

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid IBN BADIS
Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد ابن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

CHAOUCH Nesrine

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : Production et transformation laitières

THÈME

*Étude de l'activité antimicrobienne
de l'extrait de thym contre
Staphylococcus aureus isolé de mammite*

Présenté le 04/09/2020

Membres du jury

Président	Mr ZABOURI.Y.	Maître assistant A	U. Mostaganem
Examineur	Mme HENNI.N.	Maître assistante A	U. Mostaganem
Encadreur	RECHIDI-SIDHOUM.N	Maître de conférences B	U. Mostaganem

Travail réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales

Année universitaire 2019-2020

Remerciements

Je remercie « ALLAH » le tout puissant de nous avoir guidé tout au long de nos années d'études et de nous avoir donné le courage, la santé pour réaliser ce travail.

J'adresse mes remerciements au ministère de l'enseignement supérieur.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à ma directrice de mémoire Dr RECHIDI SIDHOUM Nadra, pour m'avoir encadré et dirigé ce travail, sa disponibilité, ses encouragements, ses conseils, ses orientations et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer.

Je remercie également mon co-directeur de mémoire Mr MESKINI Zakaria qui m'a aidé et orienté durant la période de mon stage.

Mes vifs remerciements pour les membres du jury à commencer par Mr ZABOURI Younes pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail en acceptant de présider ce jury.

Très reconnaissante envers Mme HENNI Nassiba de m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail.

Mes sincères remerciements à mes enseignants de ma promotion en production et transformation laitière qui nous ont accompagnés durant deux ans de master.

Sans oublier Mr BENHARAT. N, l'ingénieur du Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales de l'Université Abdelhamid Ben Badis de Mostaganem.

Finalement, Je remercie également ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci à tous...



Dédicaces

Je dédie ce travail à mes chers parents pour leur amour et leur support continu, je vous dois tous mes succès, tous mes bonheurs et toutes mes joies. Je suis très heureuse et fière de votre présence à mes côtés.

A mon très cher papa, pour ses précieux conseils et encouragements, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

A ma chère maman, qui m'a donné la vie et cette éducation que j'avais tant besoin qui est toujours présente pour moi.

A mes chers frères : Amine et Kamel.

A mes chères sœurs : Nadia et Asmaa.

A mes nièces et mon neveu.

À tous les membres de ma famille.

A tous mes amis(es) sans exception.

À tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

À ma promotion de Master en production et transformation laitière 2020.

NESRINE.

Résumé

Les mammites sont très fréquentes chez les vaches laitières. Elles se caractérisent par un état d'inflammation de la glande mammaire résultant de l'action de micro-organismes pathogènes d'origine très variés. La lutte contre les mammites passe d'une part, par la prévention et d'autre part, par leur traitement. Les antibiotiques sont ainsi classiquement utilisés pour lutter contre les affections intra-mammaires. L'objectif de ce travail est l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante du genre *Thymus*, considérée comme étant l'une des plus riches en huiles essentielles, sur une bactérie responsable d'infection intra-mammaire, le *Staphylococcus aureus*. La première partie de cette recherche a permis l'isolement et l'identification d'une bactérie de type staphylocoque, du groupe coagulase-négative, isolée d'une vache atteinte de mammité. La seconde partie, devait porter sur l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait de *Thymus vulgaris L.* de la région de Naama, sur ce germe. Les plantes aromatiques et médicinales constituent une source importante de molécules antimicrobiennes notamment, dans leurs extraits volatils, et peuvent être une alternative aux traitements antibiotiques. L'activité antimicrobienne vis-à-vis du staphylocoque aurait été réalisée par la technique de diffusion en gélose. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) de l'extrait de *Thymus* auraient été évaluées.

Mots-clés : Activité antimicrobienne, huile essentielle, mammité, *Staphylococcus aureus*, Thym.

ملخص

التهاب الضرع شائع جدًا في أبقار الألبان. تتميز بحالة التهاب في الغدة الثديية ناتجة عن عمل الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض من مجموعة متنوعة من الأصول. تبدأ مكافحة التهاب الضرع بالوقاية من جهة والعلاج من جهة أخرى. وهكذا تستخدم المضادات الحيوية تقليدياً لمحاربة الأمراض داخل الثدي. الهدف من هذا العمل هو دراسة النشاط المضاد للميكروبات للزيت العطري لنبات من جنس الغدة الصعترية والذي يعتبر واحداً من أغنى الزيوت العطرية على بكتيريا مسؤولة عن العدوى داخل الغدة الثديية المكورات العنقودية الذهبية. سمح الجزء الأول من هذا البحث بعزل والتعرف على بكتيريا من نوع المكورات العنقودية من المجموعة سلبية تجلط الدم، معزولة عن بقرة مصابة بالتهاب الضرع. الجزء الثاني كان دراسة النشاط المضاد للميكروبات لمستخلص نبات الغدة الصعترية فلغريس ل من منطقة النعامة على هذه الجرثومة. تشكل النباتات العطرية والطبية مصدرًا مهمًا للجزيئات المضادة للميكروبات ، ولا سيما في مستخلصاتها ، ويمكن أن تكون بديلاً عن العلاجات بالمضادات الحيوية. وبحسب ما ورد تم تحقيق النشاط المضاد للميكروبات ضد المكورات العنقودية من خلال تقنية انتشار الأجار. كان من الممكن تقييم الحد الأدنى للتركيزات المثبطة والتركيزات الدنيا للجراثيم لمستخلص الغدة الصعترية.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للميكروبات ، الزيت العطري ، التهاب الضرع، المكورات العنقودية الذهبية ، الزعتر.

Abstract

Mastitis is very common in dairy cows. They are characterized by a state of inflammation of the mammary gland resulting from the action of pathogenic micro-organisms of a wide variety of origins. The fight against mastitis starts with prevention on the one hand and treatment on the other. Antibiotics are thus conventionally used to fight against intramammary diseases. The objective of this work is the study of the antimicrobial activity of the essential oil of a plant of the genus *Thymus*, considered to be one of the richest in essential oils, on a bacterium responsible for intramammary infection. Mammary gland, *Staphylococcus aureus*. The first part of this research allowed the isolation and identification of a staphylococcal-type bacterium, of the coagulase-negative group, isolated from a cow with mastitis. The second part was to study the antimicrobial activity of the extract of *Thymus vulgaris L.* from the Naama region on this germ. Aromatic and medicinal plants constitute an important source of antimicrobial molecules, in particular in their volatile extracts, and can be an alternative to antibiotic treatments. Antimicrobial activity against staphylococci was reportedly achieved by the agar diffusion technique. The minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) of *thymus* extract would have been evaluated.

Key words: Antimicrobial activity, Essential oil, Mastitis, *Staphylococcus aureus*, Thyme.

Sommaire

Liste des abréviations, sigles, acronymes et symboles	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des annexes	
Introduction.....	11
Première partie : Revue de littérature	
Chapitre I. Mamelle et infection intra-mammaire.....	15
Chapitre II. Huiles essentielles et activité antimicrobienne.....	31
Deuxième partie : Recherche Expérimentale	
Chapitre I : Matériel et méthodes	48
Chapitre II: Résultats et discussion.....	59
Conclusion	66
Annexes	68
Liste des Références.....	72
Table des matières.....	85

Liste des abréviations, sigles, acronymes et symboles

AFNOR : Association Française de Normalisation

HE : Huiles Essentielles

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

E. coli : *Escherichia coli*

SCN : *Staphylococcus coagulase négatif*

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

UFC : Unité formant une colonie

Liste des tableaux

Tableau 1. Nature des réservoirs des germes	23
Tableau 2. Principaux antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites	25
Tableau 3. Classification taxonomique du thym	42

Liste des figures

Figure 01. Coupe longitudinale d'une mamelle.....	15
Figure 02. Les différentes structures internes de la mamelle	16
Figure 03. Les différentes structures du canal du trayon (d'après Baronne).....	17
Figure 04. Observation microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
Figure 05. Les plantes aromatiques et médicinales les plus utilisées au quotidien	31
Figure 06. Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles par les plantes Aromatiques.....	33
Figure 07. Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne ..	39
Figure 08. Morphologie de <i>thymus vulgaris</i>	43
Figure 09. Les échantillons de lait (E1 ; E2 et E3) prélevés respectivement sur les 3 vaches de l'exploitation.....	50
Figure 10. Conservation des souches (photo personnelle) A : prélèvement d'une colonie. B : piqûres centrales. C : conservation de la souche on double	53
Figure 11. Schéma illustrant les étapes de la recherche des <i>Staphylococcus aureus</i> . E (1 ; 2 ; 3) : échantillon de lait des vaches (1 ; 2 ; 3).....	54
Figure 12. Schéma d'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du thym.....	56
Figure 13. Colonies bactériennes dorées, E1.....	59
Figure 14. Colonies bactériennes dorées, E3.....	59
Figure 15. <i>Staphylococcus aureus</i> Gram+, Cocci en amas en grappes raisin, E1	60
Figure 16. <i>Staphylococcus aureus</i> Gram+, Cocci en amas en chainettes en grappes raisin, E3.....	60
Figure 17. Recherche de la Catalase (+) E1, E3	60
Figure 18. α - hémolyse, E1.....	61
Figure 19. β - hémolyse, E3.....	61
Figure 20. Coagulase négative (-) E1, E3.....	61

Liste des annexes

Annexe A. Milieux Chapman	68
Annexe B. Milieux Gélose Mueller-Hinton (MH), Bouillon Mueller-Hinton	68
Annexe C. Gélose de conservation	69
Annexe D. Bouillon nutritif, Gélose Colombia.....	69

Introduction

Introduction

Les mammites sont des inflammations de la mamelle provoquées principalement par des bactéries. Elles représentent un problème majeur en élevage car elles entraînent d'importantes pertes économiques dans exploitations. En effet, elles vont toujours de pair avec une baisse de la production laitière des quartiers touchés de la mamelle. Cette baisse est la plus nette en cas de mammites cliniques. Les infections intra-mammaires cachées ou mammites sub-cliniques réduisent également la productivité jusqu'à 40% et les durées de vie des vaches concernées deviennent plus courtes (Schaeren, 2006).

Le traitement des mammites par les antibiotiques restent le moyen de choix, mais l'émergence de bactéries résistantes pose un problème d'inefficacité de ces molécules anti-infectieuses. Certaines bactéries ont acquis au cours de leur évolution des mutations génétiques, qui leur permettent de résister aux antibiotiques (Remy, 2010). Elles ne sont donc plus éliminées par les traitements à base d'antibiotiques dans les organismes contaminés, ce qui a conduit à la nécessité de rechercher un traitement alternatif tel que, les plantes.

L'utilisation des plantes pour leurs vertus médicinales est une pratique très ancienne. Il a été prouvé qu'environ 20% des espèces végétales poussant dans le monde possèdent des vertus thérapeutiques ou cosmétiques, car elles contiennent des molécules ou des principes actifs à différentes propriétés biologiques, qui trouvent leur application dans divers domaines (médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture) (Suffredini *et al.*, 2004).

Parmi ces espèces, on note le « Thym » qui possède des atouts considérables grâce à la découverte progressive de leurs applications thérapeutiques. La plante entière est très utilisée en médecine traditionnelle, leurs huiles essentielles sont connues par leurs propriétés antiseptiques et antimicrobiennes (Zayyad *et al.*, 2014).

Problématiques : Est-ce que l'extrait de thym à une activité antimicrobienne contre le germe *Staphylococcus aureus* ?

Hypothèse : L'extrait de thym à une activité antimicrobienne contre le pathogène *Staphylococcus aureus* car il contient des molécules actives à différentes propriétés biologiques.

Introduction

Dans le cadre de la recherche de nouveaux produits antimicrobiens naturels, issues de plantes médicinales, nous nous sommes intéressés à étudier l'activité antimicrobienne de l'extrait de thym contre *staphylococcus aureus* isolé de cas de mammite.

Notre étude sera donc subdivisée en deux grandes parties :

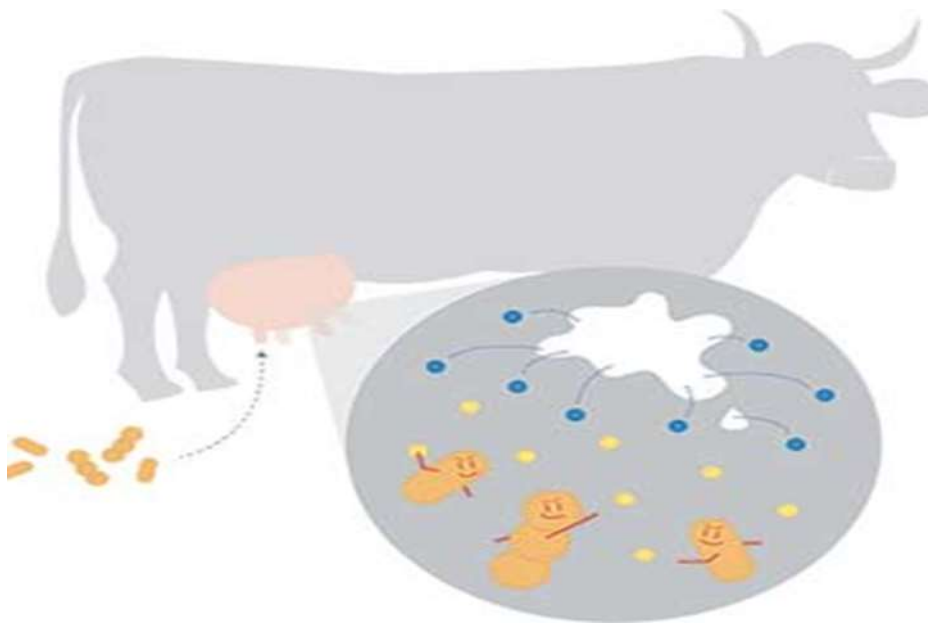
- La première partie est une revue littérature où le premier chapitre est consacré à des généralités sur par la glande mammaire et les infections intra-mammaires. Le second chapitre est dédié aux l'huiles essentielles et à leur activité antimicrobienne.
- La deuxième partie concerne la recherche expérimentale où sera présenté dans le premier chapitre, le matériel et les méthodes utilisées dans le cadre de la réalisation de cette étude expérimentale. Le deuxième chapitre comporte la présentation des résultats qui sont discutés.

Première partie

Revue de littérature

Chapitre I

Glande mammaire et infection intra-mammaire



Revue de littérature

I. Généralités sur la glande mammaire

1. Anatomie

1.1. Organisation

La mamelle de la vache est constituée de quatre quartiers anatomiquement séparés par des ligaments. Chaque quartier se termine à son extrémité par un trayon.

La mamelle est suspendue à l'abdomen par le ligament suspenseur du pis, tissu fibro-élastique, inséré sur la ligne blanche. Très résistant et épais, il garantit le maintien de la glande, qui atteint 50 kg en moyenne chez la vache mais pouvant atteindre 100 kg chez les très hautes productrices. Les quartiers avant et arrière quant à eux sont séparés par un septum plus mince. Le parenchyme mammaire et les voies d'excrétion de chaque quartier sont donc isolés, sans passage direct possible d'un quartier à l'autre (Delaval, 2010).

Un quartier est ainsi une « glande » indépendante, composée du parenchyme mammaire, des voies d'excrétion du lait et du trayon, comme le montre la figure 01.

