

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid IBn Badis
Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

BOUZIANE ECHAIMA

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Production et transformation laitières

THÈME

Etude expérimentale de l'effet thérapeutique de
l'huile de *pélargonium gravelens* contre les
infections mammaires bovins par *Staphylococcus*
aureus

Soutenue publiquement :09/07/2019

Devant les membres du jury

Président	Mr. BOUCHERF.D	Docent	U. Mostaganem
Examinatrice	Mme. HENNI .N	Maitre assistant	U. Mostaganem
Encadreur	Mme. RECHIDI-SIDHOUM .N	Maitre assistant	U. Mostaganem
Co-encadreur	Mr. DAHOU.A	Maitre assistant	U. Mostaganem
Invité d'honneur	Mr. BENBOUZIANE.A	Maitre assistant	U. Mostaganem

Travail réalisé au laboratoire des Sciences et Technique de production Animales

Année universitaire 2018-2019

Remerciements

*En toute simplicité, nous tenons à remercier Allah de nous
Avoir guidé, aidé et éclairé notre chemin.*

*Au terme de ce travail nous tenons à remercier en premier lieu notre directrice
de mémoire Dr RECHIDI-SIDHOUM.N et notre co-directeur de mémoire Dr
DAHOU.A de nous avoir accompagné durant cette recherche, pour leurs
orientations, leurs encouragements et surtout pour leurs précieux conseils.*

Nous tenons à remercier les membres du jury :

Dr BOUCHERF.D pour avoir accepté de présider ce jury,

Mme HENNI.N pour avoir accepté d'examiner notre travail.

*Nous tenons également à exprimer notre reconnaissance et notre sincère
gratitude à tous les enseignants qui nous ont accompagnés
durant ce cursus universitaire.*

*Finalement, il nous est agréable d'adresser nos remerciements à tous ceux qui
ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste
travail.*

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit récolté après tant d'années d'efforts :

A mon cher papa pour ses précieux conseils et encouragements, aucune dédicace ne saura exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai pour toi.

A ma très chère Maman et meilleure amie, qui a œuvré pour ma réussite, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

A Mon très cher Mari Amine, je te remercie pour tout le soutien exemplaire que tu me portes et pour tes encouragements.

A Mes chères sœurs Asma, Ikrame, Ghizlène pour vos encouragements et le soutien que vous me portez et, à mon beau frère Mehdi, sans votre aide ma vie n'aurait pas eu de goût.

A Mon très cher frère, adorable Mohamed Illyés.

A Ma chère belle-mère Mme Siam wahiba.

A toutes mes amies sans exception.

A tous les étudiants de ma promotion et à mes enseignants.

A Ma chère cousine Esmahene et son mari Mr Benbouziane.

Echaima

Résumé :

Les mammites restent au début du XXIème siècle un des fléaux majeurs de l'élevage laitier. Elles constituent une pathologie majeure de l'élevage laitier aussi bien par leur fréquence que par les pertes qu'elles entraînent. Notre étude a pour objectif de déterminer l'efficacité expérimentale de l'effet thérapeutique de l'huile essentielle de *pélargonium graveolens* contre les infections mammaires bovines due au *staphylococcus aureus*. Deux souches d'origines différentes (souche d'origine clinique et souche de référence) sont utilisées dans cette étude pour l'évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la plante médicinales *Géranium rosat*, extraite par hydrodistillation. L'activité de l'huile essentielle a été comparée à celle de l'action de quatre antibiotiques vis-à-vis des souches de *staphylococcus aureus* (d'origine clinique est la souche de références). Ils ont été testés pour leur pouvoir antibactérien par la méthode des disques. Les résultats des activités antimicrobiennes ont démontré que le huile essentielle de *pélargonium graveolens* à une concentration de 4µl à 6µl, présente une bonne activité inhibitrice, avec une action bactéricide et un traitement curative, très rapide par rapports à la dose de 2µl pour un traitement étalée en 4fois. Par contre, les quatre antibiotiques, n'ont qu'une activité de blocage et une sensibilité moins rapide envers les deux souches *staphylocoques aureus* (référence et clinique). D'après les résultat obtenus, on note que le géranium a présenté la meilleure activité antimicrobienne est on peut conclure que l'huiles essentielle de *Géranium rosat* a une activité antibactérienne plus rapide que les antibiotiques envers la souche bactérienne *staphylococcus aureus* d'origine clinique et la souche de référence.

Mots clés : Antibiotique, activité antibactérienne, huile essentielle, *pélargonium graveolens*, *Staphylococcus aureus*.

Abstract :

Mastitis remains at the beginning of the 21st century one of the major plagues of dairy farming. They constitute a major pathology of the dairy farming as well by their frequency as by the losses which they entail. Our study has for objective to determine the experimental study of the therapeutic effect of the essential oil of pelargonium gravelens against the Bovine mammary infections due to Staphylococcus aureus. Two strains from different origins (strain of clinical origin and reference strain) are used in this study for the in vitro evaluation of the antibacterial activity of the essential oil of the medicinal plant Geranium rosat. extracted by hydrodistillation. The activity of the essential oil was compared with that of the action of four antibiotics vis-à-vis Staphylococcus aureus strains (clinical origin is the strain of references). They have been tested for their antibacterial power by the disc method. The results of the antimicrobial activities demonstrated that the essential oil of pelargonium gravelens at a concentration of 4µl to 6µl, has a good inhibitory activity, with a bactericidal action and a curative treatment, very fast compared to the dose of 2µl for a spread treatment in 4 times. On the other hand, the four antibiotics, have only a blocking activity and a less rapid sensitivity towards the two strains staphylococcus aureus (reference and clinical). From the results obtained, geranium has been shown to have the best antimicrobial activity and it can be concluded that essential oils of Geranium rosat have a faster antibacterial activity than antibiotics against the bacterial strain staphylococcus aureus of clinical origin and the reference strain.

Keywords: Antibiotic, antibacterial activity, essential oil, pelargonium gravelens, Staphylococcus aureus.

ملخص

لا يزال التهاب الضرع في بداية القرن الحادي والعشرين أحد الأوبئة الرئيسية في زراعة الألبان. إنها تشكل مرضًا رئيسيًا في زراعة الألبان بالإضافة إلى تواترها والخسائر التي تنطوي عليها ، حيث تهدف دراستنا إلى تحديد الدراسة التجريبية للتأثير العلاجي للزيوت الأساسية لحجر البيلارونيوم ضد الالتهابات الثديية الناجمة عن المكورات العنقودية الذهبية. تم استخدام سلالتين من أصول مختلفة (سلالة من أصل سريري وسلالة مرجعية) في هذه الدراسة للتقييم في المختبر للنشاط تم مقارنة نشاط الزيت العطري مع المضاد للبكتيريا من الزيوت الأساسية للنبات الطبي إبرة الراعي. المستخرجة بواسطة نشاط أربعة مضادات حيوية تجاه سلالات المكورات العنقودية الذهبية (الأصل السري و سلالة المراجع). لقد تم اختبارها من أجل قوتها المضادة للبكتيريا بواسطة طريقة القرص. أظهرت نتائج الأنشطة المضادة للميكروبات أن الزيوت العطرية من حصى البيلارونيوم بتركيز من 4 ميكرو لتر إلى 6 ميكرو لتر ، لها نشاط تثبيطي جيد ، مع عمل مبيد للجراثيم وعلاج سريع جداً مقارنة بجرعة 2 ميكرو لتر لعلاج انتشار في 4 مرات. من ناحية أخرى ، فإن المضادات الحيوية الأربعة لها نشاط مانع فقط وحساسية أقل تجاه السلالة المكورات العنقودية الذهبية (المرجع والسري). من النتائج التي تم الحصول عليها ، تبين أن إبرة الراعي لديها أفضل نشاط مضاد للميكروبات ، ويمكن أن نستنتج أن الزيوت العطرية من روس إبرة الراعي لها نشاط مضاد للجراثيم أسرع من المضادات الحيوية ضد المكورات العنقودية الذهبية (سلالة المرجعية وسلالة اصل السريرية

الكلمات المفتاحية: المضادات الحيوية ، النشاط المضاد للبكتيريا ، الزيت العطري ، حصى البيلارونيوم ، المكورات العنقودية الذهبية.

Liste des abréviations, des sigles et acronymes

ATB : Antibiotique

ATCC: American Type Culture Collection

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CMI : Concentrations Minimales Inhibitrices

HEPG : Huile essentielle *Pélargonium graveolens*

HE : Huile Essentielle

MDR : multi résistance aux antibiotiques

PAM : Plantes aromatiques et médicinales

PB : Paires de bases

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PLP : Protéine liant Pénicilline

m/z : masse/charge

PIA : Polysaccharide intercellulaire adhésion

PVI : Povidone iodée

SCP : Staphylocoques à Coagulase Positif

UFC/ml : Unité Formant Colonie par millilitre

UV : Ultraviolet

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Désignations de l'huile de géranium	42
Tableau N°2 : Classification botanique de la plante de géranium rosat	43
Tableau N°3 : Propriétés organoleptique de l'huile de géranium.....	43
Tableau N°4 : Aspect macroscopique de la bactérie <i>staphylocoque aureus</i>	47
Tableau N°5 : Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques	52
Tableau N°6 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle	58
Tableau N°7 : Composition de le milieux Chapman.....	66
Tableau N°8 : Composant de le milieux PCA(Plate-count Agar).....	67

Liste des figures

Figure 01: Traitements des infections mammaires.....	24
Figure 02 Classes des constituants chimiques des huiles essentielles.....	28
Figure 03 : Distillation par entrainement à la vapeur d'eau.....	30
Figure 04 : Alambic à l'hydrodistillation	30
Figure 05: Extraction par pression à froid ou expression.....	31
Figure 06: Extraction par solvant.....	32
Figure 07 : Extraction par le CO2 supercritique (CO2)	32
Figure 08 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne	35
Figure 9 :Revivification de les deux souches bacterinne stpylocoque aureus.....	51
Figure 10 : Vérification de la pureté de S. aureus de références.....	52
Figure 11 : Vérification de la pureté de S. aureus d'origine clinique.....	52
Figure 12 : la formation de bulles de gaz par le teste catalase.....	53
Figure 13 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100) par la Coloration de gram de la souche d'origine clinique et la souche de référence	52
Figure14 : teste coagulase par le plasma de la souche bactérienne <i>staphylocoque aureus</i> (d'origine clinique et de référence)	53
Figure15: teste oxydase des souches <i>staphylocoques aureus</i> d'origine clinique et de référence.....	54
Figure16 : Evaluation de l'activité antibactérienne <i>staphylocoque aureus</i> testées par antibiogramme de l'antibiotique (tétracycline et l'Amoxicilline) après 5 jours.....	55

Figure17 : Evaluation de l'activité antibactérienne *staphylocoque aureus* testées par antibiogramme de l'antibiotique (vancomycine et gentamicine) après 5jours56

Figure 18:Evaluation de l'activité antibactérienne *staphylocoque aureus* testées par antibiogramme de l'antibiotique (Amoxicilline et tétracycline) après 12 jours57

Figure 19:Evaluation de l'activité antibactérienne *staphylocoque aureus* testées par antibiogramme de l'antibiotique (vancomycine et gentamicine) après 12 jours58

Figure 20 : Evaluation de l'activité antibactérienne *staphylocoque aureus* testées par antibiogramme de l'huile essentielle de géranium après 5jours.....59

Figure 21 : Evaluation de l'activité antibactérienne *staphylocoque aureus* testées par antibiogramme de l'huile essentielle de géranium après 12 jours60

Table de matière

Résumé

Liste des abréviations, sigles et acronymes

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des annexes

Introduction..... 11

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

I- Infections mammaires.....14

1- Causes des infections mammaires14

2- Présentation des souches responsables des infections mammaires16

2-1- Bactéries pathogènes Majeurs16

2-1-1- *Staphylococcus aureus*.....17

2-1-2- *Escherichia coli* 17

2-1-3- *Streptococcus uberis*18

2-1-4- *Staphylocoques à coagulase négative*.....18

2-1-5- *Corynebacterium bovis*20

2-2- Autres bactéries pathogènes mineures21

3-Rôle pathogène21

II - Infections à *staphylocoques aureus*21

1- Généralités 21

2 -Caractères morphologiques et culturaux.....	22
3 -Caractères biochimiques	22
4- Caractères antigéniques	22
5-Pouvoir pathogène.....	23
5-1-Substances élaborées.....	23
5-2- Physiopathologie de l'infection mammaire à <i>Staphylococcus aureus</i>	23

II-Généralité sur les antibiotiques

1- Antibiotiques des infections mammaires.....	23
2- Schéma de traitement des infections mammaires.....	24
3- Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques en infection mammaire.....	25

Chapitre 2 : Produits naturels et infections mammaires

I. Généralité sur les plantes médicinales et aromatiques.....	26
I-1- Définition Les plantes médicinales et L'aromathérapie	26
I-1-1-Plantes médicinales.....	26
I-1-2-Aromathérapie.....	26
I-2- Généralités sur les huiles essentielles	27
I-3- Définition des huiles essentielles	27
I-4- Composition des huiles essentielles.....	28
I-5-Méthodes utilisées d'extractions des huiles essentielles.....	29
I-5-1- Distillation et entrainement à la vapeur	29
I-5-2-Hydrodistillation.....	30
I-5-3-Expression à froid (E).....	31
I-5-4-Extraction par solvants volatils.....	31

I-5-5-Extraction par le CO2 supercritique (CO2)	32
I-5-6-Extraction par enfleurage	33
I-6- Activité antimicrobienne	33
I-7- Mécanismes d'action des huiles essentielles	34
I-8- Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne	35
I-8-1- Définition de l'aromatogramme	35
I-8-2- Méthode du puits ou cylindre	36
I-8-3- Méthode de dilution	36
I-9- Méthodes de détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice	36
I-9-1- Dilution en bouillon	36
I-9-1-1-Méthode de macro dilution	36
I-9-1-2-Méthode de micro dilution	37
I-9-2-Dilution en gélose	37
I-9-3- Méthode de diffusion et de dilution	37
I-9-3-1- E-test	37
I-10- Domaines d'utilisation des huiles essentielles	37
I-10-1-Pharmacie	37
I-10-2-Parfumerie	39
I-10-3-Industrie Agro-alimentaire	39
I-10-4-Diverses industries	39
I-11-Principales voies d'utilisation des huiles essentielles	39
I-11-1-Voies d'administration et posologie	39

I-11-1-1- Voie orale.....	39
I-11-1-2- Voie cutanée.....	40
I-11-1-3- Voie respiratoire.....	41
I-11-1-4- Voie rectale.....	41
I-11-1-5- Autres voies.....	42
I-12.Monographie des plantes sélectionnées.....	43
I.13.Propriétés inhibitrices des produits naturels vis-à-vis des infections mammaires..	43

Synthèse expérimentale

Chapitre 1 :

Lieux de notre étude	45
Objectif.....	45
I-Matériel et Méthodes	45
1-Matériel	45
I-1-1- Matériel microbien.....	45
Origine des souches	45
Souches de références	45
Souches d'origine clinique.....	45
I-1-2.Matériel végétal	
Huiles essentielles extraites.....	45
Culture des souches.....	46
2-Méthode	46
1-Revivification du <i>staphylocoque aureus</i>	46
2-Examen bactériologique	46
- Vérification de la pureté de <i>S. aureus</i>	46
3-Examens macroscopiques et microscopiques	46

3-1-Examens macroscopiques	46
3-2-Examen microscopique	47
2-La coloration de gram	47
3-teste biochimique	
1-Le teste de catalase.....	47
2-le teste de coagulase	47
3-Le teste d'oxydase	48
4-Antibiogramme	48
4-1- Evaluation de l'activité antibactérienne	48
4-2- Étude de la combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques	49
Chapitre 2 :	
Résultats et discussion	
I-Revivification du <i>Staphylocoque aureus</i>	51
II- Examen bactériologique	51
II-1-vérification de la pureté de S. aureus	52
II-2-Examens macroscopiques et microscopiques :	
2- Coloration de gram	52
Teste biochimique	
1- Teste de catalase.....	53
2- Teste coagulase.....	53
3- Teste oxydase	54
III- L'antibiogramme	54
III-1-L' Evaluation de l'activité antibactérienne	54
III-1-1-Résultats est discussion après la duré de 5jours a 12 jours	55
III-2-Etude de la comparaison « huile essentielle/antibiotique »	63
Conclusion	65
Annexes	66
Références bibliographiques	68

INTRODUCTION

Introduction

Introduction :

Les mammites restent au début du XXIème siècle un des fléaux majeurs de l'élevage laitier. Elles constituent une pathologie majeure de l'élevage laitier aussi bien par leur fréquence que par les pertes qu'elles entraînent. (Fourichon *et al*,1997), L'infection intra mammaire se définit par la présence et la multiplication d'une population bactérienne dans un ou plusieurs quartiers de la mamelle. Elle est suivie, le plus souvent, par une réaction inflammatoire à l'origine de lésions du tissu mammaire. Ces dernières s'accompagnent d'une augmentation de la perméabilité entre le compartiment sanguin et le lait qui a pour conséquence des modifications de la composition du lait (Rainard et Poutrel,1993), D'un point de vue clinique, deux types d'infection intra mammaire peuvent être distingués : dans certains cas, l'inflammation peut être révélée par l'expression de signes cliniques plus ou moins marqués.

En Algérie, comme dans la plupart des pays, les mammites bovines constituent une pathologie dominante dans les élevages bovins laitiers. Cependant malgré la fréquence des mammites sub-cliniques et cliniques dans les élevages bovins laitiers dans les élevages algériens(Niaretal., 2000 ; Bouazizetal., 2000, Benmounah, 2002 ; Heleili, 2003),il faut signaler le manque d'études approfondies, indispensables pour cerner les facteurs de risque associés à ces infections mammaires ainsi que la connaissance des bactéries responsables. La connaissance précise de la fréquence des germes responsables de mammites chez la vache est indispensable pour la définition et l'adaptation des programmes de maîtrise des mammites aux différentes situations épidémiologiques. De ce fait, il devient nécessaire de mettre en place des enquêtes épidémiologiques.

La rareté des données sur les infections mammaires nous a incité à mener une étude globale afin de contribuer à une meilleure connaissance des mammites cliniques et sub-cliniques de la vache laitière. En effet, la présente étude a pour objectif de :

- ✓ Estimer l'importance des mammites cliniques et sub-cliniques ;
- ✓ Déterminer la nature et la fréquence des germes responsables de ces infections ;
- ✓ Mettre en évidence les différents facteurs susceptibles d'augmenter le risque d'infections intra-mammaires ;
- ✓ Etudier l'antibiorésistance *in vitro* des germes isolés de lait de mammites ;
- ✓ Apprécier l'efficacité d'un traitement hors lactation de la vache laitière.

Introduction

Classiquement, la base du traitement des mammites est l'antibiothérapie. La consommation des antibiotiques en élevage laitier est d'ailleurs majoritairement due aux traitements des mammites, Dans le contexte du plan Eco-Anti- Bio 2012-2017 et de la préoccupation grandissante contre l'antibio résistance, du changement des attentes sociétales et de la forte augmentation des conversions en agriculture biologique(BourachoTmathilde.2017), les solutions possibles apportées par les médecines complémentaires et le développement de la prévention contre les maladies constituent les pistes principales pour diminuer la consommation d'antibiotiques et pour favoriser leur utilisation raisonnée.

Depuis quelques années, 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 confère des rôles et des propriétés biologiques très variés, ainsi qu'une utilisation moins dommageable, car ils n'ont pas d'effets secondaire(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 (Amartietal., 2010; Rosato *etal.*, 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 (Rosatoetal., 2010 ; Zafaretal.,2010.).

De ce fait, l'objectif de notre étude est de mettre en évidence l'effet thérapeutique des huiles essentiels contre les infections mammaires de souches bactériennes :*Staphylococcus aureus* et leurs comparative aux antibiotiques

Pour cela nous optons pour la méthodologie suivante :

- ✓ Mise en évidence de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode d'antibiogramme .
- ✓ Etude la comparaison entre huiles essentielle/antibiotiques par la méthode des disques .

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1
GÉNÉRALITÉS SUR LES
INFECTIONS MAMMAIRES ET LES
ANTIBIOTIQUES

Chapitre 1: Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

I-Synthèse bibliographique :

Chapitre 1 : les infections mammaires :

1- Les causes des infections mammaires :

Le problème de mammite est difficile à cerner, trois facteurs essentiels ont été impliqués dans les infections mammaires chez la vache. Les microorganismes sont responsables de l'infection mais pour que ceux-ci entrent dans les glandes mammaires et qu'ils s'établissent au point de provoquer une infection, une série de facteurs peuvent intervenir. Les facteurs liés à l'animal et à son environnement sont jugés comme des facteurs favorisant (Medefouni et Bendib, 2006), Il existe aussi des sites de prédilection ou réservoir primaires dans les quels les germes se développent. Les germes responsables d'infections sub-cliniques se développent essentiellement dans les mamelles infectées et les lésions des trayons. Les Entérobactéries et certains *Streptocoques* ont pour réservoir primaire la litière. A partir de ces réservoirs primaires, les germes peuvent occuper de façon transitoire d'autres sites ou réservoirs secondaires, les bactéries qui se développent dans les mamelles se retrouvent également dans le matériel de traite. Certains facteurs favorisent la persistance ou la multiplication des germes dans les réservoirs (Federici, 1988), Les concentrations cellulaires somatiques du lait dans le tank constituent un des critères de paiement du lait. Les infections mammaires peuvent engendrer une augmentation de ces concentrations cellulaires induisant alors des pénalités sur le paiement du lait (Gallois d. 2016).

