



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la

Recherche Scientifique

Université Blida -1-

Faculté de science de la nature et de la vie

Département de biologie et de physiologie cellulaire

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme

De Master en sciences biologiques

Option : Microbiologie-Bactériologie

Thème

**Etude de l'activité antibactérienne des extraits essentiels de
deux plantes à caractère thérapeutique :
Nigella sp et *Thymus algeriensis* vis-à-vis quelques bactéries
pathogènes à l'hôpital de Boufarik**

Présenté par :

Soutenu le: 22/06/2017

M^{lle} ACHI Nesrine

Devant le jury:

Mme KHALDOUN H

MCB

UB 1

Présidente

Mr BOUKHATEM M.N.

MCA

UB 1

Examineur

M^{me} BOKRETA S.

MAB

UB 1

Promotrice

M^{me} LASSAS K.

Médecin

EPH

Co-promotrice

biologiste

Boufarik

Promotion : 2016-2017

Remerciements

Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant » de m'avoir donné le courage la volonté et la santé pour achever ce travail.

Nos remerciements s'adressent à notre promotrice de thèse, le docteur BOKRETA S. Nous la remercions pour son encadrement, de nous avoir fait confiance et de ses encouragements.

Nous remercions chaleureusement, notre co-promotrice de mémoire, le docteur LASSAS F. pour ses précieux conseils, son soutien, son oreille attentive, sa gentillesse, et de son dynamisme. Merci de nous encourager pour la réalisation de ce projet de recherche. Ainsi de votre aide, disponibilité et votre présence au sein de ce jury.

C'est avec un grand plaisir que nous remercions le docteur KHALDOUN de nous faire l'honneur de présider le jury de ce mémoire, je vous remercie beaucoup pour l'occasion offerte à moi.

Nous adressons nos vifs remerciements par ailleurs à mon examinateur Mr BOUKHATEM.M.N, pour nous avoir fait l'honneur en acceptant d'examiner notre mémoire . Merci pour les conseils fournis au début de mon travail et je vous remercie beaucoup pour l'occasion offerte à moi.

Nous tenons à exprimer nos remerciements profondément à tous les membres du laboratoire de microbiologie à l'EPH de Boufarik, à leur tête Mme BAYA, Mme BENCHIT, Mme SABABOU, Mme LACHMAT, Mme BEL KHIRANI, Mme REMIDI, et Mme YAHIA, pour leurs aides précieuses.

Dédicace

*Je dédie ce travail à ma mère qu'elle trouve ici ma plus
Profonde gratitude et tout mon amour pour leur patience et soutien tout au long
de mes études, merci pour tout maman, sache que je t'aime.*

*A la pensée de mon père qu'il restera à jamais gravé dans mon
Cœur et mon esprit. Paix à son âme.*

*A mon époux Eddahmani Mohamed et leur parents Boualem et Malika,
je t'aime de tout mon cœur, tu as été à mes côtés dans les moments les plus difficiles d
e l'élaboration de ce travail.*

*A mes grands-mères, mon frère et mes sœurs pour leurs encouragements durant
tout mon parcours vers un avenir meilleur.*

*A tous mes proches, je spécifie : Rabiaa T., Meriem T., Hassiba B., Chahra O et
Imane D, pour votre soutien moral.*

A tous mes camarades, et à l'ensemble de la famille Achi et Eddahmani

Résumé

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antibactérienne de l'huile essentiel (HE) et l'extrait N-Hexane du *Nigella sp.* et l'huile essentiel du *Thymus algeriensis* *in vitro* sur nombreuses souches bactériennes en utilisant deux méthodes complémentaires (aromatogramme et micro-atmosphère).

Au total 93 souches ont été isolées et identifiées, dont 80 sont des bacilles à Gram négatif, et 13 bactéries à Gram positif. L'étude de la sensibilité de ces souches aux antibiotiques a permis de sélectionner 51 souches résistantes à ces molécules avec une dominance des entérobactéries.

Aucun rendement en l'HE n'a été obtenu par l'hydrodistillation des graines sèche de la nigelle, par contre le rendement de l'extrait N-Hexane des graines est de 42.11%.

L'activité antibactérienne de l'extrait N-Hexane du *Nigella sp.*, est évaluée par la méthode de diffusion du disque sur 6 souches à Gram négatif et 2 souches à Gram positif, isolées cliniquement et certaines souches de référence.