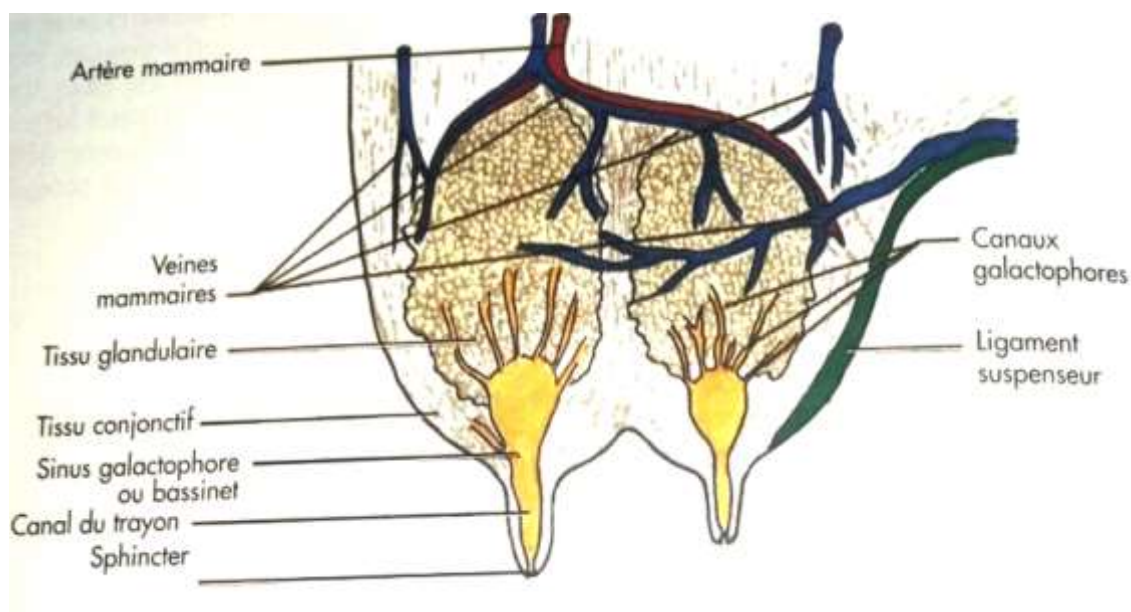


Figure 01. Coupe longitudinale d'une mamelle (Cauty et Perreau, 2003).

Revue de littérature

1.2. Parenchyme mammaire

C'est le constituant principal du corps de la mamelle. Il est formé d'un parenchyme conjonctif de soutien et du parenchyme glandulaire constitué d'acini entourés de quelques cellules myoépithéliales. Ces acini mesurent de 100 μm à 300 μm , au sein de ces acini qu'est sécrété le lait par les lactocytes. Ces alvéoles débouchent sur les canaux galactophores, qui débouchent sur la citerne de la mamelle (Rémy, 2010).

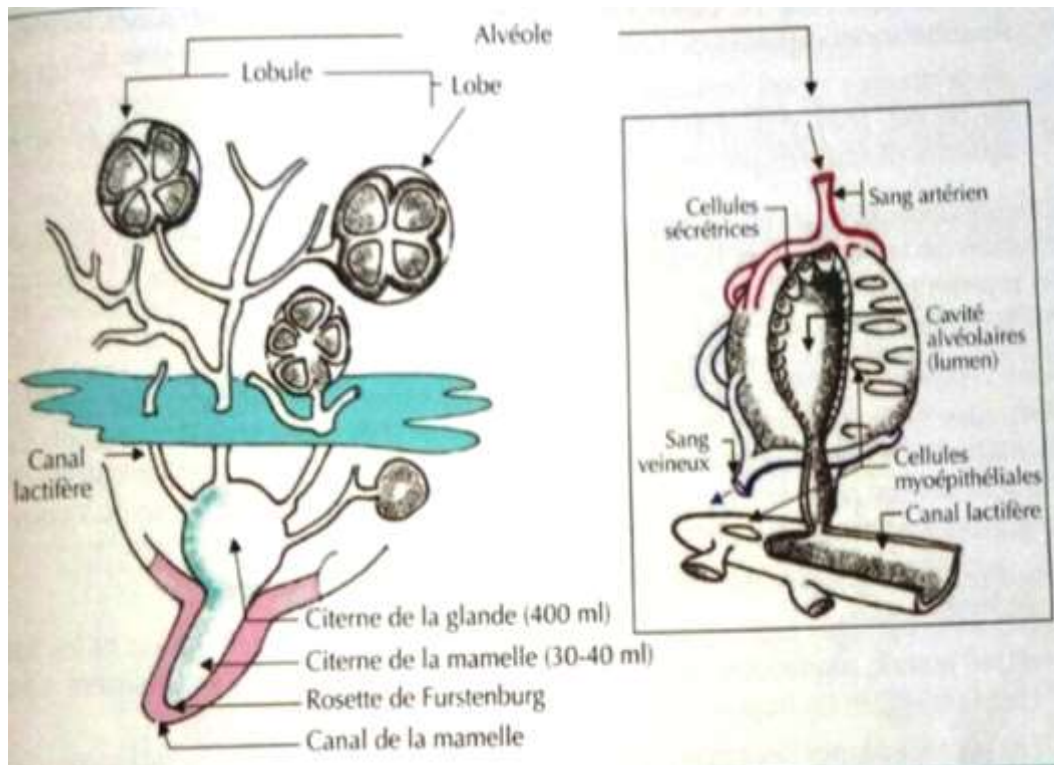


Figure 02. Les différentes structures internes de la mamelle (Rémy, 2010).

1.3. Citerne

La citerne de la mamelle reçoit le lait provenant des conduits lactifères du parenchyme mammaire. Elle est séparée du sinus du trayon par un repli annulaire, aussi appelé anneau veineux de Fürtenberg. Elle correspond à la partie glandulaire du sinus lactifère (Rémy, 2010).

Revue de littérature

1.4. Trayon

Chaque quartier se termine par un trayon. Il se compose d'une citerne du trayon (partie glandulaire du sinus lactifère) en communication avec la citerne de la glande (partie papillaire du sinus lactifère) via le relief annulaire. A son extrémité se situe le conduit papillaire ou canal du trayon (figure 03). La muqueuse du trayon est plissée et contient des fibres musculaires lisses (qui participent à l'excrétion du lait). L'ostium papillaire conduit au canal du trayon. Il mesure 1 cm de long. A l'entrée du canal, les plis de la muqueuse vont se concentrer et former la rosette de Fürstenberg qui est un filtre passif pour les agents pathogènes. A l'extrémité du canal, un muscle lisse circulaire formant un sphincter permet la fermeture de celui-ci (Rémy, 2010).

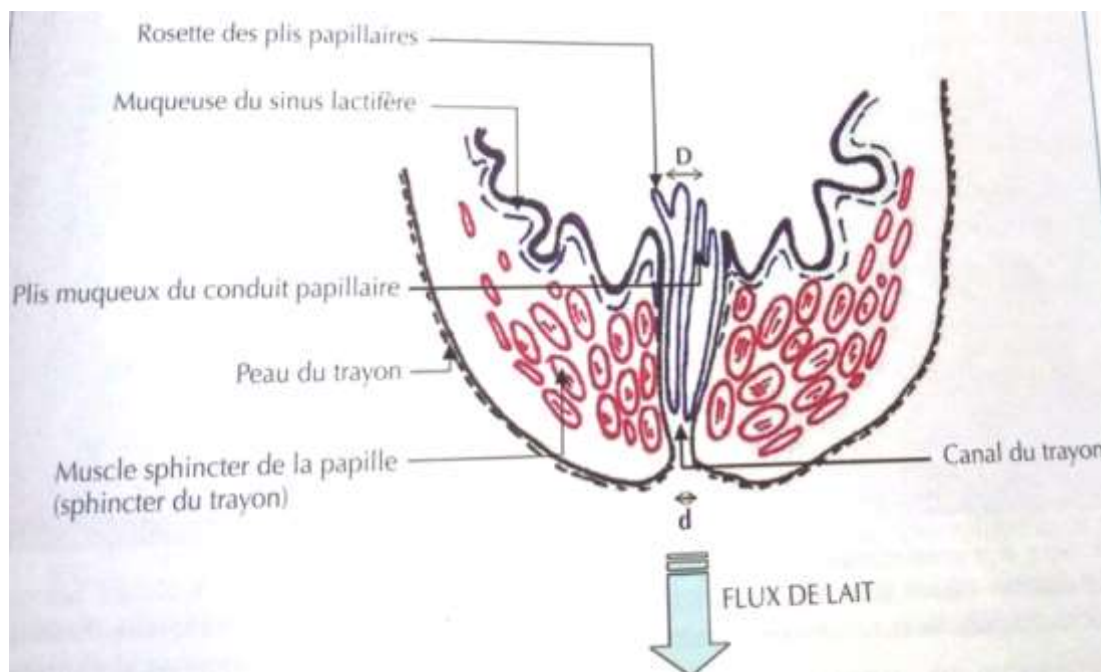


Figure 03. Les différentes structures du canal du trayon (d'après Baronne)

(Rémy, 2010).

Revue de littérature

2. Défenses

2.1. Défenses basses

➤ Défenses du trayon

La peau saine du trayon constitue un environnement hostile aux bactéries grâce à ses couches de cellules mortes kératinisées et au film lipidique bactériostatique. Cette protection est compromise par les lésions cutanées (blessures, gerçure, verrue, etc.) ou les produits d'hygiène de prétraite car la peau du trayon est très sensible aux variations de température et d'hygrométrie, et aux produits chimiques, elle se lèse facilement. L'application de produit émoullissant en post-traitement a pour objectif de protéger cette barrière cutanée (Rémy, 2010).

La forme conique du canal dont la partie proximale est plus large que la distale, et la contraction du sphincter, permettent l'absence de lait résiduel dans celui-ci. La fermeture du sphincter prend au minimum 30 minutes. Le sphincter fermé est étanche et empêche la pénétration des bactéries.

L'épithélium stratifié du canal du trayon produit de la kératine qui emprisonne les bactéries et permet leur élimination. En effet, lors de l'éjection des premiers jets de lait une partie de la couche de kératine est évacuée. Elle est renouvelée par dégénérescence cornée. L'épithélium synthétise également de l'ubiquitine. C'est un marqueur protéique des protéines en vue de leur lyse. L'accumulation de kératine forme également un bouchon durant le tarissement de manière non systématique surtout chez les vaches hautes productrices, ce qui diminue la réceptivité de la mamelle aux infections (Rémy, 2010).

2.2 Défenses hautes

La pénétration d'agents pathogènes dans la mamelle entraîne une réponse immunitaire cellulaire et biochimique. L'inflammation joue un rôle important permettant le passage de ces cellules du sang vers la mamelle. L'inflammation se caractérise par des signes locaux : rougeur, chaleur, œdème, douleur.

Le lait d'une mamelle saine comprend principalement des cellules épithéliales, des macrophages et des lymphocytes alors qu'en cas de mammite, les polynucléaires neutrophiles prédominent (Risco *et al.*, 2011).

Revue de littérature

Les polynucléaires neutrophiles représentent le type cellulaire dominant en cas d'inflammation suivi des macrophages puis des lymphocytes. Les macrophages et les polynucléaires neutrophiles phagocytent les bactéries. Les lymphocytes T cytotoxiques induisent l'apoptose des cellules lésées ou infectées. Les lymphocytes T auxiliaires participent avec les lymphocytes B à la production d'anticorps. Le complément a une activité bactéricide pour les souches bactériennes sensibles à son action.

Au tarissement, la lactoferrine a une activité bactériostatique en diminuant la disponibilité du fer, élément nécessaire à la multiplication des bactéries telles que *Escherichia coli*. Elle est inhibée par les citrates. Ces défenses diminuent également la sensibilité de la mamelle aux infections (Rémy, 2010).

II. Mammites

1. Définition

La mammite bovine est une inflammation d'un ou plusieurs quartiers de la mamelle de la vache. Elle est généralement septique et d'origine infectieuse. Les mammites aseptiques sont rares et sont dues en général à des traumatismes locaux, des toxiques ou des désordres physiologiques (Rémy, 2010).

1.1. Mammite clinique

On distingue deux formes des mammites selon la sévérité de l'infection de la mamelle :

Les mammites cliniques sont définies par la présence de symptômes fonctionnels, elles entraînent systématiquement une modification du lait dans son aspect, sa texture et dans la quantité produite (grumeaux, pus, caillots sanguins, etc.). Les mammites cliniques peuvent être associées à des signes locaux (douleur, chaleur, œdème, rougeur, etc.) et/ou généraux (hyperthermie, abattement, anorexie, etc.) (Rémy, 2010).

Il existe deux types de mammites cliniques :

➤ Mammites aiguës

La douleur et la chaleur associées au quartier caractérisent les douze premières heures de l'infection. Vingt-quatre heures après l'entrée des germes, apparaît l'altération du lait et du

Revue de littérature

tissu mammaire : un œdème interstitiel dû aux toxines et à la migration leucocytaire se forme. On note par ailleurs une hyperthermie modérée autour de 39-39,5°C (Rémy, 2010).

➤ Mammites suraiguës

Elles sont rares mais généralement mortelles. La mamelle est dans un premier temps très rouge, brillante et chaude pour devenir en quelques heures très sombre et froide. On note, par ailleurs, une altération intense et rapide de l'état général avec abattement, perte d'appétit, difficultés motrices, impossibilité de se lever, hyperthermie puis très vite une hypothermie (<37,5°C) synonyme de choc. Le pronostic devient alors très réservé, et la mort est possible en 24 à 72h (Rémy, 2010).

1.2. Mammite subclinique

Les mammites subcliniques sont asymptomatiques. Les animaux atteints ne présentent ni symptômes fonctionnels (pas de modification du lait), ni symptômes locaux (pas de signes externes d'inflammation), ni symptômes généraux. Ces mammites se traduisent uniquement par une réaction immunitaire mise en évidence indirectement par une augmentation de la concentration en cellules somatiques du lait (Rémy, 2010).

2. Etiologie

Les espèces bactériennes impliquées dans les infections mammaires de la vache sont présentes sur l'animal lui-même ou dans son environnement. Par ailleurs, les bactéries responsables de mammites sont toutes capables de se multiplier dans le lait qui est un milieu nutritif suffisamment riche pour assurer leur développement. Il est courant de distinguer deux types d'agent pathogènes pour la mamelle de la vache, majeurs et mineurs (Gabli, 2005).

2.1. Pathogènes majeurs

Les bactéries pathogènes majeures regroupent les *Staphylococcus aureus*, des espèces de *Streptococcus* (*agalactiae*, *dysagalactiae*, *uberis*) et des entérobactéries notamment *E.coli*, *klebsiella sp*, *Proteus* et rarement les *Bacillus cereus*, *Mycoplasma bovis*, et *Nocardia asteroides*.

Les *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. *Streptococcus uberis* est un streptocoque non groupable qui se fixe à l'épithélium des canaux lactifères. Cette bactérie peut présenter un caractère oligoclonal (un petit nombre de souches

Revue de littérature

de *S. uberis* est retrouvé dans le troupeau) ou au contraire polyclonal (un grand nombre de souches de *S. uberis* est retrouvé dans le troupeau), ce qui fait de cette bactérie le pathogène majeur rencontré dans les pays où l'élevage extensif dominant. Concernant *Escherichia coli*, certaines souches sont sécrétrices de toxines, ce qui renforce ainsi le pouvoir pathogène du colibacille. La présence d'adhésines, nommées fimbriae, permet à *E. coli* d'adhérer aux cellules épithéliales et de résider ainsi dans la lumière des canaux lactifères. La multiplication de cette bactérie est extrêmement rapide bien qu'elle soit en partie éliminée pendant la traite. Elle présente un caractère polyclonal net. C'est une bactérie peu contagieuse, parfois non retrouvée sur les analyses bactériologiques car elle est excrétée en petite quantité et par intermittence (Rémy, 2010).

2.2. Pathogènes mineurs

Les bactéries pathogènes mineures regroupent principalement les staphylocoques coagulase négatif (SCN), *Micrococcus varians*, *Actinomyces pyogènes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella hemolytica*, *Cornybactérium bovis*.

Le groupe des Staphylocoques à Coagulase Négative comprend de nombreuses espèces dont les plus fréquemment isolées lors de mammites sont : *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. simulans* et *S. sciuri*. Il s'agit du groupe de germes le plus souvent isolé dans le lait de vaches à priori sans symptômes. En effet il est responsable d'un doublement du taux cellulaire en moyenne, ce qui est assez faible en comparaison des pathogènes majeurs, et très rarement de mammites subaiguës. Ainsi il a été montré que selon la nature du germe, sa source pouvait aussi bien être la mamelle, la peau des vaches ou du trayeur ou même l'environnement.

Lors d'infections persistantes, les germes généralement rencontrés sont : *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, et *S. simulans*. Lors de mammites subcliniques, le germe le plus isolé a été *S. epidermidis*. Par contre, aucune association n'a été trouvée entre les espèces de SCN et la production laitière ou le taux cellulaire (Van De Leemput, 2005).

