

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M. ENGANDJIS OTHAS Aurel Gaumez

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

THÈME

**Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de
Thymus vulgaris de Nedroma (Algérie) sur les bactéries
responsables des infections post-opératoires au centre Hospitalier
Régionale Amissa Bongo de Franceville**

Soutenu publiquement le 28 Juin 2017

DEVANT LE JURY

Président	M. BOUZNAD Ahcene	MCB	Université de Mostaganem
Encadreur	M. BAHRI Fouad	Professeur	Université de Mostaganem
Examineur	M. BEN ALI Sid'Ahmed	MAA	Université de Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire du Centre International de Recherches Médicales de Franceville
(CIRMF-Gabon)*

Dédicaces

Je dédie tout d'abord ce travail :

À mon Dieu tout puissant qui sans lui je ne serais arrivé jusqu'ici

À ma très chère et tendre maman YVONNE qui m'a donné la vie et qui me soutient de toutes ses forces dans mes études. Merci maman pour tout, que Dieu te bénisse. Je t'aime maman,

À ma petite sœur chérie, EUNICE CHRISTAEELLE (princesse) qui est l'amour de ma vie, et la source de ma motivation,

À mon grand frère Crépin, mon petit frère Gédéon et mon cousin Ravick pour leur soutien de de toujours croire en moi

Aussi à mon grand Edo BIKOUATI Fleur, qui m'a formé, m'a supporté et m'a aidé à devenir un élève et étudiant exemplaire. Pour son soutien et son suivis dans toutes mes études. A toute sa famille pour son amour et son attention envers moi.

À mon très cher amis, collègue, compagnon de route et frère MAMBONDO MBOUMBA Teddy Paoly pour son soutien et ses encouragements et un bon exemple à suivre.

À ma grande famille de l'église primitive ainsi qu'au pasteur Job et sa femme, pour leurs amour, soutien et encouragement.

Dédicaces

À tous mes compatriotes étudiants en Algérie, particulièrement à ma promotion, Fred, Martine, Christie, Yorick, Aldy, Davy Baudry, Glenn et William.

À toute la communauté chrétienne de Mostaganem, particulièrement aux frères Maristes et particulièrement au frère Bernard REGIS.

A tous mes amis de près ou de loin de Mostaganem (Algérie) qui m'ont soutenu tout au long de mes études et plus particulièrement à Atteste et Roseman.

A Pélagie TENKODOGO pour avoir toujours été là pour me soutenir et m'encourager dans toutes situations.

À Toute ma promotion Master 2 de Microbiologie Fondamentale et Appliquée (MFA) 2016-2017, que Dieu les accompagne tout au long de leurs études.

ENGANDJIS OTHAS Aurel Gaumez

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à mon Dieu, sans qui je n'aurai pas la vie et sans qui je ne serais là aujourd'hui. Aussi pour la force, la persévérance, le courage et l'intelligence qu'il m'a donné pour effectuer ce travail.

J'adresse ma profonde reconnaissance à ma famille qui m'a soutenue du mieux qu'elle pouvait dans la réalisation de mon mémoire.

Je remercie l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de prendre le temps de participer à l'examen de mon travail de mémoire et plus particulièrement M. BOUZNAD et M. BENALI pour leur qualité d'enseignement exemplaire.

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma gratitude particulière à mon encadreur le Pr. BAHRI Fouad de l'université de Mostaganem et mon co-encadreur le Dr ONANGA Richard du Centre International de Recherche Médicale de Franceville (CIRMF), qui ont bien voulu m'accepter et diriger ce travail en me faisant profiter de leur savoir et leur expérience, qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde reconnaissance, pour tous leur efforts, conseils et encouragements.

Mes remerciements vont également à l'endroit de tout le personnel du département de Biologie de l'université de Mostaganem, particulièrement à M.

MEDJAED, chef du dit département, et à tous mes enseignants qui ont su me transmettre les connaissances nécessaires afin d'assurer ma formation tout au long de mon cursus universitaire. Particulièrement à Mme DALACHE, M. NABBECHE, M. et Mme CHERIGANE, M et Mme AIT SAADA, M. CHADLI, M. YAHLA, M. MEKHALDI et M. ALILI du département d'Agronomie pour leur disponibilité et leurs précieux conseils.

Je remercie aussi l'ensemble du personnel du CIRMF pour leur disponibilité tout au long de mon travail pratique et plus particulièrement à Arsène MABIKA-MABIKA, au Dr Nadine, au Dr Larson et au Dr Phillip MBEHANG pour leur conseils et soutient tout au long de la réalisation de mon mémoire.

Résumé

Actuellement, on assiste à un problème de santé publique à l'échelle mondiale. Il s'agit, entre autres, de l'apparition depuis bien longtemps, de souches bactériennes résistantes impliquées dans certaines infections post-opératoires.

Ce présent travail se veut une contribution à tester l'effet des antibiotiques utilisés dans les hôpitaux et valoriser l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* de la région de Nedroma Wilaya de Tlemcen (Algérie) sur les germes responsables des infections post-opératoires.

Les échantillons récoltés à partir de Pus et de Comresse sur les plaies nous montrent une forte prévalence de bactéries à gram positif telles que *Staphylococcus aureus* issues de prélèvements de pus et des Entérobactéries comme *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*.

Les tests d'antibiogramme effectués ont montré un taux de résistance très élevé de l'ordre de 8 antibiotiques sur 16 testés, chez des souches telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* avec des diamètres nul pour plusieurs souches de *S. aureus*.

L'activité antibactérienne mise en évidence par la méthode d'antibio-aromatogramme, a montré que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* de la région de Nedroma Wilaya de Tlemcen (Algérie), présentait un effet inhibiteur important sur certaines souches bactériennes ayant des profils de résistance dit Faible (*Proteus mirabilis*, *E coli ATCC25922*) ; Moyen (*Citrobacter freundii*, *Shigella group*) et Fort (*Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*), avec des diamètres des zones d'inhibition assez significatifs.

Cette étude nous a permis de valoriser le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* de la région de Nedroma Wilaya de Tlemcen (Algérie). Aussi lors de notre étude, nous avons observé une diminution du diamètre d'inhibition proportionnelle au gradient de résistance des bactéries.

Mots clés : *Thymus vulgaris*, Huile essentielle, activité antibactérienne.

Abstract

Currently, there is a global public health problem. These include the long-standing appearance of resistant bacterial strains involved in some post-operative infections.

This work is intended as a contribution to test the effect of antibiotics used in hospitals and to enhance the essential oil of *Thymus vulgaris* from the Nedroma Wilaya region of Tlemcen (Algeria) on the germs responsible for post-operative infections.

Samples collected from Pus and Compress on wounds show a high prevalence of Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* from pus specimens and Enterobacteriaceae such as *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*.

The antibiotic tests carried out showed a very high resistance rate of about 8 out of 16 antibiotics tested in strains such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* with zero diameters for several strains Of *S. aureus*.

The antibacterial activity demonstrated by the antibio-aromatogram method, showed that the essential oil of *Thymus vulgaris* from the Nedroma Wilaya region of Tlemcen (Algeria) showed a significant inhibitory effect on certain bacterial strains with profiles of weak resistance (*Proteus mirabilis*, *E. coli* ATCC25922). Medium (*Citrobacter freundii*, *Shigella group*) and Fort (*Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*) with diameters of significant inhibition zones.

This study allowed us to evaluate the antibacterial power of the essential oil of *Thymus vulgaris* in the Nedroma Wilaya region of Tlemcen (Algeria). Therefore, in our study, we observed a decrease in the inhibition diameter proportional to the resistance gradient of the bacteria.

Key words: *Thymus vulgaris*, Essential oil, antibacterial activity.

ملخص

حاليا، هناك مشكلة صحية عامة في جميع أنحاء العالم. وهذا هو، من بين أمور أخرى، وظهور لفترة طويلة، من سلالات بكتيرية مقاومة تشارك في بعض الالتهابات بعد العملية.

العمل الحالي هو مساهمة لاختبار تأثير المضادات الحيوية المستخدمة في المستشفيات وتعزيز من الضروري النفط من الغدة الصعترية الشائع ندرومة لولاية منطقة تلمسان (الجزائر) على الجراثيم المسؤولة عن الالتهابات بعد العملية الجراحية.

العينات التي تم جمعها من القيح وضغط على الجروح تظهر ارتفاع معدل انتشار البكتيريا إيجابية الجرام مثل المكورات العنقودية الذهبية من عينات من القيح والمعوية مثل الإشريكية القولونية، الكلبسيلا الرئوية الالتهاب الرئوي. SSP

وأظهرت اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية معدل مقاومة عالية من حوالي 8 إلى 16 من المضادات الحيوية اختبارها في سلالات مثل الزانفة الزنجارية، كولاي، الكلبسيلا الرئوية SSP الرئوية، المكورات العنقودية الذهبية مع عدم وجود أقطار عدة سلالات S. الذهبية.

النشاط المضاد للبكتيريا كما يتضح من طريقة المضادات الحيوية *aromatogramme* ، أظهرت أن من الضروري النفط من الغدة الصعترية الشائع منطقة ندرومة ولاية تلمسان (الجزائر) كان له تأثير كابح بشكل كبير على بعض السلالات البكتيرية مع التشكيلات وقال مقاومة ضعيفة (المتقلبة الرائعة، E القولونية ATCC25922 ؛ المتوسطة (الليمونية الفرويندية، مجموعة الشغيلة) وحصن (المكورات العنقودية الذهبية والكلبسيلا الرئوية SSP الرئوية) بأقطار مناطق كبيرة جدا من كبت.

وقد سمحت هذه الدراسة لنا لتعزيز الزيت العطري مضاد للجراثيم السلطة الشائع الغدة الصعترية في منطقة ندرومة ولاية تلمسان (الجزائر). أيضا في دراستنا، لاحظنا انخفاضا في قطر تنبيب تعتمد التدرج المقاومة البكتيرية.

كلمات البحث: الغدة الصعترية الشائع من الضروري النفط، والنشاط المضاد للبكتيريا.

Liste des abréviations

%	: Pourcent
°C	: Degré celsius
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AMC	: Amoxicillin-clavulanate
ATB	: Antibiotique
CEF	: Cephalothin
CEP	: Cefoperazone
CHL	: Chloramphenicol
CHRAB	: Centre Hospitalier Régionale Amissa Bongo
CIRMF	: Centre International de Recherche Medicale de Franceville
CLSI	: Clinical & Laboratory Standards Institute
CO2 SC	: Dioxyde de carbone super critique
CST	: Colistin
CTT	: Cefotetan
CZN	: Cefazolin
EO	: Essential oil
ERT	: Ertapenem
FTN	: Nitrofurantoin
GN	: Gram négatif
GP	: Gram positif
GS	: Gélose au sang
h	: Heure
IMP	: Imipenem
McF	: Mac Farland
MH	: Muelleur Hinton
ml	: Millilitre
mm	: Millimètre
NaCl	: Chlorure de sodium
OFX	: Ofloxacin
Pc	: Pression critique
PIR	: Piperacillin

Liste des abréviations

SMN	: Streptomycin
SXT	: Trimethoprim+ Sulfamethoxazole
Tc	: Température critique
TMN	: Tobramycin
TS	: Trypticase soja
TZP	: Piperacillin+ Tazobactam
UFC	: Unité formant colonie
USI	: Unités de soins intensifs
VIH	: Virus de l'immunodéficience Humaine

Liste des figures

Figure n°1 : Organe sécréteur d'huile essentielle.....	4
Figure n°2 : L'aspect morphologique de <i>Thymus vulgaris</i>	7
Figure n°3 : composition chimique majeur de <i>Thymus vulgaris</i>	10
Figure n°4 : Schéma illustrant l'entraînement à la vapeur d'eau.....	13
Figure n°5 : Schéma du principe de la technique d'hydro-distillation	14
Figure n°6 : Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO ₂ supercritique	16
Figure n°7 : Principe schématisé du système d'extraction par micro-onde sans solvant	17
Figure n°8 : Action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne.....	19
Figure n°9 : Structure des parois chez les bactéries Gram (-) et Gram (+).....	20
Figure n°10 : Différents niveaux d'infection	24
Figure n°11 : Plaies d'infections post-chirurgicales	26
Figure n°12 : Les mécanismes d'acquisition de la résistance bactérienne	28
Figure n°13 : Centre Hospitalier Régional Amissa Bongo.....	31
Figure n°14 : Tube pour Compresse	32
Figure n°15 : Tube pour pus	32
Figure n°16 : Itinéraire du transport des échantillons	33
Figure n°17 : Centre International de Recherche Médical de Franceville.....	34
Figure n°18 : Ensemencement des échantillons sur milieu Gélose au sang	35
Figure n°19 : Ensemencement des bactéries sur milieu Trypticase soja (TS).....	36
Figure n°20 : Produits de la coloration de Gram	37
Figure n°21 : DensiChek® (Biomérieux, France)	40
Figure n°22 : Cassette VITEK®2 compact15.....	40
Figure n°23 : Chargement des cassettes dans l'air de chargement du VITEK® compact 15	41
Figure n°24 : Ensemencement sur Gélose Mueller-hinton.....	43
Figure n°25 : Dépôt de disques sur boites carrées	44
Figure n°26 : Dépôt de disque sur boîte ronde	44
Figure n°27 : Dépôt de disque et d'huile de la technique de l'antibio-aromatogramme	47

Liste des figures

Figure n°28 : Aspects macroscopique de quelques colonies isolées sur gélose au sang	48
Figure n°29 : Profil de résistance des bactéries Gram (-)	51
Figure n°30 : Profil de résistance des bactéries Gram (+)	51
Figure n°31 : Diamètre d'inhibition de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>E. coli</i>	57
Figure n°32 : Diamètre d'inhibition de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>P. aeruginosa</i>	57
Figure n°33 : Diamètre d'inhibition de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>S. aureus</i>	58
Figure n°34 : Diamètre d'inhibition de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>P. stuartii</i>	58
Figure n°35 : Diamètre d'inhibition de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>C. freundii</i>	58
Figure n°36 : Diamètre d'inhibition de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>Shigella</i>	58
Figure n°37 : Diamètre d'inhibition de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>P. aeruginosa (11)</i>	59
Figure n°38 : Diamètre d'inhibition de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>K. pneumoniae ssp pneumoniae (22)</i>	59
Figure n°39 : Diamètre d'inhibition de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>E. coli ATCC25922</i>	60
Figure n°40 : Diamètre d'inhibition de <i>Thymus vulgaris</i> sur <i>Proteus mirabilis</i>	60

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i>	8
Tableau n°2 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> d'Algérie...	11
Tableau n°3 : Types de fiabilités d'identifications réalisées par VITEK® 2 compact 15.....	39
Tableau n°4 : Antibiotiques spécifiques aux bactéries Gram (-)	42
Tableau N°5 : Antibiotiques spécifiques aux Gram (+)	42
Tableau n°5 : Tableau général des prélèvements	49
Tableau n° 6 : Prévalence des germes obtenus par VITEK® 2 compact 15 entre les compresses et les pus.....	50
Tableau n°7 : Profil global de résistance des bactéries Gram (+) et Gram (-).....	52
Tableau n°8 : Profil phénotypique des bactéries Gram+ et Gram- aux antibiotiques	53
Tableau n°9 : Normes de phénotypes par rapport aux huiles essentielles.....	55
Tableau N°10 : Résultats du test de l'activité antibactérien de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> exprimés par des diamètres d'inhibition en mm	56

Table des Matières

Sommaire

Table des matières

INTRODUCTION.....	3
-------------------	---

Partie bibliographique

Chapitre I

Généralité sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles	5
I.1- Historique.....	5
I.2- Définition	5
I.3- Localisation et lieu de synthèse	6
I.4- Propriété physico-chimiques.....	7
II- Famille des Lamiacées (<i>lameaceae</i>).....	7
I.5.1- Présentation de <i>Thymus vulgaris</i>	8
I.5.2- Description morphologique et botaniques	8
I.5.3- Taxonomie	9
I.5.4- Habitat.....	10
I.5.5- Répartition géographique de la plante	11
I.5.5.1- Dans le monde.....	11
I.5.5.2- En Algérie	11
I.5.6- Composition chimique de la plante.....	11
I.5.7- Usage et domaines d'application de <i>Thymus vulgaris</i>	14
I.5.8- Méthodes d'extraction des huiles essentielles	14
I.5.8.1- L'entraînement à la vapeur d'eau	15
I.5.8.2- Enfleurage	17
I.5.8.3- Extraction par des solvants volatils.....	17
I.5.8.4- Extraction au CO ₂ supercritique.....	17
I.5.8.5- Extraction par micro-onde.....	18
I.5.9- Activité biologiques de <i>thymus vulgaris</i>	20
I.5.9.1- Activité antibactérienne et mode d'action.....	20
I.5.9.2- Activité antifongique et mode d'action	23
I.5.10- Toxicité des huiles essentielles	24

Sommaire

Chapitre II

Généralité sur les infections chirurgicales

II.1- Les infections post chirurgicales	25
II.1.1- Introduction	25
II.1.2- Définition.....	25
II.2- Principales causes d'infection post chirurgicales.....	27
II.3- Diagnostique.....	28
Signes cliniques	28
II.4- Traitement d'infections post chirurgicales	29
II.5- Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques.....	29
L'inaccessibilité des antibiotiques à leur cible.	30
La modification de la cible par l'antibiotique.....	31
L'inactivation de l'antibiotique par une enzyme.	31

Partie expérimentale

Chapitre III

Matériel et méthodes

III.1- Matériel végétal (<i>Thymus vulgaris</i>)	33
III.2- Matériel biologique.....	33
III.2.1- Présentation du Centre Hospitalier Régional Amissa Bongo	33
III.2.2- Patients et prélèvements (échantillonnage).....	34
III.2.3- Transport et conservation des échantillons	35
III.2.4- Préparation des milieux de culture	36
III.2.5- Ensemencement.....	37
III.2.6- Isolement et purification des colonies bactériennes	37
III.2.7- Identification des isolats bactériens purifiés	38
III.2.7.1- Identification phénotypique (Coloration de Gram)	38
III.2.7.2- Identification biochimique des isolats par VITEK®2 compact 15	39

Sommaire

III.2.8- Test de sensibilité des souches aux antibiotiques.....	43
III.2.8.1- Préparation du milieu Mueller-Hinton (MH)	44
III.2.8.2- Préparation de l'inoculum.....	44
III.2.8.3- Dépôt des disques de diffusion d'antibiotique	45
III.2.8.4- Lecture et interprétation.....	46
III.3- Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	47
III.3.1- Les souches microbiennes testées	47
III.3.2- Milieu de culture	47
III.3.3- Préparation de l'inoculum	48
III.4- Technique de l'aromatogramme (méthode de Vincent)	48

Chapitre IV

Résultats et discussion

IV.1- Echantillons récoltés	50
IV.2- Prévalence des germes identifiés par rapport au type de d'échantillon.....	52
IV.2- Profil des bactéries résistantes aux antibiotiques choisis.....	53
IV.3- Profil phénotypique des bactéries aux antibiotiques testés.....	55
IV.4- Etude du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	57
IV.4.1- L'antibio-aromatogramme	58
Conclusion et perspectives	63
Références bibliographiques	66
Annexes	71

Introduction

INTRODUCTION

Depuis la découverte des antibiotiques avec comme chef de file la pénicilline, ces molécules ont toujours fait preuve d'efficacité comme une solution miracle en thérapeutique anti-infectieuse (Touré et al., 2004).

Cependant, on note ces dernières années que l'effet des antibiotiques sur les bactéries tend de plus en plus à diminuer au fil du temps. La résistance bactérienne aux antibiotiques (ATB) est en perpétuelle évolution. Cette résistance bactérienne est la résultante d'interactions complexes entre la bactérie d'une part et son environnement d'autre part. Elle est liée essentiellement à un usage excessif des antibiotiques aussi bien en médecine humaine, que la médecine vétérinaire et bien d'autres (ENNIGROU et al., 2000).

La résistance croissante des bactéries aux antibiotiques devient une préoccupation de plus en plus grande dans les établissements de soins de santé ainsi que dans la communauté en général. Dans certains cas, les bactéries peuvent pénétrer dans l'organisme par le biais de cathéters, de ventilateurs respiratoires, ou directement dans une plaie. L'entrée de ces micro-organismes peut conduire à une infections respiratoire, une infection des voies urinaires, du site opératoire ou à une septicémie. Ces types d'infections affectent majoritairement les personnes immunodéprimées et les personnes âgées, représentant généralement la clientèle des établissements de soins de santé (Hidron et al., 2008). La prévalence de ces mêmes infections a augmenté et représente environ de 70% des malades présents dans les unités de soins intensifs (USI) (Weinstein et al., 2005). Ainsi l'apparition de souches résistantes à plusieurs antibiotiques autrefois efficaces devient de plus en plus inquiétants et nécessite aujourd'hui que la recherche s'oriente vers d'autres alternatives plus performantes.

Toutefois, on assiste, ces dernières années, à un regain d'intérêt pour les plantes médicinales et aromatiques et pour leurs extraits (Sabu and Kuttan, 2002). En effet, de nombreuses études faites sur les plantes et particulièrement leurs huiles essentielles ont montré qu'elles avaient un grand pouvoir antibactérien. Le *thymus vulgaris* est une plante Nord-africaine qui a fait l'objet d'études montrant que son huile essentiel avait un grand potentiel antibactérien bien que son pouvoir inhibiteur et antibactérien à tout type de souches reste indéterminé.

De tout ce qui précède, nous avons voulu, à travers cette étude menée au Centre Hospitalier Régionale Amissa Bongo (CHRAB) de Franceville, apporter le maximum d'aide

INTRODUCTION

possible aux cliniciens du service de chirurgie, pour le diagnostic des infections en étudiant la sensibilité des germes à un lot d'antibiotique fréquemment utilisé, ainsi que tester l'efficacité de l'huile essentielle de *thymus vulgaris* aux souches résistantes. Cela servira de point de départ à d'autres études comparatives ultérieures afin d'avoir une vision globale des résistances dans cet hôpital. Et nous essayerons, à partir de la littérature et de nos résultats, de tirer des conclusions qui pourront être transformés en conduites à tenir par rapport à ce phénomène.

Le but de notre travail est d'atteindre deux objectifs principaux à savoir, premièrement établir une identification des principaux pathogènes causant des infections persistantes chez les patients admis aux services de chirurgie du CHRAB en établissant leur profil de résistance. Et dans un deuxième temps, nous évaluerons l'activité antibactérienne de notre huile essentielle.