Nos résultats montre que l'extrait est fortement inhibitrice sur *S.aureus* (Sa6) et *Streptococcus sp* avec une zone d'inhibition (ZI) (ZI= 30mm, ZI = 25mm) respectivement pour la faible dose de l'extrait.

L'activité antibactérienne de l'HE du *Thymus algeriensis* est évaluée par la méthode aromatogramme et microatmosphère. D'après les résultats obtenus, la quasi-totalité des souches bactériennes étudiées sont sensibles vis-à-vis l'HE de thym, dont le diamètre des zones d'inhibition augmentent en fonction du dose d'HE et oscillent entre 15 et 72 mm pour les disques imprégnés de 20µL, et entre 25 et 85 mm avec les disques imprégnés de 60 µL.

A partir de ces résultats, on constate que l'extrait N-Hexane de la nigelle et l'huile essentiel de thym constituent des sources importantes des molécules actives qui peuvent être utilisées comme alternatifs aux antibiotiques.

Mots-clés: *Nigella sp*, *Thymus algeriensis*, huile essentielle, l'extrait N-Hexane, activité antibactérienne

Abstract

The objective of the present study is to evaluate the antibacterial activity of the essential oil (HE) and the N-Hexane extract of *Nigella sp.* and the essential oil of *Thymus algeriensis* in vitro on numerous bacterial strains, using two Complementary methods (aromatogram and micro-atmosphere).

A total of 93 strains were isolated and identified, of which 80 were Gram-negative bacilli, and 13 Gram positive bacteria. The study of antibiotic susceptibility of these strains allowed to select 51 strains resistant with a dominance of Enterobacteria.

No essential oil yield was extracted by the hydrodistillation of the dry seeds of the nigella, whereas the N-Hexane extract of *Nigella sp.* was 42.11%.

The antibacterial activity of the N-Hexane extract of *Nigella sp.* is evaluated by the disk diffusion method (aromatogram only) on 6 Gram-negative strains and 2 Gram-positive strains, clinically isolated and some reference strains.

Our results show that the N-Hexane extract of the nigella exert significant effect inhibitory on *Staphylococcus aureus* (Sa6) and *Streptococcus sp* with an inhibition zone (IZ) (IZ = 30mm, IZ = 25mm) respectively for the low dose of the N-Hexane extract and (IZ = 11mm, IZ = 12mm, IZ= 13mm, IZ = 15mm), respectively.

The antibacterial activity of the essential oil of *Thymus algeriensis* is evaluated by the disk diffusion method (aromatogram) and the micro-atmosphere method. According to our results, almost all the bacterial strains studied are sensitive to the essential oil of thyme, and the diameter of the zones of inhibition increase according to the dose of essential oil and oscillate between 15 And 72 mm for discs impregnated with 20 μ L of HE, between 20 and 85 mm with disks impregnated with 40 μ L of HE and between 25 and 85 mm with disks impregnated with 60 μ L of essential oil. .

From these results, it can be seen that the N-Hexane extract of the nigel and the essential oil of thyme constitute important sources of active molecules that can be used as alternatives to antibiotics.

Keywords: *Nigella sp.*, *Thymus algeriensis*, essential oil, N-Hexane extract, antibacterial activity

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تسليط الضوء على النشاط المضاد للبكتيريا في الزيت العطري (HE) ومستخلص N-Hexane من حبة البركة *Nigella sp.* والزيت الطيار للزعيترة *Thymus algeriensis* في المختبر على العديد من السلالات البكتيرية باستخدام طريقتين متكاملتين (Micro-atmosphère و aromato gramme). تم عزل وتحديد 93 سلالة ، منها 80 عصية Gram négatif ، و 13 بكتيريا Gram positif. أتاحت دراسة حساسية هذه السلالات للمضادات الحيوية اختيار 51 سلالة مقاومة لهذه الجزيئات. لم يتم الحصول على مردود من الزيت الطيار بواسطة l'hydrodistillation من البذور الجافة *nigelle*، في حين أن المردود من مستخلص N-Hexane المستخرج من البذور هو 42.11%.

يتم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلص N-Hexane من *Nigella sp.* ، بواسطة طريقة aromato gramme على 6 سلالات Gram négatif و 2 سلالات Gram positif، معزولة سريريا وبعض السلالات المرجعية.