Pour ce qui est des *Pseudomonas spp*, le *Pseudomonas aeruginosa* est à l'origine de mammites cliniques allant de la mammite endotoxinique suraiguë à des mammites chroniques et récurrentes. Le plus souvent, il provoque des mammites cliniques aiguës. La contamination est rare, mais elle peut concerner plus du tiers du troupeau car l'origine de l'infection est l'eau contaminée utilisée pour nettoyer le matériel de traite ou laver les trayons. Les mammites à

Revue de littérature

Pseudomonas spp sont difficiles à traiter car la bactérie possède la capacité de réaliser des biofilms dans la mamelle, limitant l'action du système immunitaire et des antibiotiques. Les chances de succès des traitements sont faibles (Rémy, 2010 ; Blowey *et al.*, 2010).

Corynebacterium bovis est un commensal de l'extrémité du trayon. Il est souvent considéré comme un contaminant à l'occasion d'examens bactériologiques du lait. Il serait toutefois responsable de mammites subcliniques avec une forte augmentation des taux cellulaires en association avec d'autres agents pathogènes surtout lors d'une faible ou absence de désinfection du trayon après la traite (Scott *et al.*, 2011).

2.3. Réservoirs des différents germes

Il existe trois réservoirs principaux pour les germes responsables de mammites, la mamelle infectée, les lésions des trayons et la litière. La connaissance de ces réservoirs est importante car elle détermine en partie les plans de lutte à mettre en place lors d'un problème de mammites dans un troupeau (IDE, 2008 ; Hanzen, 2009).

- Les réservoirs des germes contagieux comme *Staphylococcus aureus* et *Corynebacterium bovis* sont la mamelle infectée et les lésions des trayons ;
- Le réservoir des germes environnementaux comme les entérobactéries est la litière. Pour les germes ubiquitaires comme *Streptococcus uberis* ou les staphylocoques à coagulase négative dont le mode de transmission n'est pas clairement établi, les réservoirs sont multiples, à savoir la mamelle infectée, les lésions des trayons et la litière. D'autres germes très pathogènes peuvent avoir pour origine une contamination entre les troupeaux soi, par les animaux eux-mêmes, soit par leur sécrétion et contamination.

Le tableau I résume les réservoirs principaux des germes responsables de mammites cités précédemment.

Tableau 01. Nature des réservoirs des germes (Hanzen, 2009).

Bactéries	Mamelle infectée	Lésions des trayons	Litière
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	-
<i>Streptococcus uberis</i>	++	+	+++
Entérobactéries	+	+	+++
Staphylocoques à coagulase négative	++	++	++
<i>Corynebacterium bovis</i>	+++	+++	-

3. Pathogénie

3.1. Pénétration d'agents pathogènes dans la mamelle

La pénétration d'agents pathogènes dans la mamelle se fait principalement par voie galactogène, par le canal du trayon à l'exception, des quelques bactéries pouvant pénétrer par voie hématogène tels que, les mycoplasmes, les salmonelles, *Listeria monocytogenes* et *Mycobacterium paratuberculosis*. La contamination de la mamelle se fait préférentiellement lorsque le sphincter est ouvert, au cours de et après la traite, au tarissement et à l'approche du vêlage (Rémy, 2010).

Cette contamination peut provenir de la multiplication d'agents pathogènes au niveau de la peau du trayon favorisée par des lésions du trayon (blessure, gerçure, éversion) et une ouverture du sphincter en fin de traite. *Staphylococcus aureus* colonise la base du trayon et se multiplie avant de remonter le canal pour atteindre le sinus lactifère. La pénétration d'agents pathogènes dans la mamelle peut également résulter de la propulsion de bactéries dans le trayon via du lait contaminé au cours de la traite à cause par exemple de phénomènes d'impact et de traite humide. Cela permet la transmission de bactéries environnementales comme *Escherichia coli*. Enfin, la contamination peut être iatrogène en raison de défauts d'hygiène

Revue de littérature

lors d'injections intra-mammaires ou de cathétérisme du canal du trayon (Rémy, 2010 ; Blowey *et al.*, 2010).

3.2. Installation d'une infection

Lorsque les agents pathogènes débordent les défenses passives du trayon, ils colonisent les canaux galactophores. Ils peuvent être évacués par l'éjection du lait. Certaines bactéries ont la capacité d'adhérer à l'épithélium, de pénétrer dans les cellules et de s'y multiplier. A l'intérieur des cellules, les bactéries échappent alors à de nombreuses défenses du système immunitaire. Ces infections intracellulaires sont associées à des infections de type chronique et récurrentes.

Les toxines bactériennes relargies dans la mamelle associées au passage des polynucléaires neutrophiles du sang vers la mamelle engendrent une perméabilité accrue de l'épithélium favorisant la pénétration des bactéries vers le parenchyme mammaire, voire même la circulation sanguine.

L'inflammation provoquée par la multiplication bactérienne dans le parenchyme mammaire entraîne une hyperplasie du tissu inter-alvéolaire constituée en vue de circonscrire l'infection, ce qui forme des nodules de consistance ferme pouvant être détectés à la palpation de la mamelle. Puis un phénomène de fibrose s'installe piégeant les bactéries à l'intérieur d'abcès où elles sont hors de portée du système immunitaire (Rémy, 2010 ; Blowey *et al.*, 2010). L'évolution de l'infection dépend du type de bactéries et du statut immunitaire du bovin.

3.3. Devenir de l'infection

Suite à ces interactions entre le système immunitaire et les agents pathogènes, trois situations sont possibles (Rémy, 2010 ; Blowey *et al.*, 2010) :

- La guérison : l'infection est éliminée avec ou sans forme cliniquement visible grâce à la réponse immunitaire.
- L'extension : la réponse de l'organisme est dépassée, l'infection progresse dans la mamelle provoquant une mammite clinique ou subclinique pouvant évoluer vers la chronicité.
- La fluctuation : l'élimination incomplète des agents pathogènes par la réponse de l'organisme permet une guérison clinique mais non bactériologique, d'où des phases d'amélioration et d'aggravation.

Revue de littérature

4. Traitement

L'objectif du traitement est d'obtenir une guérison clinique (retour à la normale de la qualité du lait) mais également une guérison bactériologique (élimination de l'agent responsable de l'infection).

Selon Faroult (1998), les antibiotiques les plus actifs sur *Staphylococcus aureus*, les streptocoques, *Escherichia coli* sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 02. Principaux antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites (Faroult, 1998).

<i>Staphylococcus aureus</i>	les streptocoques	<i>Escherichia coli</i>
-Les pénicillines M (cloxacilline, oxacilline), -L'association amoxicilline / acide clavulanique, les céphalosporines, -Les associations pénicilline aminoside (streptomycine, néomycine, Gentamicine), -Les macrolides et apparentés (lincosamines, novobiocine).	-Les béta-lactamines (pénicilline G) -Les aminosides en association avec les béta-lactamines.	-Les pénicillines A (ampicilline, amoxicilline), -L'association amoxicilline / acide clavulanique, Les céphalosporines, les aminosides, les fluoroquinolones et les polypeptides

5. Incidence des mammites sur la qualité du lait

Les mammites bovines occasionnent des pertes économiques considérables dans les élevages laitiers. Ces derniers sont confrontés à des frais supplémentaires et à des problèmes de qualité du lait fourni aux acheteurs. En outre, l'incidence annuelle de la mammite clinique

Revue de littérature

est de 20 à 40% et elle représente la principale cause de l'utilisation d'antibiotique chez la vache. De plus des risques engendrés par les microorganismes impliqués dans la mammite, leur traitement par les antibiotiques peut parfois constituer un danger pour le consommateur (Medefouni, 2006). Le risque est encore plus important pour l'homme, lorsque le lait contient des bactéries très pathogènes responsables de brucellose (Rechidi-Sidhoum, 2019) ou de tuberculose (IDE, 2008). Aussi, il faut savoir qu'un lait de mammite subclinique est à l'origine d'altérations en industrie fromagère (Dahou, 2017).

III. Mammites à *Staphylococcus aureus*

Les mammites à *S. aureus* peuvent revêtir diverses formes suivant qu'elles soient associées ou non à des signes cliniques. Bien que *S. aureus* puisse provoquer des mammites cliniques aiguës, ces infections mammaires ont tendance à devenir chroniques. Cette capacité de *S. aureus* à provoquer une infection chronique est corrélée à sa faculté à échapper à la réponse immune et à persister à long terme dans des niches particulières au sein de la mamelle. Des formes de mammites suraiguës ont également été rapportées, et elles sont caractérisées par une dégradation de l'état général, une déshydratation, une anorexie, avec une hypothermie ou une hyperthermie. La forme gangréneuse est caractérisée par une forte inflammation, et une nécrose au niveau du quartier atteint qui devient froid, bleuâtre, avec une sécrétion gazeuse rouge foncée dégageant une odeur nauséabonde (Wallemacq *et al.*, 2010).

1. Caractérisation de *Staphylococcus aureus*

1.1. Généralités

Les *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Ce sont des coques à Gram positifs, immobiles, non capsulés et non sporulés. Ils sont le plus souvent regroupés en «grappe de raisin». Ils sont aéro-anaérobies facultatifs, halophiles et mésophiles. Ces colonies ont une couleur facilement reconnaissable, jaune dorée, qui est à l'origine de son nom staphylocoque doré, et qui permet de le différencier de staphylocoque blanc (Carip, 2011).

Revue de littérature

1.2. Historique

En 1879 a été observés par Pasteur dans un pus de furoncle, le mot staphylocoque a été créé par l'anglais Ogston (1881) qui les a mis en évidence dans des abcès aigus et chroniques (Kuroda *et al.*,2001).

1.3. Habitat

S. aureus est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino- pharynx, intestins). On le trouve sur la muqueuse nasale d'un tiers environ des sujets normaux. Éliminé dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement (Kuroda *et al.*,2001).

1.4. Classification

Selon la classification de Delarras (2007). Les *S. aureus* appartenait à phylum : *Firmicutes*, domaine : *Bacteria*, classe : *Bacilli*, ordre : *Bacillales*, familles : *Staphylococcaceae*, genre : *Staphylococcus*, espèces : *Staphylococcus aureus*.

1.5. Caractères morphologiques

S. aureus est un cocci à Gram-positif. Son diamètre moyen est d'environ 0,5 à 1µm. Il est immobile, non sporulé et souvent encapsulé. Il se divise de façon caractéristique selon plusieurs plans et s'organise le plus souvent en amas ayant la forme d'une grappe (leur nom vient d'ailleurs du grec « staphylo » qui signifie grappe de raisin) mais peut aussi se trouver isolé ou groupé par deux (diplocoque) ou par quatre (tétrade) (Vos *et al.*, 2009).

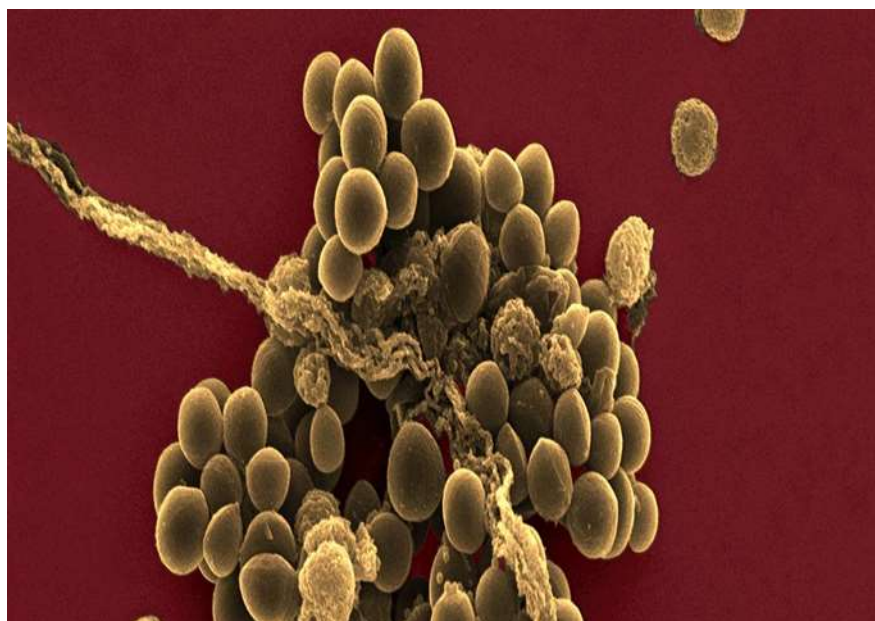


Figure 04. Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* (Institut Pasteur, 2012).

1.6. Caractères cultureux

Certaines espèces de staphylocoques sont capables de croître dans des conditions hostiles (par exemple en bouillon hypersalé à 7% de NaCl). Ce caractère est parfois mis à profit (surtout en bactériologie alimentaire), dans l'utilisation de milieux sélectifs (milieu de Chapman) pour les isoler (Le loir *et al.*, 2010).

S.aureus présente une bonne croissance sur milieux usuels en 18-24h à 37 °C (culture entre 10 et 45 °C). Sur gélose ordinaire, Les colonies sont lisses, rondes, d'un diamètre de 1 à 3mm, arrondies, bombées, opaques, parfois colorées (pigment jaune à jaune-orange, pour *S. aureus*). En gélose profonde, la croissance est observée sur toute la hauteur du tube signant le caractère aéro-anaérobie facultatif. En bouillon, la culture de cette un trouble uniforme abondant, parfois un dépôt et un voile en surface (Le loir *et al.*, 2010).

1.7. Caractère structuraux

Certains *S. aureus* sont capables de produire des polysaccharides et des protéines qui forment une microcapsule. L'excrétion de polysaccharides et de protéines capsulaires est dépendante du milieu de culture. En effet, les bactéries synthétisent une capsule lorsqu'elles se

Revue de littérature

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

1.8. Caractères biochimiques

Caractère biochimique *S.aureus* est capable de fermenter le glucose et la plupart des sucres (notamment, le mannitol et le tréhalose). La présence d'une coagulase permet d'identifier le *S.aureus*. Il existe deux formes de coagulases : la « coagulase libre » et la « coagulase liée » (Sutra *et al.*, 1998).

1.9. Pouvoir pathogène

D'après Prescott (2010), les Staphylocoques dorés possèdent des pouvoirs pathogènes invasifs et toxiques. Les souches de *S. aureus* élaborent différentes sortes de toxines solubles dans l'eau qui ont la capacité de se fixer à la surface des cellules pour former des canaux hydrophiles laissant passer librement l'eau, les ions et les petites molécules.

1.10. Résistance aux antibiotiques

De par sa multi-résistance, *S. aureus* représente un problème majeur de santé humaine et animal. Habituellement résistant aux β -lactamines, ce germe produit des pénicillinases qui ouvrent le cycle β -lactame et inactivent l'antibiotique. Les aminosides peuvent aussi subir des modifications par diverses enzymes staphylococciques conférant à cette espèce une résistance à de nombreux antibiotiques comme la gentamycine, l'amikacine ou encore la kanamycine (Prescott,2010).

Chapitre II

Huiles essentielles

et activité

Antimicrobienne



Revue de littérature

I. Plantes médicinales

1. Définition

Les plantes médicinales sont toutes les plantes qui auraient une activité pharmacologique pouvant conduire à des emplois thérapeutiques, cela grâce à la présence d'un certain nombre des substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain ; elles sont utilisées en pharmacie humaine et vétérinaire (Naghibi *et al.*, 2005).



Figure 05. Les plantes aromatiques et médicinales les plus utilisées au quotidien
(Ibert *et al.*, 2016).

2. Importance

Les plantes en nombre illimité, constituent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels, grâce à ses molécules qui présentent l'avantage d'une grande diversité de structure chimique et activités biologiques.

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques car elles contiennent des principes actifs (telles que les polyphénols et les flavonoïdes, tanins, huiles essentielles) qui sont dotées de plusieurs propriétés physiologiques et biologiques surtout celles destinées à la santé humaine et qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie ; elles présentent, en effet, des avantages dont les médicaments sont dépourvus (Bruneton, 2009).