Pour atteindre nos objectifs, notre travail a été divisé en deux grandes parties. La première partie concerne la bibliographie et sera divisée en trois chapitres : Le premier portera sur les généralités sur les huiles essentielles, le second présentera la plante *thymus vulgaris*, et le troisième chapitre parlera d'une manière générale des deux grand groupes de bactéries et leurs mécanismes de résistance. La deuxième partie, qui est la partie expérimentale sera répartie en deux chapitres, le chapitre IV où nous aborderons le matériel et les méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail et en fin le chapitre V qui nous permettra de présenter et de discuter les résultats obtenus lors de cette étude. Le manuscrit est achevé par une conclusion générale résumant l'ensemble de ces résultats et par des perspectives qui ouvriront d'autres pistes de travail que nous n'avions pas pu explorées au cours de notre expérimentation.

Partie Bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles

I.1- Historique

L'histoire des plantes aromatiques est souvent liée à celle de l'humanité. Déjà, depuis l'Égypte antique (environ quatre mille cinq cents ans avant Jésus Christ), l'homme utilise largement les huiles balsamiques, les onguents parfumés, les résines aromatiques, les épices et les végétaux odoriférants en rites, en magie, en thérapeutique, en alimentation ainsi que dans les pratiques de la vie courante. La distillation des huiles essentielles commence en Orient, les premières bases de préparation des huiles essentielles ont été développées en Inde, en Perse et en Égypte (Ntezurubanza, 2000).

Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. René-Maurice GATTEFOSSE a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches (Besombes, 2008).

I.2- Définition

La norme AFNOR NF T 75-006 définit l'huile essentielle comme : «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale ; soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydro distillation». Les huiles essentielles ou simplement essences sont des produits aromatiques légers volatils ; généralement liquides à température ambiante et insolubles dans l'eau (Ntezurubanza, 2000). Elles se caractérisent par leur odeur, spécifique des plantes ou des organes végétaux dont elles proviennent et qui leur donnent une valeur économique comme matière première pour l'industrie des parfums et des cosmétiques. L'huile essentielle est un mélange de produits ou un produit obtenu à partir d'une matière d'origine végétale, soit par expression de l'épicarpe des citrus soit par distillation à sec (KOUDOU, 2009).

I.3- Localisation et lieu de synthèse

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour essayer d'expliquer l'origine des huiles essentielles dans la plante. Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal.

Elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles : Conifères, Rutaceae, Umbellifères, Myrtaceae, Lamiaceae, Annonaceae. Tous les organes peuvent en renfermer : les sommités fleuries (Lavandes, Menthes, Mélisse), les racines ou rhizomes (Vétiver, Gingembre), les écorces (Cannelles), les fleurs (Ylang-ylang), le bois (Camphrier), les fruits (Persil, Citrus), les grains (Poivre). A noter que dans la même espèce, on peut rencontrer les huiles essentielles simultanément dans des organes différents et que la composition de celle-ci peut varier d'un organe à l'autre. En outre, cette composition peut varier dans une même espèce selon les conditions climatiques et édaphiques du lieu de récolte. Le plus souvent, en climat chaud, la teneur en huile essentielle est plus élevée (Mahmout, 1992).

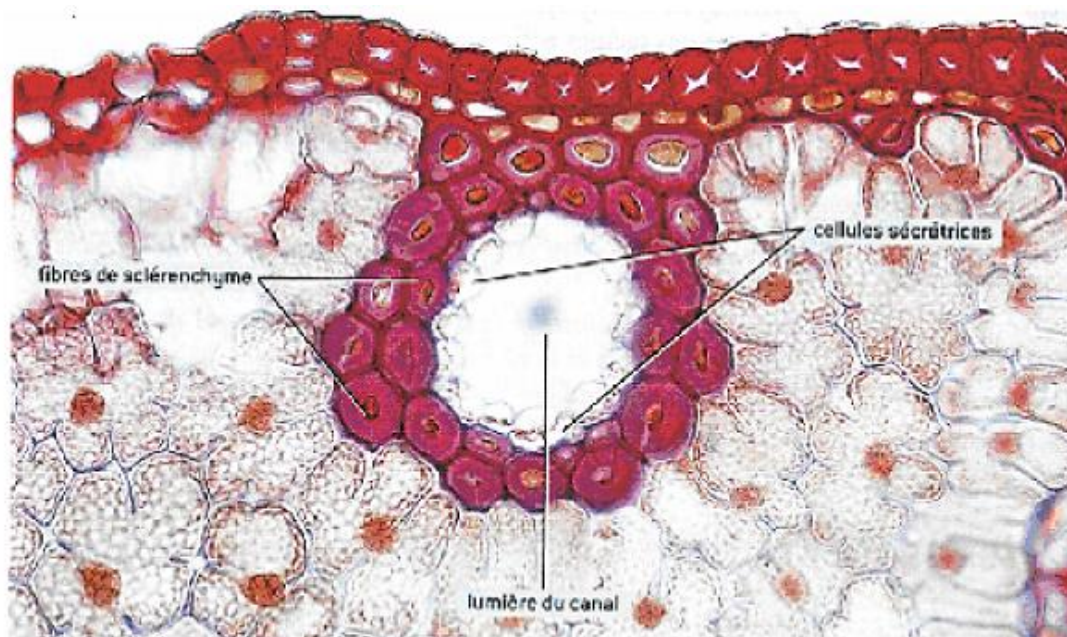


Figure n°1 : Organe sécréteur d'huile essentielle (Raymond, 2005).

I.4- Propriété physico-chimiques

Les huiles essentielles possèdent malgré leur différence de constitution, un certain nombre de propriétés physico-chimiques connues, à savoir leurs températures ambiante où elles y sont généralement liquides ; alors qu'elles sont volatiles à haute température, c'est à partir de cette volatilité qu'on les distingue des huiles fixes telles que l'huile d'olive et l'huile d'amande douce (Jean, 2009).

Les huiles essentielles forment un groupe homogène du point de vu de leurs propriétés physique ; par contre, elles sont par leur composition chimique, le groupe le plus hétérogène qui existe (Bernard et al., 1988).

II- Famille des Lamiacées (lameaceae)

Les Lamiacées sont des plantes herbacées, rarement ligneuses, souvent velues, à tige généralement quadrangulaire ; feuilles opposées, disposées en paires se croisant d'un nœud à l'autre (décussées), sans stipules, à limbe denté ; fleurs (rarement isolées) en cyme, souvent réunies en faux verticilles étagés, axillaires ou terminaux ; corolle en forme de tube se terminant par 4-5 lobes ou subégaux, ou formant une lèvre inférieure, ou le plus souvent formant deux lèvres. Les Lamiacées, répandues dans le Bassin méditerranéen, possèdent souvent des poils glanduleux ou des glandes à huiles essentielles les rendant très odorantes (nombreuses espèces aromatiques ou médicinales). Les lamiacées constituent l'une des principales familles de plantes dicotylédones, qui comprend environ 258 genres et 6900 espèces plus ou moins cosmopolites, mais particulièrement répandues depuis le Bassin méditerranéen jusqu'en Asie centrale (Botineau, 2010).

I.5.1- Présentation de *Thymus vulgaris*

Le nom du thym (en anglais thyme) vient du grec thumos, qui signifie « odeur ». Plante sacrée, très recherchée dans l'antiquité, le thym était un symbole de force chez les romains ; il était brûlé au cours des sacrifices et utilisé comme encens dans les temples grecs. Le thym est originaire du bassin méditerranéen, il existe plusieurs espèces de ce genre dans le monde, et sur celles qui sont actuellement connues, l'espèce *Thymus vulgaris* est toutefois la plus répandue. Au Maghreb, on dénombre autres telles que : *Thymus numidicus*, *Thymus pallescens*, *Thymus ciliatus*, etc. (Hynes, 1992).

L'espèce *Thymus vulgaris* est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, connu surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales (Isérin et al., 2001).

Il existe une variation de la production des composés secondaires chez certaines espèces végétales que l'on appelle polymorphisme chimique. Cette variation peut être quantitative ou qualitative. Un grand nombre d'espèces possèdent des individus dont les composés secondaires varient quantitativement d'un individu à un autre. Par contre, les exemples de variations qualitatives, c'est-à-dire l'existence des chémotypes au sens strict dont les individus peuvent porter des molécules de nature chimique différentes les uns des autres, sont moins fréquents. C'est notamment le cas de *thymus vulgaris* qui exprime six formes de chémotypes différents, chaque chémotypes est nommé suivant le composant principal de son huile essentielle (exemple : thymol (T), carvacrol (C) (Amiot et al., 2005).

I.5.2- Description morphologique et botaniques

Thymus vulgaris est un petit sous-arbrisseau vivace, touffu et très aromatique de 7 à 30 cm de hauteur, d'un aspect grisâtre ou vert-grisâtre (**Figure n°2**). Ses tiges, ligneuses à la base, herbacées supérieurement, sont presque cylindriques. Ces tiges ligneuses et très rameuses sont regroupées en touffe ou en buisson très dense. Elles peuvent acquérir, vers leur base, une assez grande épaisseur. Les tiges florifères ne produisent jamais de racines adventives, et sont rampantes, dressées ou redressées, tortueuses dans leur partie inférieure, velue et blanches tout

autour chez les jeunes rameaux. Ses feuilles sont très petites, ovales, lancéolées, à bord roulés en dessous à nervures latérales distinctes, obtuses au sommet, ponctuées supérieurement, au pétiole extrêmement court, et blanchâtres à leur face inférieure. Les fleurs, quant à elles, sont presque roses ou presque blanches, font de 4 à 6 mm de longueur, sont pédicellées et réunies ordinairement au nombre de trois à l'aisselle des feuilles supérieures (Biologiquement, 2012).

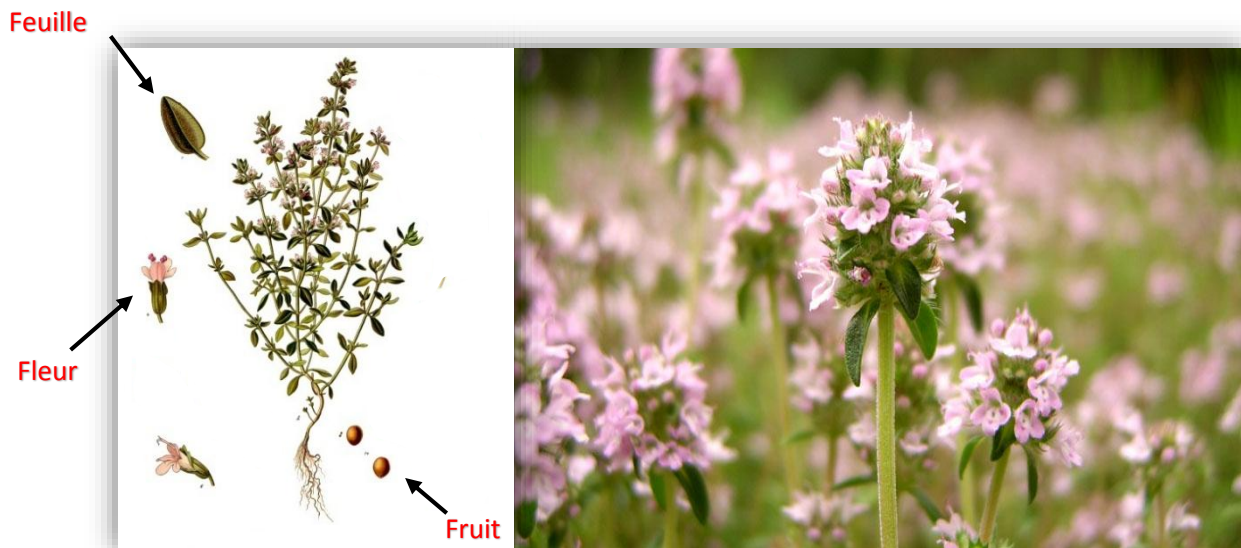


Figure n°2 : L'aspect morphologique de *Thymus vulgaris* (Gary et al., 2004)

I.5.3- Taxonomie

Thymus est un genre de plantes (couramment appelées thym) de la famille des Lamiacées. Ce genre comporte plus de 300 espèces et près d'une centaine de variétés de thym, sauvages et/ou cultivées (cornichon, 2017)

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure (Morales et al., 2002) synthétisée dans le tableau suivant.

Tableau n°1 : Classification botanique de *Thymus vulgaris* (Morales et al., 2002)

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus vulgaris L.</i>

Noms vernaculaires

- **Latin :** *Thymus vulgaris thymoliferum* (Haddad et al., 2007)
- **Arabe :** Saatar, Zaatar (Goetz et Ghedira, 2012)
- **Anglais:** Common thym, garden thyme, winter thyme (Goetz et Ghedira, 2012)
- **Français:** Thym vulgaire, thym des jardins, farigoule, thym commun, thym cultivé (Goetz et Ghedira, 2012)

I.5.4- Habitat

Le thym pousse dans des endroits naturels, sols légers et calcaire, mais il prospère tout aussi bien sur sols fertiles argileux mais non détrempés. Il nécessite des endroits bien ensoleillés et supporte relativement bien la sécheresse. C'est d'ailleurs sur sols pauvres (maquis, rocaïlle de garrigue) que se développe le mieux son arôme. Dans les endroits de fortes gelées, une protection est recommandée durant l'hiver. Sa multiplication se fait par semis superficiel (germination à la lumière), réalisé mi-avril ou plus rarement en août, en rangée écartée d'environ 20 à 30 cm, sur sol léger et sablonneux (Goetz et Ghedira, 2012).

I.5.5- Répartition géographique de la plante

I.5.5.1- Dans le monde

Les thymes sont de petites plantes buissonnantes, érigées (thym commun) ou plus étalées (serpolet), typiques de la région méditerranéenne où ils poussent naturellement. Il est indigène de l'Europe du Sud, on le rencontre depuis la moitié orientale de la péninsule ibérique jusqu'au sud-Est de l'Italie, en passant par la façade méditerranéenne française (Ozcan et Chalchat, 2004, Amiot et al., 2005). On cultive le thym dans le monde entier, certaines variétés supportent le froid et l'humidité, d'autres la chaleur tropicale. Dans le sud de la France, le thym est aussi fréquemment appelé farigoule (de son nom occitan : farigola) (Herboristerie, 2017)

I.5.5.2- En Algérie

Originaire du bassin méditerranéen, cet arbrisseau aux nombreux rameaux serrés est une espèce végétale rustique très répandue en Algérie (Lucchesi, 2005). Les différentes espèces qui y existent sont réparties le long du territoire national, du Nord Algérois à l'Atlas saharien, et du Constantinois à Oranais (Yakhlef, 2010).

I.5.6- Composition chimique de la plante

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *Thymus vulgaris* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection). L'hybridation facile de l'espèce mène à une grande variabilité intra-spécifique, qui affecte l'homogénéité du rendement d'extrait et sa composition en produits chimique (Balladin et Headley, 1999).

Une étude récente a été faite en 2016 visant à élucider la composition chimique de deux échantillons d'huiles essentielles (EO) obtenus à partir des feuilles de *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) recueillies dans deux régions de l'ouest de l'Algérie (Tlemcen et Mostaganem) et d'évaluer leur toxicité aiguë in vivo ainsi que leur activité anti-inflammatoire.

L'analyse des huiles obtenues par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) et par chromatographie en phase gazeuse couplée au détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID) a permis d'identifier 66 composés volatiles représentant 99% du total de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* de Tlemcen. La composition de l'huile est dominée par le thymol avec 67,3%. D'autres composants se trouvent également à des taux appréciables. Il s'agit notamment du γ -terpinène (10,1%), du p-cymène 6,0%, α -pinène (1,6%) et linalool (2,7%). (Wafae et al., 2016).

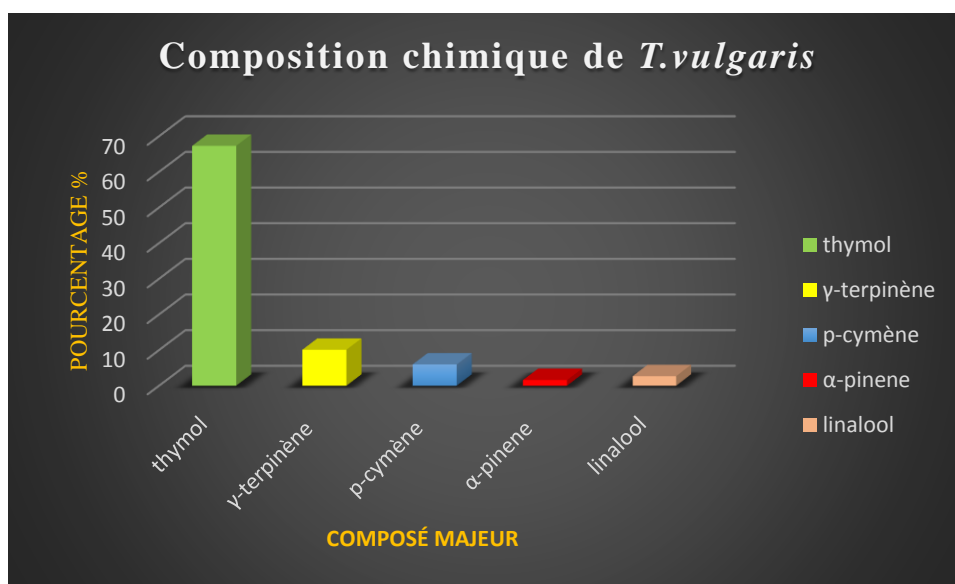


Figure n°3 : composition chimique majeur de *Thymus vulgaris*

Tableau n° 2 : Composition chimique totale de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* d'Algérie (Wafae et al., 2016)

N°	Compound	<i>T. vulgaris</i> (Mostaganem)		<i>T. vulgaris</i> (Tlemcen)		N°	Compound	<i>T. vulgaris</i> (Mostaganem)		<i>T. vulgaris</i> (Tlemcen)	
		RI	Area (%)	RI	Area (%)			RI	Area (%)	RI	Area (%)
1	Methyl-2-methylbutanoate	775	tr	775	0.1	34	Terpinen-4-ol	1192	0.4	1192	0.4
2	Ethyl butyl ketone	885	tr	886	tr	35	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1194	0.1	1194	tr
3	α -Thujene	934	1.0	934	1.0	36	α -Terpineol	1203	0.1	1203	0.1
4	α -Pinene	944	5.7	944	1.6	37	<i>cis</i> -Dihydrocarvone	1211	0.2	1211	0.1
5	Thuja-2,4(10)-diene isomer	952	tr	953	tr	38	<i>trans</i> -Dihydrocarvone	1220	0.3	1220	0.1
6	Camphene	961	0.4	961	0.1	39	<i>trans</i> -Carveol	1230	tr	1230	tr
7	Thuja-2,4(10)-diene	965	tr	965	tr	40	Carvacrol methyl ether	1251	0.3	1251	0.1
8	1-Octen-3-ol	978	0.6	978	0.1	41	Carvone	1259	0.1	1259	tr
9	Sabinene	983	tr	983	tr	42	Thymol methyl ether	1294	0.7	1294	2.9
10	3-Octanone	986	0.3	986	0.1	43	Carvactrol	1300	tr	1300	tr
11	β -Pinene	990	0.4	990	0.2	44	Thymol	1309	59.5	1309	67.3
12	Myrcene	993	1.4	993	1.4	45	Eugenol	1370	tr	1369	tr
13	3-Octanol	995	0.1	995	0.1	46	α -Copaene	1400	tr	1400	tr
14	α -Phellandrene	1014	0.2	1014	0.2	47	β -Bourbonene	1413	0.1	1413	tr
15	δ -3-Carene	1021	0.1	1021	0.1	48	(<i>E</i>)- β -Caryophyllene	1451	1.9	1451	1.4
16	α -Terpinene	1026	1.1	1026	1.3	49	β -Copaene	1458	0.1	1458	tr
17	<i>p</i> -Cymene	1033	5.6	1033	6.0	50	Aromadendrene	1471	0.2	1471	0.1
18	Limonene	1038	1.0	1038	0.4	51	α -Humulene	1486	0.1	1486	tr
19	β -Phellandrene	1041	0.3	1041	0.2	52	<i>allo</i> -Aromadendrene	1494	0.1	1493	tr
20	(<i>E</i>)- β -Ocimene	1050	0.1	1050	0.1	53	γ -Muurolene	1501	0.1	1501	0.1
21	γ -Terpinene	1067	8.7	1067	10.1	54	Germacrene D	1512	0.1	1511	tr
22	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1077	0.1	1077	0.1	55	Ledene	1525	0.2	1525	0.1
23	3-Nonen-1-ol	1079	0.2	1080	0.1	56	Bicyclogermacrene	1527	0.1	1527	tr
24	3-Nonanone	1087	tr	1087	tr	57	γ -Cadinene	1542	0.1	1541	0.1
25	<i>trans</i> -Linalool oxide	1096	tr	1096	tr	58	δ -Cadinene	1546	0.2	1546	0.1
26	Terpinolene	1098	0.1	1098	0.1	59	Cadina-1,4-diene	1559	tr	1559	tr
27	Linalool	1102	5.1	1102	2.7	60	α -Cadinene	1564	tr	1564	tr
28	Nonanal	1105	0.1	1105	0.1	61	Spathulenol	1612	0.3	1612	0.1
29	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1109	0.1	1109	0.1	62	Caryophyllene oxide	1622	0.2	1621	0.2
30	<i>trans</i> -Pinocarveol	1156	0.1	1156	tr	63	Glaboul	1630	tr	1630	tr
31	<i>cis</i> -Verbenol	1158	0.1	1158	tr	64	Isospathulenol	1670	0.1	1670	0.1
32	<i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	1178	tr	1179	tr	65	<i>r</i> -Cadinol	1672	tr	1672	tr
33	Borneol	1183	1.2	1183	0.1	66	α -Cadinol	1685	tr	1685	tr
Total identified								99.3		99.0	

RI: Retention index; tr: Traces < 0.05 %

I.5.7- Usage et domaines d'application de *Thymus vulgaris*

Le thym possède des propriétés désinfectantes et peut être utilisé sous forme de décoction, en usage interne et externe. C'est un excellent remède contre les maladies d'origine bactérienne contre les infections de voies respiratoires, bronchite, maux de gorge, ainsi qu'en cas de rhinite ou d'infections buccales. Il est efficace en bain de siège pour soulager les troubles des voies urinaires. En décoction, il apaise les crampes abdominales ou menstruelles. Sous forme de badigeonnage, il soulage les démangeaisons désagréables et les rougeurs liées aux piqûres d'insectes. Il possède des vertus diurétiques. C'est un ingrédient très répandu dans l'industrie cosmétique en raison de ses propriétés anti-infectieuses et de son pouvoir désinfectant tant pour les cheveux que pour les problèmes de peau : il est en effet reconnu pour ses effets modulateurs du fonctionnement des glandes sébacées (Swiss, 2016). Le thym est un remède efficace des peaux grasses, et acnéiques. Ses effets anti infectieux ont été prouvés par des recherches. Il purifie l'organisme, renforce le système immunitaire, et grâce à sa teneur en acide caféique et en flavonoïdes, il contribue à la prévention des maladies tumorales (Zu et al., 2010).

