essentielles donnent des effets antibactériens à de faibles concentrations.

Mots clés : Activité antibactérienne, huile essentielle, *Thymus fontanesii*, *Eucalyptus sp* (*Lavandula sp.*) Aromatogramme, association HEs/ATBs, *Staphylococcus aureus*

Abstract

The aim of this study is to evaluate the antibacterial activity of essential oils from three plants (*Thymus fontanesii*, *Eucalyptus sp.* Et *Lavandula sp.*) and their association with Penicillin against Penicillin resistant *Staphylococcus aureus*.

The aromatogram was used to evaluate the activity of these essential oils and their associations essential oils / penicillin.

Essential oils of *Thymus fontanesii*, *Eucalyptus sp.* have showed effects more or less important against the strain, essential oil of *Thymus fontanesii*. were proved the highest effect. 0,625 µl/ml .

The determination of Minimal Inhibitory Concentration was performed by micro-dilution broth methods, the results show that essential oils provide antibacterial effects at low concentrations.

Key words: Antibacterial activity, Essential oil, *Thymus fontanesii* ,*Eucalyptus sp* (*Lavandula sp.*) aromatogram, association EOs ATBs, *Staphylococcus aureus*

ملخص

الغرض من هذه الدراسة هو تقييم نشاط زيوت اساسية مستخلصة من ثلاث نباتات عطرية (*Staphylococcus aureus*) ضد بكتيريا مرضية (*Thymus fontanesii*, *Eucalyptus sp.*, *Lavandula sp.*) مقاومة للبنسيلين.

شملت الدراسة ايضا تقييما لنشاط الزيوت الاساسية ممزوجة بالبنسيلين.

اظهرت الزيوت الاساسية المستخلصة من الزعتر و الكاليتوس نشاطا جد فعال ضد البكتيريا المدروسة بكمية

0,625µl/ml بالنسبة للزيت الاساسي للزعتر

الكلمات المفتاحية: الزيوت الاساسية، بكتيريا، زعتر، كاليتوس، خزامى

Table des matières

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	6
Partie bibliographique	
CHAPITRE I : Les huiles essentielles	
<i>I-I Généralités sur les huiles essentielles</i>	7
I-I-1- Définition	7
I-I-2- Procédés d'extraction	7
I-I-3- Les composants chimiques des huiles essentielles.....	8
I-I-4- Activité antibactérienne et mécanisme d'action des huiles essentielles.....	8
I-I-5- Toxicité des huiles essentielles.....	9
I-I-6- Synergie entre l'huile essentielle et l'antibiotique	9
<i>I-II Plantes aromatiques utilisées</i>	10
<i>Eucalyptus sp.</i>	10
I-II-1- Généralités sur l' <i>Eucalyptus</i>	10
I-II-2- Huile essentielle d' <i>Eucalyptus</i>	10
I-II-3- Activité antibactérienne	10
<i>Thymus fontanesii</i>	11
I-II-1- Généralités sur le thym	11
I-II-2- Huile essentielle du thym.....	11
I-II-3- Activités antibactériennes	11

<i>Lavandula sp.</i>	12
I-II-1- Généralités sur la lavande	12
I-II-2- Huile essentielle de lavande	12
I-II-3- Activité antibacterienne	12
<i>CHAPITRE II : Les mammites bovines</i>	
II-1- Définition.....	13
II-2- Classification des mammites	13
II-3- Principaux facteurs qui causent la mammite	13
II-4- Bactéries impliquées dans les mammites	14
II-5- Traitement des mammites à <i>S. aureus</i>	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	15
II-1- Historique	15
II-2- Caractère structuraux	15
II-3- Caractère biochimique	15
II-4- Epidémiologie.....	15
II-5- <i>Staphylococcus aureus</i> et les mammites bovines	16
II-6- La résistance bactérienne aux antibiotiques	17
Partie expérimentale	18
Matériel et méthodes	18
Résultats et discussion	24
Conclusion et Recommandations	31
Références bibliographiques	32

Liste des figures

Figure 1 : Dispositif de l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation	7
Figure 2 : <i>Staphylococcus aureus</i> sous microscope optique	16
Figure 3 : Dispositif d'hydrodistillation utilisé pour l'extraction des huiles essentielles. ISV Taret.	19
Figure 4 : Résultat de l'antibiogramme.	25
Figure 5 : Résultat de l'aromatogramme et l'antibiogramme.	25
Figure 6 : Résultats de l'aromatogramme de l'HE du thym.	26
Figure 7 : Résultats de l'aromatogramme de l'HE de l' <i>Eucalyptus</i>	26
Figure 8 : Résultats de l'aromatogramme de l'HE de la lavande.	26
Figure 9 : Résultats de l'association huile essentielle/Pénicilline.	27
Figure 10 : Résultat de l'effet de l'association huile essentielle de <i>T. fontanesii</i> / Pénicilline .	28
Figure 11 : Résultat de l'effet de l'association huile essentielle d' <i>Eucalyptus sp.</i> / Pénicilline .	28
Figure 12 : Résultat de l'effet de l'association huile essentielle de <i>Lavandula sp.</i> / Pénicilline	29

Liste des tableaux

Tableau 1 : Présentation des plantes employées pour l'extraction des huiles essentielles	18
Tableau 2 : Résultat des rendements.	24
Tableau 3 : CMI des huiles essentielles.	29

Liste des abréviations

ATB : Antibiotique

BHIB : Bouillon cœur cervelle

BN : Bouillon nutritif

CMI : Concentration minimale inhibitrice

GN : Gélose nutritive

HE : Huile essentielle

ISV : Institut des sciences vétérinaires

MH : Muller-Hinton

MHE : Masse en huile essentielle récupérée

Mms : Masse en matière sèche

S.aureus : Staphylococcus aureus

SNV : Science de Nature et de Vie

T. fontanesii : *Thymus fontanesii*

Introduction



La mammite constitue une pathologie dominante dans tous les troupeaux laitiers qui a un impact économique et médical très important.

Le phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ATB) constitue un véritable problème de santé publique. Les bactéries développent de plus en plus de la résistance en s'adaptant aux thérapeutiques antibactériennes ce qui entraîne l'échec thérapeutique **(Philippon, 2008; Kempf et al., 2011)**.

Environ 90-95% des souches de *Staphylococcus aureus* dans le monde sont résistantes à la pénicilline **(Hemaiswarya et al., 2008)**.

Il est donc important d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et de revenir à des solutions alternatives notamment des médecines dites douces basées sur les propriétés des plantes médicinales notamment des huiles essentielles **(Oussou et al., 2010)**. Des études récentes ont montré que les huiles essentielles et leurs constituants présentent un important potentiel en tant qu'agents antimicrobiens et dans plusieurs domaines industriels et médicaux. La diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent leur confèrent des rôles et des propriétés biologiques très variés ainsi qu'une utilisation moins dommageable car ils n'ont pas d'effets secondaires **(Amarti et al., 2008; Mazari et al., 2010; Goetz et Ghedira, 2012)**. Pour la même raison, aucune résistance particulière vis-à-vis des huiles essentielles n'a été décrite, et il est important de souligner que certaines d'entre elles constituent des alternatives efficaces ou des compléments aux antibiotiques sans montrer le même effet secondaire **(Amarti et al., 2010; Rosato et al., 2010)**.

De nombreuses études le plus souvent *in vitro* se sont intéressées à l'étude de l'association des antibiotiques et des huiles essentielles pour surmonter les problèmes de résistance et des effets secondaires associés aux médicaments. Ces recherches révèlent une synergie intéressante entre les antibiotiques et les huiles essentielles étudiées **(Rosato et al., 2010; Zafar et al., 2010)**.

De ce fait, l'objectif de notre étude est de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Eucalyptus sp.*, *Thymus fontanesii* et *Lavandula sp.* et leur association à la pénicilline vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline isolé à partir de cas de mammite subclinique bovine.

Partie

bibliographique



CHAPITRE I

Les huiles essentielles

I-I Généralités sur les huiles essentielles

I-I-1- Définition

L'Association Française de Normalisation (**AFNOR**). Décrit l'HE comme étant un produit obtenu à partir d'une matière végétale. Soit par l'entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec. L'HE est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (**AFNOR ,2000**) ; mais cette définition reste restrictive car elle exclut les produits extraits à l'aide de solvants et ceux obtenus par tout autres procédés (**Bruneton ,1999**).