Revue de littérature

II. Huiles essentielles

1. Définition

Selon Preedy, (2016), il existe différentes définitions des huiles essentielles, mais la plus précise est probablement celle proposée par Schilcher, Hegnauer, et Cohn-Riechter, qui a été résumé par Sonwa, (2000): *«Les huiles essentielles sont des produits ou des mélanges de produits qui se forment dans le cytoplasme et sont normalement présentes sous forme de minuscules gouttelettes entre les cellules. Ils sont volatils et aromatiques »*. Ils sont composés de *«mélanges de substances parfumées ou de mélanges de substances parfumées et inodores»*, où une substance parfumée est définie comme *«un composé chimiquement pur qui est volatil dans des conditions normales et qui, en raison de son odeur, peut être utile à la société»*.

Pour sa part, l'Organisation internationale de normalisation (ISO) a défini les huiles essentielles comme *«un produit obtenu à partir d'une matière première naturelle d'origine végétale, par distillation à la vapeur, par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des agrumes, ou par distillation à sec, après séparation de la phase aqueuse - le cas échéant - par des procédés physiques »*, précisant ensuite que *« l'huile essentielle peut subir des traitements physiques qui n'entraînent pas de modification significative de sa composition. »*.

2. Classification

Selon Chakou *et al* (2007), le pouvoir spécifique sur les germes microbiens et grâce à l'indice aromatique Obtenu par des aromatogramme les huiles essentielles sont classées en groupes : les huiles majeures, les huiles médiums, les huiles terrains.

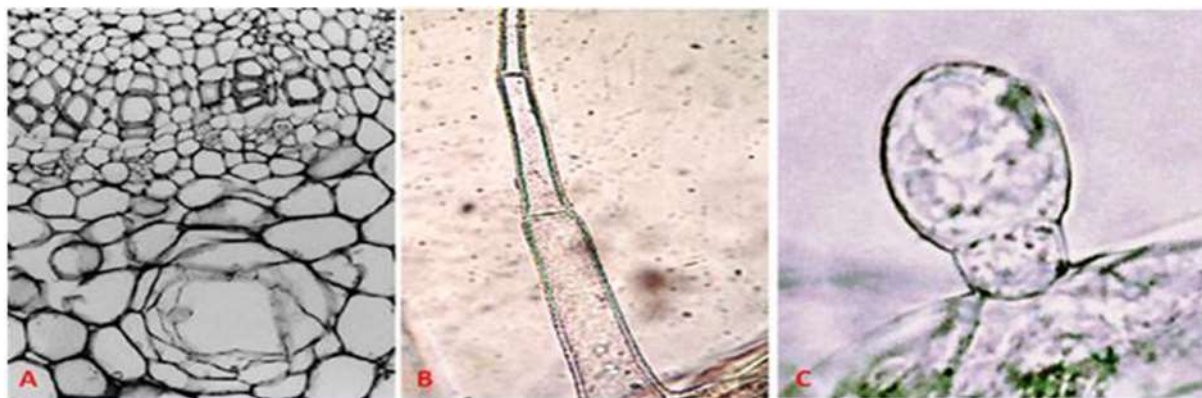
3. Localisation et lieu de biosynthèse

Les huiles essentielles 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 (anis, badiane, persil), 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

Revue de littérature

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 figure 06 (Haddouchi *et al.*, 2008).



A: Coupe transversale du pétiole avec deux cavités de sécrétions dans le parenchyme (*Rustia formosa*)
B: Poil sécréteur (*Mentha pulegium*)
C: Trichome glandulaire (*Mentha pulegium*)

Figure 06. Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles par les plantes aromatiques (Karray-Bouraoui *et al.*, 2009).

4. Propriétés physico-chimiques

Selon Bernard *et al* (1988), les propriétés des huiles essentielles sont : liquides à la température ordinaire, volatiles et très rarement colorées, leur densité est le plus souvent inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0,75 à 0,99, elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques, elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation, elles ont un indice de réfraction élevé.

5. Rôle physiologique

Certainement plusieurs effets apparents « utiles » ont été décrits : protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux (Guidah, 2013).

Revue de littérature

En phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne (Billerbeck *et al.*, 2002).

6. Rôle écologique

Parmi les composants majoritaires des huiles essentielles, nous trouvons les terpénoïdes qui possèdent un rôle écologique lors des interactions végétales, comme agents allélopathiques, c'est-à-dire inhibiteurs de la germination, mais aussi lors des interactions végétales-animal, comme agents de protection contre les prédateurs tels que les insectes. Ils interviennent également, par leurs odeurs caractéristiques, dans l'attraction de pollinisateur (Ceccherli *et al.*, 2003).

7. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant plusieurs centaines de molécules chimiques différentes. Les constituants des huiles essentielles appartiennent de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les monoterpènes et les sesquiterpènes), le groupe des composés aromatiques (Bruneton, 2009).

8. Facteurs influençant la composition chimique

Le rendement et la composition chimique des huiles essentielles varient d'une espèce à une autre. Cette variabilité peut être liée à des facteurs extrinsèques et intrinsèques.

8.1. Facteurs intrinsèques

Une huile essentielle doit avant être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue pour éviter toutes dénominations trompeuses du matériel végétal, L'influence du stade végétatif, l'organe de la plante et le polymorphisme chimique « chimio types ou formes physiologiques » sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles.

8.2. Facteurs extrinsèques

Il s'agit de l'indice des facteurs de l'environnement et des pratiques culturales. La température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents exercent une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de

Revue de littérature

stockage superficielles (poils sécréteurs des *lamiaceae*). Lorsque la localisation est plus profonde la qualité est beaucoup plus constante (Bruneton, 2009).

9. Procédés d'extraction

Il existe plusieurs méthodes d'extraction comme l'hydrodistillation, pression à froid, l'extraction par solvants organiques, l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau, etc.

9.1. Extraction par pression à froid

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

9.2. Extraction par hydrodistillation

Le matériel végétal est chauffé jusqu'à l'ébullition. L'huile essentielle s'évapore alors avec les vapeurs dégagées puis elle est condensée après refroidissement et enfin séparée de l'eau (Adio, 2005).

9.3. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

La masse végétale est déposée sur une grille à travers laquelle la vapeur passe. Les cellules se distendent et les particules d'huiles se libèrent. Puis, elles sont vaporisées et condensées dans un serpentín réfrigéré et la suite est la même que la technique de distillation (Adio, 2005).

9.4. Extraction par les solvants organiques

Le CO₂ sous-pression et à température supérieure à 31°C se trouve dans un état supercritique. La matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO₂ est introduit sous pression. Le mélange est recueilli. Puis, la pression étant réduite, le CO₂ reprend sa forme gazeuse et donc complètement éliminé. L'huile essentielle est ensuite isolée (Wenqiang *et al.*, 2007).

10. Conservation

Les huiles essentielles sont des substances sensibles et très délicates, ce qui rend leur conservation difficile et obligatoire dans le but de limiter les risques de dégradation. Ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas conservées dans des flacons opaques à l'abri de la lumière et de la chaleur (Valnet, 2000).

11. Domaines d'utilisation

11.1. Phytothérapie

La phytothérapie est une médecine qui utilise les huiles essentielles pour traiter un certain nombre de maladies. En effet, les huiles essentielles sont largement utilisés pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). Les huiles essentielles sont utilisées aussi en médecine dentaire, les huiles essentielles de thym et de romarin ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête, les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoires (Schwartz *et al.*, 1992).

11.2. Parfumerie et cosmétologie

L'utilisation des huiles essentielles comme un composant dans la fabrication des parfums, des savons, des détergents, des crèmes, des lotions et des gels parfumées permet de leur procurer un arôme agréable tout en préservant ces produits grâce aux propriétés antibactériennes et antioxydantes des huiles essentielles (Khan *et al.*, 2010).

11.3. Applications en industrie alimentaire

Au cours des dernières années les consommateurs sont de plus en plus préoccupés par la sécurité des aliments qui contiennent des agents conservateurs synthétiques. Ces derniers ont été utilisés dans les aliments pendant des décennies, ce qui peut conduire à des conséquences négatives sur la santé Humaine. Par conséquent, il y a eu un intérêt croissant pour le développement de nouveaux types de composés antimicrobiens efficaces et non toxiques et agents aromatisants naturels, tel que les extraits d'épices et fines herbes utilisées comme additifs alimentaires et agents de conservation des aliments .Dans cet optique l'usage des huiles essentielles est conseillé du moment qu'elles sont connues à la fois pour leurs propriétés aromatisantes et antimicrobiennes et leur toxicité réduite comparée à celle des additifs alimentaires synthétiques (Aissani, 2015 ; Nemet *et al.*, 2009).

Revue de littérature

12. Activités biologiques

Les extraits d'huiles essentielles possèdent des propriétés antioxydantes, antibactériennes et antifongiques connues de longues dates. L'activité biologique d'une huile essentielle est en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son «totum» ; c'est-à-dire, l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires (Lahlou, 2004).

12.1. Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir.

Il existe deux sortes d'activité antioxydante selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation). En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que, la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène (Chemloul, 2014).

12.2. Activité antifongique

Les huiles essentielles ont un grand pouvoir antifongique aérien et cutané. Les modes d'actions antifongiques sont assez semblables à ceux décrits pour les bactéries. Cependant, il faut y ajouter deux phénomènes supplémentaires inhibant l'action des levures: l'établissement d'un gradient de pH et le blocage de la production d'énergie des levures (phénomène de respiration). La plupart des composés terpéniques sont de très bons agents antifongiques. Le thymol, le carvacrol, et l'eugénol sont les composés les plus actifs (Khaldi, 2017).

12.3. Activité antibactérienne

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles sont bien connues et bien documentées. En effet, de nombreux travaux de recherche ont mis en évidence leur puissante activité antiseptique agissant aussi bien sur les bactéries, les champignons pathogènes que les virus.

Revue de littérature

L'activité antibactérienne des huiles essentielles est la plus étudiée. On distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur ces microorganismes : effet bactéricide (bactéricidie) : exerçant une activité mortelle, effet bactériostatique (bactériostase) : entraînant une inhibition de la croissance (Bencheikh, 2017).

12.3.1. Mode d'action des huiles essentielles

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Chakou *et al.*, 2007 ; Sonwa, 2000).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne (El amri *et al.*, 2014). Ce qui entraîne: L'augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires, l'acidification de l'intérieure de la bactérie, bloquant ainsi la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure, l'inhibition de la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des polysaccharides (El amri *et al.*, 2014).

Le mécanisme d'action des huiles essentielles est lié aussi à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries. En revanche, les bactéries à Gram- sont plus résistantes que les Gram+. Ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes (Boutabia *et al.*, 2014).

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique. Le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique (Zhiri, 2006).

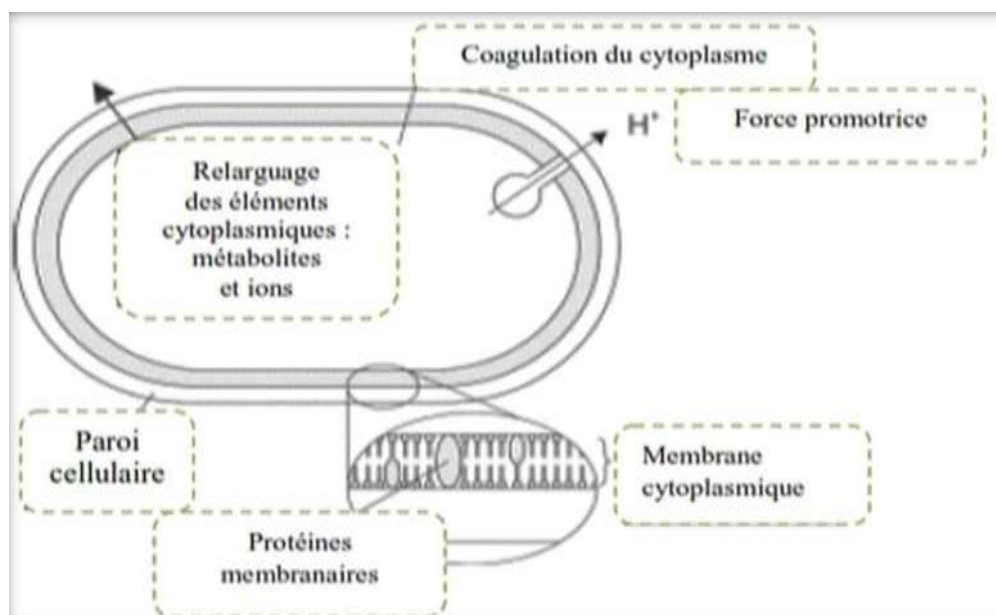


Figure 07. Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).

13. Facteurs influençant l'activité antibactérienne

Selon Kalemba *et al* (2003) l'efficacité antimicrobienne des huiles essentielles dépend de deux principaux paramètres : l'huile essentielle et sa composition chimique d'une part, et le microorganisme (type, structure) d'autre part.

13.1. Activité liée à la composition chimique

L'efficacité d'une huile essentielle dépend de sa richesse en composés phytochimiques, plus l'huile essentielle est riche en substances actives, plus son activité est importante. L'activité biologique d'une HE est liée à sa composition chimique, aux groupements fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, les composés terpénique et cétonique). Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important dans l'activité et semblent agir en synergie avec les composés principaux (Zhiri, 2006).

Les espèces du genre *Thymus* sont connues par leurs activités antibactériennes importantes, cette activité est due à leur composition chimique riche en composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol. En effet, la composition chimique de 162 espèces différentes analysées

Revue de littérature

appartenant au genre *Thymus* a montré que 77 espèces contiennent plus de 10 % en thymol et 73 espèces ont plus de 10 % en carvacrol (Sthal-Biskup *et al.*, 2002).

Les composés chimiques qui ont plus d'efficacité et à large spectre sont les phénols (thymol, carvacol, eugénol), les alcools (α -terpinéol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et rarement les terpènes (Dorman *et al.*, 2000).

Les phénols, dont le thymol et l'eugénol, sont responsables de l'activité bactéricide des huiles essentielles qui en contiennent (Lambert, 2001).

Ils produisent des dégâts irréversibles au niveau de la membrane bactérienne. La molécule de thymol exerce un effet inhibiteur et létal sur différentes souches bactériennes et, parmi elles *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium. Par contre, elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa* (Zhiri, 2006).

Les alcools viennent après les phénols, en termes d'activité, avec le géraniol, linalool, thujanol, myrcéol, terpinéol, menthol et pipéritol pour les plus connus. Ils sont généralement plus connus pour leur activité létale que bactériostatique sur les cellules végétatives, en dénaturant les protéines (Zhiri, 2006).

Les aldéhydes, fortement électronégatifs à double liaison, deviennent de puissants agents antimicrobiens en réagissant avec les composés nitrés vitaux (protéines et acides nucléiques) des bactéries (Dorman *et al.*, 2000).

13.2. Activité liée au microorganisme

La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé car une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet. Ceci peut être lié au type de microorganisme (à Gram positif ou à Gram négatif), à sa forme de croissance, planctonique ou en biofilm, à son métabolisme et à sa résistance.

En général, les bactéries à Gram négatives sont plus résistantes que les bactéries Gram positives grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatifs est plus riche en lipo-polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer (Cristiani *et al.*, 2007). Il existe cependant quelques exceptions, les bactéries Gram négatives *Aeromonas hydrophila* (Zheng *et al.*, 2009) et *Campylobacter jejuni* (Wannissorn *et al.*, 2005) ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles. La bactérie reconnue comme la moins sensible à

Revue de littérature

leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négative *Pseudomonas aeruginosa* (Dorman *et al.*, 2000).

Certaines huiles essentielles (huiles de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym d'eucalyptus) sont révélées particulièrement efficaces contre les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline et les entérocoques résistants à la vancomycine (Fisher *et al.*, 2009).

Les travaux réalisés par Shin et ses collaborateurs (2005) sur des huiles essentielles, isolées de deux espèces de thym de Corée, *T. magnus* et *T. quinquecostatus*, ont confirmé la capacité de ces huiles essentielles à inhiber la croissance de bactéries résistantes comme *Streptococcus pneumoniae*, *Samonella typhimurium*, *Salmonella entereditiset*, *Staphylococcus aureus*.