I.5.8- Méthodes d'extraction des huiles essentielles

La grande diversité des propriétés physico-chimiques de ces composés permet d'utiliser plusieurs techniques d'extraction. Elles seront sélectionnées en fonction de la composition chimique de l'huile essentielle ou de l'organe de la plante à extraire (KOUDOU, 2009). Le choix du procédé d'extraction influe directement sur la qualité des produits et sur le rendement de l'extraction. Il est orienté par la localisation histologique et la composition chimique de ces essences. A l'échelle industrielle, le procédé le plus employé reste la distillation à la vapeur d'eau. Les principales raisons pour cette préférence sont facilité et la mise en œuvre du procédé, la sélectivité et donc la qualité des produits obtenus, sachant qu'il ne nécessite pas de dispositifs particuliers de sécurité (Ait-Ouazzou et al., 2012).

I.5.8.1- L'entraînement à la vapeur d'eau

C'est une technique plus utilisée à l'industrie et un procédé rigoureux d'obtention des huiles essentielles. La plante n'est pas mise directement en contact avec de l'eau qui est chauffée, mais placée sur la grille perforée d'un alambic et épuisée à la vapeur (Dubey et al., 2003).

La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange «eau + huile essentielle». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle.

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (**Figure N°4**) (Nait Achour, 2012).

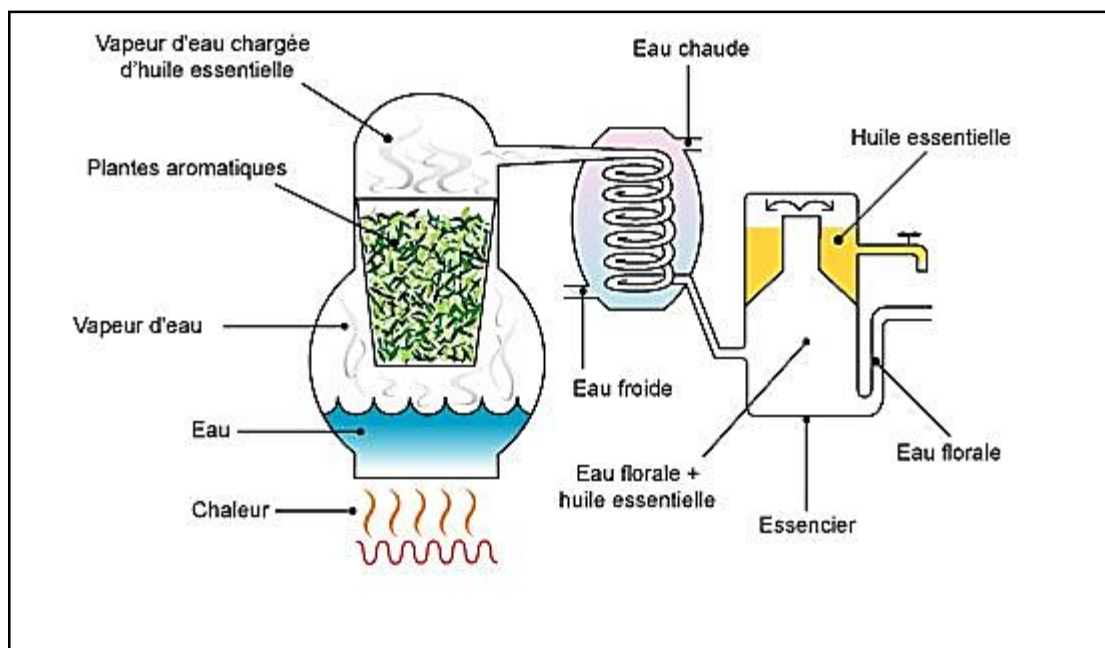


Figure n°4 : Schéma illustrant l'entraînement à la vapeur d'eau (El Haib, 2011)

I.5.8.1.1- Hydro-distillation

L'hydro-distillation est une des méthodes d'extraction les plus simple et la plus utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. L'ensemble est porté à ébullition. Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont entraînées par la vapeur d'eau créée. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat (**Figure N°5**) (Nait Achour, 2012)

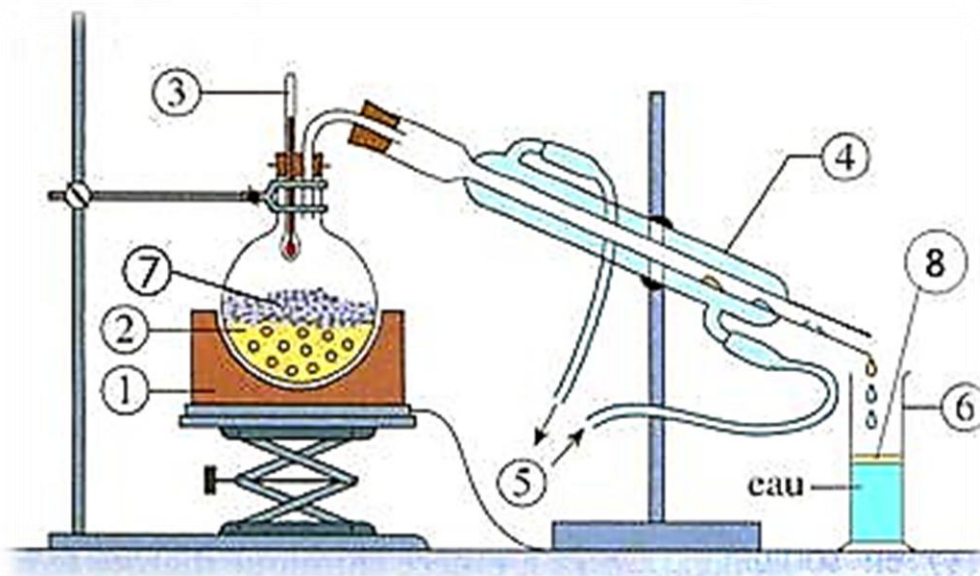


Figure n°5 : Schéma du principe de la technique d'hydro-distillation (Lucchesi, 2005)

- | | |
|---------------------|-----------------------------------|
| 1- Chauffe ballon ; | 5- Entrée et sortie d'eau ; |
| 2- Ballon ; | 6- Erlenmeyer ; |
| 3- Thermomètre ; | 7- Matière à extraire l'essence ; |
| 4- Réfrigérant ; | 8- Couche d'huile essentielle |

I.5.8.2- Enfleurage

Cette technique se base sur la liposolubilité des composés odorants des végétaux dans les corps gras. Il consiste à déposer des pétales de fleurs fraîche sur la plaque de verre recouvert de mince couche de graisse (graisse animal type saindoux). Selon les espèces, l'absorption des huiles essentielles des pétales par le gras peut prendre 24 à 72 heures. Les pétales sont éliminés et remplacés par des pétales frais jusqu'à saturation du corps gras. On épuise ce corps gras par un solvant que l'on évapore ensuite sous (Belaiche, 1979). De nos jours l'enfleurage reste une technique très délicate et nécessite un matériel et une main d'œuvre considérable.

I.5.8.3- Extraction par des solvants volatils

L'extraction par des solvants volatils consiste à dissoudre la matière odorante de la plante dans un solvant que l'on fait ensuite évaporer. Cette technique pratiquée dès le 18ème siècle avec de l'éther, produit coûteux et fortement inflammable, utilise de nos jours des solvants plus adaptés comme l'hexane ou l'éthanol. Cette méthode est utilisée pour les plantes dont les substances aromatiques risqueraient d'être dégradées par la distillation et lorsque le matériel végétal :

- ne peut être chauffé, par exemple le jasmin
- contient une faible concentration de substances aromatiques comme la rose
- contient une substance résineuse, comme le benjoin (Aroma, 2017).

Les végétaux sont placés dans d'énormes cuves en acier appelées extracteurs et soumis à des lavages successifs aux solvants qui se chargent ainsi de leur parfum. Après décantation et filtrage, le solvant est évaporé afin d'obtenir une sorte de pâte fortement odorante appelée concrète pour les fleurs et résinoïde pour la matière dérivée du traitement des plantes sèches (racines, mousses...). Après une série de lavages à l'alcool dans des batteuses mécaniques et de glaçages, la concrète donne naissance à une essence pure appelée absolue (Parfumeur, 2017).

I.5.8.4- Extraction au CO₂ supercritique

L'extraction supercritique est apparue au stade industriel vers la fin des années 1970 comme procédé alternatif à la distillation de plantes. L'utilisation du CO₂ supercritique (CO₂ SC) comme solvant d'extraction de molécules organiques à partir de plantes est l'application la plus ancienne et la plus développée à l'échelle industrielle, notamment dans le secteur agroalimentaire. Le premier exemple d'industrialisation de ce procédé concerne la dé-caféination du café. Le CO₂ de par ses propriétés physico-chimiques (incolore, inodore, non toxique, non inflammable) est le fluide supercritique le plus utilisé. De plus, du fait de ses conditions critiques modérées (**T_c = 31 °C, P_c = 73,8 bar**), le CO₂ SC est très rapidement apparu comme un candidat particulièrement approprié à l'extraction végétale, et ce notamment comme alternative aux solvants organochlorés. Depuis, de nouvelles applications du CO₂ SC pour l'extraction de plantes sont apparues et ont permis de confirmer les potentialités de ce fluide comme solvant alternatif de choix, non seulement pour l'extraction d'une large gamme de composés naturels mais également pour bien d'autres applications relatives au végétal (Benaissi, 2013).

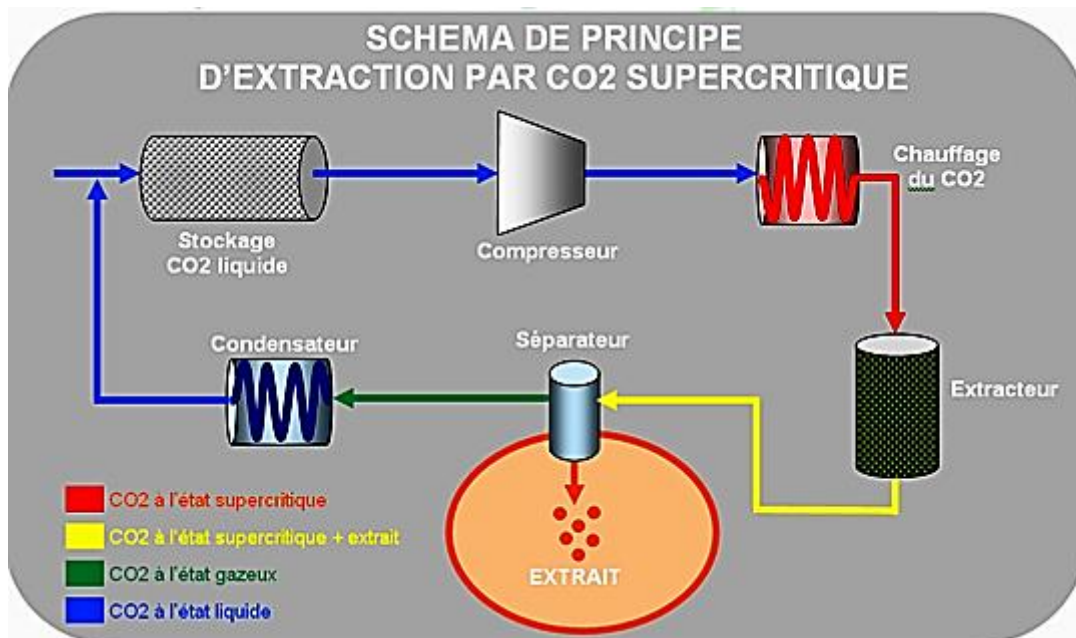


Figure n°6 : Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO₂ supercritique (Pourmortazavi and Hajimirsadeghi, 2007)

I.5.8.5- Extraction par micro-onde

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes est l'une des plus récentes. Inspirée d'un ancien procédé de distillation dite « sèche » utilisé par les alchimistes Arabes pour l'extraction des huiles essentielles. Elle consiste en une distillation sèche à l'aide d'un alambic utilisant le soleil comme source de chaleur. L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes a été développée en remplaçant l'énergie solaire par un chauffage micro-ondes plus performant, plus spécifique et beaucoup moins polluant qu'un chauffage traditionnel au feu de bois (**Lucchesi, 2005**). Il consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur au sein d'un four micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant (**Figure N°7**).

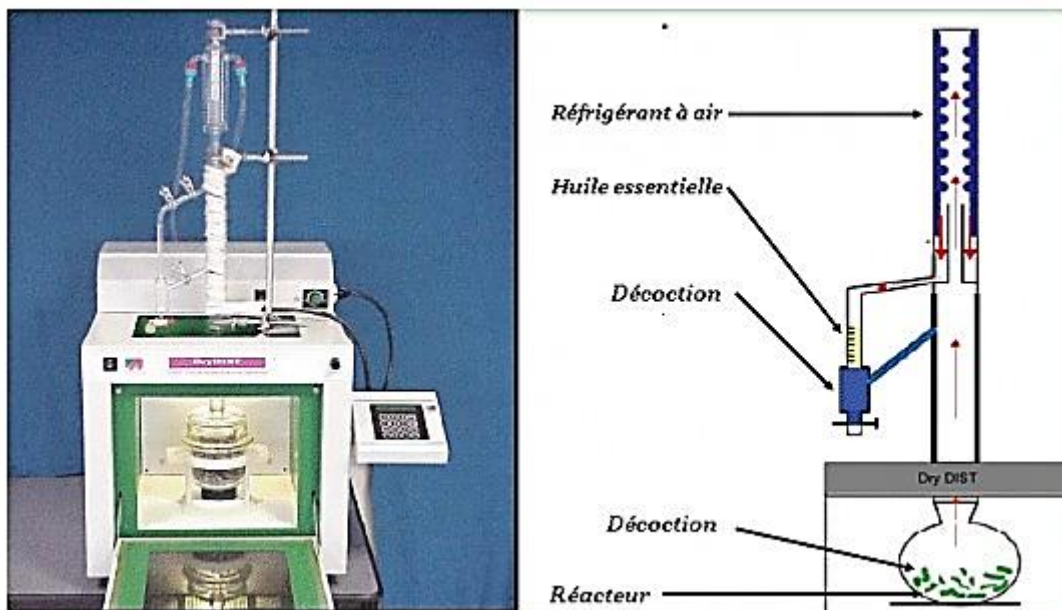


Figure n°7 : Principe schématisé du système d'extraction par micro-onde sans solvant (Soins et Nature, 2017).

Le chauffage interne de l'eau contenue dans la plante permet d'en dilater ses cellules et conduit à la rupture des glandes et des réceptacles oléifères. L'huile essentielle ainsi libérée est évaporée avec l'eau de la plante. Un système réfrigérant situé à l'extérieur du four à micro-ondes permet la condensation du distillat en continu. L'excès d'eau est réintroduit dans le réacteur de manière à restaurer la quantité d'eau initialement présente dans la plante (Fillatre, 2011).

I.5.9- Activité biologiques de *thymus vulgaris*

La diversité moléculaire des métabolites que contiennent *thymus vulgaris* ainsi que les huiles essentielles en générale, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés telles que, les propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoire, anticancéreuses, antimicrobiennes, antiseptiques, antiparasitaires, diurétiques... (Guinoiseau, 2010).

I.5.9.1- Activité antibactérienne et mode d'action

L'huile essentielle du thym est douée de propriétés antibactériennes qui peuvent facilement être mises en évidence par des expériences in vitro (Bruneton, 1999). Tous les chimiotypes sont actifs, cependant son activité bactéricide est le plus marquée pour les types à thymol et à carvacrol. Cette activité s'exerce vis-à-vis de salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Listeria monocytogènes et d'autres espèces bactériennes. L'effet antibiotique du thymol est 25 fois supérieur à celui du phénol et moins toxique que ce dernier (Burt and Reinders, 2003, Dorman and Deans, 2000).

La structure chimique des constituants du thym et d'autres huiles essentielles conditionne leur mode précis d'action antibactérien (Dorman and Deans, 2000). Compte tenu du nombre de différents groupes de composés chimiques présents dans les Huiles essentielles, il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuée à un mécanisme spécifique mais qu'il y ait plusieurs cibles dans la cellule (Carson et al., 2002, Skandamis et al., 2002). Les principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles sont indiquées dans la figure suivante (**Figure N°8**).

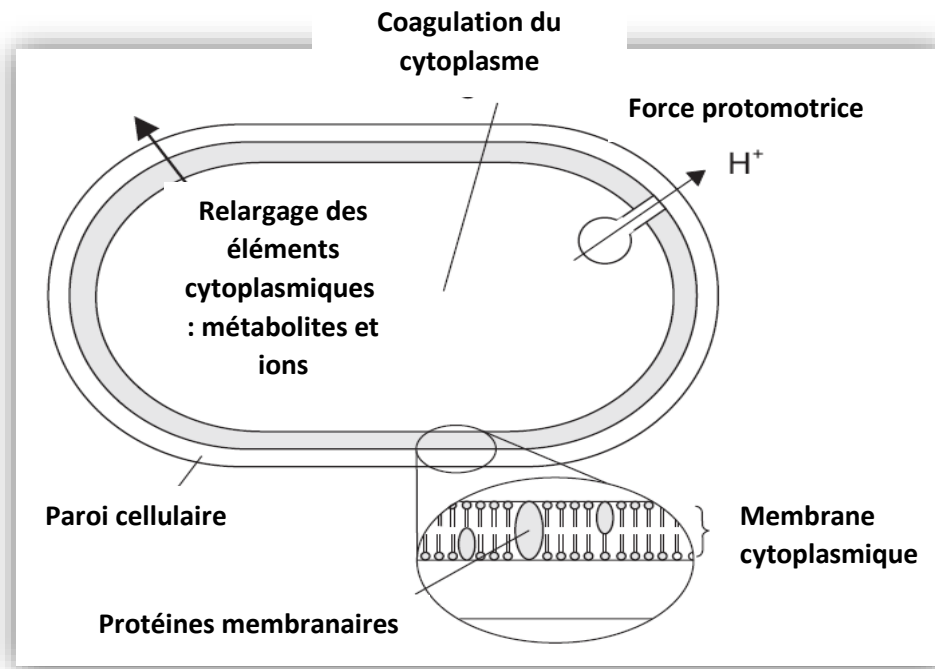


Figure n°8 : Action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Burt, 2004)

Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des huiles essentielles sont :

- ❖ L'altération de la paroi cellulaire (Helander et al., 1998);
- ❖ La dégradation de la membrane cytoplasmique (Ultee et al., 2000);
- ❖ L'altération des protéines membranaires (Ultee et al., 1999);
- ❖ Fuite du contenu cellulaire (Cox et al., 2000) ;
- ❖ Coagulation du cytoplasme (Gustafson et al., 1998);
- ❖ Epuisement de la force de mouvement des protons (Ultee et Smid, 2001).

Une des caractéristiques importantes de *thymus vulgaris* et de ses constituants est leur caractère hydrophobe, ce qui leur permet de s'insérer dans les couches lipidiques de la membrane cellulaire bactérienne et des mitochondries, perturbant les structures et les rendant plus perméables. La fuite des ions et autres constituants de la cellule peut alors se produire (Goetz et Ghedira, 2012).

Bien qu'une certaine proportion de fuite de cellules bactériennes puisse être tolérée sans perte de viabilité, une perte importante du contenu de la cellule ou la sortie de molécules essentielles et d'ions peut amener la mort bactérienne. Certains travaux portant sur les effets de l'huile essentielle d'arbre à thé sur *E coli* ont permis de montrer que la mort cellulaire peut survenir avant la lyse bactérienne (Goetz et Ghedira, 2012).

D'une façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries, cette diversité ne dépend pas seulement de la nature chimique des huiles essentielles mais aussi du type membranaire des bactéries, selon qu'elle soit Gram positif (+) ou gram négatif (-) (**Figure N°9**). En général, les bactéries Gram (-) sont plus résistantes que les Gram (+) grâce à la structure de leur membrane externe riche en lipopolysaccharides et en protéines ce qui la rend plus hydrophile empêchant ainsi les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane interne plus vulnérable (Mokaddem-Daroui et al., 2012).

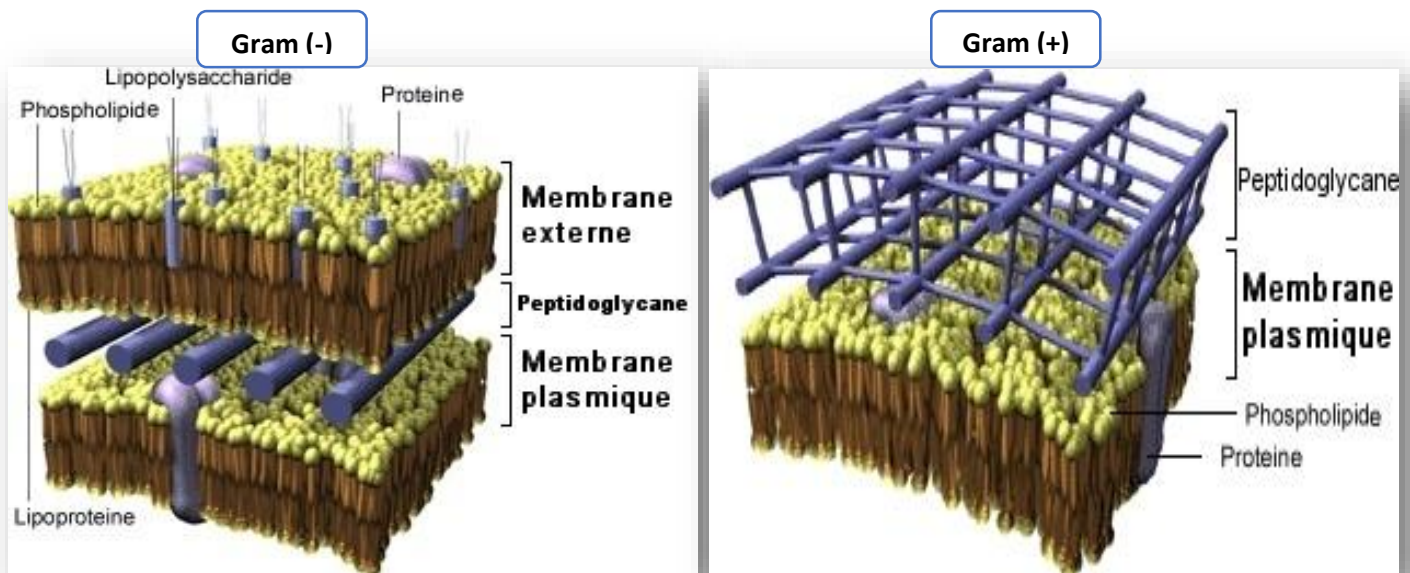


Figure n°9 : Structure des parois chez les bactéries Gram (-) et Gram (+)

I.5.9.2- Activité antifongique et mode d'action

En plus de son activité antibactérienne, l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* possède également le pouvoir d'inhiber la croissance d'un certain nombre de souches fongique dont *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, *Saprolegnia*, et *Zygorhynchus*. Cette même huile potentialise l'effet antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis de *C. albicans* (Mokaddem-Daroui et al., 2012, Pina-Vaz et al., 2004).