I-I-2- Procédés d'extraction

Procédés d'obtention des HE interviennent d'une manière déterminante sur sa composition chimique (**Garnero ,1977**).

L'hydrodistillation est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE (**Scheffer ,1996**).

- **L'hydrodistillation**

L'hydrodistillation simple consiste à immerger directement le matériel végétal dans un ballon rempli d'eau qui est porté à ébullition.

Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide

Les HE se séparent par différence de densité, la phase huileuse est récupérée après sa séparation de la phase aqueuse (séchée avec sulfate de sodium anhydre) puis conservée à 4°C jusqu'à utilisation (**Baser et Buchbauer ,2010**).

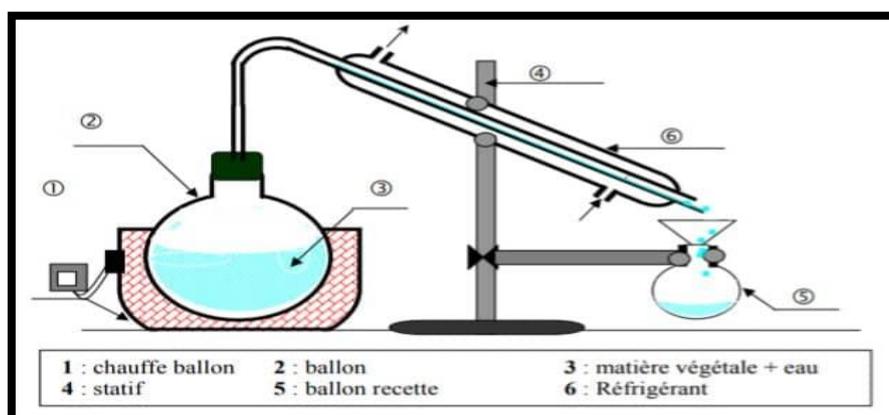


Figure 1 : Dispositif de l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation

I-I-3- Les composants chimiques des huiles essentielles

D'un point de vue général, la teneur des plantes en essence est faible 1% - 1‰, mais il existe quelque exception Ex : clou de girofle 15 % de l'HE (Paris et Hurabielle, 1981; Guignard ,2000).

Les composants chimiques sont variables d'une huile à une autre, la plupart sont polymoléculaire, plus des composés majoritaires on trouve d'autres composés qui sont minoritaires et un certain nombre des constituants en forme de traces (**Pibiri ,2006**).

Ces composants appartiennent à deux groupes distincts

- a. Terpénoïdes
- b. Composés aromatique dérivés du phénylpropane (phénylpropanoïdes).

I-I-4- Activité antibactérienne et mécanisme d'action des huiles essentielles

Les HE ont un effet sur la croissance des bactéries, elles agissent en empêchant leur multiplication, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines, les essences ont montré une activité contre les pathogènes résistants aux antibiotiques, tels que les staphylocoques dorés ce qui attire beaucoup d'attention (**Tohidpour et al. ,2010**).

D'une manière générale, l'action de l'HE déroule en 3 phases (**Calsamiglia et al.,2007 ; Djilani et Dicko ,2012; Goetz et Ghedira ,2012**).

- Attaque de la paroi bactérienne ce qui provoque une augmentation de la perméabilité et en conséquent la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule provoquant la coagulation des constituants cellulaires par dénaturation des protéines ce qui bloque la production de l'énergie et la synthèse des composants de structure.
- Dénaturation du matériel génétique, ce qui cause la mort de la bactérie.

I-I-5- Toxicité des huiles essentielles

D'après (**Pibiri ,2006**), la toxicité des huiles est moins investiguées les interactions de leurs produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées.

Toxicité par voie orale faible (**Bruneton ,1999**).

Toxicité dermique : thym et origan ont un pouvoir irritant, la cannelle est dermocaustique et allergisante pour la peau sensibles (**Pibiri ,2006**).

Toxicité sur cellules animales : thym ; toxicité augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour la lavande (**Inouye ,2003**).

I-I-6- Synergie entre l'huile essentielle et l'antibiotique

Une interaction positive, crée lorsque les deux agents ensemble provoquent un effet supérieur à la somme de leurs effets individuels.

En effet, les HE peuvent rendre l'agent pathogène sensible à un antibiotique inefficace précédemment (**Aiyegoro, Okoh, 2009**).

L'association des HE aux antibiotique peut être employée pour :

- Augmenter le spectre d'activité antibactérienne (**Fadli et al ,2012**).
- Empêcher l'apparition des mutants, résistants, réduire la toxicité et minimiser les effets secondaires de l'antibiotique (**Lv et al ,2011**).

I-II Plantes aromatiques utilisées

Eucalyptus sp.

I-II-1- Généralités sur l'*Eucalyptus*

Les *Eucalyptus* appartiennent à la famille des Myrtacées grande famille 72 genres et 300 espèces. Ils comportent environ 600 et 700 espèces et variétés (Warot ,2006)

Les *Eucalyptus* sont de grands arbres dont certains peuvent dépasser les 100 m de hauteur, mais la moyenne est de 40 à 50 m (Traore et al ,2013).

L'*Eucalyptus* porte des feuilles persistantes, coriaces, glabres mais différentes en fonction de l'âge des rameaux (Goetz et Ghedira ,2012).

Les fleurs naissent à l'aisselle des feuilles et sont de couleur blanc-crème " blanc-bleu ", en toupie surmontée d'un pseudo corolle en forme de coiffe qui tombe lors d'épanouissement, laissant apparaître un panache d'étamines (Baba Aissa ,2000).

Le fruit ligneux est une grasse capsule glauque, marron a la maturité, dure, anguleuse, verruqueuse et s'ouvrent légèrement par 3,4 ou 5 fentes (qui désignent une étoile à son sommet) pour libérer des grains sombres et minuscules (Goetz et Ghedira ,2012).

En Algérie, l'*Eucalyptus* occupe une surface de 5855 hectares dont plus de la moitié dans la région oranaise (Boudy ,1955).

Actuellement on les retrouve dans El-Kala, Azzefoun, Mitidja et Hadjout (Faudil-Cherif ,1991).

I-II-2- Huile essentielle d'*Eucalyptus*

L'HE d'*Eucalyptus* est obtenue par l'hydrodistillation des feuilles en pleine maturité.

- **Composé majoritaire**

L'eucalyptol ou le 1,8 cinéole avec une concentration de 70 à 85% (Opdyke ,2002; Zhiri et Baudoux ,2008).

I-II-3- Activité antibactérienne

Efficacité contre *S.aureus* et *E.coli* est prouvée par (Raho et Benali ,2012).

Thymus fontanesii

I-II-1- Généralités sur le thym

Environ 110 espèces différentes du genre *thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen (**Jalas ,1971**). A cet effet la région méditerranéenne semble être le centre d'origine de ce genre.

La famille des Lamiaceae (Libiatae) est l'une des familles botanique les plus utilisées comme source mondiale d'extraits à forts pouvoir antioxydant et antibactérien (**Bouhdid et al ,2006**). Elle regroupe entre 200 et 250 genres et entre 3200 et 6500 espèces (**Anon ,2003 ; Dorman et al ,2004**).

Le thym est un sous-arbrisseau, de hauteur de 7 à 30 cm. Il a des tiges ligneuses, dressés, cylindrique et très rameuses, disposées en buissons denses.

Les rameaux portent des feuilles opposées, grisâtres, ovales et lancéolées.

Les fleurs sont petites, mauves et éclosent en épis aux aisselles des feuilles (**Pacchioni ,2014 et Bruneton J ,2009**).

I-II-2- Huile essentielle du thym

HE du thym est extrait principalement à partir des feuilles et des sommités fleuries.

- **Composé majoritaire**

Le thymol avec une concentration de 36.65% selon (**D'après CONSEIL DE L'EUROPE, juillet 2015**).

I-II-3- Activités antibactériennes

D'après plusieurs études réalisées in-vitro l'HE du thym a une activité antibactérienne puissante sur la bactérie gram+ et gram- grâce au thymol et carvacrol (**Dorman et al ,2000**). Tous les chémotypes sont actifs, en revanche, l'activité bactéricide est plus prononcée pour les HE riches en thymol et carvacrol (**Bruneton J ,2009**).

Lavandula sp.