تظهر نتائجنا أن المستخلص كان مثبطا بشدة على *Staphylococcus aureus* (Sa6) و *streptococcus sp.* مع وجود منطقة تثبيط (ZI = 30mm) (ZI = 25mm) على التوالي للجرعة المنخفضة من المستخلص.

يتم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيت الطيار *Thymus algeriensis* من خلال طريقة aromato gramme و micro-atmosphère. ووفقاً للنتائج التي تم الحصول عليها ، فإن جميع السلالات البكتيرية التي تمت دراستها تقريباً حساسة للزيت الطيار للزعيترة، حيث يزيد قطر مناطق التثبيط وفقاً للجرعة ويتأرجح بين 15 و 72 مم للأقراص المشبعة بـ 20µL ، وبين 25 و 85 مم مع الأقراص المشربة بـ 60µL.

من هذه النتائج ، نجد أن المستخلص N-Hexane من *Nigella sp.* والزيوت الطيارة من الزعيترة ، هي مصادر مهمة للجزيئات النشطة التي يمكن استخدامها كبدايل للمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية حبة البركة ، الزعيترة ، الزيت الطيار ، النشاط المضاد للبكتيريا.

LISTE DES TABLEAUX

Titre	Page
Tableau I. Compositions chimique de l'huile essentielle de <i>T. algeriensis</i>	9
Tableau II. Utilité de test oxydase	25
Tableau III. L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne	33
Tableau IV. Répartition des germes isolés	39
Tableau V. Les souches microbiennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne	40
Tableau VI. Résultats de la méthode aromatogramme de l'extrait N-Hexane nigelle	42
Tableau VII. Résultats quelque étude sur l'activité antibactérienne de la nigelle	47
Tableau VIII. Résultats des tests de l'évaluation de l'activité antibactérienne l'aromatogramme et micro-atmosphère	48
Tableau IX. Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI, µL/mL)	50

LISTE DES FIGURES

Titre	Page
Figure 1 : Différentes espèces de Nigelle : <i>Nigella damascena</i> , <i>Nigella sativa</i>	5
Figure 2 : Aspect des graines de <i>Nigella sativa</i>	5
Figure 3 : <i>Nigella arvensis</i>	6
Figure 4. <i>Thymus algeriensis</i>	9
Figure 5. Principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles	11
Figure 6. Mécanisme d'action de principaux antibiotiques	17
Figure 7. Démarche expérimentale	19-20
Figure 8. Schéma d'un dispositif Clevenger	30
Figure 9. Schéma d'un dispositif Soxhlet	31
Figure 10. Illustration de méthode aromatogramme et micro-atmosphère	35
Figure 11. Répartition globale des prélèvements d'urine	36
La figure 12. Répartition globale des prélèvements de pus	38
Figure 13. Répartition des souches par groupe bactérien	38
Figure 14. Etude Comparative: Aromatogramme Vs Microatmosphère	51

LISTE DES ABREVIATIONS

- ATB : Antibiotique
 - DZI : Diamètre de Zone d'Inhibition
 - PAM : Plantes Aromatique et Médicinale
 - HE : Huile Essentielle
 - HF : huile fixe
 - ATCC : American Type Culture Collection
 - MH : Muller-Hinton
 - GN : gélose nutritive
 - ATB : Antibiotiques
 - ECBU : Examen Cytobactériologique des Urines
 - LDC : Lysine décarboxylase
 - ODC : Ornithine Décarboxylase
 - ADH : Arginine Dihydrolase
 - TSI : Triple-Sugar-Iron Bio-Radest
 - ONPG : Orthonitrophényl- β -D-galactopyranoside
 - TDA : Tryptophane désaminase
 - TCC=Ticarcilline+Acide Clavulanique
 - CTX = Céfotaxime / Ceftriaxone
 - AMP/AM/AML= Ampicilline
 - SXT : Triméthoprim + Sulfamides
 - AMC : Amoxicilline + Acide Clavulanique
 - VA : Vancomycine
 - TE : Tétracycline
 - NA : Acide Nalidixique
 - C : Chloramphénicole
 - FA : Acide Fusidique
 - CIP : Ciprofloxacine
 - IPM : Imipénème
 - CL: Colistine
 - CAZ = Ceftazidime
 - COT = Cotrimoxazole
 - CZ = Cefazoline
 - E= Erythromycine
 - GM = Gentamicine
 - LVX = Lévofloxacine
 - RA= Rifampicine
 - AK = Amikacine
 - CN : Céfalexine
 - K : Kanamycine
 - OX : Oxacilline
 - P = Pénicilline
 - FOX/CX = Céfoxitine
-