L'utilisation de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* comme agent protecteur des fruits de fraise (*Fragira ananassa*) contre la détérioration causée par les mycètes lors des travaux effectués par (Reddy et Yusuf, 1998) a montré que cette dernière était dotée d'un potentiel antifongique élevé contre *Brotry cinerea* et *Rhizopus stolonijer* (Valero et Salmeron, 2003).

Le mécanisme d'action des huiles essentielles contre les mycètes n'est pas totalement compris jusqu'à maintenant, mais quelques auteurs ont donnés plusieurs suppositions selon leurs observations (Ali, 2012) La plupart des études sur le mécanisme d'action des huiles essentielles se sont accentuées sur leurs effets sur la membrane cellulaire.

En outre, l'activité antifongique des huiles essentielles pourrait également être liée à l'interférence des composants de l'huile dans des réactions enzymatiques de la synthèse de la paroi cellulaire, qui affecte la croissance fongique (Carmo et al., 2008). Ces suggestions ont déjà été rapportées par (Kyu-Ho et al., 2000). Ils ont étudié l'inhibition des enzymes synthétisant la paroi des cellules fongiques en examinant les effets inhibiteurs de l'huile sur le β -(1,3) glucane sur la chitine synthétase. (Chalchat et al., 1997), Signalent que les huiles essentielles endommagent une série de système enzymatique des moisissures, de ce fait affectant la synthèse et la production énergétique des composantes structurales.

I.5.10- Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles bien qu'ayant de nombreux effets bénéfiques dans des domaines variés, peuvent aussi constituer un danger si elles sont mal utilisées. En effet, Les huiles essentielles suscitent, depuis quelques années, un engouement grandissant chez les thérapeutes mais aussi dans le grand public. Leur accessibilité fait oublier qu'il s'agit de produits très puissants et que leur utilisation implique quelques règles de prudence (Santé, 2017). Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leurs pouvoir irritant (les huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhydes) (Smith et al., 2000), ou photo-toxique (huiles de *citrus* contenant des furocoumarines) (Naganuma et al., 1985).

D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique. La toxicité des huiles essentielles est assez mal connue. Il manque des données sur leurs éventuelles propriétés mutagène ou cancérigènes. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Il existe quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancer, c'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzènes ou de propenylbenzenes comme le safrole, l'estragole, le β -arason, et le méthyl-eugénole (Wiseman et al., 1987).

Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe (Kehal, 2013).

Chapitre II

Généralités sur les infections post-opératoires

II.1- Les infections post chirurgicales

II.1.1- Introduction

Dans les hôpitaux et centre de santé en général, on rencontre souvent plusieurs cas de décès dues à des infections identifiés au niveau des plaies issues d'opérations post chirurgicales. Une fréquence élevé de ce type d'infection indique que les soins ne sont pas dispensés de manière optimale, et entraine de ce fait des couts qui pourraient être évités (Lortat-Jacob et al., 1987). La plupart des études traitant d'infections post chirurgicale bactériennes en Afrique intertropicale sont issues d'équipes pédiatriques ou chirurgicales (Okeke et al., 2005). La rareté des données publiées sur le sujet limite l'analyse descriptive de la situation. Les principaux facteurs favorisant sont liés aux conditions d'exercice médical, à l'environnement microbien hospitalier et communautaire, et à un état de santé souvent précaire. Les infections par bactéries multirésistantes sont de plus en plus décrites, reflétant les faillites de l'hygiène hospitalière. En revanche, les infections de site opératoires, la tuberculose et les viroses à transmission aérienne sont largement sous-estimées (Simon et al., 2007).

II.1.2- Définition

On entend par infection chirurgicale toutes les infections qui nécessitent une intervention chirurgicale et celles qui surviennent après un traumatisme ou une opération .Elles sont relativement fréquentes dans le domaine de la pathologie externe occupant un taux de 30-50% des cas de maladies chirurgicales. Ce type d'infection survient généralement dans les 30 jours suivant l'intervention, ou dans l'année s'il y a eu pose d'une prothèse (implant définitif tel que : valve cardiaque, prothèse articulaire, ...). Les infections du site opératoire se situent à la 3ème place des infections nosocomiales. Leur surveillance, bien que complexe et chronophage, paraît donc essentielle.

Une infection du site opératoire survient chez 3% des patients opérés et représente près de 10% des infections nosocomiales. Les patients opérés ont deux fois plus de risque d'acquérir

une infection nosocomiale que les autres patients (qu'elle soit du site opératoire ou d'un autre site) (Fehr et al., 2006).

Il existe 3 niveaux d'infection retrouvés chez les patients (voir schéma) :

- les infections dites superficielles (60% des infections du site opératoire)
- les infections profondes (25%)
- les infections d'organe (15%)

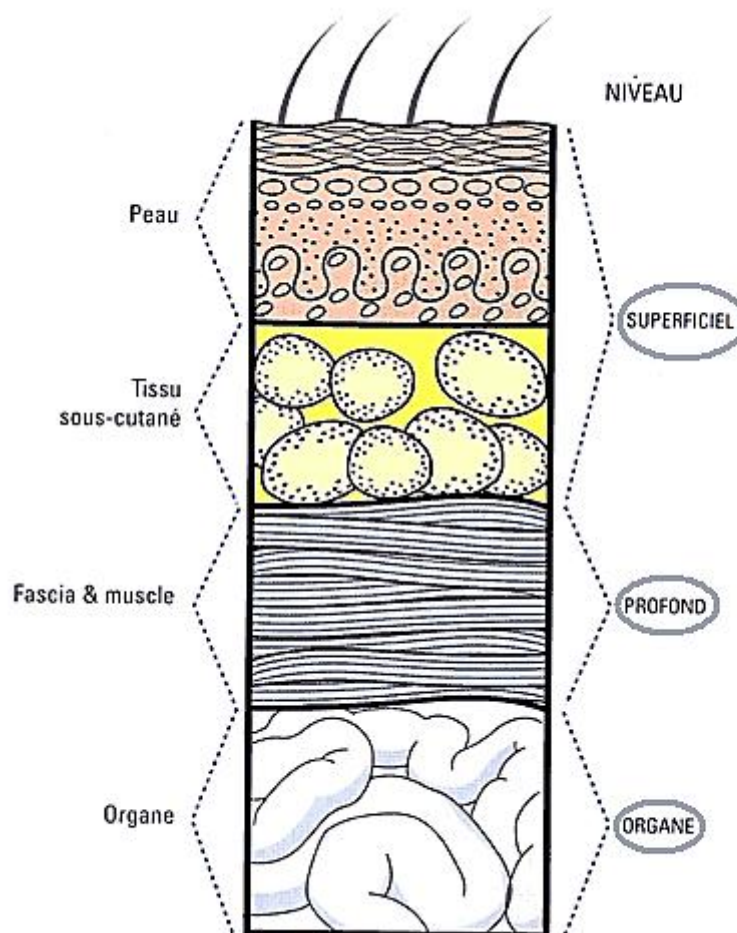


Figure n°10 : Différents niveaux d'infection (Barbut et al., 2004)

II.2- Principales causes d'infection post chirurgicales

Les germes responsables d'une infection du site chirurgical sont normalement inoculés durant l'intervention et proviennent de la peau ou des muqueuses non stériles touchées (digestive, urogénitale, respiratoire) durant l'intervention. En outre, les germes peuvent provenir d'un foyer infectieux distant concomitant. Les sources exogènes peuvent être : le personnel chirurgical, l'environnement de la salle opératoire et tous les instruments qui entrent en contact avec le site opératoire. Ce mode de contamination est nettement plus rare (Mangram et al., 1999).

Le risque d'infection du site chirurgical dépend des facteurs suivants :

- la contamination du site opératoire par des germes, leurs doses et virulence
- la résistance de l'hôte/facteurs dépendant du patient
- des facteurs opératoires

Le Staphylocoque doré reste le germe numéro un dans tous les sites opératoires, en dehors de la chirurgie abdominale où les bâtonnets Gram négatifs prévalent (Misteli et al., 2011). Quatre-vingt pour cent (80%) des infections nosocomiales (les infections du site chirurgical incluses) sont causées par seulement huit (8) germes : Staphylocoque doré, entérocoques, Escherichia coli, staphylocoques coagulase-négatifs, Candida spp, Klebsiella spp, Pseudomonas aeruginosa et Enterobacter spp. Ce spectre n'a pas changé pendant les dernières décennies. Si la présence de germes multirésistants est problématique pour les autres infections nosocomiales (pneumonies, infections urogénitales), ils ont une moindre importance pour les infections du site opératoire (Sievert et al., 2013).

Les bactéries commensales présentes dans la flore normale des sujets en bonne santé. Elles jouent un rôle protecteur significatif en empêchant la colonisation par des micro-organismes pathogènes. Certaines bactéries peuvent provoquer une infection si les défenses immunitaires de l'hôte sont faibles (Smaill et Grivell, 2014).

Les bactéries le plus couramment retrouvé dans ce type d'infection sont (Barbut et al., 2004):

- *Staphylococcus aureus* 35%
- *Escherichia coli* 10%
- *Pseudomonas aeruginosa* 10%
- Staphylocoque coagulase négatif 8%

II.3- Diagnostique

➤ Signes cliniques

Les signes cliniques classiques d'une infection (rougeur, douleur, œdème, tuméfaction, sécrétion) ne sont pas toujours univoques. Ce n'est souvent qu'au cours de l'évolution que l'on arrive à reconnaître une infection : par des douleurs de plus en plus fortes, une déhiscence secondaire de la plaie ou une sécrétion persistante ou nouvelle. Il existe néanmoins des signes de gravité qui sont non seulement discriminatoires d'une infection, mais également prédictifs d'une infection sévère nécessitant une prise en charge urgente : bulles/vésicules, nécrose de la peau, ecchymoses, crépitation (révélatrice de gaz intra tissulaire), œdème s'étendant au-delà de l'érythème cutané, zone d'anesthésie au sein de la zone d'inflammation, étendue progressive ou rapide sous antibiotique, et bien sûr des signes de toxicité systémique (Hajjar et al., 2000). La fièvre n'est pas un paramètre fiable, mais si elle est présente, elle indique une situation plus grave.



Figure n°11 : Plaies d'infections post-chirurgicales

En général, le frottis de plaie n'a qu'une valeur limitée comme moyen diagnostique microbiologique étant donné qu'il n'y a pas de seuil limite quantitatif ni qualitatif pour discriminer entre une colonisation et une infection de plaie. Une colonisation de plaie a naturellement lieu. C'est pourquoi l'appréciation clinique est requise et permet d'attribuer une valeur pathologique à la trouvaille microbiologique. Un bilan diagnostique agressif, parfois même une exploration chirurgicale, sont nécessaires, raison pour laquelle un approfondissement en milieu hospitalier s'impose et un traitement antibiotique empirique est prohibé (Borens et al., 2009).

II.4- Traitement d'infections post chirurgicales

Il n'y a que peu d'études sur le traitement des plaies infectées. Selon les recommandations de la Société américaine des maladies infectieuses, (Hajjar et al., 2000). Le traitement de choix pour une plaie chirurgicale infectée sans signe d'atteinte systémique (fièvre supérieure) 38,5°C et localement contenue (érythème 15 cm) est local par ouverture et drainage, suivi de soins locaux par pansement humide lors de la guérison en deuxième intention. Il n'y a pas d'évidence qu'un traitement antibiotique à ce stade soit bénéfique (Borens et al., 2009). En cas d'atteinte systémique (inflammatoires diffuses dont l'origine est inconnue.), un traitement antibiotique de 24-48 heures maximums est conseillé. Dans un tel cas, le choix de l'antibiotique est empirique, se basant sur la flore du site chirurgical. Un frottis superficiel peut être utile. En cas de chirurgie propre, on couvre des germes de la peau (streptocoques, *S. aureus*) avec une céphalosporine de 1re-2e générations, tandis qu'en cas de chirurgie sur muqueuses, on choisit des antibiotiques actifs contre la flore intestinale. Une absence de réponse doit faire penser à une étendue d'infection plus profonde et motiver des investigations radiologiques (Roselli et al., 2013).

II.5- Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques des bactéries

La résistance bactérienne est généralement attribuée à trois mécanismes à savoir : l'inaccessibilité des antibiotiques à leur cible, l'altération de la cible de l'antibiotique par une enzyme, la modification de la cible (Li et al., 2007).

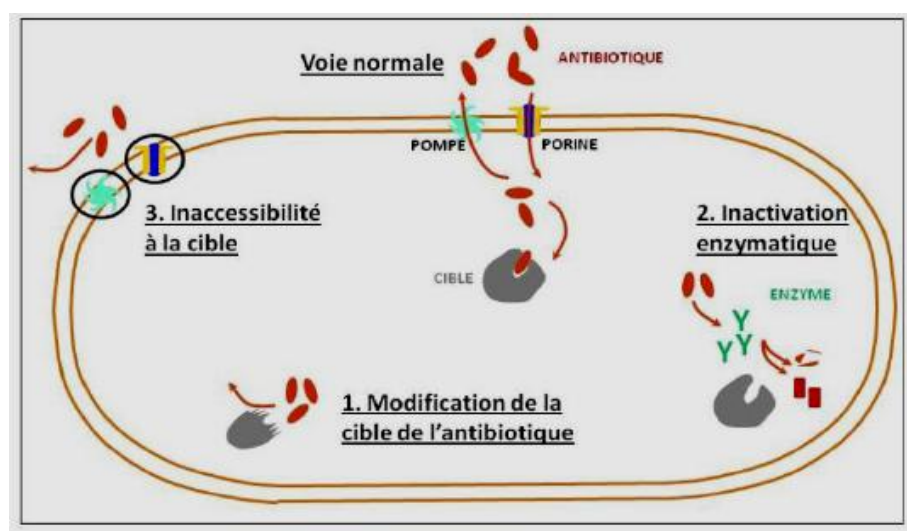


Figure n°12 : Les mécanismes d'acquisition de la résistance bactérienne (Bonnet, 2014)

➤ L'inaccessibilité des antibiotiques à leur cible.

Le mécanisme de l'inaccessibilité à la cible consiste en la diminution de la perméabilité membranaire ou le phénomène d'efflux (Bonnet, 2014). Les altérations des porines peuvent être obtenues par trois (3) mécanismes généraux: un changement de type de porine exprimé, un changement dans le niveau d'expression de la porine et une altération de la fonction de la porine. Ce mécanisme est particulièrement observé chez les bactéries à Gram négatif, limitant l'afflux des substances du milieu extérieur (Munita et Arias, 2016). En effet, les bactéries à Gram négatif, possède une membrane externe pouvant agir comme une barrière empêchant l'antibiotique de rejoindre sa cible (Thériault, 2015).

Plusieurs antibiotiques sont concernés par ce mécanisme: la Tétracycline, les macrolides, chloramphénicol et les quinolones (Mc Dermott et al., 2003). Plus particulièrement, les molécules hydrophiles telles que les β -lactames, les tétracyclines et certaines fluoroquinolones seront affectées par le changement de perméabilité de la membrane externe car ils utilisent des porines pour traverser cette barrière (Munita et Arias, 2016). Le phénomène à efflux se fait par expulsion de l'antibiotique hors de la cellule. Des protéines appelées <<pompes à efflux>> se chargent de sortir l'antibiotique hors de la cellule afin que la concentration intracellulaire soit faible. Les antibiotiques affectés par ce mécanisme sont : la tétracycline, les macrolides, les streptogramines et les quinolones (Thériault, 2015).

➤ **La modification de la cible par l'antibiotique.**

L'autre mécanisme de résistance aux antibiotiques est la modification de la cible. En effet une bactérie possède la capacité de modifier la cible de l'antibiotique. Ce changement de cible peut consister à: une mutation dans les gènes codant pour le site cible, une altération enzymatique du site de liaison (par exemple addition de groupes méthyles) et/ou le remplacement ou la dérivation de la cible initiale (Munita et Arias, 2016). Ce mécanisme met en jeu des organites telles que les ribosomes, les parois ou les enzymes de l'ADN, et est bien développé chez les bactéries à Gram négatif qui vont grâce à des modification de la cible parviennent à développer des hauts niveaux de résistance (Bonnet, 2014). La modification de la cible est une stratégie utilisée contre toutes les familles d'antibiotiques mais en particulier: les aminoglycosides, β -lactames, macrolides, quinolones, rifampicine, triméthopine, tétracycline, mupirocine (Mc Dermott et al., 2003).

➤ **L'inactivation de l'antibiotique par une enzyme.**

Les bactéries peuvent aussi utiliser l'inactivation enzymatique via la production d'enzyme détruisant ou modifiant l'antibiotique (Bonnet, 2014). Ce mécanisme concerne les bactéries à Gram négatif et Gram positif. Les antibiotiques qui sont concernés sont: les aminoglycosides, les chloramphénicols, β -lactames, et les streptogramines et les tétracyclines (Mc Dermott et al., 2003, Thériault, 2015). La plupart des antibiotiques affectés par ce mécanisme sont celle qui inhibe la synthèse des protéines au niveau du ribosome. Les réactions d'inactivation de

l'antibiotique par l'enzyme les plus fréquentes sont : l'acétylation (aminoglycoside, chloramphénicol, streptogramine), la phosphorylation (aminoglycoside, chloramphénicol) acétylation (aminoglycoside, lincosamide). L'effet résultant est souvent l'encombrement stérique qui diminue l'avidité de l'antibiotique pour la cible (Munita et Arias, 2016).

Chapitre III

Matériel et méthodes

III.1- Matériel végétal (*Thymus vulgaris*)

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* de Nedroma (Algérie) (**Annexe 1**) qui nous a été remise, est issue d'une plante récoltée en Mai 2015 dans la commune de Sebaa Chioukh, située au nord de la wilaya de Tlemcen par Mlle Abdelli wafae (doctorante).

L'extraction de l'huile essentielle du thym a été réalisée par hydro distillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. Le rendement calculé était de 4,2%.

III.2- Matériel biologique

III.2-1- Présentation du Centre Hospitalier Régional Amissa Bongo

Le Centre Hospitalier Régional Amissa Bongo situé à Franceville la capitale provinciale du Haut-Ogooué au Gabon est une structure publique de soins courants et spécialisés. Il a été inauguré le 08 Mai 2013 par le défunt président du Gabon, Omar Bongo Ondimba. Le CHRAB sert de recours aux centres médicaux et aux dispensaires de la province du Haut- Ogooué. Il participe à la recherche opératoire et à la formation pratique des personnels de santé.

Le CHRAB joue pleinement son rôle d'hôpital de référence dans la province du Haut – Ogooué en desservant une population évaluée à 105 000 habitants, par des services de bon niveau avec un nombre de spécialités fondamentales présentes. La gestion médicale constitue le cœur de l'activité hospitalière (Gabon news, 2013).



Figure n°13 : Centre Hospitalier Régional Amissa Bongo (Gabon news, 2013).

III.2.2- Patients et prélèvements (échantillonnage)

L'ensemble des échantillons utilisés dans cette étude a été prélevé au Centre Hospitalier Régional Amissa Bongo (CHRAB) de Franceville, précisément dans les services de petite et Grande chirurgie dont le responsable est le Docteur OFOUBOU. Pour se faire, une fiche de prélèvement a été établie contenant dans une première partie des informations concernant le patient et dans une autre partie, des informations concernant le prélèvement (**Annexe 2**). Il est à noter que la fiche était remplie par le patient hospitalisé au CHRAB avec au bas de la page un émargement signifiant l'accord du patient pour participer à cette étude.

Au total, 23 échantillons issus d'opérations de chirurgie ont pu être récoltés chez 23 patients dans les deux services de chirurgie que comporte le CHRAB dont 10 en Grande chirurgie et 13 en petite chirurgie. Ces échantillons étaient essentiellement constitués de prélèvements faits à partir des compresses stériles et de pus. Les compresses étaient utilisées pour prélever sur les plaies suppurées avant application de tout autres produit de soin tel que l'alcool ou la Bétadine, puis introduites dans des tubes à bouchon bleu (**Figure N°14**) contenant un mélange de 10ml de PBS plus 15% de glycérol pour optimiser la conservation. Les pus étaient prélevés et conservés dans des pots stériles à bouchon rouge (**Figure N°15**). Le tout est mis dans un frigidaire à 4°C avant le transport.



Figure n°14 : Tube pour Compresse



Figure n°15 : Tube pour pus

III.2.3- Transport et conservation des échantillons

Après le prélèvement, les échantillons de compresses et de pus sont placés dans une glacière à $\pm 4^{\circ}\text{C}$ puis acheminés sur 9 Km jusqu'au Centre Internationale de Recherche Médicale de Franceville (CIRMF) pour y être analysés au laboratoire de bactériologie (**Figure N°16**)

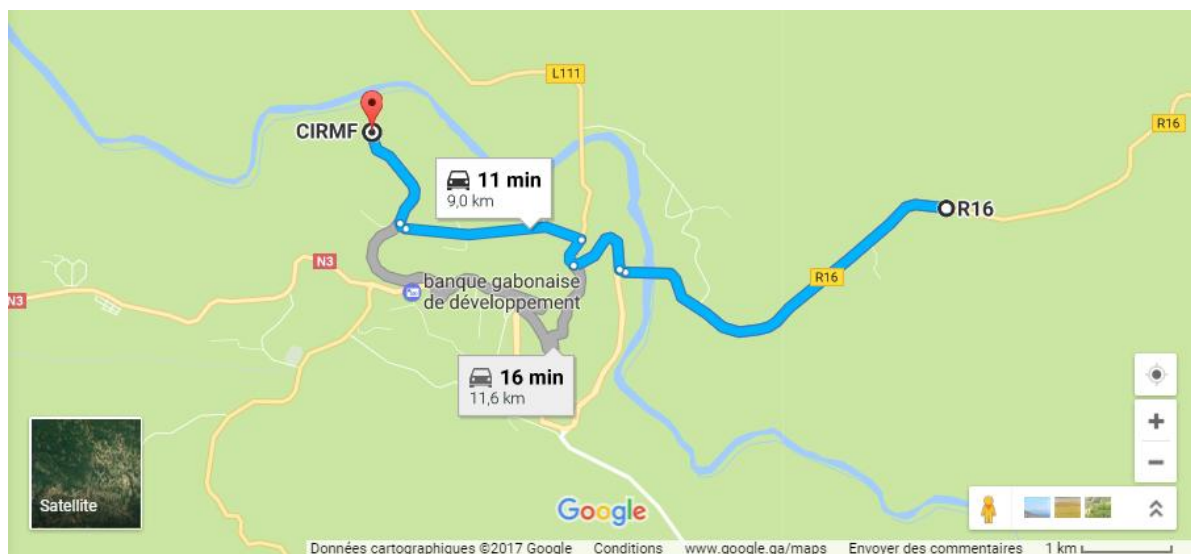


Figure n°16 : Itinéraire du transport des échantillons (Google map, 2013)

Le Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) est un Institut Gabonais de référence pour la recherche, le soutien au système de santé et la formation. Créée en 1974 sur une initiative de feu le Président de la République Gabonaise, Son Excellence El Hadj Omar BONGO ONDIMBA, et du président d'Elf Aquitaine, Monsieur Pierre GUILLAUMAT.