I-II-1- Généralités sur la lavande

A l'état sauvage, il en existe plus d'une centaine de variétés et de chémotypes différents. (Wichtl et Anton, 1999) Suivant les espèces, ce sous-arbrisseau vivace mesure de 30 à 70 cm de haut et porte des fleurs bleues, pourpres ou violettes, groupées en épis. (Vialard, 2008)

Les feuilles sont étroites, sans pétiole ni dents, de couleur vert bleuté, disposées en paires opposées. Les jeunes feuilles sont souvent blanchâtres, ce qui donne à la plante sa teinte gris-argentée caractéristique. Les feuilles peuvent mesurer jusqu'à 5 cm de longueur et sont à la fois amères et aromatiques. (Vialard, 2008)

Les tiges sont courtes, dressées, très ramifiées, ligneuses à la base (Small et Deutsch, 2001). La tendance spiralée des rameaux se résorbe presque en une rosette, portant de longs et minces épis de fleurs. (Pelikan, 2002)

La lavande nécessite un endroit ensoleillé, où la température ne descend pas en dessous de (-10°C) et surtout, sec. (Festy et Dupin, 2012)

Cette belle plante pousse à l'état sauvage, sur les terres rocailleuses et ensoleillées. Elle s'adapte bien aux hivers plus froids des régions tempérées si le sol est bien drainé.

Elle aime les terrains calcaires de la méditerranée occidentale.

Plus le sol où elle pousse est aride, plus son essence est fine. (Vialard, 2008)

I-II-2- Huile essentielle de lavande

L'extraction de l'huile essentielle de lavande se fait par hydrodistillation à partir des

- **Composé majoritaire**

L'acétate de linalyle avec une concentration de 30-55% (Wichtl et Anton, 1999).

I-II-3- Activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait de lavande sur six souches bactériennes responsables d'infection alimentaire ; *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *B. cereus* et *Clostridium perfringens*. Le pouvoir antibactérien a été révélé dont les souches *S. typhimurium* et *S. aureus* sont les plus sensibles. (Benyagoub et al, 2014).

CHAPITRE II

Les mammites bovines

II-1- Définition

La mammite est une inflammation de la mamelle dont l'origine la plus fréquente est la pénétration d'une bactérie dans un quartier par le canal du trayon. On différencie la mammite clinique (entraînant une modification systématique de l'aspect du lait, avec présence ou non de signes locaux sur la mamelle et de signes généraux), de la mammite subclinique que l'on met en évidence a posteriori, grâce aux comptages cellulaires somatiques individuels (CCSI) ou à ceux du quartier, *S. aureus* est l'agent étiologique des mammites cliniques et subcliniques le plus prépondérant et le plus contagieux (**Bosquet et al ,2010**).

II-2- Classification des mammites

Les mammites sont classées selon les modifications de la mamelle (chaleur, douleur, rougeur, gonflement) et la composition du lait (grumeaux, couleur) (**Faroult ,2000**).

- **Mammites cliniques**

Les mammites cliniques s'accompagnent parfois d'une très forte réaction inflammatoire et de symptômes locaux graves qui peuvent être spectaculaires (congestion, œdème, sécrétion du lait décomposée ou purulente, abcès, fistule, gangrène...) et parfois sont associés à des signes généraux plus ou moins intenses (hyperthermie, trouble nerveux, amaigrissement...). Ces mammites entraînent toujours une chute importante de production. Quelquefois, la perte d'un ou plusieurs quartiers qui conduisent à la réforme et exceptionnellement à la mort de l'animal. La sévérité et l'évolution de l'infection dépendent à la fois du pouvoir pathogène du microorganisme en cause et de l'efficacité de la défense immunitaire de l'hôte (**Faroult ,2000**).

- **Mammites subcliniques**

Il n'y a pas d'inflammation macroscopique évidente, mais l'examen du lait révèle l'existence d'une infection, une augmentation du comptage cellulaire et également une altération des propriétés chimiques du lait (**Poutrel ,1985**).

II-3- Principaux facteurs qui causent la mammite

- **La traite**

Une mauvaise hygiène de la traite ; un réglage défectueux de la machine à traire favorisant la pénétration et la propagation des microbes (**Jolly ,2007**).

- **Les traumatismes et blessures de la mamelle**

Ils sont occasionnés par la machine à traire, les barbelés... ; l'efficacité de la barrière du trayon en est amoindri (Jolly ,2007).

- **Les conditions de vie**

Malpropreté du logement, inconfort

II-4- Bactéries impliquées dans les mammites

- **Agents pathogènes majeurs**

Ils sont responsables aussi bien des mammites subcliniques que des mammites cliniques plus moins graves. Par la fréquence, la persistance ou la sévérité des infections qu'ils provoquent, trois espèces bactériennes ont une importance capitale : *S.aureus*, des espèces de Streptococcus (*agalactiae*, *dysgalactiae*, *uberis*) et des entérobactéries notamment *E. coli*, *Klebsiella sp.* On leur adjoint parfois des agents plus rares comme *Actinomyces pyogènes*, *Bacillus cereus*, *Mycoplasma bovis*, *Nocardia asteroides* (Badinand ,1994).

- **Agents pathogènes mineurs**

Ils entraînent le plus souvent une réaction modérée de la mamelle, se comportant à la limite entre les agents saprophytes et les agents pathogènes. Cependant, ils peuvent être parfois à l'origine de mammites cliniques aiguës. Il s'agit, en particulier, parmi les plus fréquents, des staphylocoques à coagulase négative, *Micrococcus varians*, *Actinomyces pyogènes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella hemolytica*, *Corynébactérium bovis*, divers Bacillus, *Cryptococcus neoformans* et des levures (Badinand ,1994).

II-5- Traitement des mammites à *S. aureus*

Les mammites à *S. aureus* peuvent être difficiles à traiter. Typiquement, le succès du traitement de la mammite est relié à plusieurs facteurs : le choix de l'antibiotique, la susceptibilité du microorganisme à l'antibiotique choisi (déterminé par CMI), la durée du traitement, l'optimisation du dosage et le statut du système immunitaire de l'animal (Erskine *et al* ,1993).

Staphylococcus aureus

II-1- Historique

Observés par **Pasteur** dans un pus de furoncle en 1880. En 1881 **Ogston** les a mis en évidence dans un abcès aigue et chronique, particulièrement au cours des suppurations. En 1884, s'était le tour de **Rosenbache** qui a pu arriver à obtenir des cultures pures de ces bactéries. Il a divisé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon la coloration des colonies (blanche ou dorée). En 1954, **Baber** a fait une relation entre les empoisonnements alimentaires à *S. aureus*, et la production de toxines (**Elliot ,2001**).

II-2- Caractère structuraux

Certains *S. aureus* sont capables de produire des polysaccharides et des protéines qui forment une microcapsule. L'excrétion de polysaccharides et de protéines capsulaires est dépendante du milieu de culture: les bactéries synthétisent une capsule lorsqu'elles se développent dans des milieux riches en sucres.

Chez les bactéries encapsulées, on note une résistance à la phagocytose et parfois une augmentation de la virulence des souches. La capsule est responsable de la formation de biofilms qui favorisent la résistance de la bactérie vis à vis du système immunitaire de l'hôte (**Euzéby ,2008**).

II-3- Caractère biochimique

S.aureus est capable de fermenter le glucose et la plupart des sucres (notamment, le mannitol et le tréhalose). La présence d'une coagulase permet d'identifier le *S.aureus*. (**Sutra et al ,1998**).

II-4- Epidémiologie

- **Réservoir**

Les principaux réservoirs de *S. aureus* sont la peau et les muqueuses de l'homme et de l'animal puisqu'il s'agit d'une bactérie de la flore commensale.

En effet, 30 à 50 % des personnes n'ayant aucun signe d'infection sont porteurs de la bactérie: il s'agit de porteurs sains. Chez l'Homme, c'est l'épithélium nasal qui est le plus chargé en *S. aureus* (**Sivaraman ,2009**).

Chez les animaux domestiques, on retrouve le portage sain cutané et au niveau de la muqueuse de l'arbre respiratoire supérieur, mais aussi au niveau de l'appareil uro-génital (Biberstein ,1984).

- **Mode de transmission**

La transmission se fait majoritairement par le biais de mains contaminées. La contamination par contact avec des sources environnementales est rare (Biberstein ,1984).