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
---------------------	----------

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Monographie de deux plantes étudiées : <i>Nigella sp</i> et <i>Thymus algeriensis</i>	3
1. Généralités sur les plantes aromatiques et médicinales	3
2. <i>Nigella sp.</i>	3
2.1. Généralités	3
2.2. Systématique	4
2.3 Aspect botanique de <i>N. sativa L.</i> , <i>N. damascena L.</i> et <i>N. arvensis L.</i>	4
2.4. Composition chimique des graines	6
2.5. Activités pharmacologiques	7
2.6. Toxicité	8
3. <i>Thymus algeriensis</i> (Thym)	8
3.1. Généralités	8
3.2. Systématique	8
3.3. Description botanique	9
3.4. Composition chimique	9
3.5. Activités pharmacologiques	10
II. Généralités sur les huiles essentielles	10
1. Les huiles essentielles	10
1.1. Définition	10
1.2. Compositions chimiques et principes actifs	10
1.2.1. Compositions chimiques	10
1.2.2. Principes actifs	11
1.3. Procédés d'extraction des huiles essentielles	12
1.4. Activité biologique des huiles essentielles	12
1.5. Activité antimicrobienne et mode d'action	12
1.6. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne	13
1.6.1. Technique par contact direct	14
1.6.2. Technique des micro-atmosphères	14
IV. Généralités sur les bactéries étudiées et antibiorésistance	15
1. Généralités sur les bactéries étudiées	15
1.1. Bactéries à Gram négative	15

1.1.1. Famille des Entérobacteriaceae	15
1.1.2. Famille des Pseudomonaceae	16
1.1.3. Famille des <i>Neisseriaceae</i>	16
1.2. Cocci à Gram positif	16
1.2.1. Famille des Micrococcaceae	16
1.2.2. Famille des Streptococaceae	17
2. Antibiotiques et résistance aux antibiotiques	17
2.1. Antibiotiques	17
2.1.1. Définition	17
2.2. Résistance aux antibiotiques	18

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel	20
1.1. Matériel non biologique	20
1.2. Matériel biologique	20
II.2. Méthodes	20
2.1. Méthodes d'isolement et d'identification des souches	21
2.1.1 Examen utilisée (Examen cytobactériologique des urines, et du pus)	22
2.2. Identification	24
2.2.1. Étude morphologique	24
2.2.2. Identification biochimique	24
2.2.2.1. La galerie biochimique classique	24
2.2.2.2. Mini galerie API 20 ^E	28
2. 3. Extraction de l'huile essentielle de <i>Nigella sp.</i> par hydrodistillation	30
2.4. L'extrait N-Hexane de la nigelle	30
2. 5. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits étudiés in vitro	31
2.5.1. Technique de l'aromatogramme (diffusion en milieu solide)	32
2.5.2. Technique de microatmosphère (diffusion en phase vapeur)	32
2.2.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice par dilution en milieu gélosé	33

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Répartition globale des prélèvements d'urine	35
2. Répartition globale des prélèvements de pus	35

3. Isolement et identification des souches	38
3.1 Répartition des souches par groupe bactérien et par espèces	38
3.2. Identification morphologique et biochimique	39
4. Extraction et rendement en huile essentielle de la nigelle	40
5. Extraction et rendement de L'extrait N-Hexane de la nigelle	41
6. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait N-Hexane de la nigelle	41
7. Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du Thym	44
8. Résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	50
9. Etude comparative : aromatoigramme vs micro-atmosphère	51
CONCLUSION	53
Références bibliographiques	55

INTRODUCTION

Introduction

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les maladies infectieuses sont la deuxième cause de décès dans le monde (**Lopez-Romero et al., 2015**). Au cours des dernières décennies, l'utilisation excessive et parfois inadéquate des antibiotiques à large spectre, a conduit à l'émergence et à la multiplication de bactéries résistantes aux antibiotiques. Or, la résistance bactérienne aux antibiotiques constitue une menace pour l'avenir entraînant des choix thérapeutiques de plus en plus limités (**Paloazzi et al., 2015**). De ce fait, divers stratégies de recherche ont été mises en œuvre afin de garantir dans le futur la disponibilité d'antibiotiques efficaces.