Initialement créé pour étudier les problèmes d'hypo fécondité qui semblaient toucher la population gabonaise dans les années 70, le Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) a réorienté ses activités au début des années 80, principalement sur les deux grandes pandémies qui allaient toucher l'ensemble du continent africain et plus généralement le monde entier, à savoir le VIH sida et le paludisme (CIRMF GABON, 2017).

A la fin des années 90, face à l'émergence de nouvelles maladies, telles que la fièvre hémorragique Ebola, la fièvre chikungunya et la pandémie H1N1, le CIRMF a su de nouveau s'adapter à l'actualité médicale pour mettre toutes ses forces dans la recherche de ces nouvelles maladies qui affectèrent gravement le continent africain et plus particulièrement le Gabon.

Aujourd'hui, le CIRMF focalise l'ensemble de ses activités sur les maladies infectieuses en mettant l'accent sur le rôle de veille microbiologique et d'aide à la santé publique au Gabon et également dans l'ensemble de la sous-région d'Afrique centrale, la recherche et la formation.



Figure n°17 : Centre International de Recherche Médical de Franceville (CIRMF GABON, 2017).

III.2.4- Préparation des milieux de culture

Pour la recherche des bactéries, deux milieux ont été utilisés à savoir la gélose au sang (GS) et la gélose Trypticase soja (TS). Les géloses étaient préfabriquées sous forme de poudre dans des boîtes (**Annexe 3**). Pour les préparer, nous avons suivi le protocole inscrit sur la boîte.

III.2.5- Ensemencement

Afin d'obtenir le maximum de colonies bactérienne à partir des échantillons, chaque échantillon issu de compresses ou de pus a été ensemencé par stries croisés à l'aide d'une anse de platine stérile sur une gélose au sang (milieu riche non sélectif pour l'isolement des bactéries).

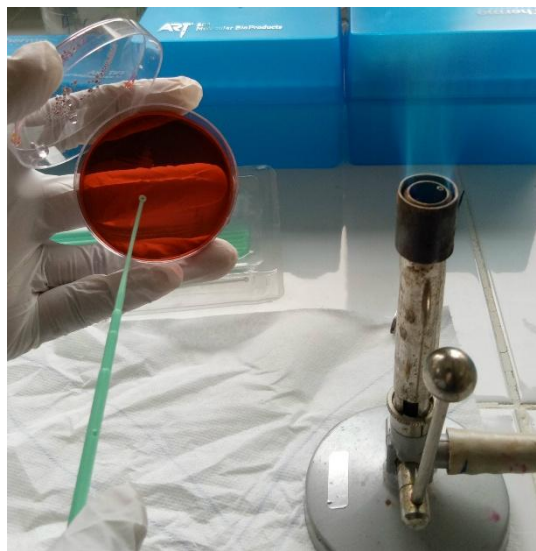


Figure n°18 : Ensemencement des échantillons sur milieu Gélose au sang

Après ensemencement, les boîtes sont placées à 37°C dans un incubateur durant 18 à 24h.

III.2.6- Isolement et purification des colonies bactériennes

24h après incubation, les boîtes sont soumises à une identification macroscopique des morphologies des différentes colonies. Les différentes colonies obtenues sont ensuite isolées sur des boîtes contenant la gélose Trypcase soja (TS) (**Figure N°19**) qui est une gélose ordinaire afin d'obtenir des colonies pures.



Figure n°19 : Ensemencement des bactéries sur milieu Trypticase soja (TS)

III.2.7- Identification des isolats bactériens purifiés

III.2.7.1- Identification phénotypique (Coloration de Gram)

C'est une coloration complexe qui permet de connaître la forme (cocci, bacille, etc...), l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées pour préciser le caractère Gram positif ou Gram négatif.

Pour cela, une colonie pure et jeune est prélevée du milieu d'isolement à l'aide d'une anse stérile en plastique. Puis nous avons réalisées un frottis sur une lame. Le tout a été séché, puis fixer par trois passages sur la flamme du bec bensen. Ensuite la coloration proprement dite a été réalisée en 4 étapes à savoir :

- **1^{er} étape** : le frottis séché et fixé a été recouverte totalement par le violet de Gentiane (BioMerieux, France) et laissé incubé pendant 1 minute puis rincer à l'eau ;
- **2^{ème} étape** : le frottis séché et fixé a été recouverte de lugol (BioMerieux, France) et laissé pendant 1 minute puis rincer à l'eau entièrement ;
- **3^{ème} étape** : le frottis séché et fixé a été décoloré par l'alcool à 90% puis rincer à l'eau entièrement ;

- **4^{ème} étape** : le frottis séché et fixé, a été complètement recouverte de safranine (fuschine) (BioMerieux, France) laissée incuber pendant 30 secondes, rincée avec de l'eau et séché pendant quelques minutes.

Pour la lecture, une goutte d'huile à d'immersion a été déposée sur le frottis séché et fixé, puis observé au microscope au grossissement X100.



Figure n°20 : Produits de la coloration de Gram

La coloration de Gram ainsi réalisée, permet de classer les souches bactériennes selon le type de paroi, pour faciliter l'identification qui sera faite par un appareille appelé VITEK[®] 2 compact 15 (**Annexe 4**).

III.2.7.2- Identification biochimique des isolats par VITEK[®]2 compact 15

❖ Principe

➤ Préparation de l'inoculum

Les recommandations du fabricant précisent qu'il faut travailler sur des cultures de 24h (culture jeune). Selon que nous soyons en présence des bactéries à Gram négatif ou Gram positif, une colonie est introduite dans un tube stérile (12 x 15 mm de hauteur) contenant 3 ml

d'une solution saline stérile (NaCl) à 0,45% ensuite la suspension bactérienne doit être homogénéisée au vortex. La turbidité de la suspension mesurée grâce à un appareil appelé DensiChek® doit être comprise entre 0,5 et 0,63 McF pour les bactéries à Gram négatif et entre 0,80 et 1,20 pour les bactéries à Gram positif : le contenu du tube ainsi préparé correspond à l'inoculum d'identification (Schreckenberger et al., 2005, Ling et al., 2001).

➤ **Distribution de l'inoculum.**

Cette étape consiste au remplissage automatique des cartes Gram négatif réalisé grâce à un système de pompe à vide qui force la suspension bactérienne à migrer depuis le tube de transfert jusqu'aux capillaires, permettant de remplir tous les puits réactionnels de la carte. Cette distribution se fait dans le compartiment de l'automate appelé module de remplissage.

➤ **L'incubation**

Le tube de transfert est ensuite coupé après que les cassettes aient été transférées manuellement dans le compartiment dédié à cet effet (aire de chargement / déchargement de la cassette) puis s'ensuit la lecture automatique du code barre des cartes et celle-ci sont scellées avant d'être incubées à 35±1°C dans l'automate.

Toutes les 15 minutes, ces cartes sont transférées vers un système optique pour la lecture des réactions biochimiques entre substrat déshydraté et microorganisme, puis ils sont à nouveau réintroduits automatiquement dans l'incubateur. C'est le principe d'identification des microorganismes (Garcia-Garrote et al., 2000, Schreckenberger et al., 2005).

➤ **La lecture et l'interprétation des résultats**

La lecture et l'interprétation des résultats sont automatiques. Le profil biochimique obtenu est ensuite comparé à ceux de la base de données figurant dans le logiciel d'identification. Les résultats des réactions sont exprimés ainsi : <<+>> pour une réaction positive, <<->> pour une réaction négative et <<?>> pour les réactions ininterprétables.

Le profil réactionnel obtenu est comparé à ceux des taxons contenus dans la base de données et un calcul de probabilité d'identification correcte est effectué. Différents niveaux de confiance y sont associés.

Tableau n°3: Types de fiabilités d'identifications réalisées par VITEK® 2 compact 15.

Fiabilité d'identification par le VITEK® 2 compact 15				
Message d'identification	Excellent	Très bonnes	Bonnes	Acceptables
Score de confiance (%)	96-99	93-95	89-92	85-88

➤ Identification des souches isolées

Les touches isolées et purifiées et datant de 18 à 24h sont prises pour être identifiées par VITEK® 2 compact 15, suivant le protocole suivant :

- La première étape consiste à introduire avec une anse stérile en plastique chaque colonie purifiée dans un tube contenant 3ml d'eau distillée. Puis le mélange est homogénéisé. La turbidité de l'inoculum a été ajustée, entre 0,5 et 0,63 Mac Ferland par un DensiChek® (Biomérieux, France) (**Figure n°21**) pour les bactéries Gram négatif et entre 0,80 et 1,20 pour les Gram positif.

○



Figure n°21 : DensiChek® (Bioré, France)

- La seconde étape est l'appareillage. Pour cela une carte d'identification Gram négatif (GN) ou Gram positif (GP) selon le type de Bactérie est placée dans une cassette spécial pour VITEK® 2 compact 15 et reliée par un tube de transfert avec le tube contenant l'inoculum de façon à ce que le tube de transfert de la carte plonge dans la suspension bactérienne ;



Figure n°22 : Cassette VITEK®2 compact15 (Yaro, 2017).

Puis la cassette est introduite dans l'aire de chargement du VITEK®2 compact 15 (Figure n°23) pour une identification phénotypique des différentes colonies bactériennes. Environ 10h après, les résultats ont été donnés sous forme de tableau imprimé avec les informations sur l'identification (carte, N° lot, Péréemption) et le germe sélectionné

(pourcentage d'identification, profil biochimique et la fiabilité) (**Annexe 5**). L'automate produit un rapport de laboratoire qui correspond à une estimation sur une identification qui est fonction du résultat de réaction typique d'espèce pour un ensemble de test biochimique discriminant.

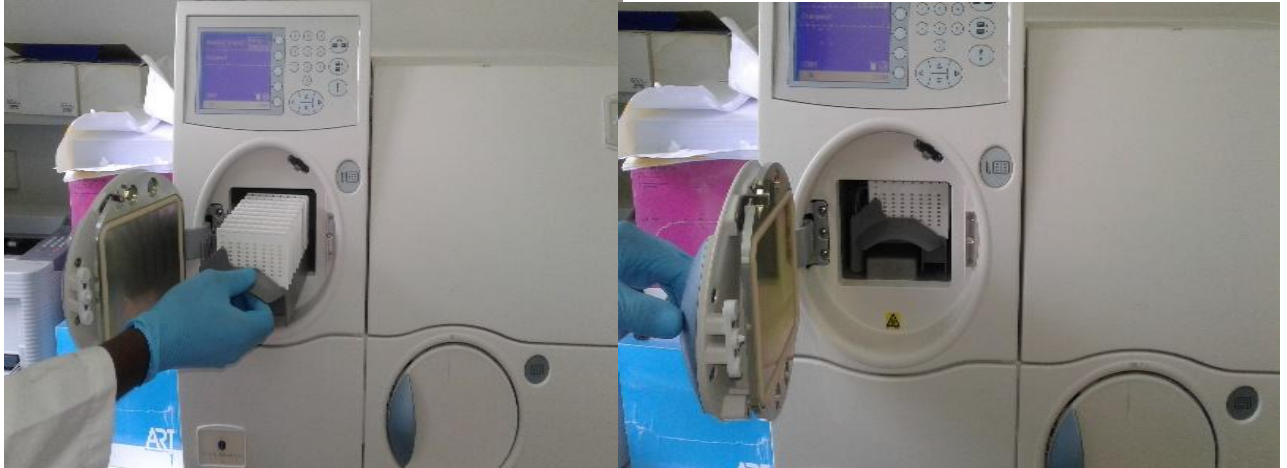


Figure n°23: Chargement des cassettes dans l'air de chargement du VITEK® compact 15 (Yaro, 2017)

III.2.8- Test de sensibilité des souches aux antibiotiques

Une fois les souches identifiées, nous avons procédé au test de sensibilité aux antibiotiques pour pouvoir déterminer le profil et le degré de résistance de ces bactéries aux antibiotiques usuellement utilisés dans cet hôpital.

Pour se faire, nous avons répertorié une gamme de vingt (20) antibiotiques usuellement utilisés par le médecin, dont seize (16) ATB pour les Gram négatif et quatre pour les Gram positif. Il s'agit entre autre de :

Tableau n°4 : Antibiotiques spécifiques aux bactéries Gram (-)

(CLSI, 2014)

Antibiotiques	Sigle	charge du disque (µg)
Amoxicillin-clavulanate	AMC	30
Cephalothin	CEF	10
Cefoperazone	CEP	30
Chloramphenicol	CHL	30
Colistin	CST	50
Cefotetan	CTT	30
Cefazolin	CZN	30
Ertapenem	ERT	10
Nitrofurantoin	FTN	300
Imipenem	IMP	10
Ofloxacin	OFX	5
Piperacillin	PIR	100
Streptomycin	SMN	10
Trimethoprim+ Sulfamethoxazole	SXT	25
Tobramycin	TMN	10
Piperacillin+ Tazobactam	TZP	110

Tableau N°5 : Antibiotiques spécifiques aux Gram (+)

(CLSI, 2014)

Antibiotiques	Sigle	charge du disque (µg)
Rifampicin	RAM	30
Oxacillin	OXA	5
Erythromycin	ERY	15
Penicillin	PEN	6

III.2.8.1- Préparation du milieu Mueller-Hinton (MH)

Le milieu utilisé pour faire le test de l'antibiogramme est en général le milieu Mueller-Hinton (**Figure N°24**). Ce milieu favorise l'étalement de l'antibiotique dans le milieu de culture.

Sa préparation s'est faite en suivant le protocole inscrit sur la boîte préfabriquée industriellement (**Annexe 6**). Le milieu est ensuite coulé dans des boîtes de pétries rondes de 9cm de diamètre et des boîtes de pétries carrées 12cm de côté (**Annexe 7**).

III.2.8.2- Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum s'est faite en suivant les normes indiquées par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Il s'agit de réaliser une suspension bactérienne (jeune de 24h) de 1ml grâce au DensiChek[®], à une densité du standard 0,5 Mc Farland qui correspond à environ 10^8 UFC/ml de bactérie (CLSI, 2014).

➤ Ensemencement

Il se fait par stries serré dans plusieurs sens, à l'aide d'un écouvillon (environ 0,1 ml de suspension), de manière à recouvrir totalement la boîte gélosée avec la suspension bactérienne.



Figure n°24 : Ensemencement sur Gélose Mueller-hinton

III.2.8.3- Dépôt des disques de diffusion d'antibiotique

Le dépôt de disque s'est effectué de manière suivante :

- ✚ Les disques spécifiques aux bactéries Gram négatifs ont été déposés sur des boîtes gélosées préalablement ensemencées de bactéries, grâce à un distributeur de disque de forme rectangulaire (**Annexe 8**). Cet instrument permet de déposer les disques d'antibiotiques en respectant les distances recommandées entre les disques de diffusion et entre les disques et le bord de la boîte. De plus cet instrument nous a permis de déposer les seize (16) ATB dans une même boîte (pour les Gram-) (**Figure N°25**). L'opération s'est répétée pour le nombre de souches bactériennes à Gram négatif à notre disposition.
- ✚ De même, un pose Disque de diffusion de forme arrondie (**Annexe 9**) nous a permis de déposer les quatre (4) ATB spécifique aux bactéries Gram+. Chaque souche bactérienne a donc été testée aux antibiotiques spécifiques aux bactéries Gram+ (**Figure N°26**).



Figure n°25 : Dépôt de disques sur boîtes carrées

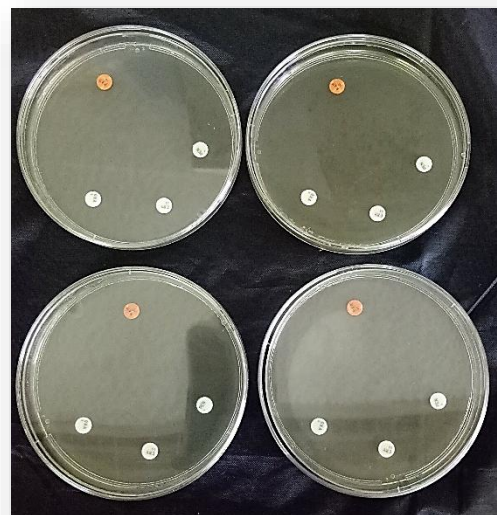


Figure n°26 : Dépôt de disque sur boîte ronde

Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C durant 18 à 24h

III.2.8.4- Lecture et interprétation

La lecture des résultats se fait environ après 18-24h. L'inhibition des bactéries par l'antibiotique se traduit par l'apparition d'un cercle clair ne contenant pas de cellules bactériennes. De plus, la dimension du diamètre permettra de déterminer si la souche est résistante, intermédiaire ou sensible à l'antibiotique, selon les normes utilisées par le **CLSI (2014)**.

III.3- Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été évaluée par deux méthodes : La méthode de diffusion des disques en milieu gélosé (Aromatogramme) qui a été choisie en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des souches microbiennes (Benchibout, 2015).

III.3.1- Les souches microbiennes testées

Pour réaliser le test de sensibilité d'aromatogramme, nous avons sélectionnées une dizaine (10) de souches qui présentaient des profils particuliers après le test de l'antibiogramme.

Les principales souches bactériennes choisies sont :

Echantillon N°11: *Pseudomonas aeruginosa*

Echantillon N°22 : *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*

Echantillon N°14 : *Escherichia coli*

Echantillon N°5 : *Providencia stuartii*

Echantillon N°9 : *Staphylococcus aureus*

Echantillon N°18 : *Citrobacter freundii*

Echantillon N°16 : *Shigella group (sp)*

Echantillon N°13 : *Proteus mirabilis*

Echantillon N° 7 : *Pseudomonas aeruginosa*

Echantillon N° 23 : *Staphylococcus aureus*

Echantillon Référence : *Ecoli ATCC25922*

III.3.2- Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour le test de l'aromatogramme est également le milieu Mueller-Hinton (MH) (**voir annexe 4**).

III.3.3- Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum se fait également comme dans le cas de l'antibiogramme, en suivant les normes indiquées par le CLSI. Il s'agit également de réaliser une suspension bactérienne (jeune de 24h) de 1ml grâce au DensiChek[®], à une densité du standard 0,5 Mc Farland qui correspond à environ 10⁸ UFC/ml de bactérie (CLSI, 2014).

L'ensemencement également se réalise de la même manière grâce à un écouvillon en effectuant des tries de manière à recouvrir toute la surface de la gélose.

III.4- Technique de l'aromatogramme (méthode de Vincent)

C'est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles (Girault et Bourgeon, 1971).

Cet examen est équivalent à un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences préalablement sélectionnées et reconnues.

Il s'agit d'une méthode de diffusion en milieu gélosé réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier Wattman de 6 mm de diamètre sur lequel on dispose une quantité de 20µl d'huile essentielle.

Dans des boîtes de pétries contenant le milieu Muller –Hinton, ensemencés avec 1ml de suspension bactérienne jeune de 18 à 24h, au standard 0,5 McFarland correspondant à 108 UFC/ml de bactéries ; les disques ainsi préparés, sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur la gélose préalablement coulée et après solidification. En parallèle, des boîtes témoins sont utilisés afin de vérifier la croissance des différentes souches.

Les boîtes sont incubées pendant 30 à 45 minutes à température ambiante pour permettre à l'huile de se reprendre sur le milieu, les boîtes sont par la suite incubées à 37°C pendant 24h. L'expérience est répétée trois fois pour chaque souche microbienne (Kabouche et al., 2005).

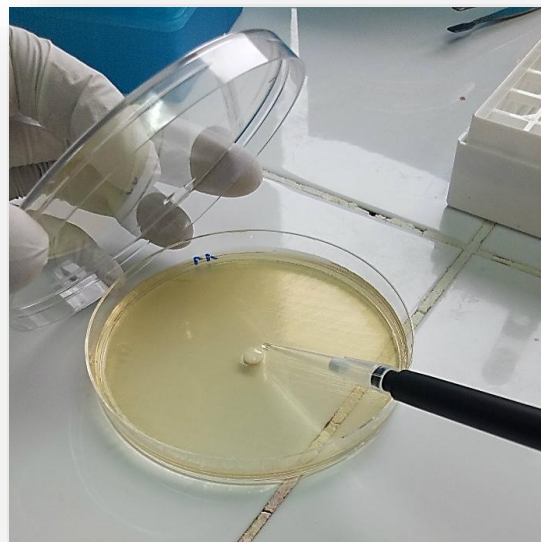


Figure n°27 : Dépôt de disque et d'huile de la technique de l'antibio-aromatogramme

Après ensemencement et incubation, on mesure le diamètre des zones d'inhibition. Chaque halo (une zone claire), montre l'inhibition des germes pathogènes et donne une indication sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles (Bondy et Lee, 1993).