En effet, quand la qualité du lait devient un problème au niveau du troupeau, un audit de qualité du lait s'impose. (Francoz d, 2014), Le vétérinaire est souvent sollicité dans les cas suivants : entrée dans le champ de menace réglementaire de l'arrêt de collecte du lait, constatation d'une élévation récente et durable des concentrations en cellules somatiques du lait de troupeau, flambée des cas cliniques, combinaison de ces situations ou encore audit de santé plus global intégrant les mammites (Roussel 2011). L'analyse des documents a lieu au préalable et permet d'identifier le mode de transmission des mammites, puis le vétérinaire se rend sur l'exploitation à l'heure habituelle de la traite afin de réaliser la visite de traite. L'objectif est de déterminer le ou les facteurs de risques responsables (logement, équipement de traite, procédures de traite, gestion d'élevage, bactéries présentes dans le troupeau)

Chapitre 1: Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

(Foucras,2012). Ces facteurs sont ensuite hiérarchisés et enfin un plan d'action avec des points de contrôle clairs est proposé à l'éleveur(Seegers ,2002).

Une mammite est une inflammation de la mamelle dont l'origine la plus fréquente est infectieuse par pénétration d'une bactérie dans le quartier par le canal du trayon (Zoetis,2016), Il s'agit d'une affection fréquente chez les vaches laitières. Seule l'origine infectieuse sera étudiée dans cette thèse mais il faut savoir qu'il peut exister également une origine traumatique ou toxique (looper ,2017).On peut différencier les mammites cliniques des mammites subcliniques.

Une mammite clinique entraîne une modification de l'aspect du lait (sécrétions lactées plus aqueuses, présence de grumeaux) avec présence ou non de signes locaux sur la mamelle (signes de l'inflammation : enflure, douleur, rougeur, chaleur) et de signes généraux (fièvre, déshydratation, baisse d'appétit, faiblesse) (Descoteaux,2004). Il existe d'ailleurs une classification pour les mammites cliniques :

- Grade 1, seule la sécrétion de lait est anormale
- Grade 2, en plus d'une sécrétion anormale, le quartier affecté est visuellement anormal (présence d'une inflammation)
- Grade 3, en plus des signes décrits précédemment, il y a une atteinte de l'état général de la vache (diminution de l'appétit, dépression, fièvre) (Baillargeon ,2010).

Une mammite subclinique se manifeste par une augmentation du comptage cellulaire somatique individuel ou du quartier (Remy ,2010) sans symptôme visualisable par l'éleveur. D'autres manifestations peuvent être observées lors d'une mammite subclinique comme une augmentation de la conductivité du lait ou la présence de bactéries dans le lait. Ainsi, une mammite clinique est facilement identifiable grâce à l'aspect des sécrétions lactées, et éventuellement grâce à la présence de signes locaux et généraux. Au contraire, une mammite subclinique n'est pas facile à détecter. On se base donc en particulier sur les concentrations cellulaires dont l'augmentation traduit la réponse immunitaire due à l'agression de la glande mammaire, avec un seuil fixé à 200 000 cellules/ml. Une vache dont le comptage cellulaire est supérieur à 200 000 cellules/ml est donc considérée comme atteinte. Néanmoins, ce critère n'est pas parfait. En effet, les concentrations cellulaires somatiques du lait des vaches saines varient selon l'âge, le

Chapitre 1: Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

nombre de jour de lactation, la saison, le statut hormonal... Il est donc impossible de définir un niveau de comptage cellulaire réellement normal même si le seuil fixé à 200 000 Cellulose/ml semble être le plus adapté (Schukken ,2012).

D'ailleurs, une étude réalisée par l'ODHIC (Ontario Dairy Herd Improvement Corporation) rappelle que, quel que soit le seuil utilisé pour classer une vache, certaines vaches seront toujours mal classées mais qu'il semble qu'un niveau de 200 000cellules/ml donne un taux de succès raisonnable (Maaou, élevages, 2016).

De nombreux facteurs influencent la présence de mammites dans un troupeau, ce sont les facteurs de risques. En effet, le nombre d'infection risque de grimper si l'exposition des trayons et mamelles aux agents pathogènes est augmentée, si on favorise l'entrée des pathogènes au travers du trayon ou si un stress ou une alimentation inadaptée induisent une baisse des défenses immunitaires de la vache (Levesque ,2006).

2-Présentation des souches responsables des infections mammaires:

Les agents pathogènes responsables de mammites peuvent être classés en deux catégories, les agents pathogènes majeurs et les agents pathogènes mineurs.

Les germes pathogènes majeurs sont potentiellement responsables de mammites cliniques. Ce sont les germes les plus virulents. C'est le cas de *Staphylocoques aureus*, *Escherichia coli*, les *streptocoques* (notamment *Streptocoques uberis*). Ils représentent 86% des germes responsables de mammites cliniques(Argente,2005). Dans de plus rare cas, on retrouve *Trueperella pyogenes*, *Klebsiella sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, des mycobactéries, mycoplasmes, brucelles, levures, algues. Ils sont parfois responsables de sévères réactions locales, d'une forte hausse des concentrations cellulaires somatiques, d'une baisse de production, et même parfois de la mort de la vache(Reyher ,2010).

Les germes pathogènes mineurs sont rarement responsables de mammites cliniques (Remy,2010). C'est le cas des staphylocoques à coagulase négative et *Corynebacterium bovis*(Reyher ,2010) .

Selon certains auteurs, les germes pathogènes majeurs ont une plus forte importance économique et épidémiologique (Baillargeon,2005). Cette affirmation peut être discutée. Une étude réalisée par (Tenhagen ,2006) montre que, sur des prélèvements de lait réalisés sur des vaches cliniquement saines, les pathogènes les plus fréquemment isolés sont des pathogènes mineurs, à savoir les staphylocoques à coagulase négative et *Corynebacterium*

Chapitre 1: Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

bovis. Il aurait été intéressant d'avoir des informations sur les concentrations cellulaires somatiques des vaches pour lesquelles ces germes ont été isolés dans le lait. On aurait alors pu savoir si ces germes étaient éventuellement responsables de mammites subclinique avec augmentation des concentrations cellulaires somatiques du lait et donc s'ils avaient une importance économique et épidémiologique. De plus, selon PYORALA (Tenhagen, 2006), les staphylocoques à coagulase négative sont devenus des germes couramment isolés lors de mammites, ils sont d'ailleurs décrits comme des agents pathogènes émergents. On peut retenir que les germes pathogènes majeurs sembleraient avoir une plus forte importance économique et épidémiologique tout en sachant que les staphylocoques à coagulase négative sont de plus en plus présents et isolés et donc risquent de gagner en importance.

Il faut également noter que les bactéries à gram négatif engendrent une baisse de production deux à trois fois plus importante que les bactéries à gram positif (Baillargeon, 2010).

Les caractéristiques des principaux germes seront détaillées ci-dessous. Elles sont en effet essentielles à la compréhension de l'analyse des documents puisque ces caractéristiques peuvent être reliées lors de l'analyse au mode de transmission des germes concernés.

2-1- Bactéries pathogènes Majeurs

2-1-1-Staphylococcus aureus :

Staphylococcus aureus représente l'espèce la plus largement incriminée dans les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), elle appartient au groupe des staphylocoques à coagulase positive. C'est une bactérie en forme de coque, immobile sphérique, Gram positif, associée par groupes en amas (grappe de raisin) ou en chaînes. D'environ 1 micromètre de diamètre, aéroanaérobie facultative, thermosensible, qui requiert des températures de croissance comprises ; entre 6 et 46°C (avec optimum à 37°C). C'est une bactérie neutrophile (croissance entre pH 4 et 9,8) qui survit dans les aliments déshydratés et/ou congelés, sa croissance peut être inhibée par la présence de flores de compétition présentes dans les aliments. Son rôle pathogène en toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est lié à entérostomies staphylococciques. (Belaidouni, 2017) .

2-1-2 Escherichia coli :

Théodor Escherichia , médecin Allemand fut en 1885 l'inventeur d'une bactérie particulière bacterium coli commune qui sera appelée plus tard Escherichia coli. Depuis plus d'un siècle, il est connu que Escherichia coli est un hôte normal de la flore digestive de l'homme et de

Chapitre1: Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

nombreuses espèces animale souvent retrouvés en petit nombres dans les urines saines, c'est une bactéries largement répandue dans le milieu extérieur; elle ne semble cependant pas pouvoir y mener une vie saprophyte authentique : sa présence en quantité importante témoigne d'une contamination fécale récente . Elle fait partie du groupe des Entérobactéries. Cette bactérie constitue une espèce aérobie quantitativement la plus importante à raison de 10⁷ à 10⁹ corps bactériens par gamme dans le caecum ou le rumen. Elles sont largement utilisées en génie génétique, Des travaux ont permis d'insérer l'ADN d'organismes étrangers dans ses plasmides et ses bactériophages. (Belaidouni,2017).

2-1-3- *Streptococcus uberis* :

Streptococcus uberis est une bactérie à gram positif, ubiquitaire. En effet, cette bactérie est d'origine digestive, on la retrouve donc inévitablement dans la litière, mais elle peut persister à la surface de la peau de la mamelle et des trayons. En cas de contamination, on peut retrouver cette bactérie au niveau de l'épithélium mammaire. Cette bactérie peut parfois s'implanter profondément dans la mamelle (Remy ,2010).

Ce germe est responsable de mammites cliniques ou subclinique se déclenchant surtout pendant le tarissement ou pendant les premières semaines de lactation. Il faut porter une attention particulière aux conditions de logements des génisses et des vaches taries(Hanzen ,2009). Les cas cliniques sont de sévérité moyenne, avec rarement des signes généraux. En général, il n'y a pas d'élévation préalable des concentrations cellulaires somatiques mais l'infection est suivie d'une élévation de la concentration cellulaire assez persistante, répondant assez bien au traitement(Seegers ,2002).

2-1-4-*Staphylocoques à coagulase négative* :

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont des bactéries à gram positif vivant dans l'environnement. Leur prévalence est de plus en plus forte, ils sont décrits comme des agents pathogènes de mammites émergents.

Ces germes sont moins pathogènes que les agents pathogènes majeurs. Ils engendrent en général des mammites subcliniques qui peuvent être persistantes(pyorala ,2009).

Dans certains troupeaux, ils peuvent induire une forte incidence de cas cliniques (Thorberg,2009). Ces cas cliniques sont en général peu sévères avec une simple modification de l'aspect du lait dans la plupart des cas . (Taponen ,2006). La prévalence des

Chapitre 1: Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

infections par des staphylocoques à coagulase négative est supérieure chez les primipares. Les infections des primipares ont lieu avant vêlage ou juste après vêlage, alors que les infections des multipares ont lieu plutôt en fin de lactation (Pyorala, 2009).

L'étude des mammites à SCN est compliquée, un seul groupe de bactéries est incriminé mais en réalité, de nombreuses espèces sont en cause. Les staphylocoques à coagulase négative les plus fréquemment impliqués dans les mammites sont *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus* et *Staphylococcus hemolyticus* (Thorberg, Danielsson – tham, 2009). Selon une étude réalisée par (Taponen, Simojoki, 2006) les deux espèces les plus couramment isolées sont *Staphylococcus chromogenes* et *Staphylococcus simulans*. En effet, sur 133 mammites cliniques ou subcliniques liées aux staphylocoques à coagulase négative, 43,6% étaient dues à *Staphylococcus simulans* et 23,3% à *Staphylococcus chromogenes*. Une étude de (Jarp, 1991) montre aussi que *Staphylococcus simulans* est le plus fréquemment isolé, suivi par *Staphylococcus chromogenes*.

Les informations concernant le mécanisme de développement des infections à SCN et leur mode de contamination sont encore parcellaires. Ces germes ne peuvent pas être classés clairement comme des germes contaminant les vaches au moment de la traite ou via l'environnement.

Actuellement, on se doute que les différentes espèces de staphylocoques à coagulase négative possèdent des caractéristiques variables mais, peu d'études ont pu mettre en évidence une différence significative (Taponen, Pyorala, 2009). Dans son étude, JARP a recherché le lien éventuel entre l'espèce de SCN isolée et le caractère clinique ou subclinique de la mammite, et aucune différence significative n'a pu être mise en évidence. De plus, aucun lien n'a pu être fait entre la sévérité des mammites cliniques et l'espèce en cause.

Une étude réalisée par PIESSENS a mis en évidence que l'épidémiologie des différentes espèces de SCN était différente. Il semblerait que le réservoir de *Staphylococcus chromogenes* et *Staphylococcus epidermidis* soit plutôt mammaire contrairement à celui de *Staphylococcus hemolyticus* et *Staphylococcus simulans* qui serait plutôt environnemental (Piessens, 2011).

selon une étude réalisée par (Thorberg, Emanuelson, 2009), les infections persistantes sont plutôt dues à *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus*

Chapitre 1: Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

simulans. De plus, les infections des multipares seraient plutôt dues à *Staphylococcus epidermidis* contre *Staphylococcus chromogenes* chez les primipares.

Finalement, on peut voir que les différentes espèces de staphylocoques à coagulase négative ont des caractéristiques différentes notamment concernant la persistance des infections, l'atteinte préférable des primipares ou des multipares, le réservoir principal, mais le mode de contamination exact des vaches selon les espèces de SCN n'est pas encore précisément connu. On peut retenir que la lutte contre ces germes est semblable à celle contre les germes contagieux et passe en partie par l'utilisation de produits de post-trempe désinfectants (Pyorala, 2009). Mais, la prévention des nouvelles infections passe également par une bonne gestion de la litière puisque l'apparition de nouvelles infections à SCN est fortement associée à la propreté des vaches (Réseau canadien, 2008).

Le contrôle des infections par les staphylocoques à coagulase négative est difficile. Cela est en partie dû à la multitude d'espèces en cause et à leurs caractéristiques variables comme on a pu le décrire précédemment.

2-1-5-Corynebacterium bovis :

Corynebacterium bovis est une bactérie à gram positif vivant à la surface de la peau des trayons et pouvant coloniser la mamelle par le canal du trayon. Ce germe est fréquemment isolé dans le lait de mammite des vaches laitières (Watts, 2000).

Il est responsable de mammites en l'absence de pathogènes majeurs. La contamination a lieu pendant la traite. Les principales sources de contamination sont les quartiers contaminés et les lésions des trayons. C'est un germe très contagieux lorsque les mesures d'hygiène de traite sont défectueuses et particulièrement lorsque le post trempe n'est pas réalisé (*Corynebacterium bovis*, 2004). D'ailleurs, *Corynebacterium bovis* peut être utilisé comme indicateur de l'hygiène de traite. En effet, dans les élevages où le post-trempe n'est pas réalisé, on peut isoler ce germe dans 60% des quartiers (Watts, 2000).

Corynebacterium bovis provoque des mammites subcliniques. On observe une augmentation des concentrations cellulaires somatiques du lait et une baisse de la production laitière. Il est très sensible aux antiseptiques donc la lutte contre ce germe passe par une bonne hygiène de traite avec réalisation du post trempe des trayons (Réseau canadien de recherche, 2017). La réalisation d'un post trempe à l'aide d'un produit antiseptique permet donc de détruire les germes présents à la surface de la peau et empêche alors la contamination des quartiers.

Chapitre 1: Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

Selon le réseau canadien de recherche sur la mammite bovine, l'usage d'antibiotiques serait même inutile (Réseau canadien de recherche s, 2010). Cette affirmation reste surprenante car en cas d'infection mammaire, il semble difficile de guérir l'animal par un simple post trempage. Malheureusement, aucune étude n'a été réalisée pour comparer l'efficacité du post trempage seul à celle du traitement antibiotique lors de mammites à *Corynebacterium bovis*.

6. Rôle des pathogènes mineurs dans la lutte contre les infections par des pathogènes majeurs
Il semblerait qu'une infection par un pathogène mineur (staphylocoques à coagulase négative ou *Corynebacterium bovis* par exemple) pourrait créer une protection contre les pathogènes majeurs (Poutrel, 1983). Néanmoins, cette affirmation est discutée. Il a été observé dans une étude qu'une infection par *Corynebacterium bovis* pendant le tarissement aurait un effet protecteur contre les infections par des pathogènes majeurs, mais qu'une infection par *Corynebacterium bovis* au retour en lactation augmenterait le risque de nouvelles infections. Il faut tout de même garder en tête que le retour en lactation constitue dans tous les cas une période de plus forte sensibilité aux infections (Bradley, 2002).

2-2-Autres bactéries pathogènes mineures :

Il existe d'autres bactéries pathogènes telles *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, et certaines souches d'*Escherichia coli* que l'on peut rencontrer de manière accidentelle dans le lait. Ces deux dernières provoquent les mêmes symptômes que *Staphylococcus aureus*, alors que la première peut provoquer la listériose, à l'origine d'avortements et de troubles nerveux. Cette maladie touche également les nouveau-nés ainsi que les adultes immunodéprimés chez qui elle peut se manifester, à l'extrême, par des septicémies ou des méningites. Cependant, en production fermière de caillés lactiques, le risque de développement de *Listeria* et *Salmonella* est très faible dès lors que le pH du caillé est inférieur à 4,5 (Kouri, 2016).

3- Rôle des pathogènes:

Une infection par un pathogène mineur aurait un effet protecteur contre les infections par des pathogènes majeurs car elle stimulerait la réponse cellulaire dans le quartier. Il pourrait également y avoir un phénomène de compétition (Bradley, 2002). Dans cette optique, l'implantation intra mammaire de pathogènes mineurs pour limiter les infections par des pathogènes majeurs peut être envisagée. Mais le bénéfice d'un effet protecteur semble inférieur au risque de baisse de production laitière et d'augmentation des concentrations cellulaires somatiques du lait (Rainard, 1987).

Chapitre 1: Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

I - Les infections à *staphylocoques aureus* :

1 -Généralités:

Observés par Pasteur dans un pus de furoncle en 1880, les staphylocoques doivent leur nom à Ogston (1881), qui les a mis en évidence dans un abcès aigue et chronique très fréquent en pathologie, 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 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), et la production de toxines(Elliot,2001) .Les Staphylocoques sont des germes ubiquitaires qui colonisent plusieurs milieux (sol, eau, air). Ils appartiennent à la flore commensale des peaux et des muqueuses. Le Staphylocoque doré est l'espèce la plus pathogène, elle est responsable d'intoxications alimentaires(Elliot ,2001).

1-1-Caractères morphologiques et culturaux:

Staphylococcus aureus est une bactérie coccoïde à Gram positif, d'environ 1µm de diamètre et apparaît en amas à l'examen microscopique. Ce sont des cellules immobiles, non sporulées, et l'examen au microscope optique ne permet pas de visualiser une capsule(Matoss,1991). C'est une bactérie mésophile dont la température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C en fonction des souches (température minimale : entre 5 et 10°C ; température maximale : environ 45°C). Elle est capable de se multiplier à des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 9,3 avec un pH optimal de croissance de 7 à 7,5. Elle est halotolérante et peut se multiplier en présence de concentrations élevées de chlorure de sodium (en général jusqu'à 10 %) [Sutra ,1998]. Elle tolère une activité de l'eau (aw) exceptionnellement basse pour une bactérie puisque sa croissance est inhibée à partir de valeur d'aw comprise entre 0,95 et 0,91. Sa culture est facile, elle se fait en milieu aérobie comme en milieu anaérobie, en milieu solide, les colonies de *S. aureus* mesurent 2 à 3 millimètres de diamètre, elles sont lisses, bombées et luisantes, les colonies peuvent parfois prendre une coloration jaune or, d'où son nom de « Staphylocoque doré » (Sutra ,1998).

1-2-Caractère biochimique:

Staphylococcus 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

Chapitre 1: Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

Staphylococcus aureus. Il existe deux formes de coagulase : la coagulase libre et la coagulase liée (Sutra, 1998).

1-2- Caractère antigénique :

La paroi des staphylocoques contient 2 antigènes principaux :

- une protéine A vis-à-vis de laquelle tout le monde a des Ac.
- l'acide teichoïque, à base de polyribitol chez *S. aureus* et de polyglycérol chez *S. albus*. Cet ac. teichoïque est très résistant au lysozyme et aux enzymes des globules blancs.

Il existe de nombreuses variétés antigéniques mais le typage des staphylocoques par l'étude de ces variétés (sérotypie) n'est guère entré dans la pratique. Par contre, la lysotypie peut rendre de grands services en épidémiologie.

Cette méthode permet aussi de déterminer si plusieurs cas dans un service sont dus à une même souche et de rechercher quels membres du personnel soignant sont porteurs de cette souche (Chantal, 1976)

1-3- pouvoir pathogène :

Les substances élaborées :

Germe pyogène par excellence, *Staphylococcus aureus* est le microbe de la suppuration. Certaines souches agissent aussi par libération d'une ou de plusieurs toxines (intoxication alimentaire, syndrome de choc toxique, impetigo). La fréquence et la gravité des infections à staphylocoques sont liées à trois principaux facteurs :

- le caractère ubiquitaire du germe,
- l'abaissement des défenses locales et générales des malades soumis à des soins intensifs, des interventions chirurgicales graves, etc.,
- et la fréquente résistance aux antibiotiques du staphylocoque, notamment du staphylocoque hospitalier (Bactériologie, 2002_2003).