III. Huile essentielle de thym

1. Définition du thym

Le nom Thym vient probablement du latin "thymus" qui signifie «parfumé» ou du grec "thymos" qui signifie "courage" ou "force" (Stahl-Biskup *et al.*, 2002).

Les espèces de thym sont utilisées depuis l'antiquité pour leurs vertus stimulantes et toniques, elles sont recommandées contre les faiblesses organiques notamment celles du système nerveux (neurasthénie, dépression, apathie) et du système circulatoire (Alpin, 2005). On leur attribue également de nombreuses activités biologiques, antispasmodiques, antimicrobiennes, antioxydants, antiplaquettaires, analgésiques et antiinflammatoires (El Bouzidi *et al.*, 2013).

2. Répartition géographique

2.1. Dans le monde

Selon Dob et ses collaborateurs (2006), il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'Ouest et la méditerranée. C'est un genre très répandu dans le Nord-Ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), il pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du Sud-ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte (Mebarki, 2010).

Revue de littérature

2.2. En Algérie

Le thym comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides. Il est représenté en Algérie par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination en raison de leurs variabilités et leur tendance à s'hybrider facilement (Mebarki, 2010).

3. Caractéristiques botaniques

La famille des *Lamiaceae* (*Labiatae*) est l'une des familles botaniques les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antioxydant et antibactérien. Elle regroupe entre 200 et 250 genres et entre 3200 et 6500 espèces (Dorman *et al.*, 2004).

4. Classification taxonomique

Selon Teuscher *et al.*, (2005) le thym appartient au :

Tableau 03. Classification taxonomique du thym. (Teuscher *et al.*, 2005).

Règne	Plantae (végétal)
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Thymus</i>

5. Description morphologique

Le thym est une plante sous-ligneuse érigée ou prostrée, odorante, elle forme des touffes compactes très ramifiées qui s'élèvent à une vingtaine de centimètres au-dessus du sol. Il pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocailleux et dans les garrigues.

Les feuilles du thym sont plus au moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles.

Revue de littérature

Le calice quant à lui, est tubuleux à deux lèvres et la corolle est plus au moins à deux lèvres aussi (Quezel *et al.*, 1963).



Figure 08. Morphologique de *thymus vulgaris* (Wikipedia, 2020).

6. Composition chimique d'huile essentielle du *thymus vulgaris*

Il a été observé que le thymol (34,50%) était présent à la concentration la plus élevée en huile essentielle du *thymus vulgaris*, suivi du p-cymène (22,27%) et du linalol (5,35%). Une variation significative est observée dans la composition chimique de l'huile essentielle du *thymus vulgaris* (Benameur *et al.*, 2018).

Mancini *et al.*, (2015) ont constaté que le composant principal est le thymol, suivi du carvacrol et de l'oxyde de caryophyllène. Cependant, Šegvić Klarić *et al.*, (2007) et El Hattabi *et al.*, (2016) ont rapporté que le principal constituant de cette huile essentielle est le carvacrol, suivi du p-cymène et de l'E-caryophyllène. Comme indiqué précédemment, la variation de la composition chimique des huiles essentielles peut être due à de nombreux facteurs tels que l'origine géographique, les facteurs génétiques, le matériel végétal et la saison de récolte (Dugo *et al.*, 2014; Tuttolomondo *et al.*, 2015). La composition chimique

Revue de littérature

ainsi que l'enquête sur la quantité de contaminants sont très importantes pour la caractérisation des aliments (Di Stefano *et al.*,2014).

7. Définition d'Huile essentielle du thym

L'huile essentielle de Thym est assez exceptionnelle. Le mot « Thym » vient du latin « Thymos » et signifie « pour parfumer ». L'huile essentielle de thym est extrait par distillation par la vapeur à partir des feuilles fraîches ou sèches et des sommités fleuries, de couleur jaune clair à jaune orange, ses qualités sont nombreuses. Elle a un goût fort, puissant, épicé, herbeux, plutôt plaisant. L'essence du thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives (Naghdi *et al.*,2004).

Les huiles essentielles du thym sont composées par des molécules aromatiques d'origine végétale présentant une très grande diversité de structure. La variabilité chimique des HEs du thym dépend de plusieurs facteurs, qui généralement sont d'ordres climatiques et environnementaux. Mais peuvent être aussi d'ordre génétique et saisonnier (stade végétal) (Loziene *et al.*, 2007).

8. Toxicité de l'huile essentielle de thym

Les huiles essentielles sont des substances très actives. A ce titre, elles doivent être utilisées avec vigilance, et toujours sur la base de connaissances fiables et suffisantes. L'huile essentielle de Thym est dermocaustique (irritante pour la peau) par la présence de phénols. Elle ne s'emploie jamais pure en application sur la peau ou dans un bain. Diluer maximum 20% dans une huile végétale pour une utilisation percutanée (Gayda, 2013).

9. Domaine d'application de l'huile essentielle de thym

9.1 Cosmétologie et industrie alimentaires

Il est bien connu que le thym est une plante condimentaire très appréciée, que l'on fait sécher pour des utilisations ultérieures. L'huile essentielle de thym riche en thymol est couramment utilisée pour la confection de savons et d'autres produits. Il entre aussi dans l'élaboration de certaines liqueurs, c'est l'un des remèdes populaires les plus utiles. Les égyptiens et sumériens de l'antiquité l'utilisaient pour embaumer leurs morts. Les romains le brûlaient pour purifier l'air et éloigner les animaux nuisibles. Ils s'en servaient aussi pour aromatiser les fromages et les boissons alcoolisées, les militaires en mettaient dans leur bain pour se donner de la vigueur. Au Moyen Age, les nobles portaient de petits bouquets pour se

Revue de littérature

prémunir des odeurs, il était réputé pour donner du courage aux chevaliers. Il entre aussi dans la composition de produits cosmétiques (Saidj, 2006).

10. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Les techniques utilisées ont une grande influence sur les résultats. Ces méthodes utilisées donnent parfois des résultats différents selon les conditions opératoires expérimentales pour chaque manipulateur (Surk, 2003).

10.1. Méthode de diffusion en milieu solide (Aromatogramme)

C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Cet examen est équivalent à un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des huiles essentielles préalablement sélectionnées et reconnues. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier (de cellulose) de 6 mm imprégné d'une quantité donnée d'huile essentielle (10 μ l) (Bondi *et al.*, 1993). Après ensemencement et incubation, on mesure le diamètre des zones d'inhibition.

10.2. Méthode de dilution

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrices. Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme.

L'efficacité de l'huile essentielle testée est évaluée par la mesure de deux concentrations : la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). Ces concentrations nous permettent de connaître la nature de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle : bactériostatique ou bactéricide (Derwich *et al.*, 2010).

Deuxième partie
Recherche Expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Objectif

L'objectif de cette étude est de réaliser une étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait de thym contre les *staphylococcus aureus*.

Dans un premier temps cette bactérie devait être isolée de lait mammitique à partir d'échantillons prélevés sur des vaches laitières la ferme expérimentale de l'université Abdalhamid IBN Badis de Mostaganem, sis à Hassi-Mamèche.

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire des sciences et techniques de productions animales (LSTPA) de l'université de Mostaganem.

2. Matériel et produits

2.1. Matériel

- Autoclave à 120 °C
- Etuve à 37 °C
- Bain marie à 100 °C

2.2. Milieux sélectifs

Nous avons utilisés le milieu Chapman (Annexe A), la gélose Mueller-Hinton, le bouillon Mueller-Hinton (MH) (Annexe B), les milieux de conservation (Annexe C), le bouillon nutritif et la gélose au sang (Annexe D).

2.3. Huile essentielle de thym

L'huile essentielle utilisée pour cette recherche a été extraite d'une plante médicinale aromatique, le thymus de l'espèce botanique : *Thymus vulgaris*. L. Elle a été extraite le 10 mars 2019. L'origine du thym est la commune de Sfisifa, dans la wilaya de Naama qui est située dans le sud de l'Algérie.

L'extraction de cette huile essentielle a été réalisée par la méthode d'hydro-distillation au niveau du laboratoire de synthèse pétrochimique « du département de Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques de l'université M'hamed BOUGARA de BOUMERDES.

Matériel et méthodes

3. Méthodes

3.1. Prélèvement de lait

Les échantillons de lait utilisés pour la recherche bactériologique sont prélevés sur 03 vaches laitières de la ferme expérimentale de l'université et ce, le 01 mars 2020 avec l'aide de notre directrice de mémoire. Le prélèvement a été immédiatement transféré au laboratoire LSTPA, pour procéder aux différentes analyses bactériologiques.

3.1.1. Mode opératoire

Le prélèvement est relativement simple, mais il doit être précis et rapide afin de ne pas le contaminer. Il est réalisé en deux étapes.

La première étape consiste, après avoir porté des gants, au nettoyage correct du trayon avec de l'eau tiède et du savon, en utilisant une lavette. On essuie ensuite avec du papier absorbant et on renouvelle l'opération jusqu'à ce que le papier soit propre. On procède ensuite à la désinfection du sphincter du trayon avec un coton imbibé d'alcool à 70 °.

Dans la seconde étape et après l'élimination des premiers jets, on prend un flacon stérile entre le pouce et l'index et on oriente le bouchon vers le bas et on dévisse celui-ci avec la main droite. Le bouchon est placé immédiatement entre le pouce et l'index de la main gauche, protégeant l'ouverture du pot. On approche le flacon à l'horizontale du trayon, on élimine les premiers jets dans un récipient à part pour éviter une éventuelle contamination de l'environnement, puis on dirige 3 à 4 jets vers le flacon stérile, on rebouche celui-ci immédiatement. On identifie le flacon avec le numéro de la vache, et le quartier atteint et la date du prélèvement. Le flacon est ensuite placé dans un conteneur isotherme et transporté au laboratoire. La culture doit être réalisée dans les 48 heures qui suivent le prélèvement (Besognet *et al.*, 2007).

Matériel et méthodes



Figure 09. Les échantillons de lait (E1 ; E2 et E3) prélevés respectivement sur les 3 vaches de l'exploitation.

4. Recherche des *Staphylococcus aureus*

4.1. Isolement et ensemencement sur milieu Chapman

L'isolement a été effectué sur la gélose Chapman. Ce milieu contient une forte teneur en NaCl (7,5%), ce qui permet principalement la croissance des espèces du genre *Staphylococcus* au détriment des autres bactéries. Il donne une indication de l'action de la souche isolée sur le mannitol, contenant du rouge de phénol (indicateur de PH). L'utilisation de mannitol avec production d'acide se traduit par un virage de couleur du rouge au jaune (Guiraud, 2003).

4.1.1. Mode opératoire

Les boîtes de Pétri ont été préparées avec de la gélose Chapman fondue, en respectant la zone stérile. Après solidification de la gélose, on dépose entre 10 à 60 μ l de lait de chaque échantillon dans les boîtes de Pétri, puis on étale sur toute la surface de la gélose. Une fois que la gélose est sèche on incube les boîtes à 37 °C pendant 24heurs à 48 heures.

5. Examen macroscopique

Il consiste à étudier la forme, l'aspect, le contour, la surface et la couleur des colonies sur le milieu Chapman.

6. Examen microscopique

L'étude microscopique des souches isolées est réalisée après une coloration de Gram, afin de déterminer leur morphologie et leur type de Gram.

Matériel et méthodes

6.1 Coloration de Gram

6.1.1. Préparation d'un frottis

Sur le centre d'une lame on met une goutte d'eau distillée, puis on place au centre avec l'anse de platine une colonie que l'on a prélevé de la boîte de Pétri, on mélange pour avoir une suspension homogène, ensuite on fixe le frottis en coupant la flamme du bec bunsen trois fois et on laisse le frottis sécher.

6.1.2. Coloration de Gram

On dépose les lames sur un porte lames au-dessus d'un bac et on recouvre les lames avec le violet de gentiane et on laisse fixer le colorant pendant 1 min, on ajoute ensuite le Lugol et on attend entre 30s à 1 min, on rince la lame doucement avec de l'eau distillée, puis on ajoute l'éthanol et on laisse agir pendant 10s. On recolore avec de la fuchsine et on attend 30s, enfin on rince à l'eau distillée et on sèche le frottis avec du papier buvard. Une fois le frottis prêt, on l'observe au microscope avec l'objectif x100 avec de l'huile d'immersion.

Les bactéries qui apparaissent en violet sont des Gram (+) et celles qui apparaissent en rose sont des gram (-).

7. Test de purification

7.1. Purification sur milieu de Chapman

On prélève une colonie et l'on effectue un repiquage sur le milieu de Chapman, en effectuant un ensemencement en stries puis on incube à 37°C pendant 24h.

8. Recherche de la catalase

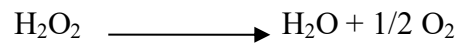
La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H_2O et $1/2 O_2$. Ce test est fondamental pour l'identification des bactéries à Gram +.

8.1. Mode opératoire

On dépose une goutte de réactif eau oxygénée (H_2O_2) sur une lame, on dépose à l'aide de l'anse de platine une colonie isolée de la souche à tester et on observe l'apparition de bulles.

Matériel et méthodes

Une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (oxygène).



Si l'on obtient un dégagement gazeux, il y'a production d'oxygène (O₂) provenant de la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), la souche est de catalase positive (+).

L'absence de dégagement gazeux indique absence de production d'oxygène, la souche est de catalase négative (-).

9. Recherche d'hémolyse par gélose au sang

C'est un milieu d'isolement enrichi sur lequel les Streptocoques se développent bien. Il permet, la lecture du caractère hémolytique, c'est un milieu riche d'autant plus par la présence de sang.

9.1. Mode opératoire

On prélève une colonie, on l'ensemence en surface de la gélose au sang par la méthode des stries dans une des boîtes préparées, on a incubé pendant 24h à 37°C et on observe les résultats.

α-hémolyse : L'hémolyse alpha présente un changement de couleur dans la gélose d'abord rouge à une couleur vert très foncé.

β - hémolyse : L'hémolyse bêta se réfère à la lyse complète des cellules sanguines. Elle se présente comme une couleur jaune transparente sur le milieu de gélose au sang.

10. Recherche de la coagulase (Test au plasma de lapin)

La propriété de *Staphylococcus aureus* à provoquer la coagulation d'un plasma est due à la sécrétion d'une protéine extracellulaire : la staphylocoagulase ou la coagulase.

10.1. Mode opératoire

Pour préparer une culture jeune de staphylocoque, on ensemence dans un bouillon nutritif en tube une colonie à partir de la gélose Chapman, puis on incube à 37°C durant 18

Matériel et méthodes

Dans un tube on ajoute 1 ml du bouillon nutritif et 1 ml du plasma de lapin ensuite on incube à 37°C La production des enzymes permet d'obtenir un caillot une heure à quatre heures après l'inoculation.

A l'issue de test, les germes répondant positivement sont définitivement identifiés comme *S. aureus*.

11. Conservation des souches

11.1. Préparations du milieu

Dans un bécher, on met 1000 ml d'eau, on pèse les composants du milieu de conservation (Annexe C), puis on les verse dans l'eau et on agite le milieu pendant 15 min, on vérifie le pH et on autoclave à 120°C pendant 15 min.

Une fois le milieu prêt, on verse 5 ml de ce milieu dans 02 tubes stériles.

11.2. Conservation

On prélève une jeune colonie de souche pure de *st. aureus*, on fait 3 piqûres centrales dans chaque des deux tubes et on incube à 37°C pendant 18h.

Après 18h d'incubation on met les tubes dans un réfrigérateur à 4 °C.



Figure 10. Conservation des souches (photo personnelle).

A : prélèvement d'une colonie. **B :** piqûres centrales. **C :** conservation de la souche en double.