Chapitre IV

Résultats et discussions

Partie expérimentale

IV.1- Coloniesensemencées

L'échantillonnage au CHRAB qui s'est étendu sur une période du 30/03/2017 au 02/05/2017 nous a permis de d'obtenir 23 échantillons que nous avons reparti selon le type et la provenance (Comresse ou Pus) ; Gram positif ou négatif, ainsi que d'autres paramètres, dans le tableau N°5. :

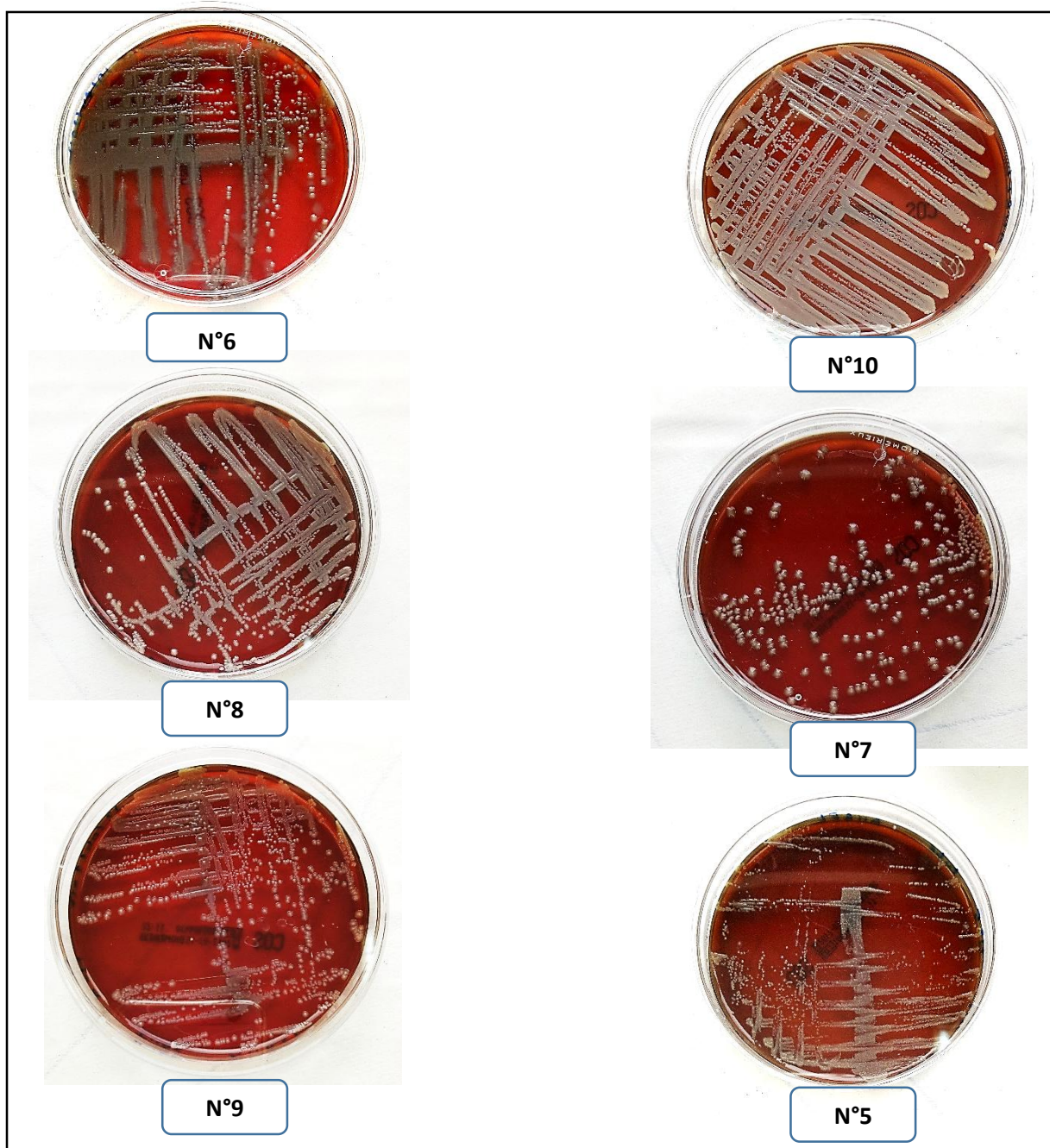


Figure n°28 : Aspects macroscopique de quelques colonies isolées sur gélose au sang

Tableau n°5 : Tableau général des prélèvements

N° Identification	Nature du prélèvement	Type de prélèvement	Coloration de Gram	Type de bactérie	Identification (VITEK 2)	Date du prélèvement
1	Pus	pot	Positif	Cocci	<i>Staphylococcus warneri</i>	30/03/2017
2	Pus	pot	Négatif	STreptobacille	<i>Pantoea spp</i>	05/04/2017
3	Compresse	Tube	Négatif	Bacille	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	05/04/2017
4	Pus	pot	Positif	Cocci	<i>Micrococcus luteus</i>	05/04/2017
5	Compresse	Tube	Négatif	Bacille	<i>Providencia stuartii</i>	07/04/2017
6	Pus	Pot	Négatif	Bacille	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	06/04/2017
7	Compresse	Tube	Négatif	Bacille	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	07/04/2017
8	pus	pot	Positif	Cocci	<i>Staphylococcus aureus</i>	06/04/2017
9	Compresse	Tube	Positif	Cocci	<i>Staphylococcus aureus</i>	10/04/2017
10	Pus	pot	Positif	Cocci	<i>Staphylococcus aureus</i>	11/04/2017
11	Compresse	Tube	Négatif	Bacille	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12/04/2017
12	Pus	pot	Positif	Cocci	<i>Staphylococcus aureus</i>	12/04/2017
13	Compresse	Tube	Négatif	Bacille	<i>Proteus mirabilis</i>	13/04/2017
14	Pus	pot	Négatif	Bacille	<i>Escherichia Coli</i>	13/04/2017
15	Pus	pot	Négatif	Bacille	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	14/04/2017
16	Pus	pot	Négatif	Bacille	<i>Shigella group</i>	18/04/2017
17	Pus	pot	Positif	Cocci	<i>Staphylococcus aureus</i>	22/04/2017
18	Compresse	Tube	Négatif	Bacille	<i>Citrobacter freundii</i>	24/04/2017
19	Pus	pot	Positif	Cocci	<i>Enterococcus faecium</i>	24/04/2017
20	Pus	pot	Négatif	Bacille	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	05/04/2017
21	Compresse	Tube	Négatif	Bacille	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26/04/2017
22	Compresse	Tube	Négatif	Bacille	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	02/05/2017
23	Compresse	Tube	Positif	Cocci	<i>Staphylococcus aureus</i>	02/05/2017

IV.2- Prévalence des germes identifiés par rapport au type de d'échantillon.

Les échantillons récoltés et identifié sont classés par numéro d'identifiant dans un tableau selon leur origine et la fiabilité d'identification de VITEK® 2 compact 15

Tableau n° 6 : Prévalence des germes obtenus par VITEK® 2 compact 15 entre les compresses et les pus

Origine	N° Identifiant	Bactérie	Fiabilité
Comprese	3 (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99%
	5 (1)	<i>Providencia stuartii</i>	97%
	7 (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97%
	9 (1)	<i>Staphylococcus aureus</i>	91%
	11 (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99%
	13 (1)	<i>Proteus mirabilis</i>	99%
	18 (1)	<i>Citrobacter freundii</i>	95%
	21 (1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	88%
	22 (1)	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	91%
	23 (1)	<i>Staphylococcus aureus</i>	98%
Pus	1 (1)	<i>Staphylococcus warneri</i>	94%
	2(1)	<i>Pantoea spp</i>	97%
	4 (1)	<i>Micrococcus luteus</i>	97%
	6 (1)	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	98%
	8 (1)	<i>Staphylococcus aureus</i>	98%
	10 (1)	<i>Staphylococcus aureus</i>	95%
	12 (1)	<i>Staphylococcus aureus</i>	96%
	14 (1)	<i>Escherichia Coli</i>	95%
	15 (1)	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	93%
	16 (1)	<i>Shigella group</i>	96%
	17 (1)	<i>Staphylococcus aureus</i>	95%
	19 (1)	<i>Enterococcus faecium</i>	86%
20 (1)	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	97%	

Le tableau n°6 montre que les échantillons issus de prélèvements de pus (54%) sont nettement supérieurs à ceux issus de compresse (46%).

L'ensemble des échantillons obtenus sont constitués de plusieurs classes de bactéries dont les Enterobactéries, les *Pseudomonas*, les Staphylocoques qui représente la plus grande proportion, respectivement 50%, 18% et 32%.

Le classement des souches selon l'origine du prélèvement, nous a permis d'observer que les échantillons issus du pus comporte en plus grande proportion des *Staphylococcus aureus* (21%), ce qui s'explique car ce type de bactérie à Gram positif est à l'origine d'une nécrose

tissulaire particulière, riche en polynucléaires altérés (Arlet, 2016). Aussi, les pourcentages de probabilité d'identification par vitek 2 compact 5 sont très élevés et témoignent d'une très bonne identification (voir Tableau n°2).

Il est à noter que la quasi-totalité des échantillons récoltés, présentaient après ensemencement, une seule souche bactérienne certainement du fait de leur pathogénicité stricte.

IV.2- Profil des bactéries résistantes aux antibiotiques choisis

Le test antibiogramme effectué sur les souches bactériennes nous a montré plusieurs profils de résistance et de sensibilités entre les différentes souches isolées (**Figure N°29**)

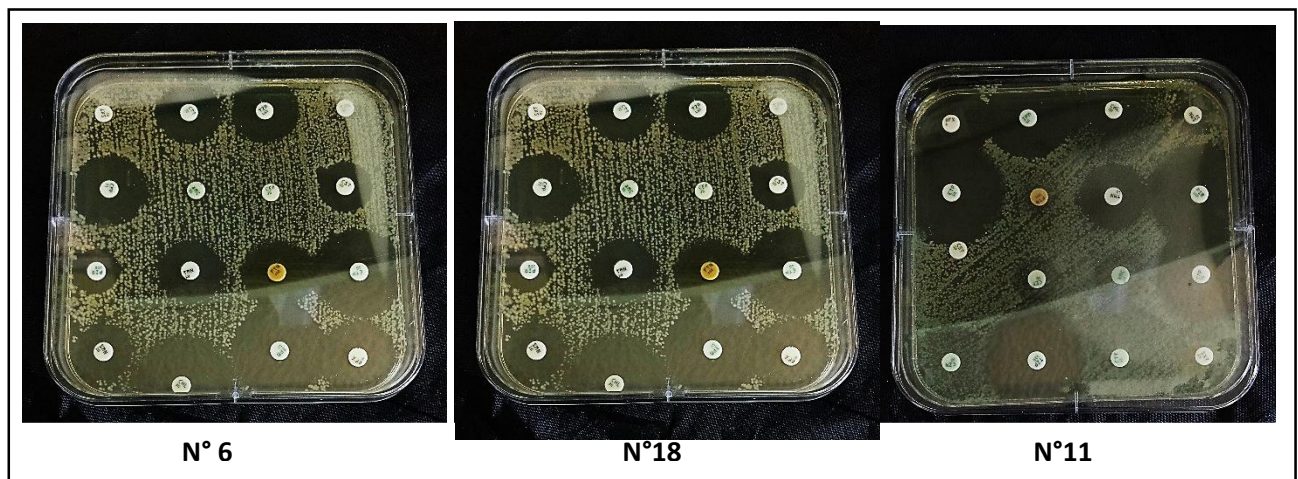


Figure n°29 : Profil de résistance des bactéries Gram (-)

Chez les bactéries à Gram positif, nous avons remarqué que le profil de résistance des souches étaient le même, à quelques exceptions (**Figure N°30**).

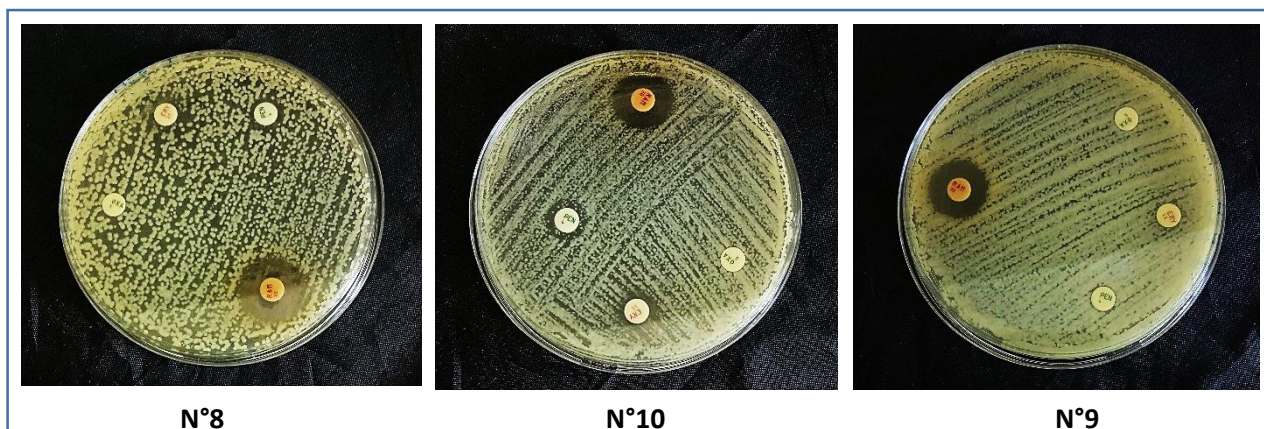


Figure n°30 : Profil de résistance des bactéries Gram (+)

Les données recueillies par ces boîtes nous ont permis de classer ces souches bactériennes selon leur profil de résistance à savoir, de la plus sensible à la plus résistante chez les Gram(-) et de la plus résistante à la plus sensible chez les bactéries à Gram (-) (**Tableau N°7**).

Tableau n°7 : Profil global de résistance des bactéries Gram (+) et Gram (-)

ID	Profil de résistance des bactéries Gram (-)															
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
2	<i>Pantoea spp</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
6	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
16	<i>Shigella group</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
18	<i>Citrobacter freundii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
20	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
5	<i>Providencia stuartii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
15	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
22	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
14	<i>Escherichia Coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
Profil de résistance des bactéries Gram (+)																
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	R	R											
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	R	R											
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	R	R											
12	<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	R	R											
1	<i>Staphylococcus warneri</i>	S	R	R	R											
4	<i>Micrococcus luteus</i>	S	R	R	R											
19	<i>Enterococcus faecium</i>	S	R	R	R											
17	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R											
23	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R											

R : résistant **S** : sensible

Le tableau ci-dessus nous présente le profil de résistance des bactéries Gram- et des bactéries Gram+ que nous avons testé.

Chez les Gram-, on remarque que le profil de résistance des souches varie entre 0 pour la souche *Pseudomonas aeruginosa* de l'échantillon N°7, et 8 sur 16 pour *Pseudomonas aeruginosa* de l'échantillon N°11, tous les deux échantillons étant issus de prélèvement par compresse. Les profils moyens de résistance varient entre 5 pour *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* de l'échantillon N°6, et 7 pour *Sphingomonas paucimobilis* de l'échantillon N°15.

Chez les bactéries Gram+, le profil de résistance est très élevé par rapport aux antibiotiques testés. On remarque que les *Staphylococcus aureus* des échantillons N° 7,13,2 et 6 sont résistant à tous les antibiotiques testés, et que seul le *Staphylococcus aureus* de l'échantillon N°23 a une résistance très faible de 1 sur 4 antibiotiques testés. Cela montre que les bactéries à Gram+ présente une résistance élevée vis-à-vis des antibiotiques que nous avons testés et cela avec des diamètres d'inhibition de 0 pour les *S. aureus* les plus résistants.

IV.3- Profil phénotypique des bactéries aux antibiotiques testés

Les différents profils phénotypique des bactéries Gram + et Gram – sont résumés dans le tableau ci-dessous (**Tableau N°8**) :

Tableau n°8 : Profil phénotypique des bactéries Gram+ et Gram- aux antibiotiques

Type de paroi	Identifiant des isolats	Souche identifiée	Phénotype de résistances
Gram -	14	<i>Escherichia Coli</i>	Ofx, Smn, Pir, Cef, Amc, Cfp, Ctt, Sxt
	21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ofx, Smn, Pir, Cef, Amc, Cfp, Ctt, Sxt
	11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Smn, Ftn, Cst, Cef, Amc, Czn, Ctt, Sxt
	22	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	Chl, Smn, Ftn, Cef, Amc, Czn, Ctt
	15	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Chl, Smn, Ftn, Cst, Cef, Amc, Sxt
	5	<i>Providencia stuartii</i>	Smn, Ftn, Cst, Cef, Amc, Czn, Sxt
	20	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Tmn, Cst, Cef, Amc, Czn, Ctt
	3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ftn, Cef, Amc, Czn, Ctt
	18	<i>Citrobacter freundii</i>	Pir, Cef, Amc, Czn, Sxt
	16	<i>Shigella group</i>	Chl, Smn, Ftn, Cst, Sxt
	6	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	Pir, Cef, Amc, Czn, Sxt
	2	<i>Pantoea spp</i>	Cef, Amc, Czn
	13	<i>Proteus mirabilis</i>	Cst
	7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
Gram+	8	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ram, Oxa, Ery, Pen
	9	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ram, Oxa, Ery, Pen
	10	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ram, Oxa, Ery, Pen
	12	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ram, Oxa, Ery, Pen
	1	<i>Staphylococcus warneri</i>	Oxa, Ery, Pen
	4	<i>Micrococcus luteus</i>	Oxa, Ery, Pen
	19	<i>Enterococcus faecium</i>	Oxa, Ery, Pen
	17	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ery, Pen
	23	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pen

Ce tableau nous révèle les différents antibiotiques aux quel les bactéries sont résistantes. Nous nous sommes basé sur les normes du CLSI pour déterminer le profil de résistances et de sensibilité des bactéries aux antibiotiques. En effet, nous pouvons observer chez les bactéries Gram (-), des profils très élevés chez *E coli* (14) et *P aeruginosa* (21 et 11) avec une gamme de 8 antibiotiques sur les 16 testés avec des diamètres d'inhibitions faible de l'ordre de 0 mm pour la Streptomycin (Smn) et la Trimethoprim+ Sulfamethoxazole (SXT), et 12 mm pour la Piperacillin (Pir), inférieurs à 14 mm pour les résistants (CLSI, 2014).

On peut aussi remarquer chez les bactéries Gram +, le profil très élevé en majorité chez les *Staphylococcus aureus* avec des diamètres d'inhibitions de l'ordre de 0 mm pour Oxacillin (Oxa) et Erythromycin (Ery) ; et de (0-10 mm) pour la penicilline (Pen), inférieurs à 28 mm pour les résistants (CLSI, 2014).

Les résultats observés dans les tableaux N°7 et 8 nous montre le fort pouvoir de résistance que possèdent les bactéries isolées des infections post-opératoire des services de chirurgie du Centre Hospitalier Régionale Amissa Bongo (CHRAB) de Franceville.

IV.4- Etude du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

L'étude du pouvoir antibactérien de *Thymus vulgaris* a été faite sur une dizaine de souches sélectionnées pour leurs différents profils de résistance :

- Les souches : *Pseudomonas aeruginosa* (**Echantillon N°11**) ; *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* (**Echantillon N°22**) *Escherichia Coli* (**Echantillon N°14**) et

Providencia stuartii (**Echantillon N°5**) ont été sélectionnés chez les Gram(-) en raison de leur fort profil de résistance de 8 et 7 antibiotiques sur les 16 testés ; et *Staphylococcus aureus* (**Echantillon N°9**) chez les Gram (+) pour son profil de 4 sur les 4 testés.

- Les souches : *Citrobacter freundii* (**Echantillon N°18**) et *Shigella group* (**Echantillon N°16**) chez les Gram (-) ont été choisie en raison de leur profil de 5 (moyen) de résistance sur les 16 antibiotiques testés.
- Enfin Les souches : *Pseudomonas aeruginosa* (**Echantillon N°7**), *Proteus mirabilis* (**Echantillon N°13**) pour son profil de 1 résistances sur les 16 testés ; *Escherichia COLI ATCC25922* (**Souche de référence**) chez les Gram (-) pour leur très faible potentiel de résistance face aux antibiotiques testé. Et *Staphylococcus aureus* (**Echantillon N°23**) chez les Gram (+).

IV.4.1- L'antibio-aromatogramme

Selon Ponce et al., (2003), la sensibilité d'une souche microbienne à une huile essentielle a été classée par rapport au diamètre des halos d'inhibition en non sensible ; sensible ; très sensible et extrêmement sensible (**Tableau N°10**).

Tableau n°9: Normes de phénotypes par rapport aux huiles essentielles (Ponce et al., 2003).

Phénotype	Diamètre d'inhibition (mm)	Sigle
Non sensible	< 8	(-)
Sensible	8 à 14	(+)
Très sensible	15 à 19	(++)
Extrêmement sensible	> 20	(+++)

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode d'antibio-aromatogramme de *Thymus vulgaris* sur les dix (10) souches sélectionnées plus la souche de référence *E coli ATCC25922*, sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°10 : Résultats du test de l'activité antibactérien de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* exprimés par des diamètres d'inhibition en mm

Souches bactérienne	Numéro d'échantillon	Diamètre d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> (mm)	Témoin (Eau)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	10 (+)	0
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	22	10 (+)	0
<i>Escherichia coli</i>	14	30 (+++)	0
<i>Providencia stuartii</i>	5	40 (+++)	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	28 (+++)	0
<i>Citrobacter freundii</i>	18	25 (+++)	0
<i>Shigella group</i>	16	45 (+++)	0
<i>Proteus mirabilis</i>	13	46 (+++)	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	32 (+++)	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	30 (+++)	0
<i>Ecoli ATCC25922</i>	Reference	35 (+++)	0

(-) non sensible ; (+) sensible ; (++) très sensible ; (+++) extrêmement sensible.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* montre qu'elle possède un effet inhibiteur notable avec des diamètres variant de 10 à 45 mm sur les souches.

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a montré une forte activité avec un phénotype d'extrêmement sensible selon (Ponce et al., 2003), sur les souches bactériennes telles qu'*Escherichia coli* (14) avec 30 mm (**Figure N°31**), *Pseudomonas aeruginosa* (7) avec 32 mm

(**Figure N°32**), *Staphylococcus aureus* (9) avec 28 mm (**Figure N°33**), *Providencia stuartii* (5) avec 40 mm (**Figure N°34**), *Citrobacter freundii* (18) avec 25 mm (**Figure N°35**), *Shigella group* (16) avec le diamètre le plus grand observé de 45 mm (**Figure N°36**). Des résultats similaires ont été observés dans les travaux **Yakhlef et al (2011)** et **Cheurfa et al (2013)** qui ont travaillé sur la même plante et ont trouvés des diamètres de l'ordre de 33 mm pour *E coli*, 16 mm pour *P. aeruginosa* ce qui est nettement la moitié de celui que nous avons trouvés, sachant que notre souche s'est montrée sensible à tous les 16 antibiotiques que nous avons testés ce qui confirme donc sa sensibilité extrême. Leurs travaux ont aussi relevés des diamètres de 42 mm pour *S aureus*, 27 mm *Citrobacter freundii*, contre respectivement 28 mm pour notre souche *S aureus* qui a été résistante à tous les 4 ATB que nous avons testé ; et 25 mm que présentent nos souches, ce qui montre un profil de résistance plus élevé d'autant plus que ces bactéries se sont montrés très résistantes lors du test de l'antibiogramme avec une résistance de 5 ATB sur les 16 testés pour *C freundii*.