II-5- Staphylococcus aureus et les mammites bovines

S.aureus est une bactérie à gram positif vivant à la surface de la peau, y compris la peau de la mamelle et des trayons. En cas de contamination de la mamelle, on peut également la retrouver dans le parenchyme.

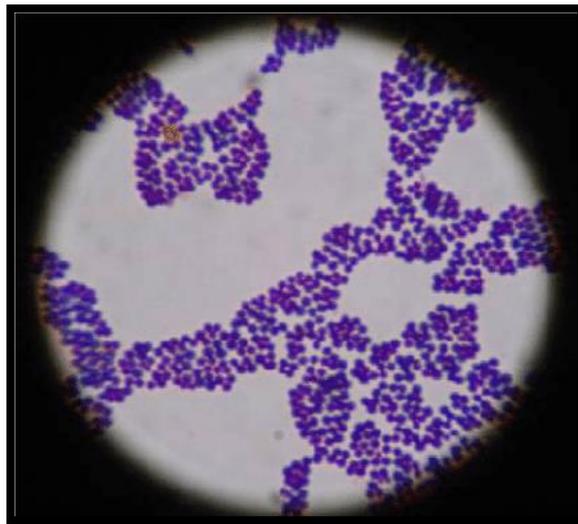


Figure 2 : Staphylococcus aureus sous microscope optique

Ce germe est connu pour sa forte contagiosité. En effet, cette bactérie se transmet principalement pendant la traite et son caractère contagieux s'explique par le fait qu'une vache infectée contamine les vaches saines par l'intermédiaire du manchon trayeur, de remontées de lait ou par l'intermédiaire des mains du trayeur. (Remy *et al* ,2010).

En présence d'infection à *S. aureus*, l'augmentation du nombre de quartiers infectés dans l'élevage est rapide, mais il faut tout de même savoir que, dans de plus rares cas, les infections à *S. aureus* sont peu contagieuses (Sommerhauser *et al* ,2003).

S.aureus a le pouvoir de pénétrer profondément dans la mamelle grâce à un équipement enzymatique performant, il peut alors s'enkyster dans le tissu mammaire. Cette bactérie a la capacité de se mettre à l'abri dans des micro-abcès et dans les cellules (**Remy et al ,2010**). Ces propriétés lui permettent de résister aux attaques du système immunitaire et de s'isoler derrière la paroi des abcès qui empêche la pénétration des antibiotiques (**Descoteaux L ,2004**). Expliquant les rechutes.

II-6- La résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques est apparue rapidement après leur introduction dans le traitement des maladies infectieuses. Cette résistance est un facteur majeur compliquant le traitement de ces infections . Parmi les bactéries multi résistantes, les *S. aureus* à cause de leur pouvoir pathogène élève et leur prévalence le milieu communautaire (**Philippon, 2008; Arnaud et al ,2012**).

- **Mécanismes généraux de résistance des bactéries aux antibiotiques**

Les bactéries ont développé différents mécanismes pour contrecarrer l'action des antibiotiques. Quatre mécanismes de résistance sont connus. (**Bisognano ,2001**):

- Production d'enzymes (ex : β -lactamase) capables d'hydrolyser les composés β -lactamines ou de modifier les aminoglycosides (par transfert de divers groupes chimiques) ce qui inactive les antibiotiques et les rend inoffensifs vis à vis de leur cible (β -lactamines, aminosides, chloramphénicol, macrolides, lincosamides, streptogramines, nitroimidazoles).
- Modification de la perméabilité, bloquant ainsi l'influx des antimicrobiens et empêchant l'accès de l'antibiotique à sa cible (changement des pores dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif) (ex : tétracycline, macrolides, quinolones).
- Augmentation de l'efflux des antibiotiques par des pompes à efflux, (ex : streptomycine, tétracyclines, fluoroquinolones, etc.) ou antiseptiques (ammoniums quaternaires, etc.).
- Substitution ou modification des cibles des antibiotiques (ex : fluoroquinolones, méthicilline, sulfamides, triméthoprim, glycopeptides).

Partie expérimentale



Matériel et méthodes

Notre étude a été effectuée au niveau du laboratoire d'amélioration et valorisation des productions animales locales et du laboratoire de microbiologie à l'ISV Tiaret, durant une période de trois mois.

I- Matériel

I-1 Echantillonnage

I-1-1- Matière végétale

Les parties aériennes (feuilles et /ou fleurs) des trois plantes ont été cueillies dans la région de Tiaret.

L'identification des plantes a été faite dans la faculté des sciences de nature et de vie à Tiaret.

Tableau 1 : Présentation des plantes employées pour l'extraction des huiles essentielles .

Nom botanique	Nom vernaculaire	Famille	Organe utilisé
<i>Thymus fontanesii</i>	Arabe : zaatar Français : thym	Lamiacées	Feuilles
<i>Eucalyptus sp</i>	Arabe : kalitous Français : eucalyptus	Myrtacées	Feuilles
<i>Lavandula sp</i>	Arabe : halhal Français : lavande	Lamiacées	Feuilles et fleurs

I-1-2-Souches bactériennes

Une souche *S.aureus* a été isolée à partir d'un lait qui a été collecté à partir d'une vache atteinte de mammite au niveau de la ferme expérimentale de l'université Ibn Khaldoun à Tiaret, suivant les étapes recommandées et en respectant les règles d'asepsie afin d'éviter la contamination du prélèvement par des germes exogènes

Une souche de référence (ATCC) a été prise du laboratoire de microbiologie de la faculté des SNV.

II- Méthodes

II-1 Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

Séchage: les parties aériennes (feuilles et/ou fleurs) des trois plantes ont été séchées en les étalant de façon homogène dans un séchoir à une température de 37°C durant 24 heures, puis on les conserve dans des sacs en papier dans un endroit sec et à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

L'extraction des HE a été effectuée par hydrodistillation. A l'aide d'un hydrodistillateur constitué d'un ballon en verre pyrex contenant la matière végétale (50g pour le thym, 60 pour les deux autres) et 600 ml d'eau distillée porté à l'ébullition sur un bec Bunsen, lors de l'apparition de la première goutte du distillat à la sortie du réfrigérant, après 1heure et 30 min on obtient un distillat dans une ampoule à décanter le distillat est formé de deux phases, une phase supérieure contenant l'huile essentielle et une phase inférieure correspondant à l'eau aromatique. Après quelques minutes de décantation, La phase huileuse est récupérée par micropipette puis on a ajouté une quantité de sulfate de sodium anhydre pour qu'il absorbe les traces d'eau restante et pour qu'on obtienne une huile pure.

Le rendement était calculé par rapport au poids sec de la matière végétale; et est exprimé par la quantité d'huile (en g) obtenue pour 100 g de matière végétale sèche (m/m) (**Salamci et al, 2007**).

$$\text{RHE}(\%) = \text{MHE} / \text{Mms} .100$$

La conservation des HE s'est faite à 4°C dans de petits flacons en verre opaque ou entourés du papier aluminium et fermé hermétiquement, pour une utilisation ultérieure.



Figure 3 : Dispositif d'hydrodistillation utilisé pour l'extraction des huiles essentielles.

ISV Tiaret.

II-2 Analyse et identification de la bactérie

- Ensemencement dans des boîtes de Pétri déjà coulées de GN et milieu Chapman avec quelques gouttes de l'échantillon du lait puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

Cette étape est suivie par :

- Un examen macroscopique pour étudier l'aspect des colonies formées, leur forme, surface et couleur pour savoir le genre.

- Un examen microscopique après une coloration de Gram, afin de déterminer leur type de Gram et autres caractères morphologiques (espèce)

- Pré-enrichissement dans un BN. Après une incubation à 37°C pendant 24 heures on a fait un isolement sur milieu Chapman et GN et par la suite un repiquage des souches isolées sur milieu Chapman, met dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

- **Test de catalase** : prélèvement d'une colonie et sa mise sur une lame, on ajoute une goutte de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). (**Garnier et Denis ,2007**). La réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (oxygène).

- **Test de DNase** : ensemencer les cultures fraîches sur une gélose a ADN par stries, incuber 18 – 24 heures entre 35 – 37 °C. Après, on recouvre la boîte avec de l'acide chlorhydrique (HCL) après 5 min on aura l'apparition d'un halo claire au tour de la strie ce qui indique la présence d'une DNase.