Matériel et méthodes

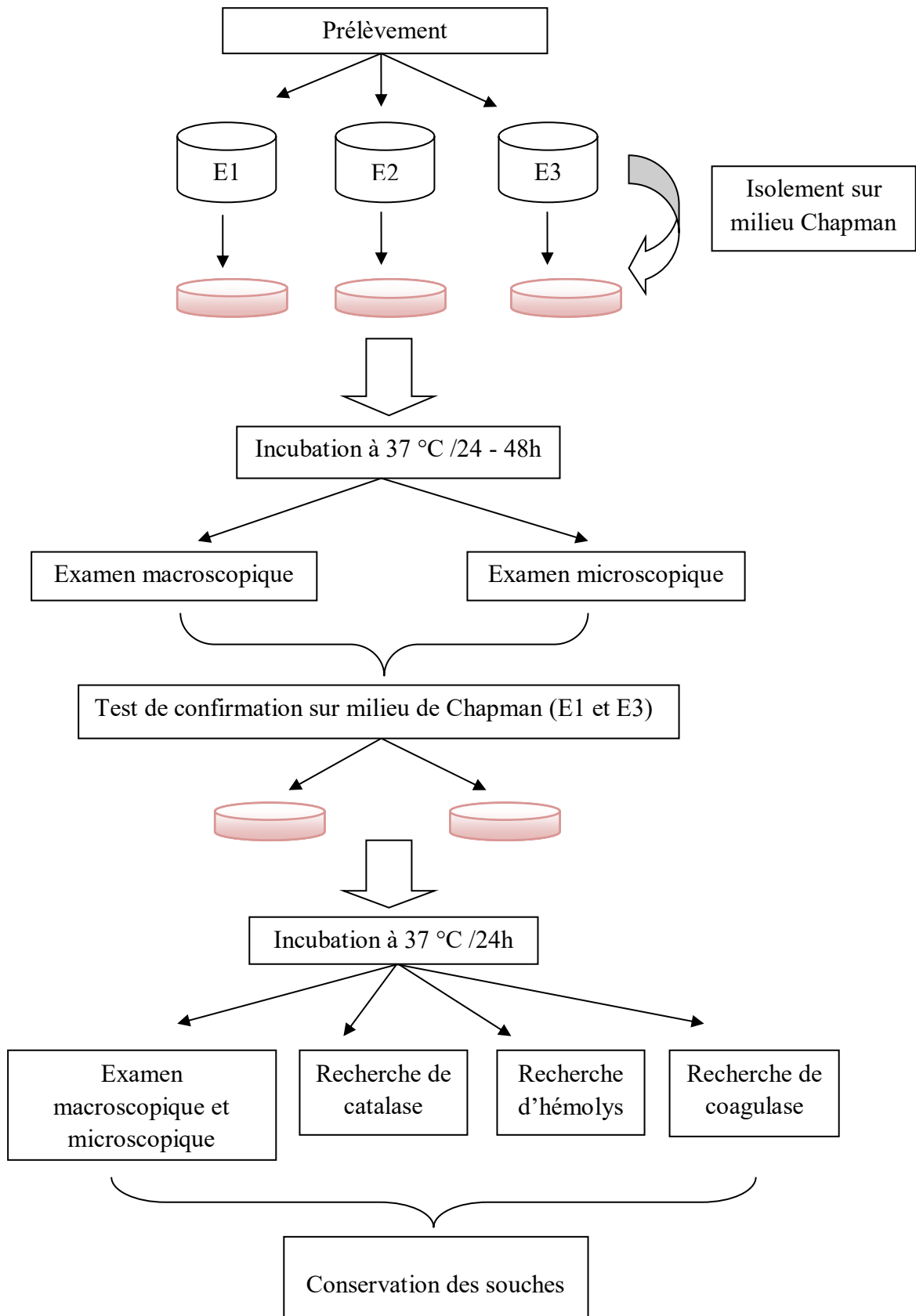


Figure 11. Schéma illustrant les étapes de la recherche des *Staphylococcus aureus*. E(1 ; 2 ; 3) : Echantillon de lait des vaches (1 ; 2 et 3).

Matériel et méthodes

12. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de thym

L'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de l'aromatogramme. C'est une méthode de mesure du pouvoir antibactérien des huiles essentielles, *in vitro*. C'est l'équivalent d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles (Benkherara *et al.*, 2011).

La diffusion sur gélose est une technique qualitative permettant de tester l'existence du pouvoir antimicrobien. Elle se traduit par la formation d'une zone d'inhibition autour de la substance à caractère antimicrobien (Amatiste *et al.*, 2014).

12.1. Préparation d'une pré-culture

L'activité antibactérienne doit être réalisée sur des souches bactériennes pures et jeunes. La réactivation des cultures est effectuée par repiquage sur des boîtes de Pétri contenant le milieu spécifique (Chapman). Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées dans l'étuve à 37 °C pendant 18 à 24h.

12.2. Préparation de la suspension bactérienne

A partir d'une culture jeune de 18-24h, une suspension bactérienne a été préparée. Pour cela, une colonie bactérienne est prélevée et mise en suspension dans un tube contenant une solution physiologique stérile (5ml). A l'aide d'un spectrophotomètre, la solution est ajustée pour obtenir un inoculum équivalent au standard de McFarland 0,5 (10^8 UFC/ml).

12.3. Méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme)

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle a été effectuée en utilisant la méthode de diffusion sur gélose agar. Selon zhanget *et al.*, (2015), c'est une méthode pratique simple, bon marché et reproductible.

Chaque plaque de Pétri stérile (90 mm) est préparée avec 20 ml de milieu gélosé Mueller-Hinton. Après solidification de la gélose, 100 µl de suspension bactérienne (1×10^8 UFC / ml) sont étalées sur la gélose. Après 5 min, un disque de papier filtre stérile (6 mm) contenant 5 µl d'huile essentielle est placé à la surface de la boîte qui est ensuite incubée à 37° C pendant 24 h. L'activité antibactérienne d'huile essentielle a été exprimée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. Un Papier filtre stérile a été utilisé comme témoin. Les

Matériel et méthodes

diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en millimètres. Les valeurs sont décrites comme la moyenne \pm écart-type des analyses effectuées en triple (Bachir et Benali, 2012).

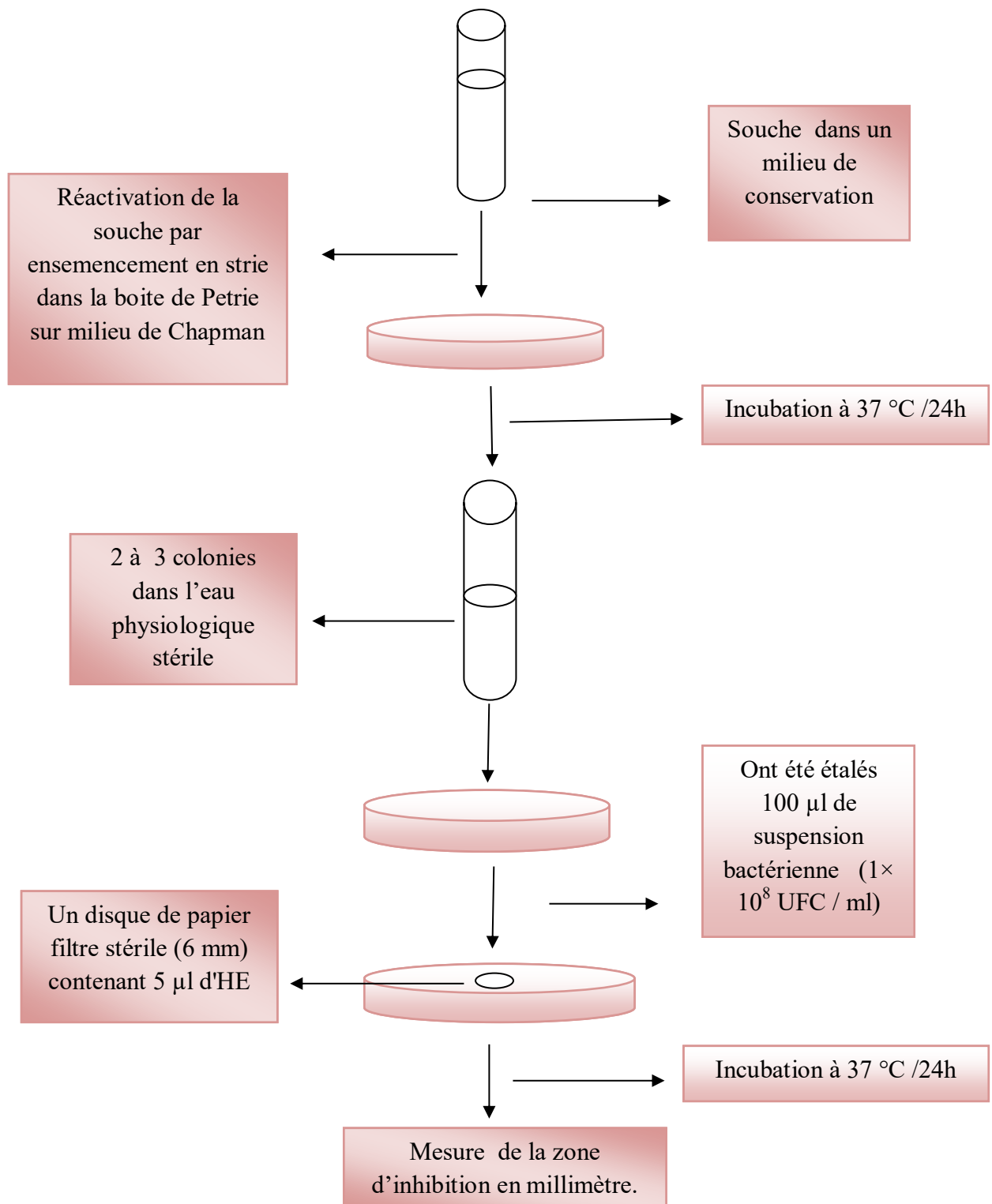


Figure 12. Schéma d'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de thym.

Matériel et méthodes

12.4. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Pour l'étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI), on procède à une dilution successive par progression les dilutions suivantes 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/50, 1/64, 1/80, 1/128. Ensuite, 400 µl de l'huile essentielle à tester sont placés dans un tube stérile contenant 4,6 ml de milieu MHB, supplémenté en Tween 80 (0,01 %, v/v). Du fait de la non miscibilité des huiles essentielles à l'eau (El Amri *et al.*, 2014; Oussou *et al.*, 2004). Une dilution en cascade est effectuée dans le milieu MHB-Tween 80 (0,01 % v/v), de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 40 mg. ml⁻¹ et 1,25mg.mL. Une quantité de 13µl d'un inoculum bactérien, de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland (108 UFC.ml⁻¹) sont déposés dans chacun des tubes de la gamme, puis placés à 37°C. Un témoin de la croissance bactérienne, pour lequel 13µl de l'inoculum standardisé a été déposé dans du milieu MHB-Tween 80 (0,01 %, v/v), est également réalisé (Guinoiseau, 2010). La CMI (% v/v) de l'huile essentielle testée est déduite à partir du premier tube de la gamme, dépourvu de croissance bactérienne.

12.5. Concentration minimale inhibitrice (CMB)

La gélose nutritive coulée dans des boîtes de Pétri estensemencée en stries par 100ul des contenus des tubes ayant une concentration \ CMI dans la série de dilution précédente. La CMB est déterminée après une incubation de 24 heures à 37°C. C'est la plus petite concentration qui inhibe totalement la croissance (El Amri *et al.*, 2014). La CMB (% v/v) de l'huile essentielle est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie (Guinoiseau,2010).

Chapitre II

Résultats et discussion

Résultats et discussion

I. Résultats

1. Résultats de la Recherche des *Staphylococcus aureus*

1.1. Résultats de l'isolement et de l'ensemencement sur milieu Chapman

Après 24H d'incubation nous avons obtenu des colonies dorées pour les 02 échantillons (figures n° 13 et 14). Par contre, concernant l'échantillon E2 nous n'avons pas obtenu de colonies.



Figure 13. Colonies bactériennes dorées,
E1.



Figure 14. Colonies bactériennes dorées,
E3.

La présence de colonies jaunes avec virage de la couleur du milieu, ce qui signifie qu'il s'agit probablement de *S. aureus*.

1.2. Résultats de l'examen macroscopique

On a observé des colonies de germe staphylocoque d'une couleur dorée, de taille 0,7 à 1 µm, au contour : lisse, relief : bombée, centre : surélevé et d'une surface lisse.

1.3. Résultats de l'examen microscopique

Les figures n° 15 et 16 montrent les caractères morphologiques des germes pathogènes présents dans les 2 échantillons de lait prélevés observés au microscope (grossissement x 100).

On a observé des colonies de *staphylococcus aureus* gram +, Cocci en amas en grappes raisin (E1).

Résultats et discussion

On a observé des colonies de staphylococcus aureus gram +, Cocci en amas en chainettes en grappes raisin (E3).

NB : E1 à gauche, E3 à droite.

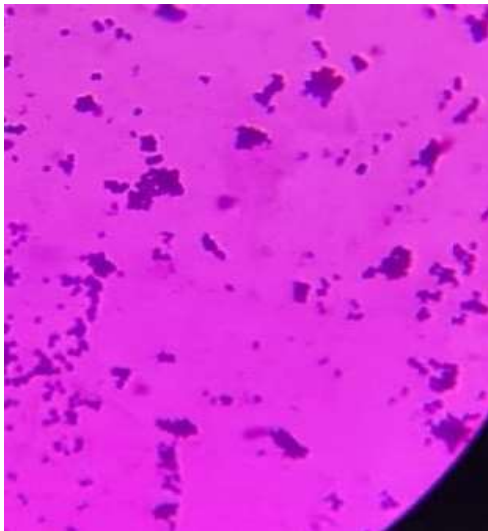


Figure 15. *Staphylococcus aureus* Gram+, Cocci en amas en grappes raisin.

Figure 16. *Staphylococcus aureus* Gram+, Cocci en amas en chainettes en grappes raisin.

1.4. Résultats de la recherche de la Catalase

La figure n°17 montre la présence de dégagement de gaz, ce qui indique que la bactérie possède une catalase positive (+).

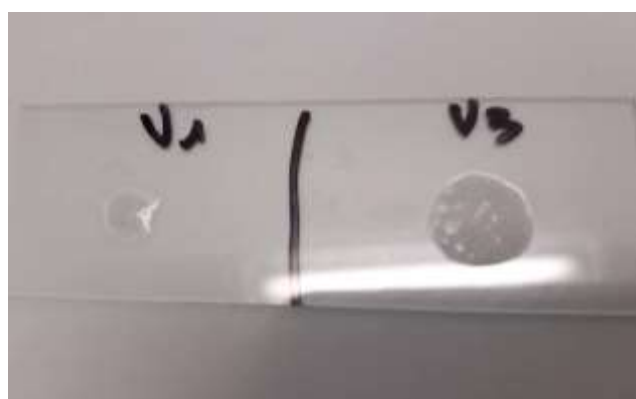


Figure 17. Recherche de la Catalase (+) E1, E3.

Résultats et discussion

1.5. Résultats de la recherche de l'hémolyse sur gélose au sang

Après 24H d'incubation nous avons obtenu des zones hémolytiques (α - hémolyse, β - hémolyse) (figure n°18 et 19).



Figure 18. α - hémolyse, E1.



Figure 19. β - hémolyse, E3.

1.6. Résultats de Recherche de la coagulase (Test au plasma de lapin)

La figure n°20 montre un résultat négatif (pas de coagulation) ce qui confirme que le staphylocoque n'est pas de type *aureus*.



Figure 20. Coagulase négative (-) E1, E3.

Résultats et discussion

La coagulase négative nous assure que ce staphylocoque n'est pas de type *Staphylococcus aureus*.

2. Résultats d'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du thym

2.1. Résultats de la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme)

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour des puits contenant l'extrait à tester. Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisés par des croix.

Selon Ponce et al. (2003), la souche non sensible (-) ayant un diamètre $\text{Ø} < 8$ mm, sensible (+) $\text{Ø} 9-14$ mm, très sensible (++) pour $\text{Ø} 15-19$ mm, extrêmement sensible (+++) pour $\text{Ø} > 20$ mm.

2.2. Résultats de la Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration en présence de laquelle, aucune croissance visible à l'œil nu n'est observée.

2.3. Résultats de la Concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB) a été définie comme la plus faible concentration d'antibiotique détruisant 99,9% de l'inoculum bactérien.

Résultats et discussion

II. Discussion

La présence des staphylocoques dans les 2 échantillons confirme la contamination car ces germes sont totalement absents dans un lait sain. Cette présence est le signe probable de mammites.