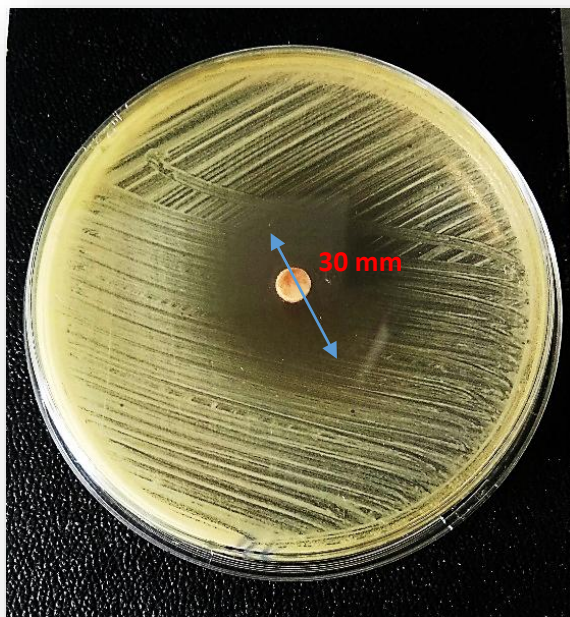


Figure n°31 : Diamètre d'inhibition de *Thymus vulgaris* sur *E. coli*

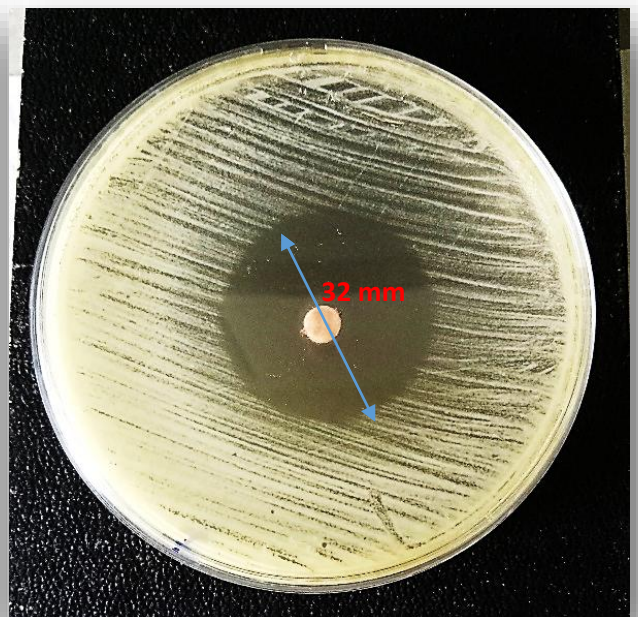


Figure n°32 : Diamètre d'inhibition de *Thymus vulgaris* sur *P. aeruginosa*

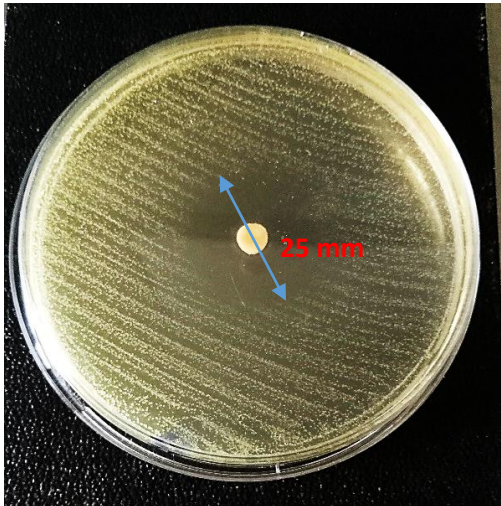


Figure n°33 : Diamètre d'inhibition de *Thymus vulgaris* sur *S. aureus*

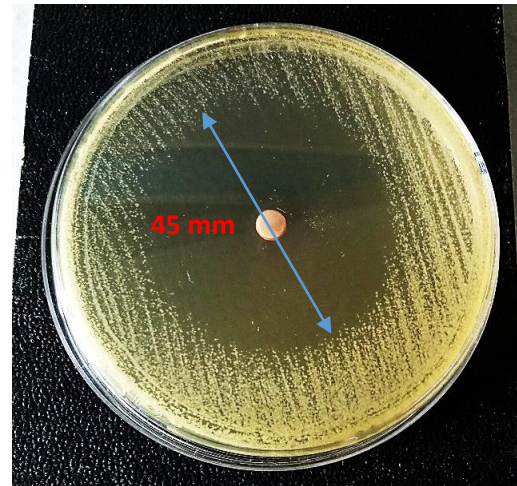


Figure n°34 : Diamètre d'inhibition de *Thymus vulgaris* sur *P. stuartii*

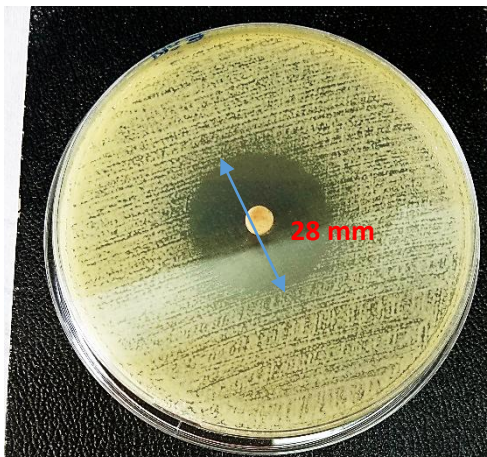


Figure n°35 : Diamètre d'inhibition de *Thymus vulgaris* sur *C. freundii*

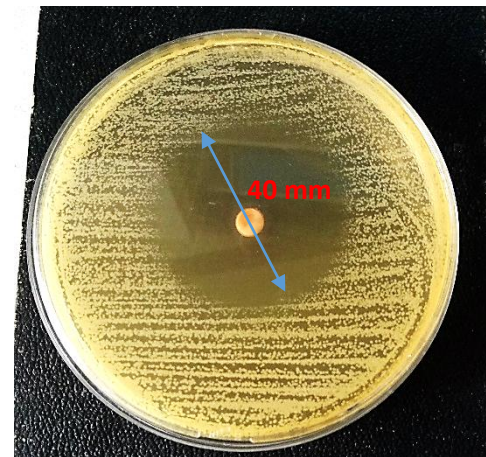


Figure n°36 : Diamètre d'inhibition de *Thymus vulgaris* sur *Shigella group*

Les plus faibles diamètres d'inhibition ont été observés chez *Pseudomonas aeruginosa* (11) et *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* (22) tous deux avec un diamètre de 10 mm (Figure N°37 et 38) ce qui témoigne tout de même d'un phénotype dit de sensible selon Ponce et al.,(2003). Des résultats rapportant 28 mm de diamètre ont été retrouvés dans les travaux de Cheurfa et al (2013) qui a testé l'efficacité de *Thymus vulgaris* sur la souche *K. pneumoniae ssp pneumoniae*, ce qui montre une meilleure efficacité par rapport à notre souche. Aussi, on retrouve dans les résultats obtenues par OBAME, (2009), une souche hospitalière de *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 28 mm, qui a étudié l'activité

antibactérienne des huiles essentielles d'*Aucoumea klaineana* sur des bactéries hospitalières au Gabon. Ces résultats montrent l'efficacité de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* face aux bactéries résistante, alors que les souches (11) et (22) présentaient chez les bactéries gram négatif, les profils les plus résistants de notre échantillonnage dans le test de l'antibiogramme avec 8 résistances sur les 16 ATB testés pour *P aeruginosa* (11) et 7 résistances sur 16 ATB testés pour *K. pneumoniae ssp pneumoniae* (22).

La souches de référence *Ecoli ATCC25922* quant à elle présente une extrême sensibilité selon **Ponce et al.,(2003)** à l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* avec un diamètre d'inhibition de 35 mm (**Figure N°39**). **Al-maqtari et al. (2011)** ainsi que **Benchibout (2015)** ont effectués les mêmes tests sur la même souche bactérienne et ont rapportés un diamètre d'inhibition de 24 mm qui est nettement inférieur à celui que nous avons retrouvé chez cette souche. Toutefois, nos résultats coïncident avec les travaux de **Cheurfa et al (2013)**, qui ont retrouvé chez *Thymus vulgaris* pour la même souche, un diamètre d'inhibition de 32 mm.



Figure n°37 : Diamètre d'inhibition de *Thymus vulgaris* sur *P. aeruginosa* (11)

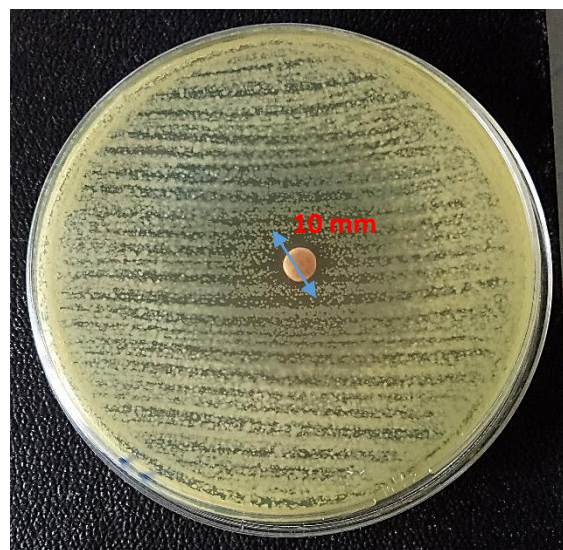


Figure n°38 : Diamètre d'inhibition de *Thymus vulgaris* sur *K. pneumoniae ssp pneumoniae* (22)

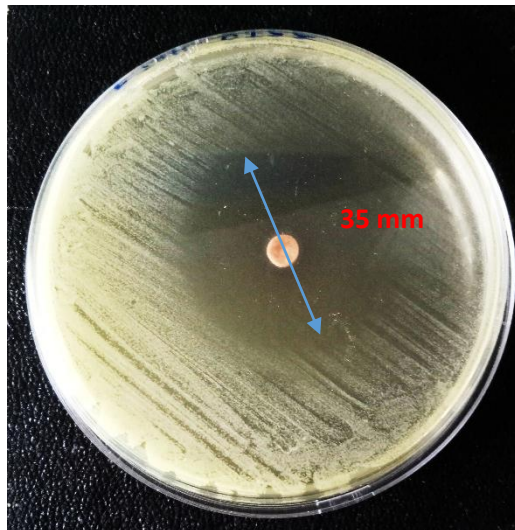


Figure n°39 : Diamètre d'inhibition de *Thymus vulgaris* sur *E. coli* ATCC25922

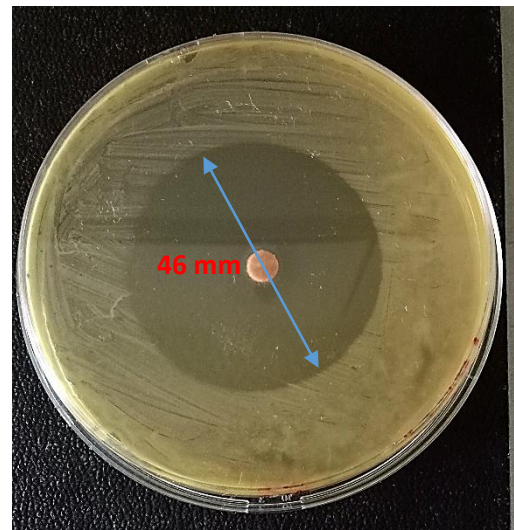


Figure n°40 : Diamètre d'inhibition de *Thymus vulgaris* sur *Proteus mirabilis*

L'effet de *Thymus vulgaris* sur la souche *Proteus mirabilis* a été très significatif avec un diamètre d'inhibition de 46 mm (**Figure N°40**) ce qui représente une meilleure efficacité comparé au diamètre de 30 mm rapporté par **Benchibout en 2015** dans ses travaux sur la même plante et la souche de référence *Proteus mirabilis* ATCC35659.

Chapitre V

Conclusion et perspectives

Dans le présent travail, nous avons pour objectif premièrement d'isoler et identifier les germes présents et responsables des infections post-opératoire chez les patients internés au Centre Hospitalier Régional Amissa Bongo (CHRAB), au service de chirurgie, grâce à des prélèvements issus de pus et de compresse, puis évaluer leur profil de résistance face aux antibiotiques utilisés pour les traiter et par la suite, tester l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur ces germes résistant aux antibiotiques utilisés.

Les résultats de l'identification indiquent que, le *Staphylococcus aureus* était la souche à gram positif la plus prédominante et retrouvée le plus dans les pus suivie de quelques Entérobactéries telles que *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Pantoea spp*, *Providencia stuartii*, *shigella group* et d'autres bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Sphingomonas paucimobilis*. Ces germes étant pour la plus part des pathogènes stricte telle que *Shigella*, *Escherichia coli* ; des pathogènes opprtunistes teles que *Staphylococcus aureus* et *K. pneumoniae ssp pneumoniae* et des saprofites comme *providencia stuartii* et *proteus mirabilis*.

Le test de l'antibiogramme sur ces germes a révélé une résistance assez variée avec des germes très sensibles comme *Proteus mirabilis*, et *Pseudomonas aeruginosa* ; des résistances moyennes avec *Citrobacter freundii* et *Sigella group* et enfin une résistance assez élevée retrouvée chez *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et les *Staphylococcus aureus*. Avec des diamètres de zéro (0), ce qui montre une multirésistance élevée.

Nous avons constaté que l'huile essentielle de thym, dont le composé majoritaire est de nature phénolique, a un large spectre d'inhibition comprenant des bactéries résistantes Gram négatif et Gram positif ; ces dernières ont montré une grande sensibilité avec des diamètres d'inhibitions allant de 10 mm pour les *Staphylococcus aureus* à 46 mm pour *Proteus mirabilis*, traduisant ainsi des phénotypes qualifiés d'extrêmement sensible selon **Ponce et al.,(2003)**.

Aussi, la diversité des diamètres d'inhibition nous a fait constater que celui-ci vari selon le degré de résistance de la bactérie. En effet, plus la bactérie est résistante à des antibiotiques et plus le diamètre d'inhibition de *Thymus vulgaris* tend à diminuer et donc son efficacité.

La conclusion de cette étude nous permet de dégager un certains nombres de perspectives faisant suite à ce travail. Ainsi, nous envisageons de :

- ✓ Déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.
- ✓ Evaluer la toxicité chronique des extraits et de l'huiles essentielles de *Thymus vulgaris* sur différentes lignées cellulaires *in vitro* et sur des modèles utilisant les animaux afin de déterminer les doses thérapeutiques et les doses létales car les remèdes traditionnels souffrent beaucoup du problème de dosages.
- ✓ Rechercher l'activité antivirale,
- ✓ Rechercher l'activité antiinflammatoire,
- ✓ Rechercher l'activité antidiabétique,
- ✓ Rechercher l'activité anti hypertensive,

Les huiles essentielles, les extraits méthanoliques et aqueux peuvent être utilisés potentiellement comme des agents naturels antimicrobiens et antioxydants contre des maladies infectieuses chez l'homme. Le développement de tels agents naturels aidera à résoudre aussi des problèmes de l'environnement causés par les produits et les médicaments de synthèse tels que la pollution et la résistance de certains microorganismes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **AIT-OUAZZOU, A., LORÁN, S., ARAKRAK, A., LAGLAOUI, A., ROTA, C., HERRERA, A., PAGÁN, R. & CONCHELLO, P. 2012.** Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, 45, 313-319.
- **ALI, B. 2012.** Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *foeniculum vulgare* Mill.
- **AMIOT, J., SALMON, Y., COLLIN, C. & THOMPSON, J. D. 2005.** Differential resistance to freezing and spatial distribution in a chemically polymorphic plant *Thymus vulgaris*. *Ecology Letters*, 8, 370-377.
- **ARLET, G. 2016.** Les microbes Microbiologie médicale. In: CURIE, U. P. E. M. (ed.). UMPC.
- **AROMA, Y. 2017.** *methode d'extraction* [Online]. Available: <https://www.zayataroma.com/fr/methodes-dextraction> [Accessed 21/03 2017].
- **BALLADIN, D. A. & HEADLEY, O. 1999.** Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris* Linne) herbs. *Renewable Energy*, 17, 523-531.
- **BARBUT, F., CARBONNE, B., TRUCHOT, F., SPIELVOGEL, C., JANNET, D., GODEREL, I., LEJEUNE, V. & MILLIEZ, J. 2004.** Infections de site opératoire chez les patientes césariées: bilan de 5 années de surveillance. *Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction*, 33, 487-496.
- **BELAICHE, P. 1979.** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie : l'aromatogramme. *Maloine*. Paris.
- **BENAISSI, K. 2013.** Le CO₂ supercritique appliqué à l'extraction végétale. *Technique de l'ingénieur*.
- **BENCHIBOUT, C. 2015.** *Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de Juniperus phoenicea et Thymus vulgaris de la forêt de Ouilis (Mostaganem)*. Master, Université de Mostaganem.
- **BERNARD, T., PERINEAU, F., BRAVO, R., DELMAS, M. & GASET, A. 1988.** Extraction des huiles essentielles: chimie et technologie. *Informations chimie*, 179-184.
- **BESOMBES, C. 2008.** *Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo-mécanique d'herbes aromatiques: applications généralisées*. La Rochelle.
- **BIOLOGIQUEMENT. 2012.** *DESCRIPTION ET CULTURE DU THYM THYMUS VULGARIS* [Online]. Available: <https://www.thym.biologique.bio/description-culture/> [Accessed 04/03/2017].

Références bibliographiques

- **BONDY, S. C. & LEE, D. K. 1993.** Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain research*, 610, 229-233.
- **BONNET, J. 2014.** *Utilisation raisonnée des antibiotiques en élevage porcin. Démarche d'accompagnement dans sept élevages.*
- **BORENS, O., NUSSBAUMER, F., BAALBAKI, R. & TRAMPUZ, A. 2009.** Update on implant related infections in orthopaedic surgery. Diagnosis and treatment. *Revue médicale suisse*, 5, 2563-2568.
- **BOTINEAU, M. 2010.** *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*, Tec & doc.
- **BRUNETON, J. 1999.** Pharmacognosie. *Phytochimie. Plantes médicinales, Paris, Ed. Tec-Doc.*
- **BURT, S. 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94, 223-253.
- **BURT, S. A. & REINDERS, R. D. 2003.** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in applied microbiology*, 36, 162-167.
- **CARMO, E. S., LIMA, E. D. O. & SOUZA, E. L. D. 2008.** The potential of *Origanum vulgare* L.(Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 362-367.
- **CARSON, C. F., MEE, B. J. & RILEY, T. V. 2002.** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46, 1914-1920.
- **CHALCHAT, J.-C., GARRY, R.-P., MENUT, C., LAMATY, G., MALHURET, R. & CHOPINEAU, J. 1997.** Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *Journal of essential oil research*, 9, 67-75.
- **CIRMF GABON, F. 2017.** *Présentation du centre internationale de recherche médicale de Franceville (CIRMF)* [Online]. Available: http://www.cirmf.ga/?page_id=944 [Accessed 05/05 2017].
- **CLSI 2014.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. 230.
- **CORNICHON, B. E. 2017.** *THYM* [Online]. Available: <http://binette-et-cornichon.com/p/thym/> [Accessed 04/03 2017].

- **COX, S., MANN, C., MARKHAM, J., BELL, H., GUSTAFSON, J., WARMINGTON, J. & WYLLIE, S. 2000.** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of applied microbiology*, 88, 170-175.
- **DORMAN, H. & DEANS, S. 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88, 308-316.
- **DUBEY, V. S., BHALLA, R. & LUTHRA, R. 2003.** An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of biosciences*, 28, 637-646.
- **EL HAIB, A. 2011.** *Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques*. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- **ENNIGROU, S., MOKHTAR, L., BEN ALAYA, N., DZIRI, C., CHERIF, A., NAJAH, N., BEN REDJEB, S. & ZOUARI, B. 2000.** Etude de l'incidence et approche du surcoût des infections nosocomiales en chirurgie générale. *Tunisie médicale*, 78, 628-633.
- **FEHR, J., HATZ, C., SOKA, I., KIBATALA, P., URASSA, H., SMITH, T., MSHINDA, H., FREI, R. & WIDMER, A. 2006.** Risk factors for surgical site infection in a Tanzanian district hospital: a challenge for the traditional National Nosocomial Infections Surveillance system index. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 27, 1401-1404.
- **FILLATRE, Y. 2011.** *Produits phytosanitaires: Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem*. Université d'Angers.
- **GABON NEWS, L. 2013.** *CHR-FCV — Centre Hospitalier Régional de Franceville (CHR Amissa Bongo)* [Online]. Libreville. Available: <http://www.mibsante.com/annuaires/institution/3496/> [Accessed 30/04 2017].
- **GARCIA-GARROTE, F., CERCENADO, E. & BOUZA, E. 2000.** Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *Journal of clinical microbiology*, 38, 2108-2111.
- **GARY, A. K. I., SCHLUETTER, J.-U. & BRUMFIELD, H. 2004.** Click based trading with intuitive grid display of market depth. Google Patents.
- **GIRAULT, M. & BOURGEON, J. 1971.** Les cahiers de biothérapie. *N o*, 29.