- **Test de coagulase** : permet de mettre en évidence le pouvoir de staphylocoques à produire la coagulase (**Hulya et al ,2006**). Une colonie prélevée du milieu Chapman est incubée dans 5 ml de BHIB à 37°C pendant 24 heures, mélangée avec 0,5ml de plasma citraté dans un tube a hémolyse stérile après 4 heures puis 18 heures la lecture doit être effectuée (**Hulya et al ,2006**). S'il y a formation d'un coagulat la souche est *S.aureus*

- **La galerie APi20** nous a permis de confirmer que la souche s'agit de *S.aureus*.

II-3 Antibiogramme

La sensibilité de cette souche à la pénicilline a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose MH suivant les recommandations de *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010)*.

➤ Des disques de pénicilline ont été disposés sur la gélose MH préalablement ensemencée avec la souche par la méthode d'écouvillonnage.

- Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés en mm, l'interprétation des résultats obtenus se réfère aux critères définis par **CLSI (2010)**.

II-4 Aromatogramme

L'évaluation de l'activité antibactérienne des HE a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide (**Abu-Darwish et al. 2012**).

- Des disques de papier Wattman N°1 de 6 mm de diamètre ont été préparés, mis dans un bocal en verre hermétiquement fermé stérilisés dans un autoclave puis déposés à égale distance de telle façon à éviter le chevauchement des zones d'inhibition à la surface des boîtes ensemencées (un disque par boîte pour le thym, trois disques par boîte pour les deux autres).
- Les disques ont été par la suite chargés avec 2 et 5 µl de l'une des huiles essentielles à l'intérieur des boîtes.
- Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 18 – 24 h. les essais ont été réalisés en triple pour chaque test et la même opération a été répétée pour chaque huile essentielle.
- Les diamètres ont été mesurés en mm et le résultat étant la moyenne des trois essais.

Détermination de la sensibilité aux huiles essentielles

La sensibilité aux différentes huiles essentielles est classée selon le diamètre de la zone d'inhibition : (**Ponce et al, 2003**)

- **Insensible (-)** si le diamètre de la zone d'inhibition est moins de 8 mm.
- **Sensible (+)** avec un diamètre compris entre 9 et 14 mm
- **Très sensible (++)** pour une zone de 15 à 19 mm.
- **Extrêmement sensible (+++)** pour une zone de plus de 20 mm.

II-5 Etude de l'association « huile essentielle / Pénicilline»

La méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de l'association HE/Pénicilline est celle de diffusion sur milieu solide. (**Toroglu, 2011**).

- Un disque de Pénicilline a été déposé au centre de chaque boîte contenant le milieu MH préalablement ensemencée.
- A l'aide d'une micropipette, 2 µl d'HE ont été déposés sur chaque disque de Pénicilline.
- Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h.
- Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré en mm. Le résultat étant la moyenne de trois essais.

Les données ont été analysées comme suit:

- **Indifférence:** les deux zones d'inhibition de l'HE seule et de l'association HE/ATB restent inchangées.
- **Antagonisme:** la zone d'inhibition de l'association HE/ATB est moins importante que celle de l'HE toute seule.
- **Synergie :** la zone d'inhibition de l'association HE/ATB est plus importante que celle de l'HE toute seule.

II-6 Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des huiles essentielles

La CMI est définie comme étant la concentration la plus faible de la substance antimicrobienne qui inhibe la croissance des micro-organismes. La détermination des CMI des HE vis-à-vis des souches étudiées a été réalisée selon la technique de microdilution sur plaques de microtitration à 96 puits (NCCLS, 1999).

- Après 24 h de culture sur gélose nutritive à 37°C, les suspensions bactériennes ont été préparées dans 5 ml de solution saline à 0,85% et ajustées à 0,5 McFarland.
- Préparation d'une solution mère des HE en utilisant du Tween 20 dissous dans de l'eau distillée stérile (1/9, v/v), à partir de laquelle on a préparé des solutions

primaires par dilution en série en utilisant du Tween 20 dissous (10%) dans des tubes à essai stériles pour atteindre des concentrations en huile essentielle de: (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 et 1/320), puis on a ajouté 0,5 ml de la solution primaire à 4,5 ml de bouillon Mueller-Hinton pour obtenir des concentrations finales de : 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, v/v des volumes de 95 µl des solutions diluées finales, et 5 µl des inocula préparés ont été distribués dans les puits de la plaque de microtitration des témoins positifs de croissance (sans huile essentielle) et des témoins négatifs de stérilité (sans bactéries) ont été réalisés. l'opération a été faite en triple .

- Après l'incubation des plaques à 37°C pendant 24 heures, on a ajouté à chaque puits, 20 µl de chlorure de 2, 3,5-triphényltétrazolium (TTC) à 0,5% pour son effet de révélation (coloration rougeâtre lors de présence de croissance bactérienne).

La CMI est la plus faible concentration en huile essentielle pour laquelle aucune croissance n'a été remarquée.

Résultats et discussion

I- Rendement en huile essentielle

Tableau 2 : Résultat des rendements.

	<i>HE du thym</i>	<i>HE de la lavande</i>	<i>HE d'eucalyptus</i>
<i>Le rendement (%)</i>	2,06	0,92	0, 51

- **Thym:** 2,06%. Ce rendement était faible par rapport à celui rapporté par **Mebarki, (2010)** qui a obtenu un rendement de 3,09%.

- **Lavande :** 0,92%. Ce résultat était en concordance avec celui trouvé par **Sidi Boulenuar et Ziane, (2003)** qui indiquent que les fleurs sèches de la lavande provenant de deux régions dans la wilaya de Tlemcen ont donné des teneurs équivalentes à 0.94% et 0.70%.

- **Eucalyptus:** 0, 51% très faible par rapport à celui obtenu par **Mendes et al, (2011)** 4,29%.

II- Identification da la bactérie

Les résultats de l'analyse et l'identification des souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir des échantillons du lait mammiteux était comme suit :

- Catalase : +
- DNase : +
- Coagulase : +

III- Antibiogramme

L'antibiogramme de vérification de la souche testée a montré qu'elle résiste à la Pénicilline. Avec une zone d'inhibition de 18 ± 0 mm alors que la zone pour laquelle on dit que la bactérie est sensible doit être supérieure ou égale à 28 mm (**MOARD, 2011**).



Figure 4 : Résultat de l'antibiogramme.

IV- Aromatogramme

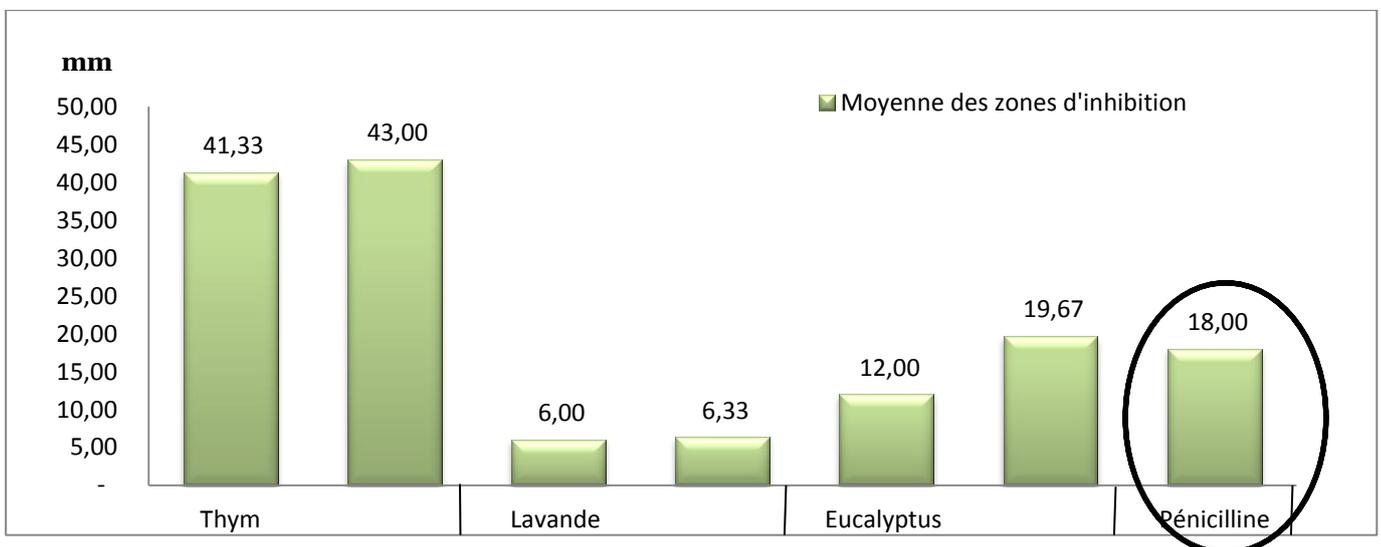


Figure 5 : Résultat de l'aromatogramme et l'antibiogramme.