Cette espèce est fréquemment rencontrée lors de mammites. Lorsqu'elle appartient au groupe de Staphylocoques à coagulase négative, sa source pouvait aussi bien être la mamelle, la peau des vaches ou du trayeur ou même l'environnement (Smith, 2008).

Une étude réalisée à Alger, qui a porté sur 69 vaches laitières appartenant à 22 élevages distincts, a permis d'aboutir aux résultats suivants : les analyses bactériologiques des échantillons de lait ont montré la présence de coques à Gram positif, notamment des staphylocoques à coagulase positive (7%), des staphylocoques à coagulase négative (1%) et des streptocoques (7%) (Boulbina *et al.*, 2009).

En plus de l'implication des mammites dans les pertes financières, il ne faut pas négliger leur incidence en santé publique. L'utilisation intensive des antibiotiques pour le traitement et la prévention des mammites constitue une menace pour la santé humaine par l'émergence de souches antibio-résistantes qui, par le biais du lait sont introduites dans la chaîne alimentaire (Werckenthin *et al.*, 2001).

Dorman *et al.*, (2000) ont démontré que l'activité antibactérienne des HE est évaluée en fonction du diamètre (mm) des zones d'inhibition de la croissance bactérienne et que le thymol c'est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne contre 25 genres de bactéries testées.

Des études réalisées par Dorman *et al.*, (2000) ; El Ouali Lalami *et al.*, (2013) ont montré que les composés phénoliques de *Thymus vulgaris* possède une forte activité antibactérienne et antifongique contre de nombreuses espèces microbiennes, dont *S. aureus*, *E. coli* et *Aspergillus sp.*

Les espèces du genre *Thymus* sont connues par leurs activités antibactériennes importantes, cette activité est due à leur composition chimique riche en composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol. En effet, la composition chimique de 162 espèces différentes analysées

Résultats et discussion

appartenant au genre *Thymus* a montré que 77 espèces contiennent plus de 10 % en thymol et 73 espèces ont plus de 10 % en carvacrol (Sthal-Biskup *et al.*, 2002).

Bourgou *et al.*, (2016) dans une autre étude ont montré que les huiles essentielles de *Thymus* Algérien ainsi que de leurs dilutions présentent des activités antimicrobiennes intéressantes ; avec des diamètres des zones d'inhibition variables allant de 7 à 26 mm.

Apparemment, tous les extraits expérimentaux de *Thymus vulgaris* ayant fait l'objet d'extractions aux solvants à différentes polarités et qui ont accusé des rapports CMB /CMI inférieurs à 2 ont montré qu'ils exercent des effets antimicrobiennes de type bactéricide vis-à-vis d'*E. Coli* (Olivier, 2007).

La CMI, de façon générale, est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible d'un microorganisme après un temps d'incubation de 18 à 24 heures (Haddouchi *et al.*, 2016).

Conclusion

Conclusion

Les mammites de vaches représentent une pathologie dominante en élevage de bovins laitiers et un risque sanitaire pour les consommateurs ; où le lait de mammite représente par conséquent un danger d'importance hygiénique, d'une part, par les germes pathogènes qu'il contient (IDE, 2008 ; Rechidi-Sidhoum, 2019) (D'autre part, par la consommation de résidus d'antibiotiques utilisés pour le traitement (Medefouni, 2006).

En vue de minimiser l'utilisation des antibiotiques et apporter plus d'information sur l'importance des plantes médicinales et précisément sur le thym, et en raison de leur richesse en polyphénols, les huiles essentielles de ces plantes sont utilisées dans le traitement de certaines infections microbiennes (Bruneton, 2009).

Un grand nombre de plantes aromatiques contiennent des composés chimiques ayant des propriétés biologiques différentes. Plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur les huiles essentielles extraites de ces plantes aromatiques. Cependant, les travaux de recherche sur les propriétés anti oxydantes, antibactériennes et antifongiques de certaines plantes sont rares. Par conséquent, l'évaluation de telles propriétés demeure une tâche intéressante et utile, en particulier pour trouver de nouvelles sources d'agents antimicrobiens naturels (Prescott, 2010).

L'ensemble des résultats obtenus par certains chercheurs montrent que le thym a une activité antimicrobienne contre certaines infections mammaires. Cette activité est due à leur composition chimique riche en composés phénoliques tels que, le thymol et le carvacrol.

A l'essor de la présente étude, il serait judicieux de mener une étude plus approfondie sur l'huile essentielle de thym afin d'isoler, de purifier et d'identifier les composés ayant une activité antibactérienne et de tester leurs effets sur des bactéries responsables de mammites particulièrement, subcliniques, afin d'éradiquer ce fléau qui est la cause de dommage dans les troupeaux.

Annexes

Annexes

Annexe A

Milieux Chapman

Milieu d'isolement sélectif des bactéries du genre Staphylococcus (coques Gram + regroupés en amas).

Composant de milieux Chapman : pour 1L (PH : 7,4)

Extrait de viande de bœuf	1 g
Peptones	10 g
Mannitol	10 g
Chlorure de sodium	75 g
Rouge de Phénol	0.025 g
Agar	15 mg

Annexe B

Milieux Gélose Mueller-Hinton (MH)

Composition des milieux de culture (pour 1 litre d'eau distillée)

Infusion de viande de bœuf déshydratée	3 g/L
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5 g/L
Amidon.....	1, 5 g/L
Agar.....	1, 5 g/L
PH	7, 3 ± 0, 2

Autoclave à 120°C/20 min

Bouillon Mueller-Hinton

Extrait de viande de bœuf	2 g/L
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5 g/L

Annexes

Amidon soluble..... 1, 5 g/L

PH7, 3 ± 0, 2

Autoclave à 120°C/20 min

Annexe C

Gélose pour la conservation

Peptone.....10g

Extrait de viande.....5g

Chlorure de sodium.....5g

Agar agar.....10g

PH7, 3 ± 0, 2

Eau distillée.....1.000 ml

Autoclave à 120°C pendant 15 min.

Annexe D

Bouillon nutritif

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée.

Peptone.....5,00g

Extrait de viande.....3,00g

PH final à 25°C.....6,8 ± 0,2

Gélose au sang de mouton

Composition et Préparation :

Peptone de viande..... 10

Peptone de caséine.....5

Extrait de levure.....3

Annexes

Chlorure de Sodium.....5

Agar.....18

Additif à 45-50°C sang de mouton défibriné.....50 à 80 ml/l

Dissoudre 41 g dans un litre d'eau distillée ; autoclave 15min à 121°C : PH=6,9±0,1

Références
Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

Adio, A. M. *Isolation and structure Elucidation of sesquiterpenoids from the essential oils of some liverworts (Hepaticae)*. Thèse pour le degré de Dr. National à l'institut de la chimie organique Allemagne : université de Hambourg, **2005**, 280 p.

AFSSAPS. (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, **2008**, pp11-12.

Aissani, F. *Analyse sensorielle de la viande bovine additionnée aux huiles essentielles Thymus ciliatus (Zaitra) et Ammoides verticillata (Nunkha)* [enligne]. Mémoire : pour l'obtention du diplôme Master en Agronomie. Tlemcen : Université ABOUBAKER BELKAID-Tlemcen, **2015**, 110 p. Disponible à l'adresse URI: <http://dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/8359>.

Amatiste, S, Carfora, V, Giacinti, G, Marri, N, Rosa, G, Rosati, R, Sagralfoli, D. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* in fresh sheep cheese. *Italian Journal of Food Safety*, 3(3). [enligne], **2014**, pp148-149. Disponible à l'adresse DOI: 10.4081/ijfs.2014.1696.

B

Bachir, R.G, Benali, M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Vol 2, (9), **2012**, pp : 739-74.

[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60220-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60220-2)

Benameur, Q, Gervasi, T, Pellizzeri, V, Pl'uchtová, M, Hassiba Tali-Maama, Farida Assaous, Badia Guettou, Kheira Rahal, Daniela Gruřová, Giacomo Dugo, Andreana Marino & Meriem-Hind Ben-Mahdi : Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against blaESBL producing multidrug resistant *Enterobacteriaceae* isolates. *Natural Product Research*, **2018**, Disponible à l'adresse DOI: 10.1080/14786419.2018.1466124 <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1466124>

Références Bibliographiques

Bencheikh, S. E. *Etude de l'activité des huiles essentielles de la plante Teucrium polium ssp Aurasianum Labiatae* [enligne]. Thèse : pour l'obtention d'un diplôme de doctorat. Ouargla : Université KASDI MERBAH – Ouargla, **2017**, 121 p. Disponible à l'adresse URI: <http://dspace.univ-ouargla.dz/jspui/handle/123456789/15534>.

Benkherara, S, Bordjiba, O, Djahra, A. B. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la *Sauge officinalis: Salvia officinalis L.* sur quelques entérobactéries pathogènes. *Revue Synthèse*, 72 (23), **2011**, pp72-80.

Bernard, T, Brav O, Delmas M, Gaset, A, Perinau F. *Extraction des huiles essentielles : Chimie et technologie*. Information chimie Paris : **1988**, Num 298, pp 179-184.

Billerbeck, V.G, Marquier, P, Roques, C, Vanière, P. *Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles*: publication scientifique revue Hygienes, **2002**, N°3.

Bloweyrw, Edmondson, P. *Mastitis control in dairy herds*. CABI, Wallingford, United Kingdom : **2010**, Seconde édition, 272 p.

Bondi D, Cianci P, Geraci C, Giuseppe R. *Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants*. FlavourFrag : **1993**, J. 8: 331-7.

Boulbina I, Driss W, Tazka H, Bouziane A.M. *Diagnostic bactériologique des mammites des vaches laitières dans quelques communes de la wilaya d'Alger (Baraki, Eucalyptus et OuledChebel)*, in Les maladies infectieuses des bovins. Ecole nationale supérieure vétérinaire d'El harrach – Alger : **2009**, 40 p.

Bourgou, R, Ksouri, R, Medini1, F, Serairi Beji, F. Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydants d'*Euphorbia helioscopia S. R.* *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, Volume 28(12). 28(12), 1649-1655 1649, **2016**.

Bruneton. J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Lavoisier : 4e éd, **2009**. 1292 p.

https://books.google.dz/books/about/Pharmacognosie_phytochimie_plantes_m%C3%A9dicinales.html?id=jDVXngEACAAJ&redir_esc=y

Références Bibliographiques

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int.J.Food Microbiol*, **2004**, 94, pp 223-253.

C

Carip, C. *Microbiologie Hygiène bases microbiologiques de la diététique*. Londres-Paris-NewYork : Edition Tec & doc et médicales internationales, **2011**, pp : 58, 59,69, 70, 79, 85,86, 103, 240, 241.

Cauty, I , Perreau, J.M. *La conduite du troupeau laitier*. Editions France Agricole, **2003**, 288 p.

Chakou, M, Bassou K. *Efficacité antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte Mentha Spicata Lisdue de la région de Ouargla sur quelques germes pathogènes : E.coli, Pseudomonas aeroginosa*. Université Kasdi Merbah de Ourgla. **2007**.

Chemloul, F. *Etude de l'activité antibactérienne de Lavandula officinalis de la région de Tlemcen*. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master en Agronomie. Tlemcen : Université Aboubaker Belkaid-Tlemcen, **2014**, 64 p.

Ceccherlli, P, Curini, M, Madruzzo, G, Marcotullio, M. Inhibition de la germination et de la croissance chez les semences de végétaux. Tortuoside, a new natural coumarin glucoside from *Seselitortuosum*. *Journal of Natural Products, Cirad*: **2003**, pp.53, 1990,536.

Cristiani, M, Castelli, F, D'arrigo, M, Mandalari, G, Micielil, D, Sarpietro, M.G. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* : **2007**, 55, 6300-6308.

Références Bibliographiques

D

Dahou.A.E.A. *Étude de l'évolution de la flore microbienne indigène d'un fromage industriel pâte molle type camembert au cours de son affinage et évaluation de ces aptitudes technologiques.* Thèse de doctorat, université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, **2017**, 139 p.

Delarras, C. *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.* Paris : Ed, Tec et Doc, **2007**, pp356-357.

Delaval. *La glande mammaire* [enligne], **2010**, consulté le 03/04/20. Disponible à l'adresse <http://www.delavalfrance.fr/fr-nl/-/Savoir-laitier/Traite/La-glande-mammaire/>.

Derwich, E, Benziane, Z, Boukir, A. GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Menthapulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. & Biol. Sci*, **2010**, 17 p. Determine Moisture. Doc, Lavoisier, **2010**, 12 p.

Di Stefano, V, Cicero, N, D'Oca, M.C, Pitonzo, R. Mycotoxin contamination of animal feeding stuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations. *Food Addit Contam Part A. Chem Anal Control Expo Risk Assess.* **2014**, 31(12):2034–2039.

Dob, T, Dahmane, D, Benabdelkader, T, Chelghoum, C. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. *Int. J. Aromather.* **2006**, 16, pp 95–100.

Dorman, H.J.D, Deans, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **2000**, 88 (2), pp 308-316.

Dorman, D.H.G, Bachmayer, O, Hiltunen, R, Kosar, M. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected *Lamiaceae* species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* : **2004**, 52, pp762-770.

Dugo, G, Franchina, F.A, Scandinaro, M.R, Bonaccorsi, I, Cicero, N, Tranchida, P.Q, Mondello, L. Elucidation of the volatile composition of *Marsala* wines by using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Food Chem* : **2010**, 142. pp262–268.

Références Bibliographiques

E

El Amri, J, Elbadaoui, K, Zair, T, Bouharb, H, Chakir, S, Alaoui, T. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum L* et l'extrait de *Silene vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*: **2014**, 82(1), pp 7481-7492.

El Bouzidi, L, AlaouiJamal, C, Bekkouche, K, Hassani, L, Wohlmuth, H., Leach, D, Abbad, A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated *Moroccan Thymus species*. *Ind. Crop. Prod.* **2013**, 43 pp 450– 456.

El Hattabi, L, El Madani, N, Charrouf, Z, Costa, J, Desjobert, J.M, Tabyaoui, M. Studies on chemical composition, phenolic contents and antioxidant activities of three *Thymus* essential oils from Morocco. *Der Pharma Chemica*.**2016**, 8(7), pp7–15.

El Ouali Lalami. A , El-Akhal. F , Ouedrhiri .W , Ouazzani C.F. Guemmouh R. Greche H. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain : *Thymus vulgaris* et *Thymus satureioïdis* *Les technologies de laboratoire* : **2013**, Volume 8, N°31.

Euzéby, J.P. *Abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*, **2008**.

F

Faroult, J. Staphylocoques et mammites bovines: importance des espèces différentes de *Staphylococcus aureus*, problèmes des échecs thérapeutiques G T V., 2B420, 7-12. Fisher K, Phillips C., 2009. *Br. J. Biomed. Sci.* **1998**, 66: 180-185.

G

Gabli, A. *Etude cinétique des cellules somatiques dans le lait des vaches atteintes de mammites et de vaches saines- Enseignements pour l'Algérie*, Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire : Université de Constantine, **2005**.

Références Bibliographiques

Gayda, A. *Etude des principales huiles essentielles utilisées en rhumatologie*. Thèse de doctorat : Université Toulouse III, Paul sabatier, **2013**, 60 p.

Guidah, A. *Étude phytochimique des métabolismes secondaires huiles essentielles, polyphénol) de la plante médicinale saharienne: Pituranthos chloranthuset l'évaluation de l'activité biologique.* Mémoire de master en biotechnologie végétales et métagénomique : UNIV. M'sila, **2013**.

Guinoiseau, E. *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action.* Sciences du Vivant [q-bio] : Université de Corse, **2010**.

Guiraid J.P. *La microbiologie alimentaire.* DUNOD. Paris : **2003**.

H

Haddouchi, F, Benmansour, A. Huiles essentielles, utilisation et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. *Les technologies de laboratoire* : **2008**, N°08, 8 p.

Haddouchi, F. Zerhouni, Kh, Sidi-Yekhelef, A, Chaouche, M. T. Evaluation of antimicrobial activity of different extracts of *Helichrysum stoechas subsp. Rupestre*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* : **2016**, Vol. 85, pp152 – 159.