Physiopathologie de l'infection mammaire à *Staphylococcus aureus* :

- **Formes cutanées** : atteinte plus ou moins sévère des follicules pilo-sébacés (folliculite, furoncle, anthrax), atteinte péri-onguéale (onyxis, perionyxis, atteinte du tissu sous-cutané (panaris, phlegmons). Certaines formes superficielles (impetigo) peuvent se compliquer de

Chapitre 1: Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

lésions bulleuses graves lorsque la souche de staphylocoque est productrice d'exfoliatine (Bactériologie, 2002_2003)

- **Formes muqueuses** : otites, sinusites, mastoïdites, conjonctivites.

- **Formes généralisées**

II- Généralité sur les antibiotique

1-Antibiotiques et les infections mammaires:

Depuis les années 1960, le traitement antibiotique systématique s'est progressivement imposé comme solution pour prévenir et guérir les infections mammaires au tarissement chez la vache laitière. Alors que la filière laitière est à la recherche de stratégies pour réduire l'usage des antibiotiques, la mise en place d'un traitement sélectif pour prévenir les risques de nouvelles infections est un levier majeur pour répondre à cette préoccupation. Le traitement sélectif consiste à traiter avec des antibiotiques seulement les vaches infectées, et à utiliser d'autres méthodes pour limiter le risque d'infections (pas de traitement, obturateur). d'Agrocampus Ouest spécialisées en productions animales ont mené une enquête auprès d'éleveurs bovins laitiers, afin d'étudier les pratiques de traitement antibiotique au tarissement chez la vache laitière. L'objectif était de déterminer les principaux freins et les motivations à l'adoption du traitement sélectif, en vue d'accompagner le passage au traitement sélectif pour un nombre croissant d'éleveurs. 54 éleveurs et éleveuses des coopératives Agrial et Triskalia, membres de la Chaire AEI, ont été interrogés sur leur exploitation par les futurs ingénieurs. De façon générale, la majorité des éleveurs interrogés se disent prêts à réduire leur utilisation d'antibiotiques dans leur élevage et/ou mettent déjà en place des stratégies alternatives. Pour les éleveurs qui mettent en œuvre un traitement sélectif, l'enquête a permis de mettre en lumière la diversité des pratiques et des motivations des agriculteurs. Parmi ces dernières, le gain économique et la nécessité de lutter contre l'antibiorésistance sont les plus partagées. Le risque sanitaire, à mettre en lien avec le coût d'une infection mammaire, est le premier frein exprimé par les éleveurs n'ayant pas encore mis en place le traitement sélectif au tarissement. D'autres freins technico-économiques ou psychologiques ont également été mis en évidence par l'enquête. La gestion du risque apparaît ainsi comme un enjeu primordial pour faciliter la diffusion du traitement sélectif, tout comme la nécessité d'assurer un état sanitaire irréprochable du troupeau. L'échange d'expérience entre éleveurs et une évolution du conseil apporté

Chapitre 1: Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

aux éleveurs sont également des pistes identifiées par l'étude pour accompagner le changement de pratique (Apolline Bleuse, 2019).

2-Schéma de traitement des infections mammaires:

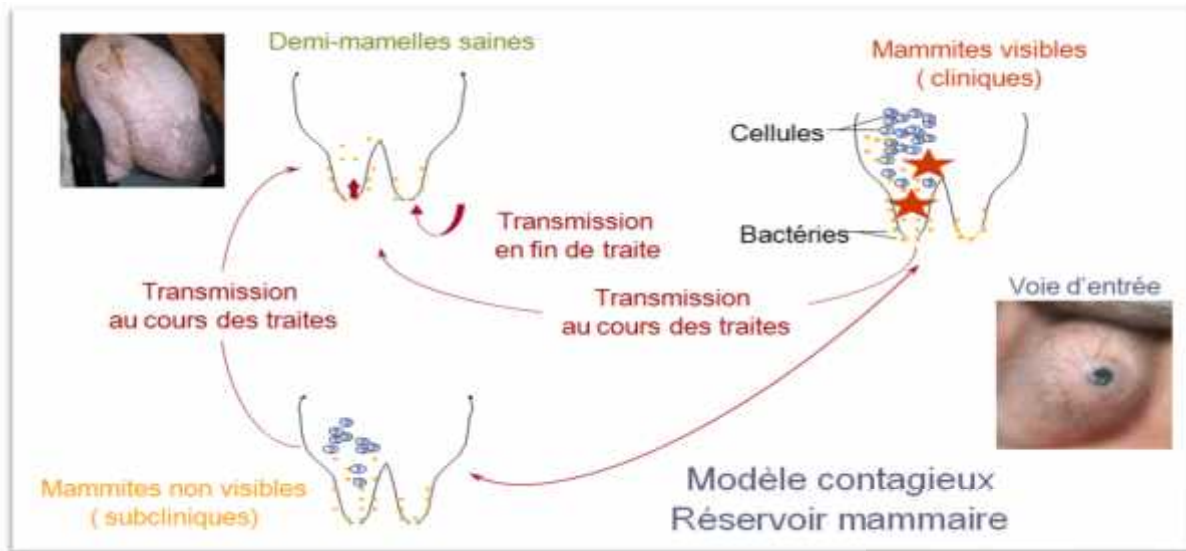


Figure 1: les traitements des infections mammaires (Apolline Bleuse, 2019)

3-Résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques en infection mammaire:

Staphylococcus aureus a un fort pouvoir adaptatif et a développé différents mécanismes de résistance à l'anti staphylococcique. Plus de 90 % des souches produisent une pénicillinase. L'oxacilline reste active contre ces souches, mais des staphylocoques hospitaliers, et plus récemment communautaires (présents hors de l'hôpital), ont développé une résistance croisée entre les pénicillines M (mécilline, oxacilline) et les autres β -lactamines par la production d'une protéine, la PLP2a, liant les pénicillines (PLP) et ayant une faible affinité pour ces composés. Le gène codant la PLP2a, *mecA*, est porté par un élément chromosomique qui contient également d'autres gènes de résistance aux métaux lourds et à d'autres antibiotiques, ceci expliquant le profil de multirésistance des SARM (*S. aureus* résistant à la méticilline) hospitaliers. En revanche, les SARM communautaires (SARM-C) ne sont résistants, outre à la méticilline, qu'à la kanamycine, à l'acide fusidique et aux tétracyclines. Ce profil est caractéristique du SARM-C européen ST80 qui possède les gènes codant pour un facteur de virulence particulier, la leucocidine de Pantone Valentine 1. Les glycopeptides vancomycine et teicoplanine sont des alternatives à l'oxacilline en cas de résistance ou d'intolérance.

Chapitre 1: Généralité sur les infections mammaires et les antibiotiques

Cependant, des souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides sont rapportées. Leur détection est difficile mais nécessaire, car l'augmentation progressive des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de vancomycine pour des souches considérées jusqu'à présent comme sensibles semble corrélée à une mauvaise évolution sur le plan clinique.

Staphylococcus aureus a une forte capacité d'adaptation et acquiert ainsi différents types de résistance aux agents anti staphylococciques. Plus de 90% des isolats produisent une pénicillinase. L'oxacilline reste active contre ces souches, mais des staphylocoques associés à l'hôpital et, plus récemment, des staphylocoques acquis dans la communauté ont développé une résistance croisée entre la méthicilline (MRSA), l'oxacilline et d'autres bêta-lactames par la production d'une protéine de liaison à la pénicilline (PBP) avec une faible affinité pour les bêtalactames, PBP2a. Le gène codant pour PBP2a, *mecA*, est porté par un élément chromosomique qui contient également d'autres gènes de résistance aux métaux lourds et d'autres antibiotiques, expliquant ainsi le profil multirésistant des SARM associés aux hôpitaux. En revanche, les SARM d'origine communautaire (CA-SARM) ne sont résistants qu'à la kanamycine, à l'acide fusidique et à la tétracycline, en plus de la méthicilline. Ce profil est spécifique du clone européen CA-MRSA ST80, qui code également pour un facteur de virulence très particulier, la leucocidine de Panton-Valentine. Les glycopeptides, la vancomycine et la teicoplanine sont des alternatives à l'oxacilline en cas de résistance ou d'intolérance. Des souches avec une sensibilité réduite aux glycopeptides ont été rapportées. Leur détection est difficile mais nécessaire car le fluage MIC de la vancomycine semble lié à un mauvais pronostic chez les patients (Dumitrescu, *et al* 2010).

CHAPITRE 2

LES PRODUITS NATURELS ET LES INFECTION MAMMAIRES

Chapitre 3 : Produits naturels et infections mammaires

I. Généralité sur les plantes médicinales et aromatiques :

La connaissance rationnelle des plantes médicinales date de l'Antiquité. C'est Hippocrate qui différençia l'usage interne et l'usage externe et qui définit la notion de dose qui permet de distinguer l'effet thérapeutique de l'effet toxique (Colette, Keller, 2004).

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales utilisées (Carillon, 2000).

Ce savoir traditionnel ancestral se transmet de génération en génération est devenu aujourd'hui une mine d'informations extrêmement précieuses pour les chercheurs d'industrie pharmaceutique (Fouché et al, 2000).

Aujourd'hui la pharmacologie s'oriente de plus en plus vers des traitements à base de plantes, car l'efficacité de la synthèse chimique a largement atteint ses limites et n'arrive plus à être créative. L'exemple de l'antibiorésistance microbienne, à l'origine de la recrudescence des maladies nosocomiales se passe de tout commentaire (Iserin, 2001).

I.1. Définition Les plantes médicinales et L'aromathérapie :

I.1.1.Plantes médicinales

Les plantes ont de tout temps été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutiques.

Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires qui interviennent dans la défense contre les bactéries pathogènes (Touré, 2015).

Les plantes médicinales sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (Sofowora, 2010).

I.1.2.Aromathérapie

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui a recourt aux extraits aromatiques des plantes. Elle se différencie de la phytothérapie qui fait appel à l'ensemble des éléments contenus dans la plante (Lakhdar, 2015). L'aromathérapie attire actuellement un nombre croissant de patients, et les publications scientifiques sur les propriétés thérapeutiques des huiles essentielles ne cessent de fleurir. Bien que naturelle, l'aromathérapie a cependant des

Chapitre3 :Produits naturels et infections mammaires

effets très puissants, il est donc capital d'intégrer la notion de la dualité « efficacité toxicité» et de maîtriser les nombreuses précautions d'emploi (Da silva, 2010).

-2-Généralités sur les huiles essentielles :

Les huiles essentielles (HEs) sont des substances odorantes et volatiles, non grasses, extraites d'un végétal sous forme liquide (Couic-Marinier et Lobstein,2013a). Elles sont synthétisées par des plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires [Bakkali et al., 2008]. La plupart des végétaux renferment des HE, mais habituellement en quantité infime. Seules les plantes dites « aromatiques » en produisent en quantité suffisante (Lardry et Haberkorn, 2007).

Ces dernières fabriquent les huiles essentielles pour se protéger, se soigner, se réparer : elles leur servent à séduire les insectes pollinisateurs, se protéger des brûlures du soleil ou du froid, des prédateurs et des maladies, et enfin à guérir (blessures, maladies).(Festy, 2011).

Les HEs peuvent être accumulées dans tous les types d'organes végétaux par exemple des fleurs (oranger, rose, lavande) mais aussi des feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier noble) et bien que cela soit moins habituel, dans des écorces (cannelier), des bois (bois de rose, camphrier, santal), des racines (vétiver), des rhizomes (curcuma, gingembre), des fruits secs des graines (muscade) (Afssaps, 2008) .

La biosynthèse et l'accumulation des molécules aromatiques sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées. Ces structures, sont souvent situées sur, ou à proximité de la surface de la plante et elles varient selon les familles botaniques, poils sécréteurs externes dans le cas des Labiées et des Géraniacées, cellules sécrétrices dans le cas des Lauracées, des Magnoliacées et des Pipéracées, poches sécrétrices dans le cas des Myrtacées et des Aurantiacées et canaux sécréteurs pour les Ombellifères et les Conifères (Haddouchi et Benmansour, 2008).

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction de ces substances. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau, est le procédé le plus pratiqué dans l'industrie des arômes. Le choix de la technique dépend principalement de la matière première. Ce choix conditionne les caractéristiques de l'HE, en particulier: viscosité, couleur, solubilité, volatilité, enrichissement ou appauvrissement en certains constituants (Haddouchi , 2008; Afssaps, 2008.).

-3-Définition des huiles essentielles :

Une huile essentielle est un liquide odoriférant d'aspect fluide à épais et de couleur variable selon les plantes dont elle est extraite. Elle est sécrétée par des cellules spécialisées se

Chapitre3 :Produits naturels et infections mammaires

trouvant aussi bien dans les feuilles (menthe poivrée, basilic grand vert), les fleurs (lavande, ylang ylang), le bois(cèdre Atlas, santal blanc), les racines (gingembre, valériane, vétiver), les graines (coriandre, anisvert, carotte) .(Othmane et Bouchakour ;2018) .

-4-Composition des huiles essentielles :

Les constituants chimiques des huiles essentielles (**Figure 02**) appartiennent principalement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane beaucoup moins fréquent d'autre part (Cheurfa, 2015).

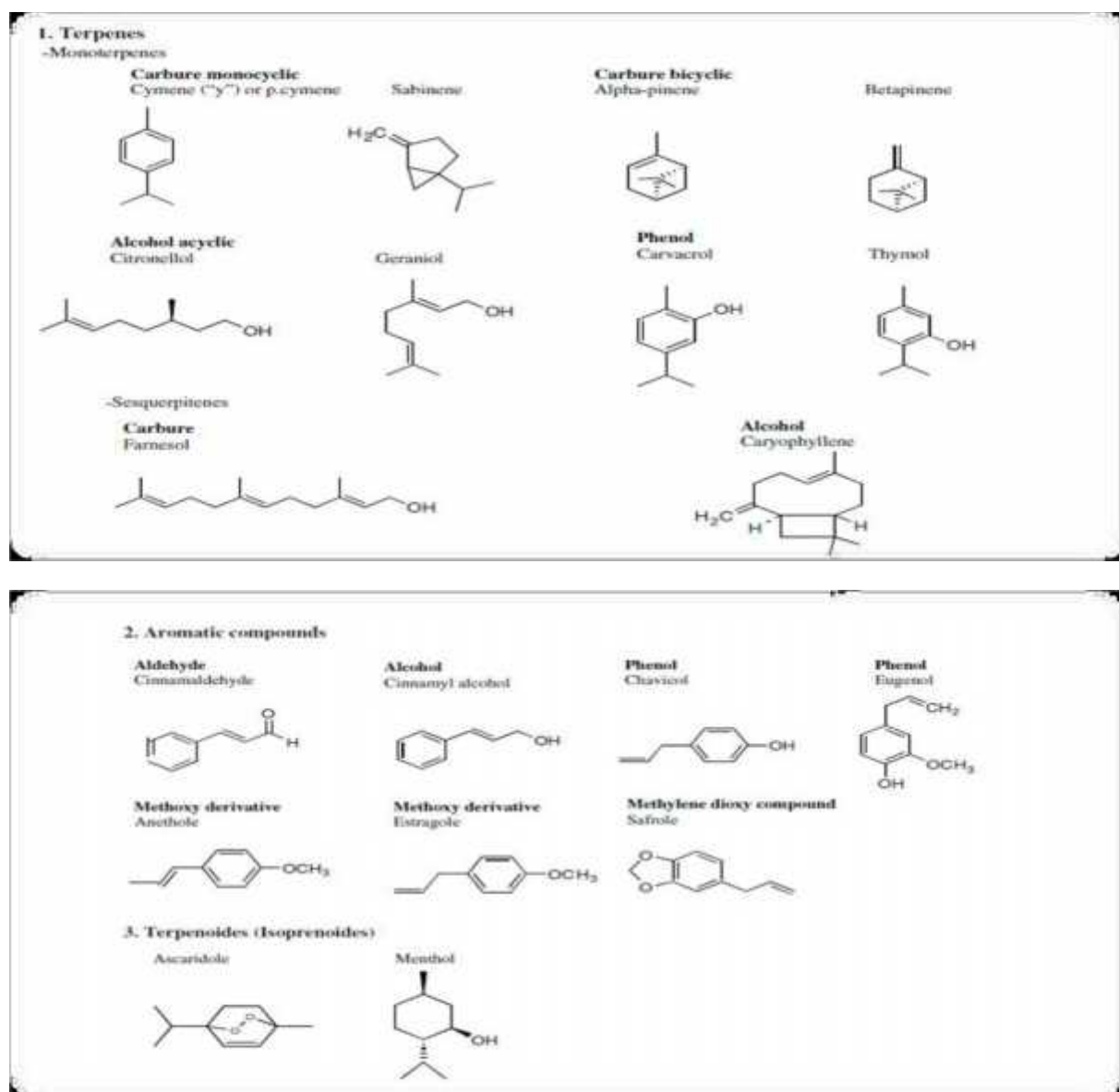


Figure 02: Les classes des constituants chimiques des huiles essentielles (Touré, 2015)

Chapitre3 :Produits naturels et infections mammaires

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles (Touré, 2015).

Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. Les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol, sont, du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, les plus actifs. Aussi, il n'est pas étonnant de constater que les huiles essentielles riches en phénols, comme les huiles de thym, de *Corydothymus capitatus* et de *Syzygium aromaticum*, démontrent les plus Hautes activités antibactériennes (Touré, 2015).

-5- Méthodes utilisées d'extractions des huiles essentielles:

Il existe plusieurs méthodes qui permettent d'extraire les huiles essentielles. Les plus utilisées sont la distillation par entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodistillation ou l'expression alcoolique par solvant. Généralement, le matériel végétal subit directement le processus d'extraction, cependant, il faut procéder parfois au broyage-concassage pour améliorer le rendement de l'extraction surtout quand il s'agit de tissus rigides. (la bioenligne. 2017).

-5-1 - Distillation et entraînement à la vapeur :

La distillation à la vapeur d'eau, ou entraînement à la vapeur d'eau, est la technique la plus courante pour l'obtention des huiles essentielles. Il s'agit en général d'une cuve en métal inerte comme le cuivre ou l'inox avec un tamis au fond pour que les végétaux ne soient pas en contact direct avec l'eau. La vapeur générée traverse le végétal et arrache par les microgouttelettes d'huile essentielle. Cette vapeur d'eau chargée est refroidie dans un serpentin par un circuit d'eau froide. À la sortie du serpentin, on a un mélange d'eau aromatique et d'huile essentielle. L'huile essentielle, de densité plus faible que l'eau, surnage : il est alors possible de récupérer l'huile essentielle par différence de densité, grâce à un vase florentin ou essencier. L'huile essentielle est séparée de l'eau de distillation, l'hydrolat (aussi appelé eau florale dans le cas des fleurs). (Othmane et Bouchakour ;2018) .

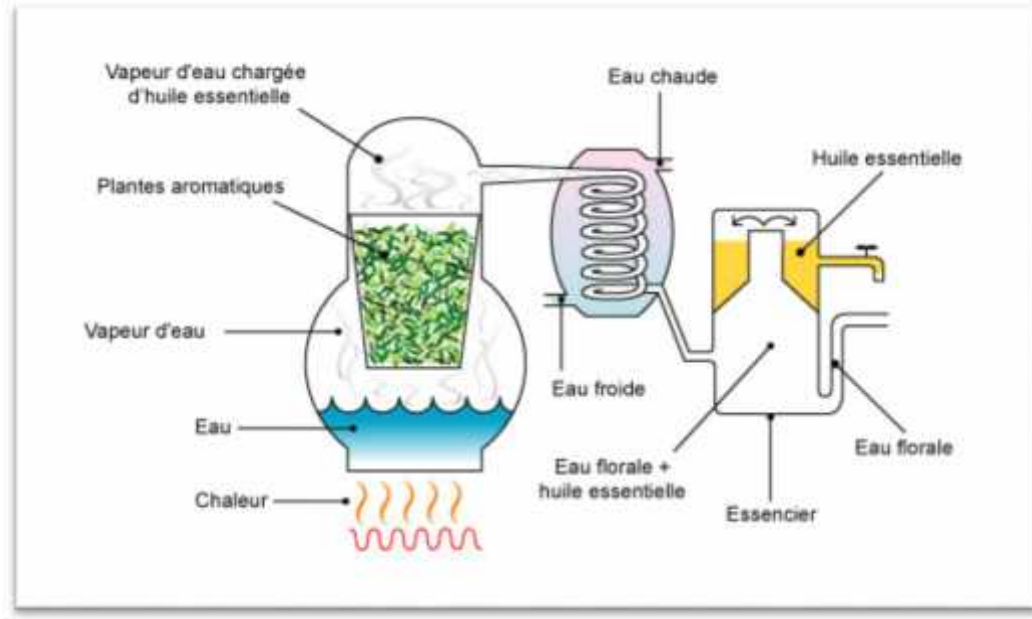


Figure 3: Distillation par entrainement à la vapeur d'eau (la bioenligne. 2017).