L'analyse a révélé un effet antibactérien Considérable pour les HE d'*Eucalyptus sp.*, et de *Thymus fontanesii*. Cependant, l'effet diffère significativement pour l'HE de *Lavandula sp.*

L'HE de *Thymus fontanesii* s'est avérée la plus active sur cette souche avec la production d'une zone d'inhibition de $41 \pm 3,61$ mm. D'après **Ponce et al., (2003)**, la souche est extrêmement sensible à cette huile essentielle vue que les diamètres d'inhibitions étaient supérieurs à 20 mm. (Figure 5 et Figure 6).

L'HE d'*Eucalyptus sp.* a montré des zones d'inhibition de $12 \pm 2,65$ mm. (Figure 5 et Figure 7).

Par ailleurs l'HE de la lavande n'a montré aucune activité sur la souche testée. (Figure 5 et Figure 8).



Figure 6 : Résultats de l'aromatogramme de l'HE du thym.



Figure 7 : Résultats de l'aromatogramme de l'HE de l'Eucalyptus.



Figure 8 : Résultats de l'aromatogramme de l'HE de la lavande.

Le test a montré que la souche est :

- Extrêmement sensible à l'HE obtenue à partir du thym, plusieurs auteurs ont ainsi rapporté dans leurs études l'activité de cette HE sur cette souche ainsi que sur d'autres espèces, particulièrement sur *E. coli*. (Cheurfa *et al.*, 2013).
- Sensible à l'HE de l'*Eucalyptus*. Raho et Benali, 2012, ont testés l'activité de cette HE vis-à-vis de différentes souches notamment sur *E. coli*. qui a été sensible.
- Insensible à l'HE de la lavande, paradoxalement à plusieurs études. Selon (Elharas *et al.*, 2013) l'HE des fleurs de *Lavandula officinalis* inhibe la croissance de *S.aureus*.

V- Etude de l'association «huile essentielle / Pénicilline »

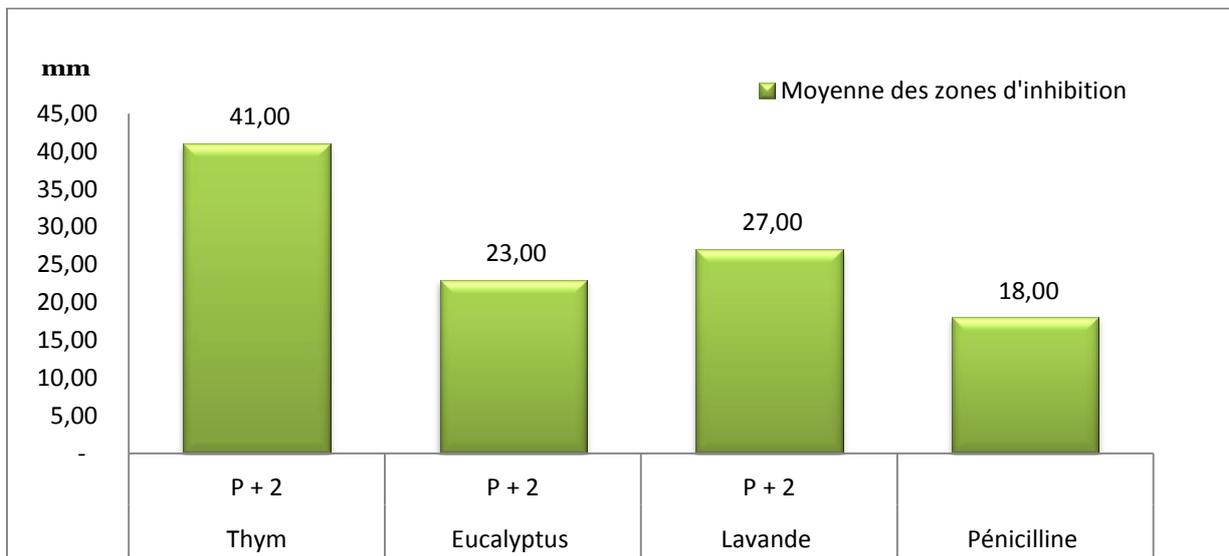


Figure 9 : Résultats de l'association huile essentielle/Pénicilline.

V-1 Effet de l'association «huile essentielle de *T.fontanesii* /Pénicilline» vis-à-vis *S.aureus*

Les deux zones d'inhibition de l'HE seule et de l'association HE/Pénicilline restent presque inchangées, pour l'HE seule $41 \pm 3,61$ mm et $41,33 \pm 5,03$ mm pour l'association. (Figure 9 et Figure 10).

Selon les résultats l'effet de l'association de la Pénicilline et l'HE de *T.fontanesii* est Indifférent.



Figure 10 : Résultat de l'effet de l'association huile essentielle de *T. fontanesii* / Pénicilline

V-2 Effet de l'association «huile essentielle d'*Eucalyptus sp.* /Pénicilline» vis-à-vis de *S.aureus*

Une augmentation des zones d'inhibitions de $12 \pm 2,65$ mm pour l'HE seule à $27 \pm 4,24$ mm pour l'association. (Figure 9 et Figure 11).

L'analyse a montré que l'association de l'HE d'*Eucalyptus sp.* donne un effet synergique considérable.



Figure 11 : Résultat de l'effet de l'association huile essentielle d'*Eucalyptus sp.* / Pénicilline

V-3 Effet de l'association «huile essentielle de *Lavandula sp.*/Pénicilline» vis-à-vis de *S.aureus*

L'accroissement des zones d'inhibition de 6 mm lors de l'utilisation de l'HE seule à 23 ±2,83 mm lors de l'association avec la Pénicilline. (Figure 9 et Figure 12) .



Figure 12 : Résultat de l'effet de l'association huile essentielle de *Lavandula sp.*/ Pénicilline

VI- Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Déterminer les valeurs de la CMI des huiles pour décrire le degré d'efficacité de l'HE du thym ainsi que celle de l'*Eucalyptus* à l'égard de *S.aureus*.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : CMI des huiles essentielles.

	CMI des huiles essentielles (µl /ml)	
	<i>Thym</i>	<i>Eucalyptus</i>
ATCC 25932	1,25	2,5
<i>Souche</i>	0,625	2,5

Les CMI des HE sont en relation avec les résultats obtenus par l'aromatogramme, autrement dit plus la zone d'inhibition est grande plus la CMI est meilleure.

Les HE de *T.fontanesii* et d'*Eucalyptus.sp* ont exercés une bonne activité inhibitrice vis-à-vis les souches bactériennes.

Les valeurs CMI obtenues par **Dob et al, 2006** sur *S.aureus* (1 µl/ml) sont différentes par rapport à celles qu'on a eu dans notre étude.

Les souches de *S.aureus* ont présenté une sensibilité à l'huile de *T. fontanesii* à des concentrations de 0,625 µl/ml pour la souche isolée du lait et de 1,25 µl/ml pour la souche ATCC 25932.

Et à l'HE d'*Eucalyptus sp*. A des concentrations de 2,5 µl/ml pour les deux souches.

Cela peut s'expliquer par la diversité moléculaire des HE qui ne réagissent pas de la même manière, la composition et les groupements fonctionnels (alcool, phénols, terpènes, et cétones) des composés ont été associés à cette activité (**Tyagui et Malik, 2011**).

L'HE du thym est riche en dérivés phénoliques (thymol et carvacrol), **Dorman et al., 2000** ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antimicrobienne contre 22 genres de bactéries testées. Selon **Farah et al., 2009**, le principal composant du thym est le thymol 67,8%.

D'après **Shapiro et al., 1995**, le fait que le thymol et le carvacrol se lient aux protéines et aux lipo-polysaccharides membranaires grâce à leurs groupe fonctionnel et font augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire bactérienne puis la mort.