Hanzen, C. *La pathologie infectieuse de la glande mammaire, étiopathogénie et traitements, approche individuelle et de troupeau.* Université de Liège : **2009**, 63 p.

I

IDE (Institut de l'élevage). *Maladies des bovins.* **2008**, Manuel pratique. Éditions France Agricole, 4^{ème} édition. ISBN 13 : 978-2-85557-149-2.

Ibert H. (ed.), Hoxha V. (ed.), Sahi L. (ed.), Courivaud A. (ed.), Chailan C. (ed.). *La dynamique des plantes aromatiques et médicinales en Algérie* [Troisième partie]. Le marché des plantes aromatiques et médicinales : analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie. Montpellier : CIHEAM / France AgriMer, **2016**, pp 101-140 (OptionsMéditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 73) disponible en ligne à l'adresse : <http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=00007156>

Références Bibliographiques

ISO (International Standard Organizatio). Aromatic natural raw materials - Vocabulary. ISO 9235:2013. Published 2014-09-10

Institut Pasteur. *Biology of Gram Positive Pathogens*, Department of Microbiology, Paris, France : 2012.

K

Karray-Bouraoui, N, Rabhi, M, Neffati, M, Baldan, B, Ranieri, A, Marzouk, B, Lachaâl, M, Smaoui, A. *Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichomemorphology and density on leaves of Menthapulegium. Industrial Crops and Products* :2009, 30, pp338–343.

Kalemba, D, Kunicka,A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Med Chem* : 2003, 10(10): 813-29.

Khaldi, A. *Etude des effets antifongiques et antimycotoxiques des extraits des plantes médicinales de la région de Béchar.* Thèse : pour l’obtention d’un diplôme de doctorat en Biotechnologie en Santé. Mascara : Université Mustapha Stambouli de Mascara, 2017.

Khan, I.A, E. A. *Used in Food, Drugs, And Cosmetics Wiley* : 2010, éd. 3^{ème}.

Kuroda M, Ohta, T, Uchiyama, I. *Whole genome sequencing of meticillin- resistant Staphylococcus aureus.* *Lancet* : 2001, 357: 1225-1240.

L

Lahlou, M. *Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils.* *Phytotherapy research*, 2004, 18(6), pp435-448.

Lambert, T. *Acinetobacter.* In : Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R. *Bactériologie médicale: Techniques usuelles.* Ed Elsevier Masson. Paris : 2007, pp344-346.

Le loir, Y, Gautier, M. *Staphylococcus aureus.* Ed, TEC et DOC, Lavoisier, 2010, 199 p.

Loziene, K, Venskutonis, P.R, Sipailiene, A, Labokas, J. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides L. chemotypes.* *Food Chemistry* : 2007, Vol. 103; pp 546-559.

Références Bibliographiques

M

Mancini, E, Senatore, F, Del Mont, D, De Martino, L, Grulova, D, Scognamiglio, M, Snoussi, M, De Feo, V. Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Five *Thymus vulgaris L.* *Essent Oils Mol.* **2015**, 20:12016–12028.

Mebarki, N. *Extraction de l'huile essentielle de Thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne.* Thèse de magistère de chimie, Boumerdes : Université –M'Hamed Bougara-Boumerdes, **2010**, 124 p.

Medefouni, Bendib. *Bactériologie sur lait en clientèle,* Le point vétérinaire, **2006**, n° 255 : pp 52-53.

N

Naghibi, F, Mosaddegh, M, Mohammadi, M.S, Ghorbani, A. *Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology.* *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **2005**, Vol 2: p63-79.

Nemet, Skrinjar, M. M. *Caractérisation et variabilité des plantes a parfume aromatiques et médicinales de corse et de l'ouest algériens.* Apteff, 40, **2009**, 220 p.

Naghdi, B.H, Yazdani D, Mohammad Ali, S, Nazari, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris L-Industrial Crops and Products* : **2004**, Vol. 19; pp 231-236.

O

Olivier, G. *Caractéristique et mode d'action des antibiotiques.***2007.**

Oussou, K. R, Kanko, C, Guessend, N, Yolou, S, Dosso, M, N'Guessan, Y. T, Koukoua, G. *Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes.* **2004.**

Références Bibliographiques

P

Ponce, A, Fritz, R, Del Valle, C, Roura, S. *Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. LWT-Food science and technology*, **2003**, 36(7), pp679-684.

Preedy VR. 2016. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, ISBN 9780124166417. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.18001-0>.

Prescott L, Harley J, Klein D. *Microbiologie*. De Boeck : **2010**, 3ème Ed, pp 520-582.

Q

Quezel, P et Santa, S. *Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Paris : CNRS, Tome 1 et 2, **1963**, p1170.

R

Rechidi-Sidhoum.N., Niar .A., Nemmiche.S et Homrani .A. *Serological diagnosis of brucellosis at the ruminants in Mostaganem (Algeria)*. *Int.J.of Biosciences*. **2018**, Vol. 12, No. 5, p. 271-278.

Accessible on line : <https://www.innspub.net/wp-content/uploads/2018/06/IJB-Vol-12-No-5-p-271-278.pdf>

Rechidi-Sidhoum.N. *Enquête épidémiologique de la brucellose animal et humaines cas de la Wilaya de Mostaganem*. Thèse de doctorat, université Abdelhamid IBN BADIS de Mostaganem, **2019**, 175 p.

Rémy, D. *Les mammites*. France Agricole Éditions, Paris, France : **2010**, 259 p.

Risco, C, Melendez ,P. *Dairy Production Medicine*. John Wiley et Sons, Chichester, United Kingdom. **2011**, 791 p.

Roux, D. *Conseil en aromathérapie*.W. Kluwer, Éd. France : **2008**.

Références Bibliographiques

S

Saidj, F. *Extraction de l'huile essentielle de thym: Thymus numidicus kabylica*. Thèse de magistère en Technologie des hydrocarbures, Département génie des procédés chimiques et pharmaceutiques. Boumerdes : université M'Hamed Bougara – Boumerdes, **2006**.

Scott, P.R, Penny C.D, Macrae, A. *Cattle medicine..* Manson Publishing, **2011**.

Schaeren, W. *Eviter les mammites chez la vache laitière* : Fiche technique destinée à la pratique, ALP actuel : **2006**, n°21, Agroscope, p4.

Schwartz R., Davis R & Hilton T.J. *Effect of temporary cements on the bond strength of resin cement*. Am. J. Dent : **1992**, 5(3) : pp147-150.

Šegvić Klarić, M, Kosalec, I, Mastelić, J, Piecková, E, Pepeljnak, S. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters appl Microbial* : **2007**, 44(1): pp36–42.

Shin, S, Kim, J.H. *In vitro* inhibitory activities of essential oils from two Korean *Thymus species* against antibiotic-resistant pathogens. *Arch. Pharm. Res* : **2005**, 28: pp897-901.

Smith, B.P. *Mammary gland health and disorders*. Large animal internal medicine, fourth edition: **2008**, 1112-1119.

Sonwa, M.M.,. *Isolation and Structure Elucidation of Essential Oil Constituents. Comparative Study of the Oils of Cyperus alopecuroides, Cyperus papyrus, and Cyperus rotundus*. Ph.D. degree, University of Hamburg, German. **2000**, 172 p.

<https://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2000/372/pdf/diss.pdf>

Sthal-Biskup, E, Saez, F. Thyme: the genus *Thymus*. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles. *J Essent Oil Res* : **2002**, 330, 415-848.

Suffredini, J. B, Sader, H. S, Goncalves, A. G, Reis, A. O, Gales, A. C, Varella, A. D. Screening of antimicrobial extracts from plants native to the Brazilian Amazon rainforest and Atlantic forest. *Brazil. J.Med. Biol. Res* : **2004**, 37, pp379-384.

Références Bibliographiques

Sutra, L, Federighi, M, Jouve, J.L. . *Manuel de bactériologie alimentaire*. Ed. Polytechnica Paris : **1998**, p308. London, Unitet Kingdom. 289 p.

T

Teuscher, Anton, R, Lobstein, A. *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Paris, Lavoisier : **2005**, 522 p.

Tuttolomondo, T, Giacomo, D, Giuseppe, R, Leto, C, Napoli ,E.M, Cicero, N, Gervasi, T, Giuseppe, V, Leone, R, Licata, M, La Bella, S. Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of *Sicilian Rosmarinus officinalis L.* *Nat Prod Res* : **2015**, 29, 20:1928–1934.

V

Valnet, J. *Aromathérapie. Alteration of saccharomyces cerevisiae*. Ed. Maloine S.A. Phytother. Res : **2000**, 19(5), 405-8.

Van de Leemput, E. *Analyse bactériologique du lait*. Conférence organisée par le laboratoire Pfizer pour les vétérinaires en exercice, Nantes, Mai **2007**.

W

Wallemacq, H., Girard, B., Lekeux, P., Bureau, F. La vaccination contre les mammites à *Staphylococcus aureus* chez la vache laitière. *Ann. Méd, Vét* : **2010**, 154, pp16-29.

Wenqiang , G, Yan, R, Tang, S, Quan, C. Comparaison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction méthodes. *Food Chemistry* : **2007**, 101, 1558-1564.

Werckenthin C, Cardoso M, Schwarz S. Antimicrobial resistance in *staphylococci* from animals with particula rreference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus*. *IntermediusVeterinary Research*. **2001**, 32: 341-362.

Wikipedia. *Thymus Vulgaris*. **2020**. https://fr.wikipedia.org/wiki/Thymus_vulgaris.

Références Bibliographiques

Z

Zayyad, N, Farah, A, Bahhou, J. Analyse chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des trois espèces de Thymus : *Thymus zygis*, *T. algeriensis* et *T. bleicherianus*-*Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* : **2014**, Vol. 83, 2014, pp118 – 132.

Zhang, Y, Liu, X, Wang, Y, Jiang, P, Quek, S. Antibacterial activity and mechanism of *cinnamon essential oil* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* .*Food Control*, doi: 10.1016/j.foodcont.**2015.05.032**.

Zheng, Z.L, Tan Justin, Y.W, Liu, H.Y, Zhou, X.H, Xiang, X, Wang, K.Y. *Aquaculture*. **2009**, 292 : pp214–218.

Zhiri, A. *Les huiles essentielles, Un pouvoir antimicrobien avéré. Art., Nutra News.* Références.**2006**.

Table des matières

Table des matières

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Sommaire	
Liste des abréviations, sigles, acronymes et symboles	
Liste des figures	
Liste des annexes	
Liste des abréviations	
Introduction	11
Première partie : Revue de littérature	
Chapitre I. Mamelle et infection intra-mammaire	
I. Généralité sur la mamelle.....	15
1. Anatomie	15
1.1. Organisation.....	15
1.2. Parenchyme mammaire	16
1.3. Citerne	16
1.4. Trayon.....	17
2. Défense	18
2.1. Défense basse.....	18
2.2. Défense haute.....	18
II. Mammites	19
1. Définition.....	19
1.1. Mammite clinique	19
1.2. Mammite subclinique	20
2. Etiologie	20
2.1. Pathogènes majeurs	20
2.2. Pathogènes mineurs.....	21
2.3. Réservoirs des différents germes	23
3. Pathogénie	23
3.1. Pénétration d'agents pathogènes dans la mamelle.....	23
3.2. Installation d'une infection.....	24
3.3. Devenir de l'infection	24

Table des matières

4. Traitement.....	25
5. Incidence des mammites sur la qualité du lait	25
III. Mammites à <i>Staphylococcus aureus</i>	26
1. Caractérisation de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
1.1. Généralités	26
1.2. Historique	27
1.3. Habitat	27
1.4. Classification.....	27
1.5. Caractères morphologiques	27
1.6. Caractères cultureux	28
1.7. Caractères structuraux.....	28
1.8. Caractères biochimiques.....	29
1.9. Pouvoir pathogène.....	29
1.10. Résistance aux antibiotiques	29

Chapitre II. Huiles essentielles et activité antimicrobienne

I. Plantes médicinales.....	31
1. Définition.....	31
2. Importance	31
II. Huiles essentielles	32
1. Définition.....	32
2. Classification	32
3. Localisation et lieu de biosynthèse	32
4. Propriétés physico-chimiques.....	33
5. Rôle physiologique.....	33
6. Rôle écologique	34
7. Composition chimique d'huile essentielle du <i>thymus vulgaris</i>	34
8. Facteurs influençant la composition chimique	34
8.1. Facteurs intrinsèques	34
8.2. Facteurs extrinsèques	34
9. Procédés d'extraction	35
9.1. Extraction par pression à froid.....	35
9.2. Extraction par hydro distillation	35
9.3. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	35

Table des matières

9.4. Extraction par les solvants organiques	36
10. Conservation	36
11. Domaines d'utilisation	36
11.1. Phytothérapie	36
11.2. Parfumerie et cosmétologie	36
11.3. Applications en industrie alimentaire	36
12. Activités biologiques	37
12.1. Activité antioxydante.....	37
12.2. Activité antifongique	37
12.3. Activité antibactérienne	37
12.3.1. Mode d'action des huiles essentielles.....	38
13. Facteurs influençant l'activité antibactérienne	39
13.1. Activité liée à la composition chimique	39
13.2. Activité liée au microorganisme	40
III. Huile essentielle de thym.....	41
1. Définition du thym	41
2. Répartition géographique	41
2.1. Dans le monde.....	41
2.2. En Algérie.....	42
3. Caractéristiques botaniques	42
4. Classification taxonomique	42
5. Description morphologique	42
6. Composition chimique	43
7. Définition d'Huile essentielle du thym	44
8. Toxicité de l'huile essentielle de thym.....	44
9. Domaine d'application de l'huile essentielle de thym	44
9.1 Cosmétologie et industrie alimentaires	44
10. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	45
10.1. Méthode de diffusion en milieu solide (Aromatogramme)	45
10.2. Méthode de dilution.....	45

Table des matières

Deuxième partie : Recherche Expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

1. Objectif	48
2. Matériel et produits	48
2.1. Matériel.....	48
2.2. Milieux sélectifs	48
2.3. Huile essentielle de thym.....	48
3. Méthodes	49
3.1. Prélèvement	49
3.1.1. Mode opératoire	49
4. Recherche des <i>Staphylococcus aureus</i>	50
4.1. Isolement et ensemencement sur milieu Chapman	50
4.1.1. Mode opératoire	50
5. Examen macroscopique.....	50
6. Examen microscopique	50
6.1. Coloration de Gram	51
6.1.1. Préparation d'un frottis	51
6.1.2. Coloration de Gram	51
7. Test de purification	51
7.1. Purification sur milieu de Chapman.....	51
8. Recherche de la catalase.....	51
8.1. Mode opératoire	51
9. Recherche d'hémolyse par gélose au sang	52
9.1. Mode opératoire	52
10. Recherche de la coagulase (Test au plasma de lapin)	52
10.1. Mode opératoire	52
11. Conservation des souches	53
11.1. Préparations du milieu	53
11.2. Conservations.....	53
12. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du thym.....	55
12.1. Préparation d'une pré-culture	55
12.2. Préparation de la suspension bactérienne	55
12.3. Méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme)	55

Table des matières

12.4. Concentration minimale inhibitrice (CMI).....	57
12.5. Concentration minimale inhibitrice (CMB).....	57
Chapitre II : Résultats et discussion	
I. Résultats	59
1. Résultats de la Recherche des <i>Staphylococcus aureus</i>	59
1.1. Résultats de l'isolement et de l'ensemencement sur milieu Chapman	59
1.2. Résultats de l'examen macroscopique	59
1.3. Résultats de l'examen microscopique	59
1.4. Résultats de la recherche de la Catalase	60
1.5. Résultats de Recherche d'hémolyse par gélose au sang ⁵	61
1.6. Résultats de Recherche de la coagulase (Test au plasma de lapin)	61
2. Résultats d'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du thym.....	62
2.1. Résultats de la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme)	62
2.2. Résultats de la Concentration minimale inhibitrice (CMI)	62
2.3. Résultats de la Concentration minimale inhibitrice (CMB)	62
II. Discussions.....	63
Conclusion.....	66
Annexes.....	68
Références Bibliographiques.....	72
Table des matières.....	85