-5-2-Hydrodistillation:

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat. (Othmane et Bouchakour ;2018).

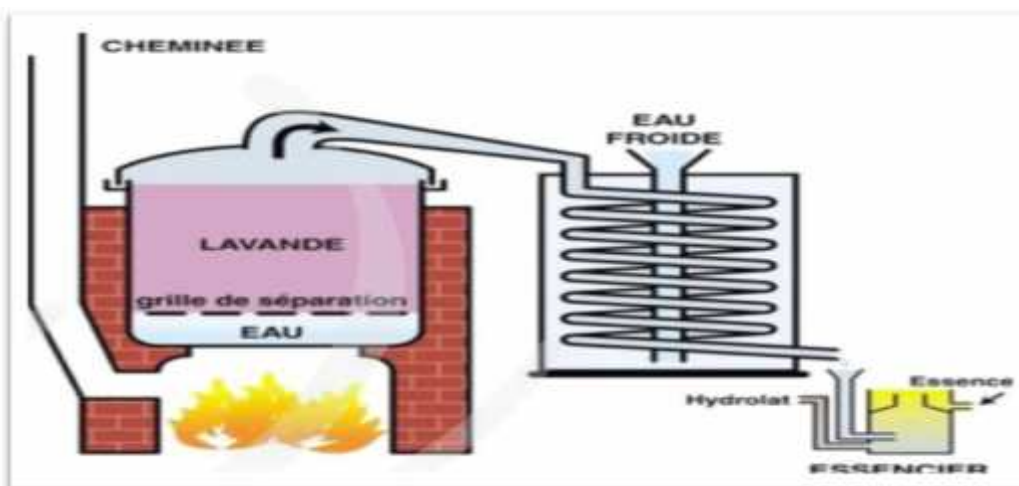


Figure 4: Alambic à l'hydro distillation (Lahlou ,2004)

-5-3-Expression à froid (E):

L'expression à froid est exclusivement réservée aux matières premières de la famille des Hespéridés, où l'essence se trouve dans des petites glandes de l'épicarpe des agrumes communément appelé « zeste ». Cette technique consiste à dilacérer mécaniquement l'écorce du fruit pour en recueillir, de diverses manières, les essences contenues dans les sacs oléifères. (Mil 1985).



Figure5: L'extraction par pression à froid ou expression (Mil , 1985)

-5-4-Extraction par solvants volatils:

Certains procédés d'extraction ne permettent pas d'obtenir des huiles essentielles à proprement parler mais des concrètes. Il s'agit d'extraits de plantes obtenus au moyen de solvants non aqueux. Ces derniers peuvent être des solvants usuels utilisés en chimie organique (hexane, éther de pétrole) mais aussi des graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par des corps gras) ou même encore des gaz. 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 bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres . .(Othmane et Bouchakour ;2018).

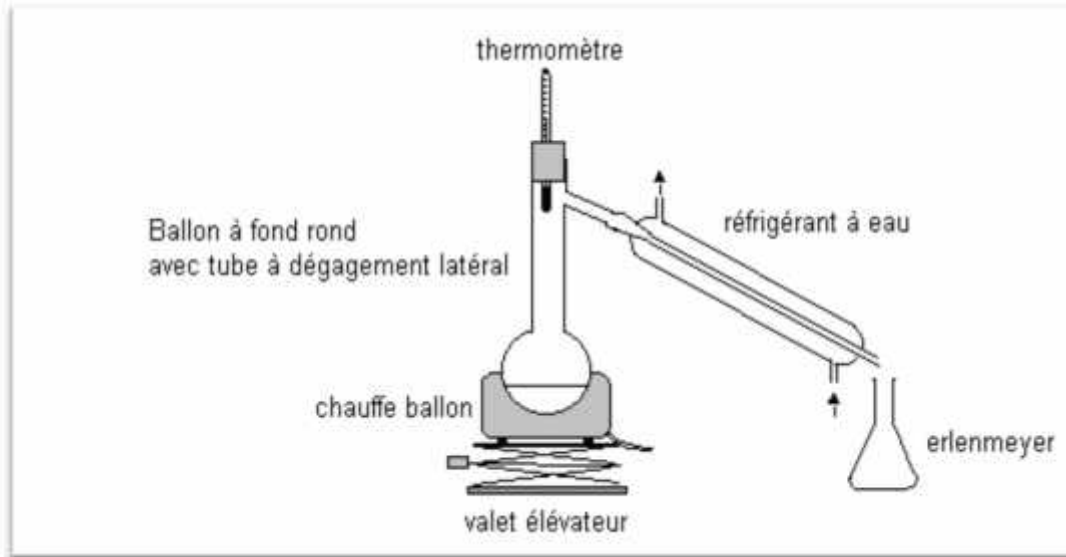


Figure6: L'extraction par solvant (la bio enligne-2017)

-5-5-Extraction par le CO₂ supercritique (CO₂):

Très moderne, très coûteuse, cette méthode consiste à faire passer un courant de CO₂ à haute pression qui fait éclater les poches à essence et entraîne les substances aromatiques. , (la bio enligne. 2017), Il existe d'autres méthodes d'extraction comme l'extraction par solvant ou l'enfleurage mais uniquement pour la parfumerie et non pour la thérapie (Mil Zayat – 1985).

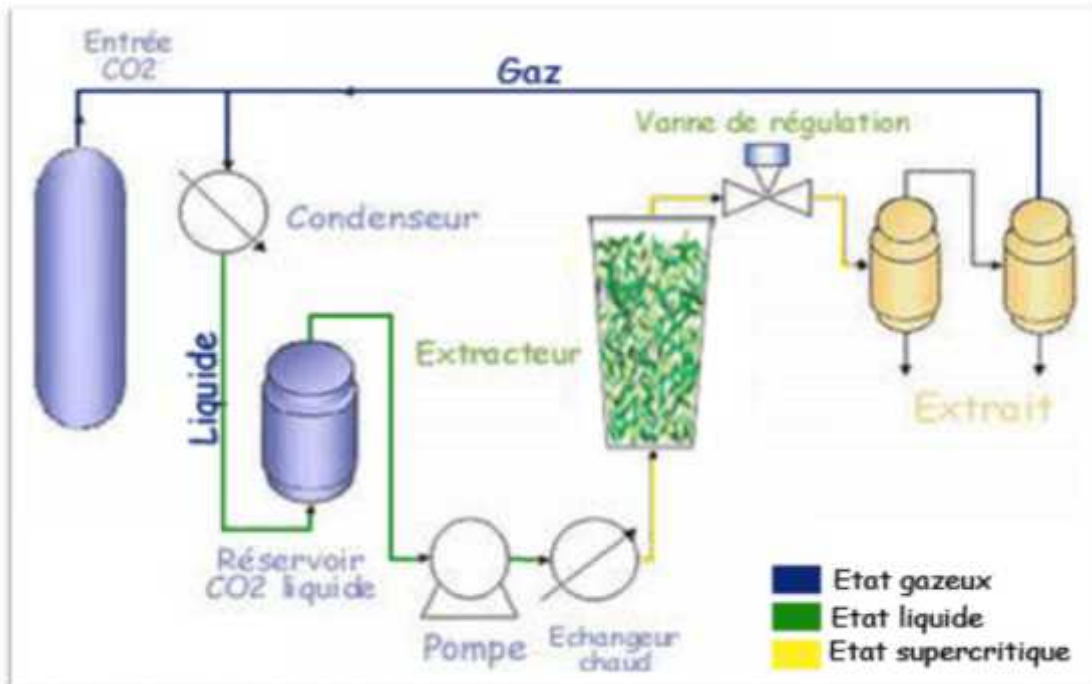


Figure07 : L'extraction par le CO₂ supercritique (Nadjeia .2016)

-5-6- Extraction par enfleurage :

La technique de l'enfleurage (ou macération à saturation) est ancienne, et n'est plus guère usitée. Elle concerne les plantes ou parties de plantes dont l'arôme est trop fragile pour supporter la chaleur d'une distillation. Elle consiste à étendre une couche de ces substances végétales fragiles entre deux couches épaisses de matière grasse. On renouvelle les matières végétales fraîche jusqu'à saturation de la graisse en fragrance. On débarrasse alors le parfum de l'excédent gras et l'on obtient une essence absolue (ou absolu), une huile essentielle de très haute qualité olfactive. Cette technique est la seule qui permette de restituer au mieux la fragrance de la plante fraîche . (Othmane et Bouchakour ;2018).

-6-Activité antimicrobienne:

Depuis l'antiquité, les extraits aromatiques de plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme les médicaments et la parfumerie (M.TOURE.2015). Les huiles essentielles ont été considéré comme agents antimicrobiens les plus efficaces dans ces plantes. Les qualités microbiologiques des plantes aromatiques et médicinales sont connues. Toutefois, la première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1995). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004).

Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développement des résistances aux antibiotiques.

Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Oussou, 2009). Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (Oussou et al., 2008.) Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (Oussou, 2008).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la nature de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries Gram à Gram négatif comme *Aeromonas hydrophila* et *Campylobacter jejuni* ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles (M. TOURE. 2015).

La bactérie reconnue comme la moins sensible à leur effet reste néanmoins les bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa* (Dorman, 2000). En fait, cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa

Chapitre3 :Produits naturels et infections mammaires

membrane externe. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre *Pseudomonas aeruginosa* deviennent actives. Il semble que cette souche se révèle résistante à un très grand nombre d'huiles essentielles (Hammer2000 *et al.*, 1999).

La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. (Oussou en 2009) a étudié les propriétés antibactériennes de quelques huiles essentielles issues de la pharmacopée traditionnelle Ivoirienne, *Ocimum gratissimum*, *O. cimumcanum*, *Xylopi aethiopica*, *Citrus aurantifolia*, *Lippia multiflora*, et *Monanthataxis capea*. Les huiles essentielles de ces plantes se sont révélées efficaces contre les bactéries multi résistantes notamment les *E. coli* résistants aux céphalosporines de 3ème génération (C3GR), *E. coli* productrice de betalactamases à spectre élargi (BLSE) et staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM).

-7-Mécanismes d'action des huiles essentielles:

Les huiles essentielles ou certains de leurs constituants sont en effet efficaces contre une grande variété d'organismes tels que les bactéries (Baser *et al.*, 2006 ; Schelzet *al*, 2006), les virus (Duschatzky *et al.*, 2005), les champignons.

(Hammer *et al*, 2002; Pawar & Thaker, 2006; Soyluest *et al*, 2006), les protozoaires (Monzote, *ET AL* 2006), les parasites (Moon, *et al*, 2006; Priestley *et al* , 2006), les acariens (Rim & Jee, 2006), les larves (Hierro *et al.*, 2004 ; , Pavela, 2005) les vers et les insectes (Burfield & Reekie, 2005; Chaiyasit *et al*, 2006; Cheng, *et al* 2006) et les mollusques (Lahlou & Berrada, 2001).

Les HEs ont un effet sur la croissance des bactéries. Elles agissent en empêchant leur multiplication, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Ces dernières attirent actuellement beaucoup d'attention parce qu'elles ont montré une activité contre les pathogènes résistants aux antibiotiques, tels que les staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM), les -Lactamases à spectre élargi (BLSE) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les HEs, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (figure 8) ; (LAOUAR, SIFER ;2012).

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

-Attaque de la paroi bactérienne, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires

-Acidification de l'intérieur de la cellule provoquant la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines, ce qui bloque la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure .

-Destruction du matériel génétique, ce qui cause la mort de la bactérie

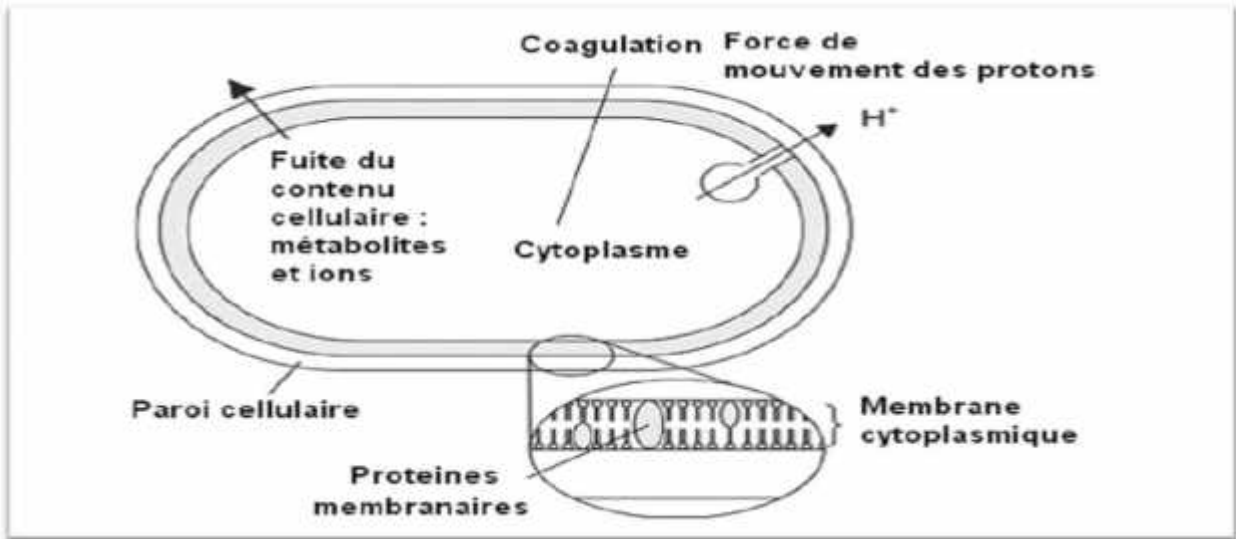


Figure 8 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne(Burt, 2004)

-8-Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne:

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro* des HE's sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur (Suhr et Nielsen 2003). Les méthodes d'évaluation les plus utilisées sont la méthode de diffusion sur l'Agar et la méthode de dilution. Dans la première méthode les HE's sont déposées sur des disques de papier ou dans des puits creusés dans l'Agar. Dans la seconde méthode, les HE's sont incorporées dans le bouillon de culture ou d'autres liquides dans lesquels les bactéries sont présentes. Ces différentes techniques sont répertoriées et décrites dans différentes publication . C'est ce qu'on appelle l'aromatogramme (Lahlou, 2004 ; Bosio et al, 2000) .

-8-1- Définition de l'aromatogramme:

L'aromatogramme est une méthode qui se réalise *in vitro*, basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou

Chapitre3 :Produits naturels et infections mammaires

encore méthode des disques. Le contact se fait par l'intermédiaire du disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée des extraits de plante. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (Fauchère et Avril, 2002). L'aromatogramme se réalise aussi sur un milieu liquide par la méthode des disques (Belaiche, 1979).

-8-2-Méthode du puits ou cylindre :

Proposé par (Cooper et al, 1946), reprise par (Shroder et Messing 1949), elle mesure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. Elle consiste à découper un tronc circulaire vertical dans la gélose et d'y verser une solution d'HE de concentration connue. L'HE diffusant radialement créant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne ou fongique (Djenadi. 2011).

-8-3 -Méthode de dilution :

Les HE's à tester peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide sans oublier que les techniques de dilutions exigent une dispersion homogène. Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes et après incubation on note la présence ou l'absence de culture; la lecture peut être visuelle ou spectrophotométrique car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (Ferhat, 2009) .

-9-Méthodes de détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice :

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), correspond à la plus faible concentration d'antimicrobiens qui inhibera la croissance visible des microorganismes après une incubation durant la 18-24 (Andrews, 2001). Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories: "sensible" ; "résistante" ; "intermédiaire"[Genné *et al* 2003].

Les méthodes de dilution sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs de concentration minimales CMI d'un extrait, d'une huile essentielle ou d'une substance pure (Rios *et al.*, 1988) Car elles offrent la possibilité d'estimer la concentration de l'agent antimicrobien testé dans la gélose (dilution d'agar) ou dans le bouillon (la micro dilution ou la

macro dilution). Ces méthodes peuvent être utilisées pour mesurer quantitativement l'activité antimicrobienne *in vitro* contre les bactéries et les champignons (Balouiri et al., 2016).

-9-1-Dilution en bouillon:

La technique standardisée de dilution en milieu liquide développée par le «comité national pour les normes de laboratoire clinique» NCCLS ou plus récemment nommé CLSI «Institut de normes clinique et de laboratoire» reste la méthode de référence la plus utilisée (Abbes *et al.*, 2011).

La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes à essai contenant un volume supérieur à 1,0 ml (habituellement 2 ml) (macro dilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microfiltration de 96 puits (micro dilution) (Jorgensen *et al.*, 2015).

-9-1-1- Méthode de macro dilution :

La méthode de macro-dilution était parmi les premières à être développée et sert toujours de méthode de référence. Le principe de base de ce dosage est le même que le dosage de la micro-dilution au bouillon. Mais le test est effectué dans des tubes à essai contenant des concentrations différentes de l'agent antimicrobien avec le même volume. Les tubes sont inoculés avec des microorganismes d'essai à des concentrations standard. Tous les tubes de dosage doivent être incubés pendant 18-24 h dans un incubateur d'air ambiant à 35-37 ° C. Après l'incubation, les tubes sont examinés pour détecter les changements de turbidité comme indicateur de croissance. La CMI de l'extrait de plante peut être déterminée par la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien qui inhibera la croissance visible du microorganisme testé (Schwalbe *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2010).

-9-1-1-Méthode de micro dilution

C'est une méthode plus simple et plus économique que la méthode de macro dilution au bouillon. Elle est maintenant considérée comme la méthode internationale de test de sensibilité de référence (Schwalbe *et al.*, 2007). Cette technique repose sur l'utilisation d'un émulsifiant ou un solvant dans le milieu d'essai pour assurer le contact entre les microorganisme d'essai et l'agent pour la durée de l'expérience. Les agents les plus utilisés sont tween 80, tween 20, éthanol et le DMSO. Après 18-24h d'incubation, la mesure de la turbidité peuvent être déterminés visuellement, ou par spectrophotométrie, soit l'utilisation

d'un indicateur de viabilité cellulaire (eg : sels de tétrazolium ou le colorant de résazurine). (Wilkinson, 2006; Elshikh *et al.*, 2016).

-9-2-Dilution en gélose :

Cette technique a été effectuée par Baron et Bruckner 1984 pour déterminer susceptibilité des bactéries anaérobique à l'aide de la dilution d'agar (Rios *et al.*, 1988). Dans cette méthode, la substance d'essai est incorporée à des concentrations connues dans la gélose et, une fois définies, des bactéries sont appliquées sur sa surface. De cette façon, un grand nombre de bactéries peuvent être criblés dans une seule opération de dosage. Les boîtes sont incubés pendant 24 h ou plus et la croissance des bactéries sur le mélange extrait / agar est marquée soit présente ou absente. Les points finaux des CMI sont enregistrées comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien qui inhibe complètement la croissance dans des conditions d'incubation appropriées (Wilkinson, 2006; Balouiri *et al.*, 2016).

-9-3 -Méthode de diffusion et de dilution:

-9-3-1-E-test

E-Test une technique basée sur la combinaison de deux concepts : diffusion du disque et de la dilution de gélose. Elle a été développée en Suède et présentée à la communauté scientifique lors de la conférence Inter science sur les agents antimicrobiens et la chimiothérapie (ICAAC) en 1988. Elle consiste en l'application d'une bandelette imprégnée de concentration croissante d'un antibiotique sur un inoculum bactérien standardisé. Après 24h d'incubation, la CMI se lit à l'intersection entre la bandelette et la zone d'ellipse d'inhibition de la culture. Cette technique est réalisable au quotidien au laboratoire de bactériologie (Joisy, 2006; Schwalbe *et al.*, 2007).

-10- Domaines d'utilisation des huiles essentielles:

Quatre domaines principaux exploitent les diverses potentialités qu'offrent les huiles essentielles (Randraianarivelo, 2010):

II-10-1-Pharmacie : Les huiles essentielles peuvent avoir un intérêt médicamenteux, en particulier dans le domaine des antiseptiques externes, comme par exemple : *Thymus vulgaris* (Thym), *Satureja montana* (Sariette). Elles sont aussi employées pour aromatiser des formulations médicamenteuses destinées à la voie orale. Elles constituent par ailleurs le support de l'aromathérapie. Les plantes aromatiques sont aussi utilisées à l'état brut, en

Chapitre3 :Produits naturels et infections mammaires

particulier pour les préparations d'infusion (menthe, mélisse, verveine, fleurs d'oranger, etc.) et sous la forme de préparations galéniques simples.

II-10-2-Parfumerie : C'est le débouché principal des huiles essentielles où la cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène en sont les marchés principaux. On note aussi l'utilisation des huiles essentielles dans les préparations pour bains (bain « calmant » ou « relaxant ») avec la possibilité d'absorption percutanée des constituants terpéniques.

II-10-3-Industrie Agro-alimentaire : Certains plantes sont utilisées brutes (épices et aromates), d'autres le sont sous forme d'huiles essentielles ou de résinoïdes. Tous les secteurs alimentaires en utilisent : boissons alcooliques ou non, confiserie, produits laitiers, produits carnés, soupes, sauces, boulangerie, snacks, la nutrition animale .