Selon **Sakouhi et al., 2015**, l'activité antibactérienne d'extraits de l'huile essentielle du genre *Eucalyptus sp*. Est due aux deux composants majeurs : 1,8-cineol et α -pinene, respectivement.

L'activité antimicrobienne de l'HE de thym comme celle de l'*Eucalyptus* pourraient être attribuées aux constituants majeurs, et également à l'effet synergique entre les différents composants des HEs, y compris les constituants mineurs.

Conclusion et Recommandations

Dans ce travail, on a évalué l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus fonatanesii*, *Eucalyptus sp.* et *Lavandula sp.* sur *S.aureus* résistante à la Pénicilline

Les résultats obtenus ont montrés que les huiles de thym et *Eucalyptus* présentent un effet antibactérien élevé à l'inverse de l'huile de lavande par la méthode de diffusion sur disque.

Les résultats de l'association de l'huile essentielle du thym avec la Pénicilline a donné un effet indifférent.

L'HE d'*Eucalyptus* a présenté une interaction synergique contre *S.aureus*.

Cependant, nous avons observé que l'huile de la lavande a présenté une bonne synergie mais elle n'a pas permet à la souche de sortir de la zone de résistance, et pour rendre la bactérie sensible à cette association on doit peut être utilisé des concentrations à l'huile plus élevées. Ces résultats témoignent un grand potentiel que présentent les huiles essentielles pour accéder aux différentes cibles cellulaires de ce fait, la résistance aux antibiotiques sera limitée.

En ce qui concerne la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices par la méthode de microdilution en milieu liquide, les deux souches ont été inhibées sous l'action des deux huiles (thym et *Eucalyptus*) avec des concentrations de 0,625 et 2,5 µl/ml, respectivement.

Nous recommandons une étude de conception d'une formule médicamenteuse qui combine entre les antibiotiques et les huile essentielle présentant des effets synergiques en association et ce dans le but de lutter contre les bactéries manifestant une résistance aux agents antibactériens.

Références bibliographiques



A

1. **Abu-Darwish MS, Al-Ramamneh EM, Kyslychenko VS et Karpiuk UV.** (2012). The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak region – South of Jordan. *Pak. J. Pharm. Sci.* 25(1), 239-246.
2. **AFNOR**, 2000 Association Française de Normalisation , Normes français , huile essentielle . Ed . Afnor, Paris .
3. **Aiyegoro OA et Okoh AI.** (2009). Use of bioactive plant product in combination with standard antibiotics: Implications in antimicrobial chemotherapy. *Journal of Medicinal Plants Research.* 3(13), 1147-1152.
4. **Amarti F., Satrani B., Aafi A., Ghanmi M., Farah A., Aberchane M., El Ajjouri M., El Antry S. et Chaouch A.** (2008). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie.* 6, 342–347.
5. **Anon** ,2003 . Major groups , Families and Genera : lamiaceae (Labiatae) . *Science and Horticulture* , Royal Botanic Garden . Kew UK .
6. **Arnaud I., Jarlier V., Carbonne-Berger A., Maugat S., Bajolet O., Dumartin C., Marty N., Savey A., Sénéchal H., Coignard B. et Astagneau P.** (2012). Bactéries multirésistantes (BMR) en milieu hospitalier: entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) et *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (Sarm),Réseau BMR-Raisin, 2002-2010. 21p.

B

7. **Baba Aissa F.** (2000). Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'orient et d'occident. Edition: Librairie moderne – Rouiba: P101
8. **Badinand F.** (1994). Maîtrise du taux cellulaire du lait. *Rec.Méd. Vét* : 170-427.
9. **Baser K.H.C. and Buchbauer G.,** 2010. Handbook of essential oils: Science. Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America. 994p.
10. **Benyagoub E., Nabbou N., Sirat M., Dahlis Z.** Propriétés antibacteriennes et constituants phytochimiques des extraits de la lavande de la région de Tlemcen et leur effet sur quelques espèces bacteriennes responsables d'infection alimentaire . *Revue des bioressources* 257 (3242), 1-11, 2014.

11. **Biberstein ernstl., Jang, Spencer S., et Hirsh Dwight C.** (1984). Species distribution of coagulase-positive staphylococci in animals. *Journal of clinical microbiology*. 19 (5). 610-615.
12. **Bisognano C.** 2001. Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de *Staphylococcus aureus*: étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires. faculté des Sciences. Université de Genève. Thèses.
13. **Bosquet G., Gourreau J., Guiouillier G., Labbe, Remy J., Salat O., Scmitt V et Hubert V.** (2010). Les mammites. Edition : Guides France agricole. Paris : 259.
14. **Boudy P.** 1955. Économie forestière nord-africaine. Ed Masson et cie, Paris, Tome IV .p826
15. **Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S. et Abrini J.,** 2006 . thymus essential oils : chemical composition and in-vitro antioxidant and antibacterial activities . Congrès International de biochimie , Agadir , Maroc , 09-12 Mai 2006 .
16. **Bruneton J.** Pharmacognosie : Phytochimie : Plantes médicinales. 4e éd. Paris : Tec & Doc, 2009. 1269 p.
17. **Bruneton J.,** 1999. Pharmacognosy, phytochimie, plantes médicinales. Ed .Lavoisier, Tech et doc., 3^{ème} Ed., Paris .

C

18. **Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P. W., Castillejos L. et Ferret A.** (2007). Invited Review : Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90 (6): 2580–2595.
19. **Cheurfa M., Allem R., Sebahia M. et Belhireche S.**(2013). Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur les bactéries pathogènes responsables de gastroentérites.
20. **CLSI** (Clinical and Laboratory Standards Institute) antimicrobial susceptibility testing standards.M100-S20, Vol. 30 No. 1 remplace M100-S19, Vol. 29 No. 3.
21. **CONSEIL DE L'EUROPE.** Pharmacopée européenne en ligne 8.3. [En ligne]. [Consulté en juillet 2015]. Disponible à l'adresse : <http://online6.edqm.eu/ep803/>

D

22. **Descoteaux L.** La mammite clinique : stratégies d'intervention. In St Hyacinthe, 2004. p. 1-23.

23. **Djilani A et Dicko A.(2012). The Therapeutic Benefits of Essential Oils. Nutrition, Well Being and Health, Dr. Jaouad Bouayed (Ed.)**, ISBN: 978-953-51-0125-3, In Tech, Available from: [http://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/ the therapeutic benefits of essential oils](http://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/the-therapeutic-benefits-of-essential-oils).
24. **Dob T., Dahmane D., Benabdelkader T. et Chelghoum C.** (2006) Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Int J Aromather* 16: 95–100.
25. **Dob T., Dahmane D., Benabdelkader T. et Chelghoum C.** 2006. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus fontanesii*.
26. **Dorman D. H.G., Deans SG.** Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000, 88(2) : 308–16.
27. **Dorman D.H.G., Bachmayer O., Kosar M. et HiltunenR.,** 2004 . Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 52 , 762-770 .

E

28. **Elharas K., Daagare A., Mesifioui A., Ouhssine M.** Activité antibactérienne de l'huile essentielle des inflorescences de *Laurus Nobilis* et *Lavandula Angustifolia*.
29. **Elliot TR.** (2001). Public Health Concerns In « Applied dairy microbiology » second édition. Elmer H. March James L. Steele. Ed Mareel Dekker. New york. P 05.
30. **Erskine R.J., Kirk J.H., Tyler J.W., DeGraves F.J.** (1993). Advances in the therapy for mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 9. 499-517.
31. **Euzéby J.P.** (2008). Abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

F

32. **Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui N, Pagès J.M et Hassani L.** (2012). Antibacterial Activity of *Thymus Maroccanus* and *Thymus Broussonetii* essential oils against nosocomial infection –bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine.* 19, 464–471.
33. **Farah H., Hamadi A. L., Meziane A., Benmansour A.** Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science*, 05 : 246 – 259, (2009).

34. **Faroult B.** (2000). Les mammites subcliniques et les mammites cliniques aiguës. Maladies des bovins 3eme éditions. France. 350p.
35. **Festy D. et Dupin C.,** 2012, La lavande, c'est malin : Huile essentielle, fraîche ou séchée, découvrez les incroyables vertus de cette fleur, pour la beauté, la santé, la maison,..., Ed. Leduc's.
36. **Foudil C Y.**1991 - Etude comparative des huiles essentielles algériennes d'Eucalyptus globulus labill. Et camaldulensis.These magister. U.S.T.H.B., Alger, 159p.