Références bibliographiques

- **GOETZ, P. & GHEDIRA, K. 2012.** *Thymus vulgaris* L.(Lamiaceae): Thym. *Phytothérapie anti-infectieuse*, 357-365.
- **GOOGLE MAP, F. 2013.** *Itineraire entre le Centre Internationale de Recherche Medicale de Franceville et L'Hopital Amissa bongo* [Online]. Available: <https://www.google.com/maps/place/Franceville,+Gabon/@-1.6214241,13.5074302,12z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x1a7082d6ed917f39:0x6160dc5d3b37a873!8m2!3d-1.6196441!4d13.6015463> [Accessed 30/04 2017].
- **GUINOISEAU, E. 2010.** *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: Séparation, identification et mode d'action.* Université de Corse.
- **GUSTAFSON, J., LIEW, Y., CHEW, S., MARKHAM, J., BELL, H., WYLLIE, S. & WARMINGTON, J. 1998.** Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in applied microbiology*, 26, 194-198.
- **HADDAD, M., HERENT, M.-F., TILQUIN, B. & QUETIN-LECLERCQ, J. 2007.** Effect of gamma and e-beam radiation on the essential oils of *Thymus vulgaris thymoliferum*, *Eucalyptus radiata*, and *Lavandula angustifolia*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55, 6082-6086.
- **HAJJAR, J., GIRARD, R., HERNIGOU, E., POURRIAT, J., POULIN, J., JAULIN, L., TROADEC, M., AUBOYER, C., GUILLOT, B. & DUFRAISSE, G. 2000** Surveillance des infections nosocomiales liées à l'anesthésie. Etude multicentrique. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation.*, Elsevier, 47-53.
- **HELANDER, I. M., ALAKOMI, H.-L., LATVA-KALA, K., MATTILA-SANDHOLM, T., POL, I., SMID, E. J., GORRIS, L. G. & VON WRIGHT, A. 1998.** Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46, 3590-3595.
- **HERBORISTERIE, F. 2017.** *Tisane Thym Mondé Extra feuille ENTIERE 1 KILO Thymus vulgaris* [Online]. Available: <http://www.france-herboristerie.com/tisanes-plantes-simples/357455-thym-monde-extra-feuille-entiere-100-g-thymus-vulgaris-3000000009598.html>.
- **HIDRON, A. I., EDWARDS, J. R., PATEL, J., HORAN, T. C., SIEVERT, D. M., POLLOCK, D. A. & FRIDKIN, S. K. 2008.** Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 29, 996-1011.
- **HYNES, R. O. 1992.** Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.
- **ISÉRIN, P., MASSON, M. & KEDELLINI, J. 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales, Identifications, Préparations. *Soins*.

- **JEAN, B. 2009.** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*, Lavoisier.
- **KABOUCHE, A., BOUTAGHANE, N., KABOUCHE, Z., SEGUIN, E., TILLEQUIN, F. & BENLABED, K. 2005.** Components and antibacterial activity of the roots of *Salvia jaminiana*. *Fitoterapia*, 76, 450-452.
- **KEHAL, F. 2013.** *Utilisation de l'huile essentielle de citrus limon comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche*. Magister Memoire de Magister, Constantine 1.
- **KOUDOU, P. J. 2009.** *Etude phytochimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes de quelques plantes aromatiques et médicinales africaines*. Université de Ouagadougou.
- **KYU-HO, B., DONG-WON, L., HEE-MOON, P. & YOUNG-HA, R. 2000.** Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64, 1061-1063.
- **LI, M., CHA, D. J., LAI, Y., VILLARUZ, A. E., STURDEVANT, D. E. & OTTO, M. 2007.** The antimicrobial peptide-sensing system aps of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, 66, 1136-1147.
- **LING, T. K., TAM, P., LIU, Z. & CHENG, A. F. 2001.** Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*, 39, 2964-2966.
- **LORTAT-JACOB, A., BORNERT, D., COIGNARD, S. & BEAUFILS, P. 1987.** Infection post-opératoire des fractures de l'extrémité supérieure du fémur. *Revue de chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil moteur*, 73, 179-187.
- **LUCCHESI, M.-E. 2005.** *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles*. Université de la Réunion.
- **MAHMOUT, Y. 1992.** *Contribution à l'étude de quelques aromates et condiments utilisés au Tchad*.
- **MANGRAM, A. J., HORAN, T. C., PEARSON, M. L., SILVER, L. C., JARVIS, W. R. & COMMITTEE, H. I. C. P. A. 1999.** Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. *American journal of infection control*, 27, 97-134.
- **MC DERMOTT, P. F., WALKER, R. D. & WHITE, D. G. 2003.** Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *International journal of toxicology*, 22, 135-143.

Références bibliographiques

- MICHEL, P. 2015. *Lacellule* [Online]. Available: http://mpronovost.profweb.ca/BIO/NP1/bionp1_cellule.html [Accessed 23/05 2017].
- MISTELI, H., WIDMER, A. F., ROSENTHAL, R., OERTLI, D., MARTI, W. R. & WEBER, W. P. 2011. Spectrum of pathogens in surgical site infections at a Swiss university hospital. *Swiss Med Wkly*, 140, w13146.
- MOKADDEM-DAROUI, H., TOUAFEK, O., KABOUCHE, A., KABOUCHE, Z., CALLISTE, C. & DUROUX, J. 2012. Components and antioxidant activity of the polar extracts of *Chrysanthemum trifurcatum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 1-2.
- MORALES, R., STAHL BISKUP, E. & SÁEZ, F. 2002. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. *Thyme: the genus Thymus*, 1-43.
- MUNITA, J. M. & ARIAS, C. A. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 4, 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- NAGANUMA, M., HIROSE, S., NAKAYAMA, Y., NAKAJIMA, K. & SOMEYA, T. 1985. A study of the phototoxicity of lemon oil. *Archives of dermatological research*, 278, 31-36.
- NAIT ACHOUR, K. 2012. Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces d'eucalyptus poussant dans la région de Tizi Ouzou. 2012 ed. Université Mouloud Mameri-Tizi Ouzou Algérie.
- NTEZURUBANZA, L. 2000. Les Huiles essentielles du Rwanda, Ed. Laseve, UQUAC, Québec, Canada.
- OKEKE, I. N., LAXMINARAYAN, R., BHUTTA, Z. A., DUSE, A. G., JENKINS, P., O'BRIEN, T. F., PABLOS-MENDEZ, A. & KLUGMAN, K. P. 2005. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *The Lancet infectious diseases*, 5, 481-493.
- OZCAN, M. & CHALCHAT, J.-C. 2004. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 30, 68-73.
- PARFUMEUR, F. 2017. *Extraction par solvant volatils* [Online]. Available: <https://www.fragonard.com/fr/extraction-par-solvants-volatils> [Accessed 21/03 2017].
- PINA-VAZ, C., GONÇALVES RODRIGUES, A., PINTO, E., COSTA-DE-OLIVEIRA, S., TAVARES, C., SALGUEIRO, L., CAVALEIRO, C., GONCALVES, M. & MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. 2004. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 18, 73-78.

Références bibliographiques

- **PONCE, A., FRITZ, R., DEL VALLE, C. & ROURA, S. 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36, 679-684.
- **POURMORTAZAVI, S. M. & HAJIMIRSADEGHI, S. S. 2007.** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of chromatography A*, 1163, 2-24.
- **RAYMOND, M. 2005.** L'aromathérapie chez le nourrisson et le petit enfant. Thèse de Dr en pharmacie, 101p, 11/2005, Université de Nantes.
- **REDDY, K. S. & YUSUF, S. 1998.** Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries. *Circulation*, 97, 596-601.
- **ROSELLI, M., CEREDA, V., DI BARI, M. G., FORMICA, V., SPILA, A., JOCHEMS, C., FARSACI, B., DONAHUE, R., GULLEY, J. L. & SCHLOM, J. 2013.** Effects of conventional therapeutic interventions on the number and function of regulatory T cells. *Oncoimmunology*, 2, e27025.
- **SABU, M. & KUTTAN, R. 2002.** Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 155-160.
- **SANTÉ, P. E. 2017.** *Huiles essentielles : faut-il redouter leur toxicité ?* [Online]. Available: <http://www.plantes-et-sante.fr/decouvrir/huiles-essentielle-faut-il-redouter-leur-toxicite> [Accessed 27/03 2017].
- **SCHRECKENBERGER, P., RISTOW, K. & KRILCICH, A.** Comparison of the Vitek Legacy, Vitek 2 Colorimetric AND Phoenix Systems for Identification of Fermenting and Non-Fermenting Bacteria of Clinical Origin. 105th General Meeting of the American Society for Microbiology, USA, 2005.
- **SIEVERT, D. M., RICKS, P., EDWARDS, J. R., SCHNEIDER, A., PATEL, J., SRINIVASAN, A., KALLEN, A., LIMBAGO, B. & FRIDKIN, S. 2013.** Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34, 1-14.
- **SIMON, F., PAROLA, P., GRANDADAM, M., FOURCADE, S., OLIVER, M., BROUQUI, P., HANCE, P., KRAEMER, P., MOHAMED, A. A. & DE LAMBALLERIE, X. 2007.** Chikungunya infection: an emerging rheumatism among travelers returned from Indian Ocean islands. Report of 47 cases. *Medicine*, 86, 123-137.

Références bibliographiques


- **SKANDAMIS, P., TSIGARIDA, E. & NYCHAS, G. E. 2002.** The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*, 19, 97-103.
- **SMALL, F. M. & GRIVELL, R. M. 2014.** Antibiotic prophylaxis versus no prophylaxis for preventing infection after cesarean section. *Cochrane Database Syst Rev*, 10, CD007482.
- **SMITH, C. K., MOORE, C. A., ELAHI, E. N., SMART, A. T. & HOTCHKISS, S. A. 2000.** Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol. *Toxicology and applied pharmacology*, 168, 189-199.
- **SOINS ET NATURE, F. 2017.** *Pharmacie Française ; spécialisée dans les produits de soins naturels* [Online]. Available: <https://www.soin-et-nature.com/fr/>.
- **SWISS, N. 2016.** *Le thym commun (Thymus vulgaris – appelé également thym des jardins, pote, farigoule, barigoule, mignotise des Génevois)* [Online]. Available: <http://www.desintoxication.info/le-thym-commun/> [Accessed 05/03/2017 2017].
- **THÉRIAULT, W. 2015.** Évaluation de l'acquisition de la résistance à la colistine chez *Escherichia coli* O149 chez le porc.
- **TOURÉ, F., LAVAUD, S., MOHAJER, M., LAVAUD, F., CANIVET, E., NGUYEN, P., CHANARD, J. & RIEU, P. 2004.** Icodextrin-induced peritonitis: study of five cases and comparison with bacterial peritonitis. *Kidney international*, 65, 654-660.
- **ULTEE, A., KETS, E. & SMID, E. 1999.** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 65, 4606-4610.
- **ULTEE, A., KETS, E. P., ALBERDA, M., HOEKSTRA, F. A. & SMID, E. J. 2000.** Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of microbiology*, 174, 233-238.
- **ULTEE, A. & SMID, E. 2001.** Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International journal of food microbiology*, 64, 373-378.
- **VALERO, M. & SALMERON, M. 2003.** Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International journal of food microbiology*, 85, 73-81.
- **WAFAE, A., FOUAD, B., ABDERRAHMANE, R., MARTINA, H., JUERGENWANNER, E. & JIROVETZ, S. A. L. 2016.** *Chemical Composition and Anti-inflammatory Activity of Algerian Thymus vulgaris L. Essential Oil*. 11.

- **WEINSTEIN, R. A., GAYNES, R. & EDWARDS, J. R. 2005.** Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clinical infectious diseases*, 41, 848-854.
- **WISEMAN, R. W., MILLER, E. C., MILLER, J. A. & LIEM, A. 1987.** Structure-activity studies of the hepatocarcinogenicities of alkenylbenzene derivatives related to estragole and safrole on administration to preweanling male C57BL/6J× C3H/HeJ F1 mice. *Cancer Research*, 47, 2275-2283.
- **YAKHLEF, G. 2010.** *ETUDE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES EXTRAITS DE FEUILLES DE Thymus vulgaris L. ET Laurus nobilis L.* Université de Batna 2.
- **YARO, M. 2017.** IDENTIFICATION DES ENTEROBACTERIES DANS LES ECBU AU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE (URAM/CIRMF) PAR LE VITEK® 2 COMPACT 15.
- **ZU, Y., YU, H., LIANG, L., FU, Y., EFFERTH, T., LIU, X. & WU, N. 2010.** Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules*, 15, 3200-3210.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Fiche de prélèvement

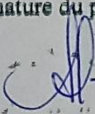
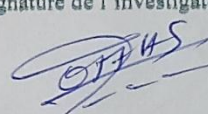
 **CENTRE INTERNATIONAL
DE RECHERCHES MÉDICALES DE FRANCEVILLE
GABON**

FICHE INDIVIDUELLE PATIENT

Consentement du Patient

NOM : NDJILA
PRENOM : Marianne
SEXE : Masculin Féminin
ÂGE : 58 ans
ADRESSE :
TEL : 02 96 39 28

Les informations relatives à l'étude sur la recherche des bactéries résistantes en milieu hospitalier m'ont été expliquées. J'ai obtenu satisfaction à toutes les questions que j'ai posées.
J'accepte librement et volontairement de participer à cette étude.

Signature du participant  Signature de l'investigateur 

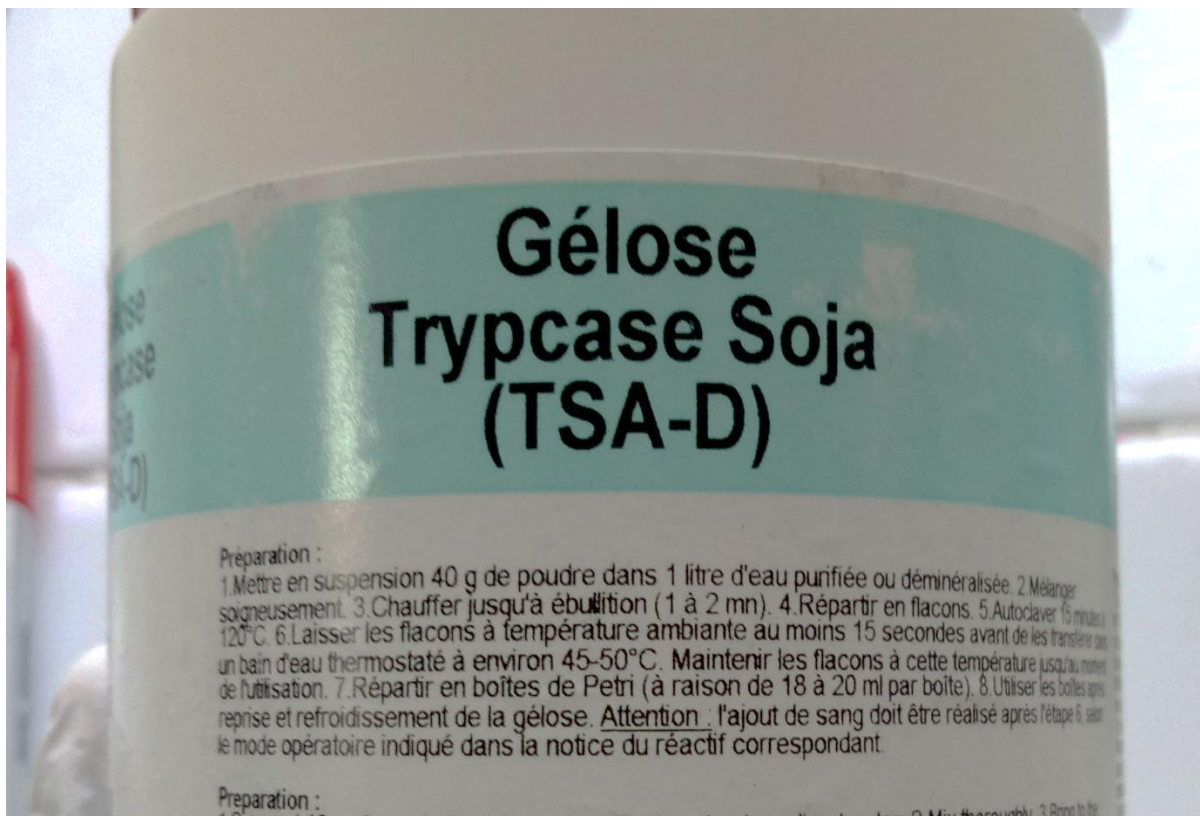
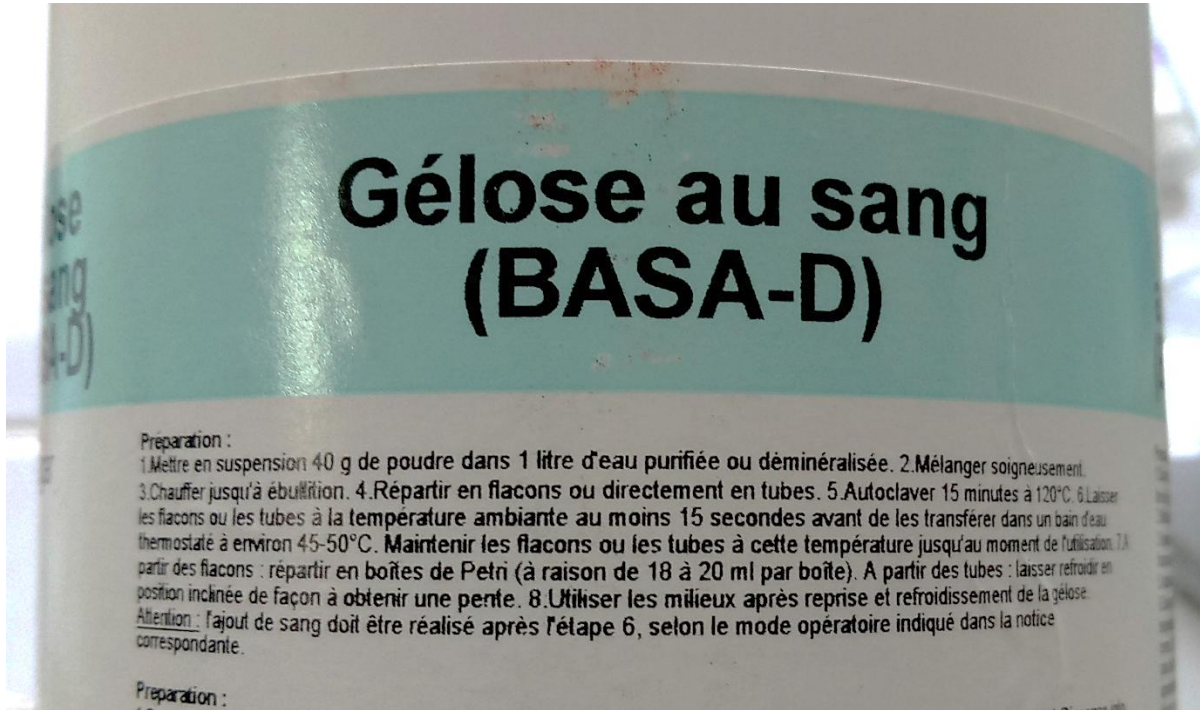
Informations sur le Prélèvement

N° d'identification : 1
Date du prélèvement : 30.03.07
Lieu du prélèvement : Centre hospitalier ANISSA BONGO (CHe)
Site de prélèvement : Face externe gauche jambe gauche (mollet)
Type de prélèvement : Sauv sur pot à bruchon rouge
Nature du prélèvement : Pus
Maladie suspectée : Erysipèle + tuéfaction

Stagiaire : ENGANDJIS'OTHAS Aurel Gaumez
URAM/ CIRMF, Tel : 06 84 41 44

Annexes

Annexe 2 : Protocole de préparation de la gélose au sang (GS) et de la gélose Trypcase Soja (TS)



Annexes

Annexe 3 : Appareil VITEK® 2 compact 15



Annexes

Annexe 4 : Fiche du rapport du laboratoire

N° Client bioMérieux :
Référence du système :

Rapport du laboratoire

Imprimé 3 mai 2017 08:44 WAT
Imprimé par : LabSuper

Nom du patient :
Groupe d'isolats : 17-1

ID du patient :

Type de carte : GP Instrument de test : 000017668A47 (CIRMF)

Profil biochimique : 010402073763231
Numération :

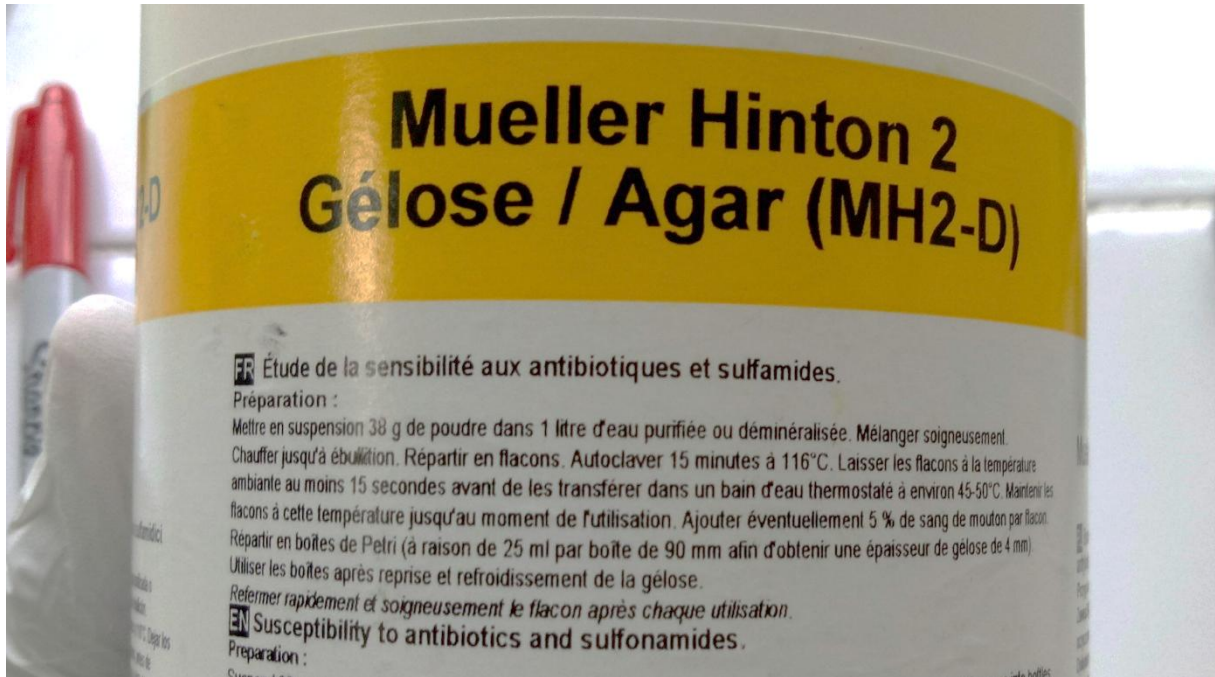
Commentaires :	

Informations sur l'identification	Carte :	GP	N° de lot :	2420217203	Péréemption :	1 juil. 2018 12:00 WAT
	Terminée le :	2 mai 2017 19:39 WAT	État :	Final	Heure de l'analyse :	6,00 heures
Germe sélectionné	95% de probabilité		Staphylococcus aureus			
	Profil biochimique :	010402073763231	Fiabilité :	Très bonne identification		
Germe SRF						
Germes identifiés et tests discriminants :						
Commentaire sur l'ident. :						
Tests à l'encontre						
Staphylococcus aureus AGLU(79),URE(2),						

Détails biochimiques																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	+	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	+	42	LAC	-	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Annexes

Annexe 5 : Protocol de préparation de la Gélose Mueller Hinton (MH)



Annexe 6 : Boites de pétrie Carrée et Ronde