II-10-4-Diverses industries : L'industrie chimique est le principal utilisateur des isolats issus des huiles essentielles comme matières premières pour la synthèse de principe actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes, exemple : pinènes, sclaréol, linalol, citronellal, citral eugénol, safrol, etc... . Ces isolats sont également utilisés en parfumerie.

Ces propriétés et caractéristiques des huiles essentielles nous intéressent et nous amènent à étudier une plante endémique Malgache qui est *Cinnamosma fragrans* (Randraianarivelo Roger 2010).

-11- Principales voies d'utilisation des huiles essentielles :

Comme nous avons pu le constater dans la partie précédente, les HEs ne sont pas dénuées de risques pour l'utilisateur. Nous allons donc nous efforcer à présent, de préconiser une aromathérapie sûre et raisonnée (Tony ,2016).

-11-1- Voies d'administration et posologie

-11-1-1- Voie orale:

La voie orale sera utilisée avec prudence, principalement dans les pathologies infectieuses (respiratoires, digestives, urinaires, etc.) Pour la voie sublinguale, les HEs pourront être utilisées pures dans le cas de celles qui ne sont pas irritantes. On pourra aussi les administrer sur un support tel qu'un comprimé neutre, du miel ou sur un sucre (sauf pour le patient diabétique). Il est également possible de les diluer dans une huile végétale, d'autant plus si l'HE est irritante, ou alors dans un complexe liposomal pouvant émulsionner les HEs, type DISPER®. Si besoin, elles pourront faire l'objet d'une préparation magistrale en gélules, ce

Chapitre3 :Produits naturels et infections mammaires

qui permet de masquer le gout s'il est incommodant, et de protéger la muqueuse gastrique dans le cas des gélules gastro-résistantes.

Posologie usuelles (sachant que 1 goutte correspond environ à 20mg) Chez l'adulte ;

- HEs pures quand elles ne sont pas caustiques, ou diluées dans du miel, une huile végétale, ou déposées sur un comprimé neutre : 1 à 3 gouttes 2 à 3 fois par jour. 10 à 30 gouttes de la solution 2.

- HEs en solution buvable : dilution de 2 à 3 % à 3 fois par jour.

Chez l'enfant après 5 ans :

- Maximum 1 goutte par prise 4 fois par jour (jamais pure) Contre-indications à l'utilisation par voie orale :

- Enfants de moins de 5 ans

- Personnes présentant des troubles gastriques : ulcère, reflux gastro-œsophagien (menthe poivrée)

- HEs neurotoxiques ou abortives contenant des cétones (thuyone dont les HE sont réglementées) ou certains éther-oxydes (apiole, ascaridole...) chez certains sujets à risque comme les femmes enceintes, les épileptiques, les enfants.

- HEs néphrotoxiques riches en terpènes aliphatiques sur de longues périodes

- HEs à phénols hépatotoxiques sur de longues périodes ou à doses élevées : maximum 100 mg/j sur de longues périodes ou 500 mg à 1 g/j sur une période n'excédant pas 15 jours (TONY POIROT. 2016) L'utilisation de la voie orale ne doit être considérée que sur le conseil d'un aromathérapeute confirmé et non en automédication.

-11-1-2. Voie cutanée:

D'utilisation pratique au quotidien, la voie cutanée est une très bonne voie d'administration quand il s'agit de traiter des affections locales, cependant on peut l'utiliser pour obtenir une action plus générale., leur caractère lipophile permet aux HEs une bonne affinité avec le stratum corneum, mais le passage systémique est dans la plupart des cas limité. Cependant il sera augmenté sur les peaux des enfants, des personnes âgées, ou présentant des lésions.

On évitera autant que possible d'employer des HEs pures par voie cutanée. Il est préférable de les diluer avec une huile végétale (Tony 2016).

L'utilisation d'HEs pures pourra être envisagée pour certaines d'entre elles, considérées comme étant sans danger connu. Un test cutané est toutefois préférable pour prévenir toute réaction.

-11-1-3- Voie respiratoire:

La voie respiratoire est très utile quand il s'agit de traiter des affections ORL ou pulmonaires. Elle sera utilisée soit en inhalation sèche avec quelques gouttes déposées sur un tissu, soit en inhalation humide en déposant une dizaine de gouttes dans un inhalateur ou un bol d'eau tiède. (Tony 2016), Il peut aussi être fait usage d'appareils de diffusion atmosphérique toujours dans une indication respiratoire, dans un but d'assainissement ou encore pour corriger certains troubles nerveux.

Les études sur l'absorption des HEs par voie respiratoire ont montré de très bons résultats, ainsi il faudra prendre garde aux HEs utilisées.

On évitera :

- Les HEs irritantes pour les muqueuses contenant phénols et aldéhydes (ex. sarriette, thym à thymol, giroflier, cannelle...).
- Les HEs à cétones convulsivantes
- La diffusion dans des pièces en présence de jeunes enfants
- La diffusion nocturne à l'aide d'un diffuseur à micro-diffusion car le volume d'HE qui peut être déposé dans ces appareils peut atteindre plusieurs millilitres et l'appareil diffusera tant qu'il ne sera pas vide.

La diffusion d'HEs chez les patients asthmatiques ou atteints d'allergies respiratoires est contre-indiquée, les molécules allergisantes étant nombreuses au sein des HEs .

-11-1.4. Voie rectale:

C'est la voie de prédilection du traitement des pathologies infectieuses des voies respiratoires inférieures. En effet, le rectum bénéficie d'une excellente vascularisation.

Il est desservi par 3 veines :

les veines hémorroïdales supérieure, moyenne et inférieure. Ces deux dernières débouchent dans la veine iliaque, puis dans la veine cave inférieure avant d'arriver au cœur et aux poumons. Les HEs parviennent alors intactes à leur cible. La veine hémorroïdale supérieure, elle, mène d'abord au foie où les molécules s'y trouvant subiront l'effet de premier passage hépatique.

Cette voie présente donc certains avantages :

- L'effet est rapide en moins de 30 minutes ;
- Le foie est moins touché que par la voie orale, on pourra alors utiliser plus facilement les HEs à phénols ;
- Les troubles gastriques rencontrés par voie orale sont ici évités.

La muqueuse rectale est néanmoins sensible. Il ne pourra donc être fait l'usage d'HEs pures.

Chapitre3 :Produits naturels et infections mammaires

Tout comme pour la voie cutanée on évitera les HEs irritantes, allergisantes ou convulsivantes (TONY POIROT 2016) , En 2012, l'AFSSAPS a décidé de retirer du marché tous les suppositoires à destination des enfants de moins de 30 mois contenant des dérivés terpénique

-11-1.5. Autres voies :

Au niveau des muqueuses vaginale ou nasale, on respectera les mêmes recommandations que pour la voie rectale afin d'éviter les HEs irritantes ou allergisantes, et on évitera les HEs convulsivantes. À titre d'exemple, l'HE de menthe poivrée utilisée par voie nasale chez l'enfant est responsable de bradypnée voire même d'arrêt respiratoire . L'utilisation des HEs par ces deux dernières voies est à éviter en automédication, et surtout par application directe des huiles pures. Il est préférable de faire appel à des préparations magistrales, sur prescription d'un aromathérapeute, ou des spécialités pharmaceutiques dont l'utilisation est éprouvée.

Certaines voies sont formellement contre-indiquées à l'usage des HEs:

- La voie oculaire
- La voie intraveineuse
- La voie intramusculaire

-12-Monographie des plantes sélectionnées:

Le Géranium rosat est un hybride entre deux espèces ligneuses de Pelargonium : radens et capitatum (Demame et Van Der Valt, 1989). Il est cultivé à la Réunion pour la production d'huiles essentielles. La plante est pérenne et récoltée plusieurs fois par an laide de sécateurs. Les travaux présent& ici font partie d'une étude plus globale qui vise élaborer un modèle de croissance. Ce modèle devrait être capable de simuler la réponse de la plante à la taille, L'huile essentielle de Géranium rhizomateux est particulièrement intéressante pour ses propriétés mucolytique et lipolytique utiles en cas de catarrhes mucopurulentes sur les sphères respiratoire et génitale. Elle possède également une action anti tumorale. Elle est à différencier des Géraniums du genre Pélargonium(P. Franchomme, et al),c'est une plante d'origine courantes Bulgarie .ça Méthode d'obtention de l'extrait Distillation par entrainement à la vapeur d'eau,il des Voies de prédilection (Orale , Cutanée ,Diffusion , Olfaction).

Tableau n°1 : la Désignations de l'huile de géranium (Demame et Van Der Valt, 1989)

Désignations vernaculaires	Géranium vrai, Géranium vivace rhizomateux, Géranium à grosses racines
Désignation anglaise	Spessart, True Geranium, Zdravets

Chapitre3 :Produits naturels et infections mammaires

Description botanique

C'est une plante tapissante basse et rhizomateuse. Ses feuilles semi-persistantes de 10-20 cm, glabres, arrondies, à 7 lobes dentés au sommet, de couleur vert clair et prenant une belle teinte chaude pourprée à l'automne, sont très aromatiques. Ses fleurs érigées en ombelles et plates sont de couleur rose, rose-pourpre ou blanche, mesurent entre 2 et 2,5 cm. Ses étamines et styles sont proéminents. Les racines, grosses et rhizomateuses, portent plusieurs rosettes. Il aime les sols moyens, frais et riches et préfère la mi-ombre.

Classification botanique

Tableau N °2 : la classification botanique de la plante de géranium rosat (Randarianarivelo Roger 2010)

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Geraniales
Famille	Geraniaceae
Genre	Geranium

Constituants biochimiques :

Sesquiterpénones (50%) : germacrone (50%), bêta-élémonone Sesquiterpènes (16%) : bêta-germacrène, gamma- et bêta-élémonène, bêta-caryophyllène, curcumène, paracymène .

Propriétés organoleptiques

Tableau N°3 : les propriétés organoleptique de l'huile de géranium(Randarianarivelo Roger 2010)

Aspect	Liquide
Couleur	vert à brun
Densité à 20°C	0,960 - 0,970
Point éclair	64°C
Indice de réfraction à 20°C	1,5003 - 1,5189

-13-LES Propriétés inhibitrices des produits naturels vis-à-vis des infections mammaires :

Les huiles essentielles et les antibiotiques ou tous les produits naturels se distinguent des huiles grasses qui sont fixes et tachent le papier d'une manière permanente, alors que leurs taches sur du papier sont plutôt éphémères et qu'elles se volatilisent à la chaleur.[Randarianarivelo Roger 2010].

Chapitre3 :Produits naturels et infections mammaires

- Les essences de plantes sont généralement incolores, mais il en existe certaines colorées : essence de cannelle rougeâtre, essence d'absinthe verte, essence de camomille bleue, huile essentielle des feuilles *Annonidium manii* bleu ciel.
- Elles ont un indice de réfraction élevé (Exemple : *Cinnamosma fragrans* : 1,4636 ;*Laggera aurita* : 1,4987 ; *Hyptis spicigera* : 1,4739) et la plupart dévient la lumière polarisée (Randarianarivelo Roger 2010)
- De densité généralement inférieure à celle de l'eau, elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, les huiles fixes. Elles sont insolubles dans l'eau à qui elles communiquent néanmoins leur odeur.
- Leur rendement d'extraction peut varier de moins de 1 % à plus de 10 % par rapport à la matière sèche c'est-à-dire, pour extraire quelques grammes d'huile essentielle, il faut une grande quantité de matériel végétal.
- Les huiles essentielles sont sensibles à l'oxygène atmosphérique et à la lumière, car le contact entraîne l'altération des composés aromatiques qui les constituent.
- Elles sont volatiles à température ambiante bien que leur point d'ébullition soit relativement haut (150 °C – 300 °C).

Une propriété peut être considérée comme commune à toutes les huiles essentielles. Elles ont pratiquement toutes le pouvoir de traverser la peau et de se retrouver plus ou moins rapidement dans le sang. Seul le temps de pénétration varie d'une huile essentielle à une autre: 2 minutes pour l'huile essentielle de thym, 20 minutes pour l'essence de térébenthine, 40 à 60 minutes pour celles de citron, bergamote et anis, d'où leur utilisation dans le développement de l'aromathérapie rietés inhibitrices des produits naturels vis-à-vis des infections mammaires (RandarianariveloRoger2010).

SYNTHÈSE

EXPÉRIMENTAL

CHAPITRE 1

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Matériel et méthodes

CHAPITRE1 :

Objectif :

Ce travail a pour objectif d'étudier l'effet thérapeutique de l'huile essentielle de *Pélargonium graveolens* contre les infections mammaires à *Staphylococcus aureus* (souche de références et souche d'origine clinique).

I-Lieux de l'étude :

Notre étude a été effectuée au sein du laboratoire des sciences et techniques de production animale qui est situé dans la commune de Mazagran , route Hassi Mamèche .

1-Matériel

I-1-1. Matériel microbien

Origine des souches :

Les souches utilisées sont des souches appartenant au genre *Staphylococcus aureus* fournies aimablement par monsieur Dahou .A, maître assistant à l'université de Mostaganem

Souches de références :

La souche de référence de collection est *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

Souches d'origine clinique:

C'est une souche locale qui provient du laboratoire vétérinaire de Tlemcen. et qui a été isolée à partir d'un lait mammitique

I-1-2. Matériel végétal

Huiles essentielles extraites:

Les huiles essentielles du Géranium rosat (*Pélargonium graveolens*) ont été isolées des parties aériennes des plantes par hydrodistillation. Le *pélargonium graveolens* ou Pélargonium à forte odeur est un arbrisseau de la famille des *geraniaceae*, d'origine d'Afrique du sud. L'extraction a été réalisée au laboratoire pétrochimique de la wilaya de Boumerdes. Le matériel végétal est soumis à une hydrodistillation au moyen d'un dispositif d'extraction type Celvenger figure 4 (alambic à l'hydrodistillation) .

Matériel et méthodes

Culture des souches:

Notre étude a porté sur la bactérie staphylocoque de différents souche (clinique et références)

-Milieux de Chapman

C'est un milieu sélectif pour la culture des staphylocoques. La teneur élevé en sel inhibe la plupart des autres bactéries à l'exception de certains germes marins. Ce milieu peut également mettre en évidence la fermentation du mannitol(annexe A)

2-Méthode

1-Revivification du *Staphylococcus aureus*:

La revivification des deux souches *Staphylococcus aureus* (d'origine clinique et référence) a été réalisée sur le milieu de culture liquide PCA(plat-Count Agar) 10ml (La composition est mentionnée dans l'annexe A)

Pour revivifier les souches conservées à une température à -4°C ,on a introduit l'anse de platine dans des tubes de conservation après décongélation puis on a prélevé soigneusement 0,1ml de les souche *Staphylococcus aureus* qu'on a mis dans 100ml du milieux PCA et qu'on a incubé à 37°C pendant 24h jusqu'à 72h .

2.Examen bactériologique :

Vérification de la pureté de *Staphylococcus aureus*:

Après avoir revivifié les souches bactériennes, la recherche s'est orientée vers l'identification des isolats, la souche a été vérifiée par un état frais sur des cultures de milieu Chapman solide (la compositions est mentionnée dans l'annexe B) .on remplir les boite par le milieu Chapman

A fin de remplir les boites par le milieu Chapman nous laissons les boites de Pétri refroidir , on ajoute 0,1 ml de la souches bactérienne , et on ensemence le contenu des boites de Pétri , qui sont incubée à 37°C pendant 72h.

3-Examens macroscopiques et microscopiques:

3-1-1Examens macroscopiques :

Il permet d'observer l'aspect, la couleur et la forme des colonies par l'œil.

Matériel et méthodes

Tableaux N°4 : l'aspect macroscopique de la bactérie *Staphylococcus aureus* .

Taille	> 2mm
Aspect des bords	Réguliers
Relief	semi-bombé.
Aspect de la surface	lisse et brillante de type staphylocoque
Comportement à la lumière	Transparente
Couleur	jaune

On observe que le milieu est devenu jaune, il y a donc acidification du milieu due à la fermentation du mannitol, les bactéries fermentent donc le mannitol, elles sont donc mannitol+.

3-2-Examen microscopique :

1-Coloration de Gram :

On prépare une goutte de suspension bactérienne de *Staphylococcus aureus* (d'origine clinique et de référence) avec l'eau distillé sur une lame pour chaque bactérie , et on réalise un frottis ,on fixe la préparation à flamme ,on sèche soigneusement puis on laisse refroidir la lame .on procède à la coloration avec le violet de gentiane pendant 1min ,puis on rince avec l'eau distillée.

On recouvre la lame au lugol pendant une 1min et on décolore jusqu'à disparition de la couleur violet par l'alcool en faisant couleur goutte à goutte sur la lame inclinée , ensuite on rince avec l'eau distillée .On recouvre la lame par la fuchine pendant une minute , on rince avec l'eau distillée , on sèche la lame l'air et on l'observe au microscope x100, en immersion avec de l'huile (Nadjeia .2016).

3-3-Teste biochimiques :

1- Teste de la catalase :

Ce test est utilisé pour différencier les bactéries catalase positive et catalase négative ,la présence d'une catalase se traduit par l'apparitions de bulles de gaz d'oxygène lors de contact de la bactérie avec l'eau oxygénée (Mechehoud ,2017).

Nous avons déposé sur une lame quelques gouttes d'eau oxygénée dans chaque partie puis , on rajoutée à l'aide d'une anse notre notre inoculum bactérienne à Partir de la colonie et on les mets en contact avec la goutte de l'eau oxygénée(Kouri ;2016) .

2- Teste de la coagulase :

Deux tubes sont utilisés pour chaque souche bactérienne .d un volume de 9ml de milieux plasma de lapin sont placés dans chacun deux(Kouri ;2016) .

Matériel et méthodes

Le premier tube est considéré comme témoin et dans le second tube on place 0,5ml de la suspension bactérienne préparée à partir de la colonie d'origine clinique revivifiée.

Pour les souches de référence, les mêmes étapes que précédemment sont réalisées le contenu des tubes est mélangé au vortex, les tubes sont ensuite mis à incuber à 37°C pendant 24h.

3- Teste d'oxydase :

C'est un test discriminant qui permettra de faire des hypothèses sur l'identité de la bactérie étudiée (Kouri ;2016).

Dans les mêmes conditions précédentes, et avec l'anse de platine, nous avons placé une colonie de *Staphylococcus aureus* (d'origine clinique et référence) sur un disque d'oxydase.

4-Antibiogramme (par la méthode de diffusion sur disque (ADT)):

Pour appliquer cette technique, on a testé l'effet de l'huile essentielle de géranium rosat vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (d'origine clinique et référence) par la méthode de diffusion de disque sur le milieu de Chapman. On a réalisé des trous de 5mm dans les boîtes, et à l'aide d'une pince stérile, on dépose des disques de papier filtre stériles à 6mm sur chaque puits de la boîte de Pétri (CLSI, 2010).

4-1-Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle :

L'évaluation de l'activité antibactérienne des HEs est réalisée par la méthode de diffusion de disque sur milieu Chapman. Le terme "agent antimicrobien" désigne toute substance utilisée pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris, agents antibactériens. Les agents antimicrobiens sont utilisés depuis des décennies pour traiter les maladies transmissibles et prévenir les infections (CCE, 2001). Le mode d'action de ces agents sur les bactéries, peuvent être : Bactériostatique, lorsque la substance inhibe la multiplication des bactéries ou bactéricides : lorsque la substance détruit totalement les bactéries.

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits, des repiquages ont été effectués pour chaque souche bactérienne en milieu solide, milieu de Chapman pour *Staphylococcus aureus*. Les deux bactéries (référence et d'origine clinique) sont utilisées pour l'antibiogramme. L'incubation a lieu à 25°C pendant 24h jusqu'à 72h.

-On met sur les boîtes de Pétri des trous à l'aide de l'inverse de la pipette de 6mm. (4 trous sur chaque boîte) Le traitement a été étalé en 4 fois.

-Des disques de papier Wattman N°1 de 6 mm de diamètre ont été préparés, stérilisés

Matériel et méthodes

puis déposés à la surface des boîtes ensemencées (un disque sur chaque puis c'est-à-dire 4 disques sur chaque boîte).

-Les disques sont chargés avec 0,5µl ; 1µl et 1,5µl de L'H.EG et déposés à la surface gélose ou sur le disque

-Les boîtes sont laissées pendant 1 heure à 4°C, On incube à 37°C pendant 24h à 48h.

Quatre essais de traitement sont réalisés pour chaque test (Zouari et *al.*2010).

4-2-Étude de la combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques :

L'Évaluation antibactérienne des antibiotique a été réalisée par la méthode de diffusion par disques imprégnés respectivement les dose préconisée par (Halawani 2009) selon les étapes suivants :

Pour la souche bactérienne d'origine clinique, deux boites de pétri sont utilisés pour chaque antibiotique (Gentamicine ,Amoxiciline,Vancomycine , Tétracycline) .

On met sur les boites de Pétri des trous à l'aide de l'inverse de la pipette de 6mm.(4trous sur chaque boîte) Le traitement a été étalée en 4fois.

-Des disques de papier Wattman N°1 de 6 mm de diamètre ont été préparés, stérilisés puis déposés à la surface des boîtes ensemencées (un disque sur chaque puis c'est-à-dire 4 disques sur chaque boîte).