G

37. **Garnero M.J.,**1977 . Problèmes rencontrés au cours de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles . In *Parfums cosmétiques* , aromes , 14, 31-40 .
38. **Garnier F., Denis F.** - Masson. Chapitre, 2007. Bactériologie médical: Techniques usuelles: Cocci à Gram positif.
39. **Goetz P et Ghedira K.** (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. Edition: Springer-Verlag France, Paris. Pp4-194, 272 p.
40. **Goetz P et Ghedira K.** (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. Edition: Springer-Verlag France, Paris. Pp4-194, 272 p
41. **Guignard J-L.** (2000). Biochimie végétale. 2ème éd. Dunod, Paris, 274 p.

H

42. **Haddaf Y., Kaloustian J., Giordan R., Regli P., Chefrou A., AbouL., Mikail C. et Portugal H.** compositions chimiques et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. et de *Thymus numidicus* Poiret d'Algerie . 6th symposium international d'aromathérapie scientifique et plantes médicinales , Grasse , France , 2004 .
43. **Hemaiswarya S., Kruthiventi K. A et Doble M.** (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 15, 639–652.
44. **Hulya T., Senay E., Dilek O.** Antibiotic resistance of *staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *Bulletin-Veterinary institute in Pulawy* 50 (1), 41, 2006.

I

45. **Inouye S.**, 2003. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part1). *International Journal of Aromatherapie*, 13, 95-107 .

J

46. **Jalas J.**, 1971 . Note of *thymus L.* (Labiatae) in Europe .I. Superspecific classification and nomenclature . *Botanical Journal Linnean Society* , 64 , 199-215 .
47. **Joly J.A.M.** (2007). Le peripartum de la vache laitiere : aspects zootechniques et sanitaire .Thèse de de Doctorat vétérinaire . Faculté de médecine de créteil. 245p.

K

48. **Kempf M., Eveillard M., Kowalczyk F., Rossines E., Panhelleux G. et Joly-Guillou M.L.**(2011). Etude de la sensibilité de 224 bactéries isolées d'infections hospitalières vis-à -vis des composés JCA 250 et JCA 251 à base d'huiles essentielles issus de la recherche. *Aroma Technologies Pathologie Biologie*. 59, 39–43.

L

49. **Lv F, Liang H, Yuan Q et Li C.** (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*. 44,3057–3064.

M

50. **Mazari K., Bendimerad N., Bekhechi C et Fernandez X.** (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea L.* and *Cupressus sempervirens L.* *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(10), 959-964, 18.
51. **Mebarki N.** Mémoire de magister. Université de Boumedès. 2010.
52. **Mendes S., Abe S.Y., Murakami F.S., Frensch G., Marques F.A. et Nakashima T.** Essential Oils from Different Plant Parts of *Eucalyptus cinerea F. Muell.* ex Benth. (Myrtaceae) as a Source of 1,8-Cineole and Their Bioactivities. *Pharmaceuticals* 2011, 4, 1535-1550.
53. **MoARD.**, 2011. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire). 6ème édition 2011. Ministry of Agriculture and Rural

Development, Ministry of Health, Population and Hospital Reform (Democratic and Popular Republic of Algeria), p. 184-185.

N

54. **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.

O

55. **Opdyke D.L.J.**(2002).Eucalyptus oil .P107.
56. **Oussou K.,Yolou S., Tue B., Kanko Bi C., Boti J., Ahibo C et Casanova J.** (2010). Etude Chimique Bio-Guidée de L'huile Essentielle de *Ocimum Gratissimum* (Lamiaceae) *Euro Journals Publishing, Inc.* p51.

P

57. **Pacchioni I.** Aromatherapia : Tout sur les huiles essentielles. Paris : Aroma Thera, 2014. 351 p.
58. **Palikan W.**, 2002, L'homme et les plantes médicinales, Tome 1, Ed. Triades
59. **Paris M. et Hurabielle M.** (1981). Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) : Généralités – Monographie. 3^{ème} ed. Tome 1. Masson, Paris, 365 p.
60. **Philippon A.** (2008). Résistance bactérienne: définition, mécanisme, évolution. EMC. (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladie infectieuse. 8-006-N-10.
61. **Pibiri MC.**, 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse Doctorat , Lausanne. Canada .177 .
62. **Ponce A.G., Fritz R., del Valle C.E. & Roura S.I.**, 2003- Antimicrobial activity of essential oils on the native microfora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36: 679-684.
63. **Poutrel B.** (1985). Généralités sur les mammites de la vache laitière. Processus infection épidémiologique diagnostique méthodes de contrôle. *Rec.Méd.Vét.* 161(67), 497- 511.

R

64. **Raho B.G. et Benali M.** (2012). Antibacterial activity of the essential oils of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (2012)739-742.
65. **Remy D, al.** Les mammites. Paris: France Agricole; 2010. 259 p.
66. **Rosato A., Piarulli M., Corbo F., Muraglia M., Carone A., Vitali M.E. et Vitali C.**(2010). In Vitro Synergistic Action of Certain Combinations of Gentamicin and Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*. 17, 3289-3295

S

67. **Sakouhi F., Sebei Kh., Herchi W., Khouja M.L. et Boukhchina S.**(2015). Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut Chemical composition and antibacterial activities of seven Eucalyptus species essential oils leaves.
68. **Salamci E., Kordali S., Kotan R., Cakir A., Kaya Y.** Chemical compositions, antimicrobial and herbicidal effects of essential oils isolated from Turkish *Tanacetum aucheranum* and *Tanacetum chiliophyllum* var. *chiliophyllum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, September 2007, Pages 569-581.
69. **Scheffer, J.J.C.** (1996). Various Methods for the Isolation of Essential Oils. *Phytotherapy Research*. 10: S6-S7.
70. **Shapiro S., Guggenheim B.** The action of thymol on oral bacteria. *Orcd Microbiol Immunol* 1995: 10: 241-246.
71. **Sidi Boulouar K et Ziane A.** (2003). Etude phytochimique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. de la région de Tlemcen. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études supérieur en biologie. Option : Biochimie. Faculté des Sciences. Univ. ABB. Tlemcen, p 54.
72. **Sivaraman, Karthikeyan, Venkataraman, Nitya et COLE, Alexander M.** (2009). *Staphylococcus aureus* nasal carriage and its contributing factors. *Future microbiology*. 999-1008.
73. **Small E. et Deutsch G.,** 2001, Herbes culinaires pour nos jardins de pays froid, Ed. CNRC.
74. **Sommerhauser J, al.** The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme.pdf. *Veterinary Microbiology*. 2003;96:91- 102.

75. **Sutra L., Federighi M., Jouve J.L.** (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Ed. Polytechnica Paris, p308.

T

76. **Tohidpoor A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A., Nazemi J.** (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against methicillin-resistant *staphylococcus aureus*(MRSA). *Phytomedicine* 17 (2), 142-145, 2010 .
77. **Toroglu S.** (2011). In-vitro antimicrobial activity and synergistic/antagonistic effect of interactions between antibiotics and some spice essential oils. *Journal of Environmental Biology.* 32 (1), 23-29.
78. **Traore N., Sidibe L., Bouare S., Harama D., Somboro A., Fofana B., Diallo D., Figueredo G., et Chalchat J.C.** Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Eucalyptus citriodora* Hook et *Eucalyptus houseana* W.Fitzg. ex Maiden. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 7(2): 800-804, ISSN 1991-8631
79. **Tyagi A., Malik A.** Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry* 126 (2011) 228–235.

v

80. **Vialard N.,** 2008, Remèdes et recettes à la lavande, Ed. Rustica.

W

81. **Warot S.**(2006). Les *Eucalyptus* utilisés en Aromathérapie .Préparatrice en pharmacie. Mémoire de fin de formation en Phyto-aromathérapie.p3
82. **Wichtl M. et Anton R.,** 1999, Plantes thérapeutiques : tradition, pratique

Z

83. **Zafar A., Shaukat S., Mahnaaz Kh., Arshiya T et Zahoor A.**(2010).Synergistic Effect of *Salvadora persica* Extracts, Tetracycline and Penicillin Against *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Basic & Applied Sciences.* 2 (1-2), 25-29.
84. **Zhiri A. et Baudoux D.,**(2008).les huiles essentielles chémotyées :ISBN :2-919905-27-9 Edition Inspir Development. P7,P38.