-Les disques sont chargés avec 5µl de L'H.EG et déposés à la surface gélose ou sur le disque

-Les boîtes sont laissées pendant 1 heure à 4°C, On incube à 37°C pendant 24h à 48h.

Quatre essais de traitement sont réalisés pour chaque test (Zouari et *al.*2010). Pour les huiles essentielles on a précédemment réalisé la méthode

Le traitement est étalé en 4fois pour chaque teste. On respectivement les mêmes étapes et on ajoute les même dose pour l'antibiotique et l'HEG , est après chaque ajout de dose d'antibiotique et les huiles essentielles on déposons un disque. le résultat étant la moyenne des 4 essais.

CHAPITRE 2

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussion

I-Revivification du *Staphylococcus aureus* .:

Les colonies observées sont caractéristiques de *Staphylococcus aureus* dans les deux souches d'origine clinique et souche de référence qui sont représentées dans la Figure (9).



1-Souche de reference

2-Souche d'origine clinique

Figure N° 9 :Revivification de les deux souches bacterinne *Staphylococcus aureus*.

Les tubes présentant dans la figure 9 montrent des colonies de couleur blanche c'est ta dire sont des colonies de *Staphylococcus aureus* de culture aérobie-anaérobie facultatif.

II-1-Vérification de la pureté de *S. aureus*

Ces figures représentent la vérification de la purification *Staphylococcus aureus* pour les deux souches d'origine clinique et de référence(figure 10 et 11).

Résultats et discussion



Figure N°10 : Vérification de la pureté de *S. aureus* de références



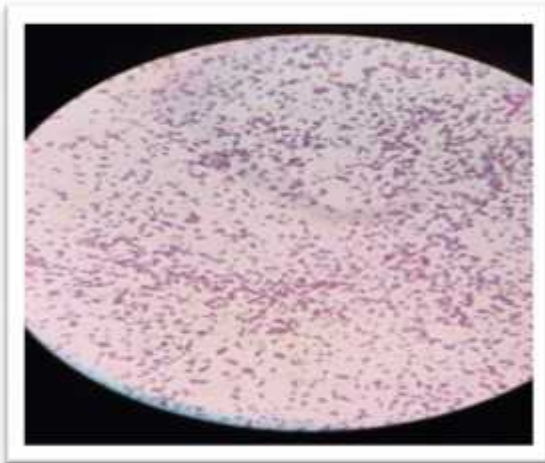
Figure N°11 : vérification de la pureté de *S. aureus* d'origine clinique

Les résultats montrent que les bactéries d'origine clinique et bactéries de référence utilisées sont pures et non contaminées (figures 10 et 11).

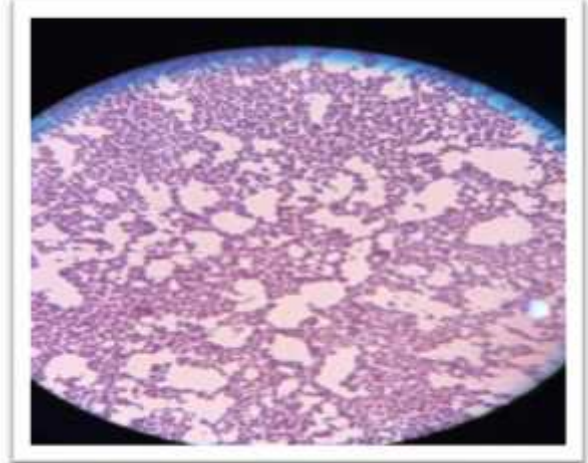
II-2-Examens macroscopiques et microscopiques :

1- Coloration de Gram :

La figure N°13 montre la coloration de Gram de la souche *Staphylococcus aureus* d'origine clinique et de référence.



1- Souche d'origine clinique



2- Souche de référence

Figure N°13 : Observation au microscope photonique et à l'immersion (x100) par la Coloration de Gram de la souche d'origine clinique et de la souche de référence.

A partir des résultats microscopiques (figure 13), on observe des coques de façon homogène en violet, c'est-à-dire des coques gram+ regroupés en amas dans les deux souches (référence et clinique). Les coques sont ronds, réguliers, de petits diamètres.

Résultats et discussion

Teste biochimique

1- Test de la catalase:

Dans ces résultats ,on observe la formation de bulles du gaz produits par des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* d'origine clinique (c) et de référence (r),les résultats sont représentés dans la figure N°12.



Figure N°12 : résultat de teste catalase

Selon les résultats de la figure 12, on observe un dégagement gazeux dans les de souches, donc sont catalase+

3- Teste à la coagulase :

Le résultat de la figure n°14 montre le test de coagulase des souches d'origine clinique et de référence par le plasma de lapin , après une incubation à 37°c pendant 24h.

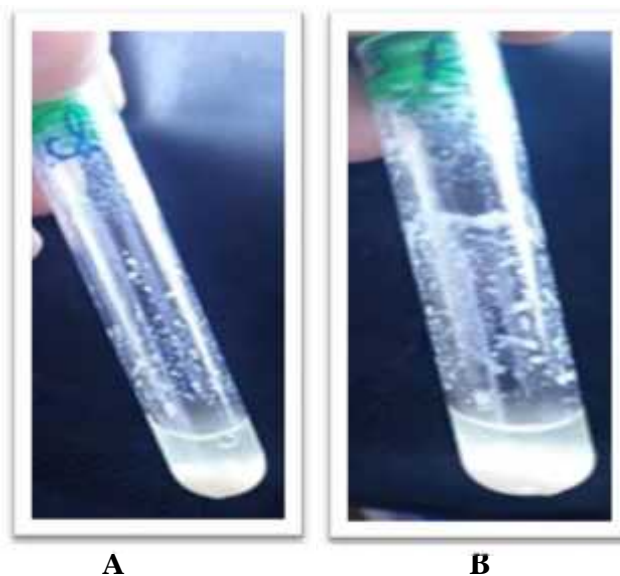


Figure N°14 : Test de la coagulase par le plasma de la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* (d'origine clinique(A) et de référence(B))

Résultats et discussion

Après l'incubation, on peut incliner le tube, le plasma reste sous forme d'un culot, cela signifie qu'il a coagulé, donc que la souche possède la coagulase, elle est donc coagulase+.

4- Test à l'oxydase :

La figure N°15 représente le test à l'oxydase des deux souches bactériennes *Staphylococcus aureus* (Souche d'origine clinique et souche de référence) en comparaison avec le témoin.



Figure N°15: teste à l'oxydase des souches *staphylococcus aureus* d'origine clinique (C) et de référence (R) et le témoin (T).

Les résultats confirment que les deux souches *Staphylococcus aureus* étaient dépourvues d'oxydase, Il n'y a pas eu de coloration. Donc les deux souches ayant apparition d'une couleur violette, elles sont donc oxydase négative.

III- L'antibiogramme :

L'antibiogramme de vérification des souches testées montre qu'elles résistent à plusieurs antibiotiques à différentes familles et de l'huile essentielle de géranium .

III-1- Evaluation de l'activité antibactérienne :

L'évaluation de la sensibilité des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* (souche d'origine clinique et souche de référence), testées par antibiogramme nous a permis d'obtenir les résultats qui sont également illustrés sur les figures (16 et 17) et sur le tableaux n°5.

On remarque qu'il ya une légère sensibilité des ces souches de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de ces antibiotiques après un traitement de 4 essais.

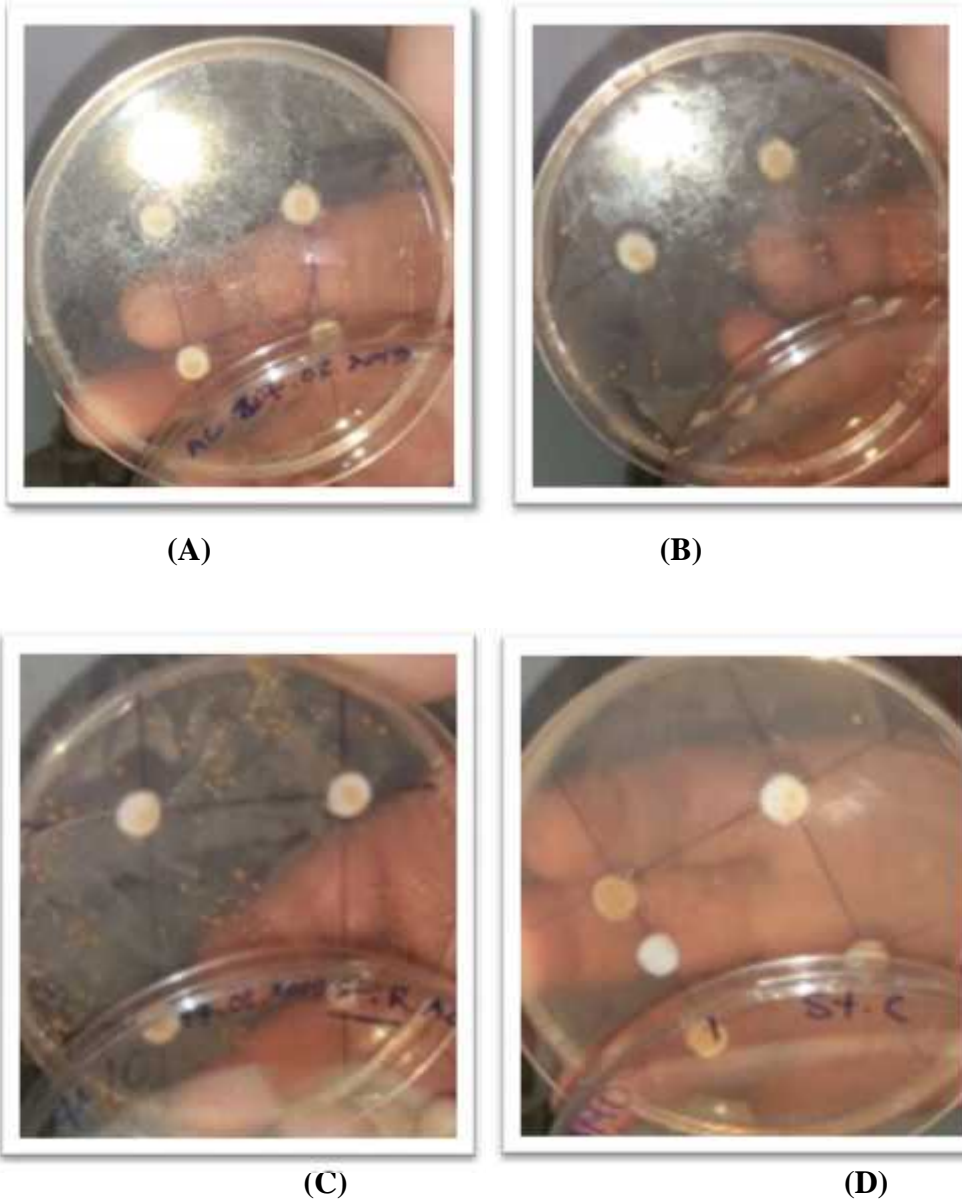
Tableau 5 : Résultats de l'activité antibactérienne des antibiotiques

Souches	Amoxiciline	Gentamicine	Vancomycine	Tétracycline
Staphylocoque d'origine clinique	+	+	+	+
Staphylocoque de référence	+	+	+	+

Résultats et discussion

Les résultats de l'évaluation de la sensibilité des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* testées par l'antibiogramme de l'antibiotique après 5 jours sont illustrés dans les figures (17 et 16). Après un traitement étalé en 2 fois.

Les résultats montrent l'absence d'effet inhibiteur de l'antibiotique.



1-Souche d'origine clinique

2-Souche de référence

Figure N°16 : Evaluation de l'activité antibactérienne de *Staphylococcus aureus* testé par l'antibiotique (tétracycline(B et D) et l'amoxiciline(A et C) après un délai de 5 jours. Les résultats montrent l'absence d'effet inhibiteur de l'antibiotique (Vancomycine et Gentamycine)



(A)

(B)



(C)

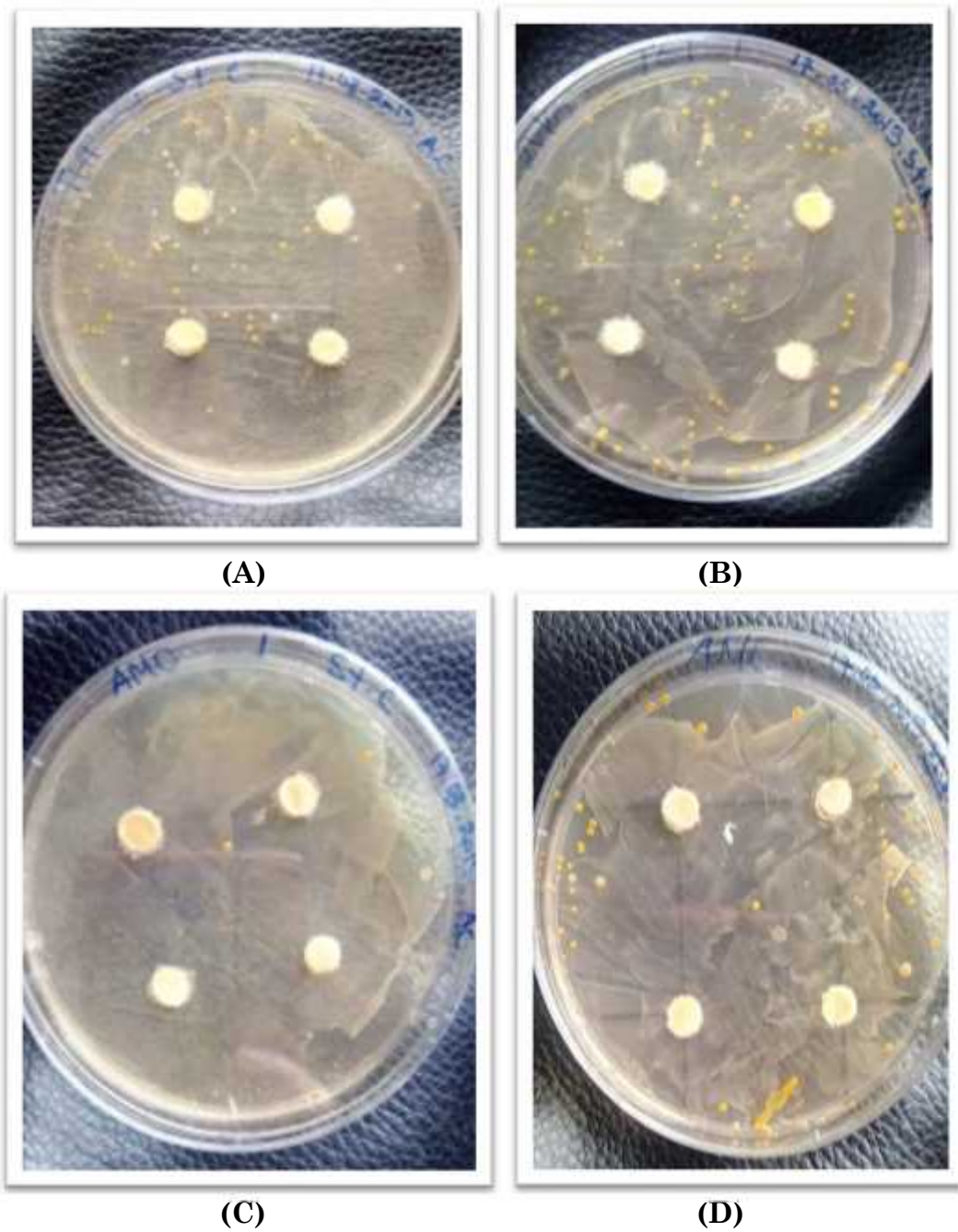
(D)

1-Souche de référence

2-Souche d'origine clinique

Figure N°17 : Evaluation de l'activité antibactérienne de *Staphylococcus aureus* testé par l'antibiotique (Vancomycine (A et B) et gentamicine(c et D))après un délai de 5 jours

Les résultats de l'évaluation de la sensibilité des *Staphylococcus aureus* testées par antibiogramme de l'antibiotique après 12 jours sont illustrés dans les figures 18 et 19.



1- Souche d'origine clinique

2-souche de référence

Figure N°18: Evaluation de l'activité antibactérienne de *Staphylococcus aureus* testé par l'antibiotique (Amoxiciline(A et B) et tétracycline(B et C)) après un délai de 12 jours .

Les résultats montrent une action de sensibilité de l'antibiotique (Vancomycine et Gentamycine) .

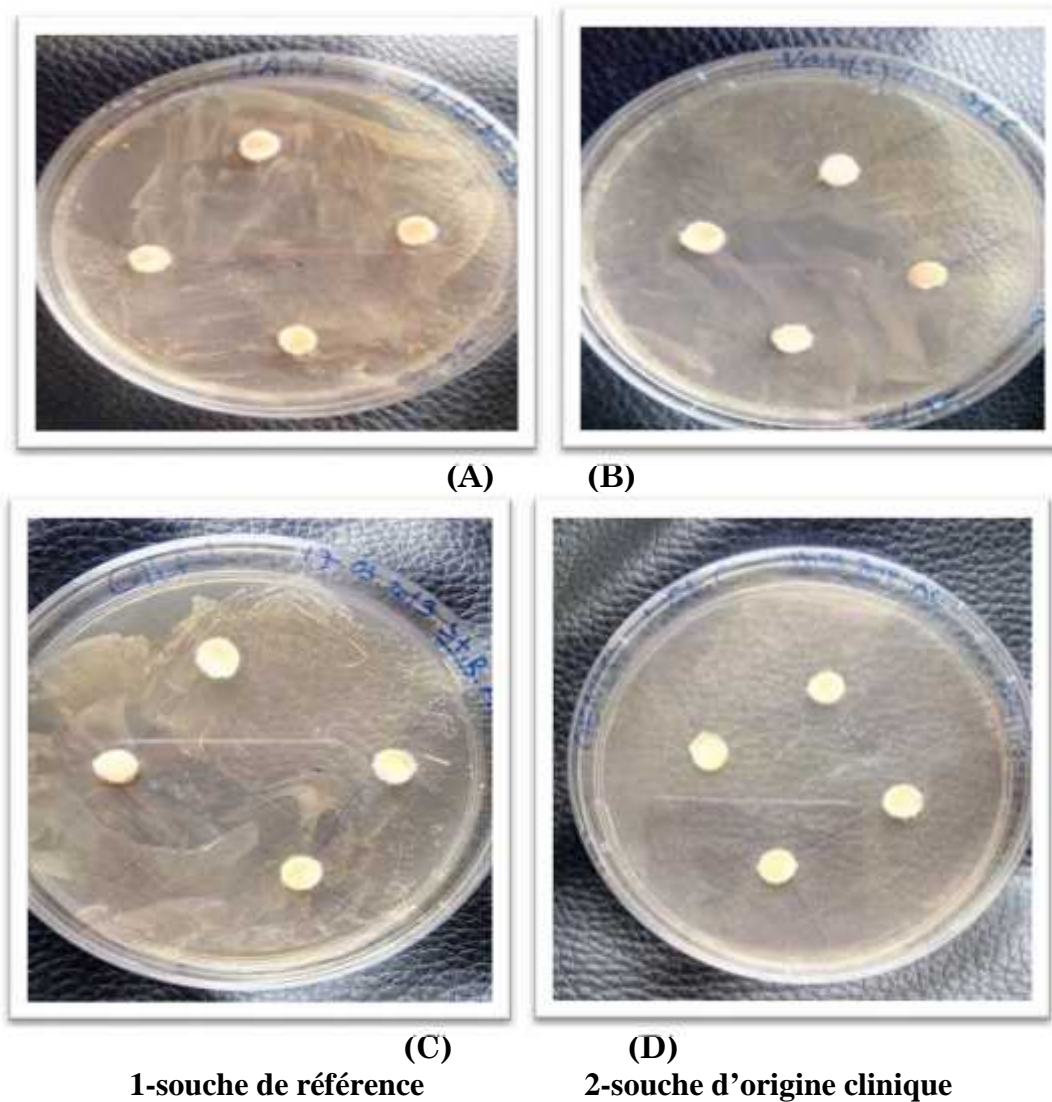


Figure N°19: Evaluation de l'activité antibactérienne de *Staphylococcus aureus* testé par l'antibiotique (Vancomycine (A et B) et gentamicine (C et D)) après un délai de 12 jours.

Résultats de l'action des huiles essentielles :

On remarque que il y'a une forte sensibilité pour les souches de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis l'HEG.

Tableau 6 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle (géranium rosat)

Huile essentielle	Dose μ l	Diamètre des zones d'inhibition	
		<i>Staphylococcus aureus</i> de référence	<i>Staphylococcus aureus</i> d'origine clinique
<i>Pélargonium graveolens</i>	0,5	0mm	0mm
	1	7mm	7mm
	1,5	8mm	8mm

Résultats et discussion

Les résultats de l'évaluation de la sensibilité des souches bactériennes *Staphylococcus aureus* testé par antibiogramme de l'huile essentielle après 5 jours sur un traitement étalée en 2 fois sont illustrés dans la figure (20).

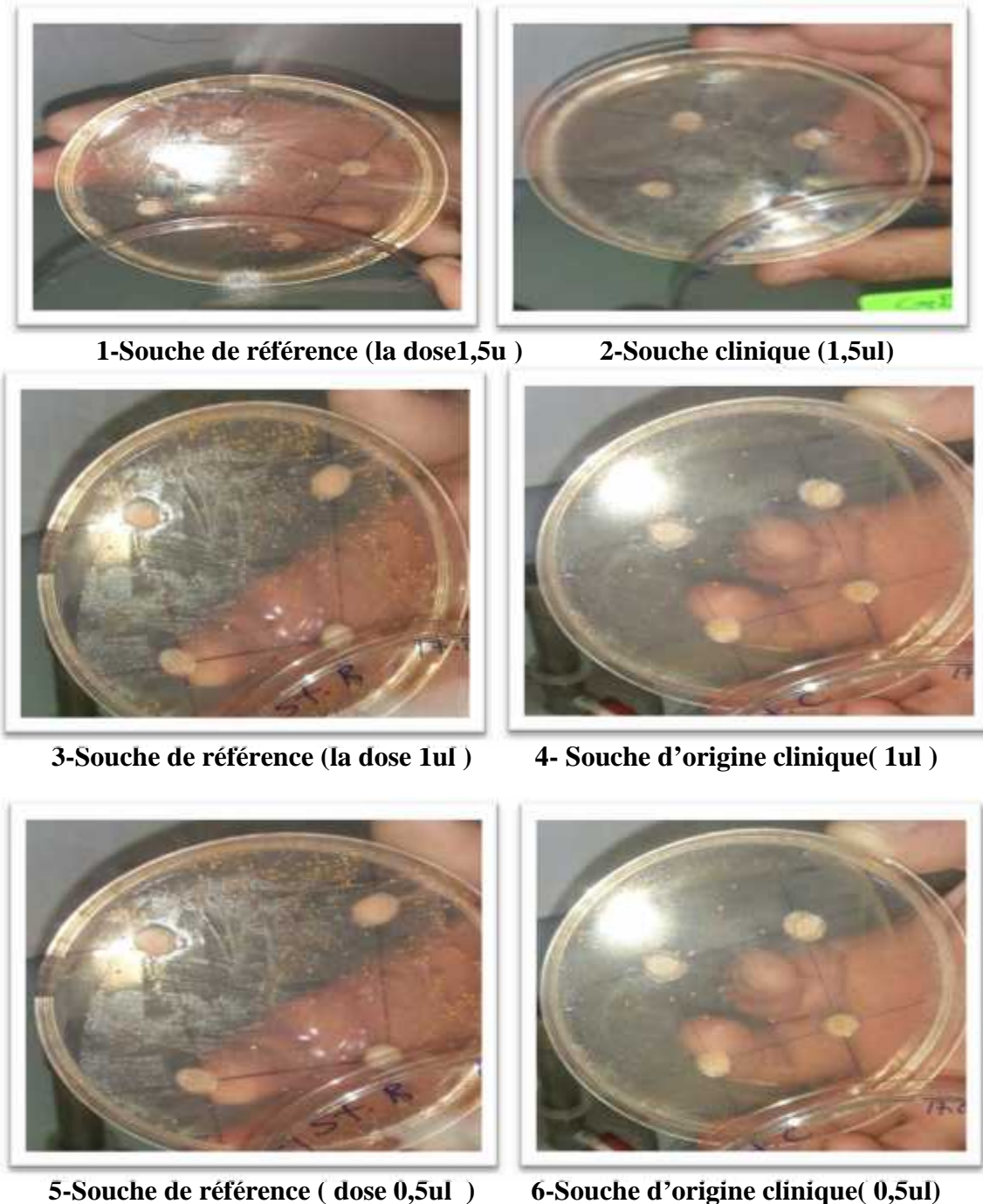


Figure N°20 : Aromatogramme de l'huile de géranium par les *Staphylococcus aureus* après un délai de 5 jours en traitement étalée en 2 fois.

Les résultats de L'évaluation de la sensibilité des souches bactériennes *staphylocoque aureus* testées par antibiogramme de l'huile de géranium après une durée de 12 jours sur un

Résultats et discussion

traitement en étalée 4fois (1 μ l X 4 fois=2 μ l ; 1,5 μ l X 4 fois=4 μ l ; 0,5 μ l X 4 fois= 6 μ l) ils sont illustrés dans la figure (21).

Les résultats montrent la présence d'effet inhibiteur et l'effet de sensibilité de l'HEG

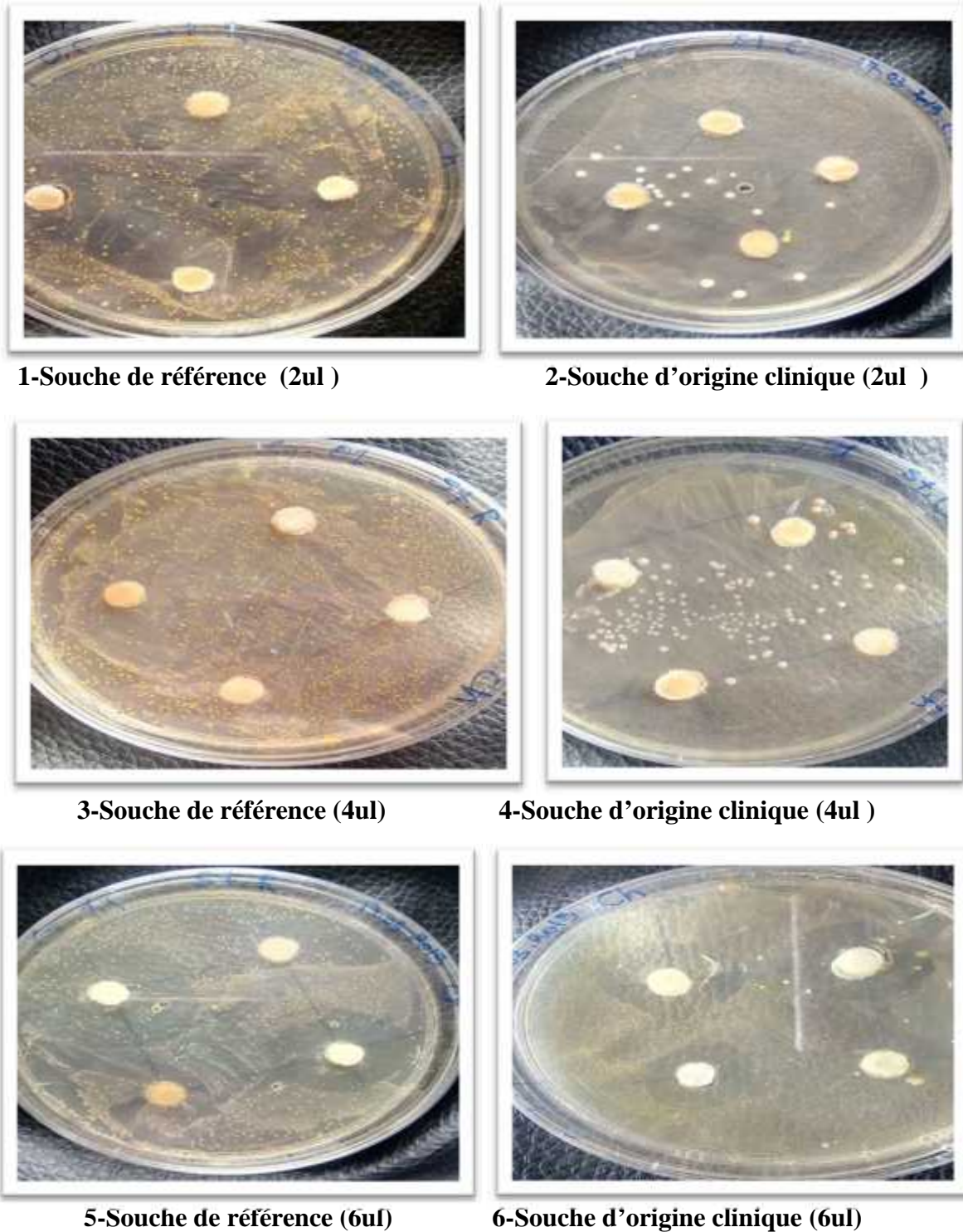


Figure N°21 : Aromatogramme de l'huile de géranium par les *Staphylococcus aureus* après un délai de 12jours en traitement étalée en 4 fois

Résultats et discussion

Résultats est discussion après la durée de 5 jours à 12 jours :

L'action des quatre antibiotiques, sur les souches de *Staphylococcus aureus* (d'origine clinique et de référence) (figures 16 et 17 et tableau 5), montrent des zones d'inhibition mais pas claires pour l'amoxicilline, gentamicine, vancomycine et même pour la tétracycline.

Après la durée de 12 jours et selon les figures (18 et 19), les résultats expérimentaux montrent des zones d'inhibition un peu plus importantes pour les quatre antibiotiques. Les deux souches de *S. aureus* présentent une résistance à la vancomycine ce qui peut conduire à des échecs thérapeutiques sur l'animal (Armando et Rahma, 2009), et à l'amoxicilline, la gentamicine et à la tétracycline dont la résistance se fait essentiellement par mutation survenant à des fréquences élevées c'est à dire les antibiotiques ayant une action de protection et une action d'inhibition.

Pour les huiles essentielles

Les résultats expérimentaux (tableau 6), indiquent que parmi l'huile essentielle de géranium testées sur les souches de *Staphylococcus aureus* (de référence et d'origine clinique), montre aucune zone d'inhibition après 5 jours pour la dose 0,5ul, 1ul et 1,5ul, donc la bactérie est pas sensible pour les trois doses dans la durée de 5 jours de traitement (figure 20).

Après la durée de 12 jours les résultats montrent (figure 21) une zone d'inhibition plus efficace, une action progressive et une action curative pour la dose de 4ul et de 6ul sur un traitement étalé en 4 fois. Par contre la dose de 0,5ul (étalée en 4 fois) a donné seulement un effet d'inhibition mais sans effet curatif sur le développement de germe *Staphylococcus aureus*, c'est à dire l'activité de l'huile de géranium est donc plus efficace sur les *S. aureus* d'origine clinique et ainsi pour la souche de référence ATCC6538 pour toutes les doses (4ul, 6ul) testées et en traitements étalé en 4 fois dans une durée de 12 jours. La souche de référence ATCC6538 et la souche d'origine clinique de *Staphylococcus aureus* montrent une sensibilité pour l'huile essentielle de géranium pour les trois doses après une durée de 12 jours dans une dose de 4ul (1ul x 4 fois) et 6ul (1,5ul x 4 fois) étaler en 4 essais.

Les résultats obtenus du test ont montré que les souches des bactéries *Staphylococcus aureus* (d'origine clinique et de référence ATCC6538) dont les matrices alimentaires présentent une aucune sensibilité vis-à-vis de différentes doses des huiles essentielles de géranium après 5 jours est après un traitement étalé en 2 fois, notamment avec les doses d'huiles essentielles après 12 jours et après un traitement étalé en 4 fois. Les zones d'inhibition pour la dose 4ul et 6ul (étalée en 4 fois) de l'huile de géranium sont plus élevées et sur tout plus efficaces sur les

Résultats et discussion

deux souches vis-à-vis la dose de 2ul , nous avons observé un effet de synergie pour la combinaison de dose(4ul et 6ul) d'huile de géranium pour cela on peut conclure que les extraits de plantes de géranium ont une activité antibactérienne plus importante et ont une action de sensibilité et une action d'inhibition plus rapide pour la dose de 4ul et 6ul à traitement étaler en 4fois sur la souche de référence et pour la souche d'origine clinique .

Toutefois, l'HE géranium présente une activité antibactérienne considérable à l'égard de ces souches (d'origine clinique et la souche de référence ATCC6538) . Cette activité peut être expliquée par leurs richesses en composés alcool mono terpénique, le géraniol et citronellol, principalement à la présence de sulfure de diméthyle (Ghanmi et *al*, 2010). Les deux dose choisies, à savoir (4ul et 6ul) correspondent aux doses énoncées par l'organisations mondiale de la santé animale OIE projet 2017-2019 l'utilisation de la phytothérapie des mammites subcliniques et cliniques aux huiles essentielles se fait par un traitement des trayons en pré-trempage à des doses allant de 5 à 20 µl suivant l'état sanitaire et infectieux des pis de vache (huiles essentielles recommandées 80/20 -70/30 -60/40) (Leperlier *et al* 2013).

N.B : nos huiles essentielles sont à 70/30 (70% de constituants liposolubles et à 30% de constituants solubles).

A montré qu'en traitement in vitro à des doses allant de 5 à 25 µl l'huile essentielle entre 1 et 5mm pour une inhibition de prolifération et de 5 à 15 mm pour une action bactéricide .La concentrations minimale bactéricide CMD vis-à-vis des staphylocoques à coagulase positive est l'ordre de 5à 15 µl pour un traitement curative/ trayon de 15 à 20 jours et de l'ordre de 2 à 5 µl /trayon un traitement préventif de 05à 7 jours inhibant toute prolifération des germes responsables des mammites (ainsi déterminant la concentration minimale inhibitrice CMI).

Les résultats obtenus, montre que l'huile de géranium a une action bactéricide et donc c'est un traitement curatif.

III-2-Etude de la comparaison « huile essentielle/antibiotique »

Dans la mesure où l'antibiotique est constitué d'une seule molécule, il est aisé pour une bactérie de synthétiser une enzyme, ou une autre molécule, le rendant inactif. Cela ne se produit jamais avec les traitements aromatiques. L'Europe est pourtant le plus grand consommateur d'antibiotiques pour le traitement des infections pathogènes chez les animaux mais , il est aussi le continent où il y a le plus grand nombre de victimes de bactéries résistantes. Au contraire, l'efficacité des huiles essentielles ne faiblit pas au fur et à mesure de leur utilisation dans la dose 4ul est 6ul. L'extrême variété de leurs composants phénoliques empêche les microbes d'organiser leur résistance, surtout lorsqu'elles sont associées entre

Résultats et discussion

elles. Le groupe des phénols possède une action puissante contre les germes pathogènes les plus résistants.

Les résultats observés montrent que l'association des HEs de géranium dans la dose 4ul et 6ul aux différents antibiotiques présente des effets qui sont différents, des zones d'inhibition des HEG et de leurs associations sont rapportés dans les figures (20et 21).

D'après les résultats obtenus dans la figure (18et 19 et 21) il apparait que les trois doses de l'huile essentielle de géranium inhibent la croissance des souches bactériennes de *Staphylococcus aureus* d'origine clinique et de références ATCC6538 après une durée de 12 jours .Les deux souche ont une action d'inhibition est une action progressif , protection et une action de sensibilité . C'est ta dire L'HEG à une action curative dans la dose 4ul et 6ul notamment pour les antibiotique ont une action sensibilité et une action de blocage moins rapide que les huiles essentielles ,notre résultat indique que l'huile de *géranium rosat* a une activité très puissante sur cette souche de référence est ainsi pour la souche clinique par la dose de 4ul et 6ul vis-à-vis les trois antibiotique déférents et la dose de l'HEG de 2ul au traitement étalée en 4fois .

CONCLUSION

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus pour leurs propriétés thérapeutiques. Avec la prévalence des microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques, nous notons un regain d'intérêt pour les molécules naturelles extraites à partir de ces dernières. L'Algérie par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. La présente étude nous a permis d'évaluer l'activité antibactérienne d'huile essentielle d'une plante médicinale aromatique locale de la région de Boumerdes et qui est le *Géranium rosat* sur deux souches bactériennes multi-résistantes (*Staphylococcus aureus* d'origine clinique et de référence ATCC6538) et leur effet avec les quatre antibiotiques (l'amoxicilline, la gentamicine, la vancomycine et la tétracycline). L'huile essentielle de géranium a présenté une activité antimicrobienne importante in vitro.

Ces résultats préliminaires obtenus s'avèrent prometteurs dans l'élargissement de l'arsenal thérapeutique des plantes dotées de propriétés antibactériennes. Leur criblage permettrait de découvrir de nouveaux antibactériens, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces. Les mammites à répétition sont principalement dues à l'absurdité des traitements antibiotiques, qui appauvrissent aveuglément nos exploitations d'élevage bovins. À l'inverse, les huiles essentielles nettoient en douceur les quartiers des glandes mammaires sans affecter le fragile équilibre de l'appareil mammaire et de la production laitière.

Depuis la brillante découverte de la pénicilline (1er antibiotique) par Fleming en 1928, les antibiotiques sont toujours utilisés pour soulager des épidémies infectieuses. Ainsi, l'augmentation de l'antibiorésistance est un fait mais les options thérapeutiques s'épuisent très rapidement. Le temps est alors compté quand on sait en plus, que l'antibiorésistance se dresse aujourd'hui au premier rang des principales causes de progression des infections mammites parmi le cheptel animal bovin (Réseaux Canadien, 2010).

L'utilisation de cette huile essentielle présente des nouvelles perspectives pour une thérapie aussi bien curative, que préventive, face à la pathogénicité des plusieurs souches bactériennes qui de surcroît, présentent une résistance au traitement usuel et que l'huile essentielle est moins chère et plus efficace vis-à-vis d'autres produits .

A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons déduire que la flore algérienne 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, où les antibiotiques ne sont plus aussi efficaces qu'avant. En fait, selon le réseau canadien de recherche sur la mammité bovine 2010, certains d'entre eux ne seront plus du tout efficaces d'ici dix à vingt ans.

ANNEXES

Annexe A: Milieux Chapman

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif.

Les Composant de le milieu Chapman : (1L pour 1000)

Tableau n°7 : les composition de le milieu Chapman

Composant	Quantité
<i>Pepton de viande</i>	10g
<i>Lactose</i>	10g
<i>Clorul de soduim</i>	5g
<i>Sterat de soduim</i>	2g
<i>Rouge neutre</i>	0 ;03g
<i>Lagar</i>	15g

-on mis les compostant dans un ph 7,1 e on ajout 1l de l'eau distillée autoclavage 120°C a 10min après on ajout 50ml flacon de le milieu préparer pour 250ml de déxoclorule dans notre travail on travaillé sur 180ml de le milieu pour 35ml de d'exo on les mélange et on mis dans un autoclave a 120°C

Annexe B: Milieux PCA

Il utilisé en bactériologie alimentaire pour le dénombrement des bactéries aérobies psychotropes mésophile dans le lait ,les viandes les produits à base de viande ainsi que l'analyse des produits pharmaceutique [**Biokar , Diagnostics**]

Les composant de le milieu PCA(Plate-count Agar)

Tableau N °8 : Les composant de le milieu PCA(Plate-count Agar)

Composant	Quantité
Tryptone	6 ,0g
Extrait de levure	2,5g
Agar	15,0g
Eau distillée	1L
Glucose	1,0g
Ph	7 ,0

ANNEXES

Annexe C : Milieux du plasma

La plasma de lapin lyophilisé est utilisé pour la détection de la coagulas libre produite par *Staphylocoques aureus* il a un principe de la production de coagulas libre par *Staphylococcus aureus* provoque une coagulation du plasma qui se traduit par la formation d'un culot de coagulation .

- Préparation du Plasma:

A l'aide d'un bécher on prend 50 ml de l'eau distillé on le mélange avec 50 ml de plasma dans un flacon stérile ,on met le flacon d'un bain marie on laisse le bouchant de le flacon plus au moins fermé jusqu' que la température de mélange doit être a 90°C on ferme le bouchant de le flacon on le laisse 5 min .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographique :

A

Abbes S , Amouri I, Ayadi A, Makni F, Nej S, Sallemi H, Trabelsi H .(2011). Methods for studying the in vitro susceptibility of *Candida* spp. to antifungal. *Annals de biology Clinique*,pp 635-642.

Aafi A , Aberchane M, Amarti F, Chaouch A, El Ajjouri M , El Antry S, Farah A, , Ghanmi M et Satrani B .(2008). Composition chimique et activite antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytotherapie*. 6, 342–347p .

Afssaps .(2008). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. *Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles*. France. 11-12Pp.

Andrews.(2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobien Chemotherapy* 48, 5-16.

Alexine W ,Apolline B , Guevellou P-A et Wendy L. (2019).agrocampus ouest, avec la participation de Cyril Urlande, *vétérinaire conseil* chez Triskalia, Marc Boudry, *vétérinaire conseil* chez agrial, et Nathalie Bareille, enseignante-chercheuse à ONIRIS.

Argente .(2005). Valeur de l'observation clinique des symptômes simples de mammite pour prédire les bactéries en cause. *Bulletin des GTV*. (32):39-46

B

Bactériologie (2002-2003).service de bactériologie.bacterio.fr .faculté de médecine Pierre et Marie Curie.29,30p. Accessible en ligne

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/bacterio.pdf>

Balouiri M , Ibsouda S-K , Sadiki M .(2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6, 71-79.

Baillargeon P.(2010). *Connaître la cause de la mammite pour perdre moins de lait*. Le producteur de lait québécois. 41-4 .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Baser H-C , Demirci K, Demirci T, Hashimoto G, Iscan B and Noma F

.(2006). *The essential oil constituents and antimicrobial activity of Anthemis aciphylla BOISS. var. discoidea BOISS.* Chem. Pharm. Bull., 54:222-225.

Belaiche P. (1979). *Aromatogramme. In Traité de phytothérapie et d'aromathérapie.* Edition Maloine-S-S, tome I . 9-20p.

Belaidouni N-W . (2017) . *Interactions des bactéries lactiques vis-à-vis à des bactéries pathogène* , Université abdelhamid ibn badis-mostaganem faculté des sciences de la nature et de la vie .16-17p.

Benmounah B.(2002). *Prévalence étiologique des mammites subcliniques dans la wilaya de Constantine.* Thèse de Magister, Université Mentouri Constantine .94p.

Biokar D – Rue des quarante mines – zac de ther – allonne – b.p. 10245 – f60002 beauvais cedex france. accessible en ligne

http://www.solabia.com/Divisao_9/BIOKAR

Bouaziz O, Kabouia R, Smati F.(2000). Enquête sur *les mammites bovines dans la région de Constantine – Résultats préliminaires.* 4ème Séminaire International de Médecine Vétérinaire Constantine .

Burt S-A.(2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. International Journal of Food Microbiology. 94: 223-253.

Bourachot M . (2017), *Traitement des mammites chez la vache laitière l'aromathérapie, état des lieux et perspectives* .Thèse Présentée à l'université Claude-bernard - Lyon , ,24 Novembre 2017 ,19p. Accessible en ligne

[file:///C:/Users/Acer%20914/Downloads/2017lyon083%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/Acer%20914/Downloads/2017lyon083%20(4).pdf)

Bosio K, D'avolio A, Savoia D .(2000) . In vitro activity of propolis against Streptococcus pyogenes. Microbiol **31**, 174-177.

Boyle W. (1955). *Spices and essential oils as preservatives.* The American Perfumer and Essential Oil Review :66, 25– 28.

Bradley AJ .(2002). Bovine mastitis,an evolving disease. . *The Veterinary Journal.* 164(2):116-28..

Burfield T, et Reekie S-L.(2005). Mosquitoes, malaria and essential oils. *International Journal of Aromatherapy* .,15, 30-41.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

C

Calsamiglia S, Cardozo PW, Castillejos L et Ferret A.(2007).Invited Review , Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science.*,90 : 2580-259.

Carillon E.(2000). *La phytothérapie face à l'évolution médicale.* Ed :Phyto . 10-15p.

Cavaleiro C, Goncalves M.J, Pinto E and Salgueiro L. (2006), Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, Aspergillus and Candida strains, *Journal of Applied Microbiology ISSN.*, **100**:1333-133.

Chaithong U, Chaiyasit D, Chaiwong P, Choochote W, Jitpakdi A,Rattanachanpichai E, Tippawangkosol P. (2006). *Essential oils as potential adulticides against two populations of Aedes aegypti, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai province, northern Thailand. Parasitol. Res.*, **99** :715-721.

Chang S-T ,Cheng S-S, Hsui Y-R, et Liu J-Y. (2006). Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource Technology*, **97**(2), 306-312.

Christoph F, Kaulfers P-M ,Stahl-Biskup E.(2001). Death kinetics of *Staphylococcus aureus* exposed to commercial tea tree oils s.l. *Journal of Essential Oil Research* **13**, 98-102.

Cheurfa M. (2015). *Intérêt des biomolécules d'origine végétale sur la santé.* Thèse de doctorat LMD, sciences alimentaires et nutrition, Université Hassiba BEN BOUALI –Chlef, 4-7 ; 12 p.

Colette-Keller D. (2004). *Les plantes médicinales.* ALS (séance du 25 Avril 2004). P 58. Cosentino, S., Barra, A., Pisano, B., Cabisa, M., Pirisi, F. and Palmas, M. (2003) *Composition and antimicrobial properties of Sardinian Juniperus essential oils against food borne pathogens and spoilage microorganisms. J Food Prot .*, **66** : 1288-1291

Couic-Marinier F et Lobstein A.(2013). Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques.* 525. 3p.

D

Da Silva F.(2010). *Utilisation des huiles essentielles en infectiologie orl.* Thèse de Doctorat, Pharmacie, université henri poincare - nancy 1, 6 ; 26 ; 29 ;45p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Djenadi F .(2011). *Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne du génévrier (juniperus phoenicea) ; essais des huiles essentielles et composé phénolique* .Université à Mira de Béjaia –Algérie ,master en biologie option applique le 2011.Accessible en ligne https://www.memoireonline.com/01/13/6764/m_Contribution--l-etude-de-l-activite-antimicrobienne-du-genevrierJuniperus-phoenicea--essai-d28.html#toc89

Dorman, H-J-D, Deans, S-G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308-316.

Dr Chantal Ruf, 1976, *Variation de l'activité bactéricide en fonction du pH et de l'anaérobiose : Application à la Gentami cine et à la Sosomicne sur Staphylococcus Aureus*, Paris V - Descartes, thèse de médecine, 37pp.

Dumitrescu O, Duwalder O, François , Reverdy M-E, Tristan A .(2010) .*Journal of veteraniaria* .Accesible en ligne

<http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/7405> .

Duschatzky C-B, Garcia C-C, , Lampasona M-P , Michis F, Possetto M- L, Schuff C ,Talarico L-B. (2005). *Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. Antivir.Chem. Chemother*, 16, 247-251.

E

Elliot TR. (2001). *Public Health ConcernsIn, Applied dairy microbiology*, second édition. Elmer H. March, james L. Steele. Ed Mareel Dekker. New york. P : 05

Elshikh M , Ahmed S , Banat I-M, Funston S, Dunlop P, Marchant R, McGaw M.(2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology letters* 38, 1015.

F

Fauchère J-L .et Avril J-L (2002). *Bactériologie générale et médicale* . Ellipses Editions Paris. P 365

Festy D. (2011). *Les huiles essentielles ça marche. A propos de l'aromathérapie*. Editions: Leduc.s .Paris. 9p.

Ferhat M. (2009) . *Recherche de substances bio actives de Centaurea microcarpa coss et dur*. Diplôme étude supérieur de biochimie Université de M'sila .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Fouché GP , Hambuckers et A Marquet A. (2000). *Les plantes medicinale : de la plante au médicament.* Exposition temporaire de 19.09 au 30.09.2000.

Franchomme P, Jollois R, Pénoël D. L'aromathérapie exactement. Editions Roger Jollois. Accessible en ligne

www.myrtea-formations.com

Foucras G .(2012). Inflammation mammaire : origine, mécanismes, diagnostic et traitement. *Le nouveau praticien vétérinaire.* 5(22),51-6.

Fourichon C, Bareille N , Beaudeau F ,Seegers H.(1997). *Action de maîtrise des mammites : nature, coûts, relations avec les niveaux de pertes économiques dans les exploitations bovines laitières.* 4 ème Ren. Rech. Rut., 4 - 5 décembre 1997, Paris : 278.

Francoz D, Couture Y.(2014). Manuel de médecine des bovins. Editions Med'com. 2014. 704p.

G

Gallois D.(2016) .La crise du lait en quatre questions. Le monde .Accessible en ligne http://www.lemonde.fr/economie/article/2016/08/19/la-crise-du-lait-en-quatre-questions_4984975_3234.html

Genné D, Siegrist Hans H.(2003). *De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique.* Forum Med Suisse. 464-468Pp.

Ghanmi M . (2010). *Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (Artemisia herba-alba) de la région de Guerif (Maroc oriental).* *Phytothérapie.* **8**, 295–301

Goetz P et Ghedira K. (2012). *Phytothérapie anti-infectieuse.* Edition : Springer-Verlag France, Paris.4-194Pp.

H

Haddouchi F et Benmansour A.(2008). Huiles essentielles, utilisation et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. Les technologies de laboratoire.N°08.8p

Hammer K-A, Riley T-V. (2002). *In vitro activity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi.* *J. Antimicrob. Chemother.*, 50 :195-199.

Hanzen c.(2009). *La pathologie infectieuse de la glande mammaire, étiopathogénie et traitements, approche individuelle et de troupeau.* Université de Liège.

Heleili N.(2002). *Etude de la mammite subclinique et la sensibilité in vitro des germes isolés aux antibiotiques.* Thèse de Magister, Université de Batna .202p .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Halawani E. (2009). Antibacterial Activity of Thymoquinone and Thymohydroquinone of *Nigella sativa L.* and Their Interaction with Some Antibiotics. *Advan. Biol. Res.* 3 (5-6), 148-152.

Hierro I, Montilla M-P, Navarro M-C, Pérez P and Valer O-A. (2004). Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex s.l. L3 larvae*. *Phytomedicine.*, 11:77-82.

I

Iserin P. (2001). *Encyclopedie des plantes medicinales*. Ed : Larousse Bourdasse .Paris.335p.

J

JARP J. (1991). Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. *Veterinary Microbiology.*;27(2):8.

Jorgensen J-H, Turnidge J-D. (2015). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition. *American Society of Microbiology*, pp. 1253-1273.

Joly-Guillou, (2006). *Intérêt du E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. Réanimation.*,15 :237-240 .

L

La bio-enligne .(2017). Techniques d'extraction des huiles essentielles Catégorie aromathérapie, Mise à jour : lundi 20 mars 2017 21:24. Accessible en ligne

<https://www.bio-enligne.com/aromatherapie-huile-essentielle/87-extraction.html>

Lahlou M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils. *phytotherapy research.*, 18(6):435-448.

Lahlou M, and Berrada R. (2001). Potential of essential oils in schistosomiasis control in Morocco. *International Journal of Aromatherapy*, 11, 87-96.

Leperlier L-M. (2013) . traitement des mammaites cliniques et subcliniques par des huiles essentielles en application cutanée (bulletin des GTN ,68, pp77-86).

Lakhdar L. (2015). *Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* : Etude in vitro. Thèse de doctorat, Sciences Odontologiques, Université Mohammed V de Rabat, 6 :38-45p

Lardry JM. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinesither Ré volume.*,61:14-7.

Levesque P. (2006). *Identifier les facteurs de risque de la mammite*. Le producteur de lait québécois.,36-8p.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les mammites bovines.(2004) , Corynebacterium bovis, un cas particulier. Les mammites bovines. Accessible en ligne
http://biosol.free.fr/liens/mammi_2004/les_mammites_bovines_traite.htm

Looper M.(2012). Reducing somatic cell count in dairy cattle [Internet]. Department of Animal Science at the University of Arkansas. Accessible en ligne
<https://www.uaex.edu/publications/PDF/FSA-4002.pdf>

Laouar S, Sifer H.(2012). *Etude de l'activité antibactérienne de quelques huiles essentielles et l'effet de leurs associations avec les antibiotiques* . Université Abderrahmane Mira ,9p.

M

MaaO.(2016).Comptage des cellules somatiques . Interprétation individuelle pour les vaches [Internet]. MAAO Élevages .Accesible en ligne

<http://www.omafra.gov.on.ca/french/livestock/dairy/facts/85-087.htm>

Matos JS, Langlois BE et Withe DG. (1991). Isolation of staphaurengrom sites other thanlactatin gmammary . *Journal of dairy science*. 1554-1549.

Mansour F.(2011). Contribution à l'évaluation du système de contrôle laitier ,traçabilité des résidus d'antibiotique utilisés dans le traitement des mammites bovins , Université Mentouri Constantine institut de la nutrition de l'alimentation et des technologie agro-alimentaire – Master . Accessible en ligne

<https://www.memoireonline.com/06/12/5959/Contribution--l-evaluation-du-systeme-de-contrle-laitier--Constantine-traabilite-des-re.html>

Mazari K.(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

Mechdouche M.(2017). *valorisation des souche lactique thermophiles dans la fabrication d'un fromage à pate molle de type de type stabilisée* .24p.

Médecine Sarbonne université 2017 .Accessible en ligne
<http://www.chups.jussieu.fr/en-ligne/index.html>

Mikael Z -1985. Alchemiste par essence. Accessible en ligne
<https://www.zayataroma.com/fr/liens-utiles>

Moon T, Wilkinson J-M.(2006).Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitol. Res.* , 99:722-728.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Monzote L , Montalvo A M , Miranda M , Scull R.(2006). Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy* 52:130-136.

Morais S-M , Oliveira C-L , Rodrigues J-R .(2006). Larvicidal activity of essential oils from Brazilian Croton species against *Aedes aegypti* L. *Journal of the American Mosquito Control Association* ., 22: 161-164.

N

Niar A. (2000). *Incidence des mammites sur les différents élevages bovins de la wilaya de Tiaret.* 4 ème Séminaire International de Médecine Vétérinaire Constantine 21-22 novembre 2000 .

Nouveautés dans l'approche des mammites colibacillaires. Accessible en ligne <http://www.gds38.asso.fr/web/gds.nsf/vueactualites/B36DBC159EC64F31C1256BD700808607?OpenDocument>

Nadjeia I (2016) *Activité antimicrobienne des huiles essentielles* .Bejaia 9p.

O

Oussou K-R, Kouadio Guessenn N, Kanko C ,Yolou S and Casanova J.(2008). Etude Chimique et Activité Antidiarrhéique des Huiles essentielles de deux Plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne; *European Journal of Scientific Research*. 24 (1): 94

Othmane A , Bouchakour T.(2018). Etude de l'activité insecticide de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et *Illicium verum* vis-à-vis *Aphis spiraecola*. Master en agronomie , définition de l'huile essentielle .p13. Techniques d'obtention des huiles essentielles p 14.

P

Pawar V-C,Thaker V-S. (2006). In vitro efficacy of 75 essential oils against *aspergillus niger*. *Mycoses.*, 49:316-323.

Poutrel B.(1983). La sensibilité aux mammites: revue des facteurs liés à la vache. *Annales de recherches vétérinaires*.14:89–104.

Piessens V. (2011). Distribution of coagulate-negative staphylococcus species from milk and environment of dairy cows differs between herds.pdf. *Journal of Dairy Science.*;94(6):2933-44

Priestley C-M, Williamson F-M.(2006). Lethality of essential oil constituents towards the human louse, *Pediculus humanus*, and its eggs.*Fitoterapia* .,77:303-309.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Pyorala S, Taponen S.(2009).Coagulase-negative staphylococci, emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*;134(1-2):3-8.

R

Remy D. (2010).Les mammites. Paris: France Agricole. 259p.

Rainard P, Poutrel B.(1993). Protection de la glande mammaire. In *Biologie de la lactation*. Ed. INSERM-INRA : 415-429.

Randraianarivelo R.(2010). *Etude de la l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar alternative aux antibiotique en cerveticulture* . these pour obtenir le garde de docteur es sciences de la vue de l'université d'antananarivo :. 20p.

Reyher K, Dohoo I, Scholl D.(2010). Les bactéries de la mammité, un mariage complexe. *Le producteur de lait québécois*.38-40p.

Réseau canadien .(2010).de recherche sur la mammité bovine. *Corynebacterium bovis* [Internet].Accessible en ligne
<http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/fr/page.php?p=48&tm=i>

Roussel p.(2011).*Guide d'intervention pour la maîtrise des mammites dans les troupeaux laitiers. (UMT Maîtrise de la santé des troupeaux bovins)*. 1-134P.

Rosato A, Piarulli M, Corbo F, 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.

Rim I-S, Jee C-H. (2006). Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) and qualitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). *Korean J. Parasitol*, 44, 133-138

Rios J, Recio M,Villar A.(1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology* 23, 127-149.

S

Seegers H.(2002). *L'intervention du vétérinaire face à un problème de mammites : questions de base et réponses possibles aujourd'hui*. In Tours. p. 139 .

Schelz Z ,Hohmann J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77(4), 279-285.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Schwalbe R, Steele-Moore L,(2007). Antimicrobial susceptibility testing protocols. Crc Press.Das, K., Tiwari, R., Shrivastava, D., 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research* 4, 104-111.

Schukken Y.(2012). Qu'est ce que la mammité ? Le producteur de lait québécois.;40-2p.

Sofowora A.(2010).Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Académie suisse des sciences.

Suhr K-I,et Nielson P-V.(2003). Antifungal activity of essential oil evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi .*Journal of Applied Microbiology.* **94:** 665-674.

Sutra L, Federighi M, Jouve J-L.(1998). *Manuel de bactériologie alimentaire.* Ed. Polytechnica Paris, 308p

Soylu E-M, Soylu S, and Kurt S.(2006). Antimicrobial activity of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. . *Mycopathologia.*

T

Taponen S, Pyorala S. (2009). *Coagulase-negative staphylococci* as cause of bovine mastitis. Not so different from *Staphylococcus aureus*,*Veterinary Microbiology.*134(1-2):29-36.

Taponen S, Pyorala S.(2006). Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFPL. *Veterinary Microbiology.*;115(1-3):199-207.

Tenhagen B.(2006). Prevalence of Mastitis Pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science*;(89):2542-51.

Thorberg B, Persson W-K.(2009). Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci.pdf. *Journal of Dairy Science.*92(10):4962-70

Toure Daouda.(2015) *Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire.* Thèse de doctorat, Biochimie, Université Félix Houphouët- boigny, 5-15 ; 41 ; 49 ; 81p.

Tony Poirot .(2016) . Effets indésirables et toxicologie ,Université de lorraine faculte de pharmacie thèse Présentée et soutenue publiquement le, 13 Juillet 2016 sur un sujet dédié à bon usage des huiles essentielles .,62 ;67p .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ocnum.univ-lorraine.fr/public/BUPHA_T_2016_POIROT_TONY.pdf

W

Wallemacq H, Bureau F, Lekeux P, (2010). La vaccination contre les mammites à *Staphylococcus aureus* chez la vache laitière. In *Annales de Médecine Vétérinaire* [Internet]. Liège: Université de Liège. 16–29p. Accessible en ligne

<http://orbi.ulg.ac.be/handle/2268/77355>

Watts J, Lowery D, Teel J, Rossbach S, (2000). Identification of *Corynebacterium bovis* and other *Coryneforms* isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science.*, 83(10):2373-9.

Wilkinson J-M. 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. *Modern phytomedicine, turning medicinal plants into drugs*, 157-171.

Wikipedia Antibioqramme. Accessible en ligne

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Antibiogramme>

Z

Zafar A, 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.

Zouari S, Zouari N, Fakhfakh N, Bougatef A, Ayadi M. A et Neffati M. (2010). Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herbaalba* Asso. *Journal of Medicinal Plants Research.* 4(10), 871-880

Résumé :

Les mammites restent au début du XXIème siècle un des fléaux majeurs de l'élevage laitier. Elles constituent une pathologie majeure de l'élevage laitier aussi bien par leur fréquence que par les pertes qu'elles entraînent. Notre étude a pour objectif de déterminer l'étude expérimentale de l'effet thérapeutique de l'huile essentielle de *pélargonium graveolens* contre les infections mammaires bovines due au *staphylococcus aureus*. Deux souches d'origines différentes (souche d'origine clinique et souche de référence) sont utilisées dans cette étude pour l'évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la plante médicinales *Géranium rosat*, extraite par hydrodistillation. L'activité de l'huile essentielle a été comparée à celle de l'action de quatre antibiotiques vis-à-vis des souches de *staphylococcus aureus* (d'origine clinique est la souche de références). Ils ont été testés pour leur pouvoir antibactérien par la méthode des disques. Les résultats des activités antimicrobiennes ont démontré que le huile essentielle de *pélargonium graveolens* à une concentration de 4µl à 6µl, présente une bonne activité inhibitrice, avec une action bactéricide et un traitement curative, très rapide par rapports à la dose de 2µl pour un traitement étalée en 4fois. Par contre, les quatre antibiotiques, n'ont qu'une activité de blocage et une sensibilité moins rapide envers les deux souches *staphylocoques aureus* (référence et clinique). D'après les résultat obtenus, on note que le géranium a présenté la meilleure activité antimicrobienne est on peut conclure que l'huiles essentielle de *Géranium rosat* a une activité antibactérienne plus rapide que les antibiotiques envers la souche bactérienne *staphylococcus aureus* d'origine clinique et la souche de référence.

Mots clés : Antibiotique, activité antibactérienne, huile essentielle, *pélargonium graveolens*, *Staphylococcus aureus*.

Abstract :

Mastitis remains at the beginning of the 21st century one of the major plagues of dairy farming. They constitute a major pathology of the dairy farming as well by their frequency as by the losses which they entail. Our study has for objective to determine the experimental study of the therapeutic effect of the essential oil of pelargonium graveolens against the Bovine mammary infections due to Staphylococcus aureus. Two strains from different origins (strain of clinical origin and reference strain) are used in this study for the in vitro evaluation of the antibacterial activity of the essential oil of the medicinal plant Geranium rosat, extracted by hydrodistillation. The activity of the essential oil was compared with that of the action of four antibiotics vis-à-vis Staphylococcus aureus strains (clinical origin is the strain of references). They have been tested for their antibacterial power by the disc method. The results of the antimicrobial activities demonstrated that the essential oil of pelargonium graveolens at a concentration of 4µl to 6µl, has a good inhibitory activity, with a bactericidal action and a curative treatment, very fast compared to the dose of 2µl for a spread treatment in 4 times. On the other hand, the four antibiotics, have only a blocking activity and a less rapid sensitivity towards the two strains staphylococcus aureus (reference and clinical). From the results obtained, geranium has been shown to have the best antimicrobial activity and it can be concluded that essential oils of Geranium rosat have a faster antibacterial activity than antibiotics against the bacterial strain staphylococcus aureus of clinical origin and the reference strain.

Keywords: Antibiotic, antibacterial activity, essential oil, pelargonium graveolens, Staphylococcus aureus.