Les plantes aromatiques sources de ces substances sont largement répandues dans la nature. L'Algérie abrite un ensemble d'espèces importantes et variées et témoigne de ce fait d'une richesse floristique incontestable (**Mebarki, 2010**)

Ainsi, les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives (**Mebarki, 2010**). Elles font l'objet de multiples études (**Reyes-Jurado et al., 2015; Boukhatem et al., 2014 ; Amarti et al., 2010 ; Tyagi et malik, 2011 ; Svoboda et Hampson, 1999**) pour leur éventuelle utilisation comme alternative dans le traitement des maladies infectieuses. C'est pourquoi, dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, nous nous sommes intéressés à étudier *Thymus algeriensis* et *Nigella sp*, deux plantes très fréquemment employées dans le pourtour méditerranéen.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antibactérienne de l'huile essentiel et l'extrait N-Hexane de la nigelle et l'huile essentiel du thym *in vitro* sur nombreuse souches bactériennes, standardisées ou isolées cliniquement de différents prélèvements (urine, pus, sang, liquide céphalo-rachidien) en utilisant deux méthodes complémentaires (aromatogramme et micro-atmosphère). Une étude comparative entre les deux méthodes a été menée, enfin, pour mieux apprécier l'efficacité des phases vapeur ou liquide de l'essence sur l'inhibition de la croissance microbienne. Nous nous sommes proposé de présenter cette thèse en trois parties :

Une 1ère Partie, est consacrée à des informations sur les deux plantes étudiée (*Tymus algeriensis* et *Nigella sp*, les huiles essentielles, et un bref rappel sur les bactéries pathogènes et antibiorésistance.

INTRODUCTION

La 2^{ème} partie, décrit le matériel et méthodes pour l'identification de nos souches cliniques isolées des patients hospitalisés aux différents services de l'hôpital de Boufarik. Ainsi que l'extraction de l'huile essentielle et l'extrait N-Hexane de la nigelle et l'évaluation de l'activité antibactérien de ces huiles et de l'huile essentielle de thym.

Enfin, la 3^{ème} partie, notre travail est réservé à la présentation et discussion de l'ensemble des résultats obtenus.

I. Monographie de deux plantes étudiées : *Nigella sp* et *Thymus algeriensis*

1. Généralités sur les plantes aromatiques et médicinales

Les plantes médicinales sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Il est peu fréquent que la plante soit utilisée entière, le plus souvent, il s'agit d'une ou de plusieurs parties qui peuvent avoir chacune des utilisations différentes (**Vercauteren, 2012**).

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (**Iserin, 2001**).

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments ; non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicament ou comme modèle pour les substances pharmacologiquement actifs (**Decaux, 2002**). Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus (**Iserin, 2001**).

2. *Nigella sp.*

2.1. Généralités

Le genre Nigelle contient environ 20 espèces d'herbes annuelles indigènes de la Méditerranée et de l'Asie occidentale (**Kökdil et al., 2006 ; Dandi et al., 2009**). Il comprend certaines espèces importantes (par exemple, *N. sativa L.*, *N. damascena L.* et *N. arvensis L.*) avec des propriétés aromatiques et médicinales (**Kökdil et al., 2006**). La nigelle fait partie aussi de la médecine traditionnelle prophétique, le prophète Mohamed satisfaction et salut de Dieu sur lui, avait dit : « Soignez- vous en utilisant la graine noire c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort ». Pour cette raison, plusieurs savants musulmans s'intéressèrent à cette graine (**Randhawa, 2008 et Meziti, 2009**). Ces paroles sont restées pour longtemps un mystère pour la science jusqu'à l'arrivée des techniques modernes qui ont réussi à prouver les vertus thérapeutiques de cette plante.

Nigella sp. est connu sous le nom de cumin noir. Il a été nommé d'après les graines noires caractéristiques retrouvées dans la plupart des espèces de *Nigella*. Le terme Latin « *nigellus* » est le diminutif de « *niger* », qui signifie noir (Toparslan, 2012).

2.2. Systématique

- Règne : Plantae
- Sous-règne : Tracheobionta
- Embranchement :Spermatophyta
- Sous embranchement :Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida (dicotylédone)
- Ordre :Ranunculales
- Famille :Ranunculaceae
- Genre :*Nigella* (Sultana *et al.*, 2015 ; Afrin *et al.*, 2016)

2.3 Aspect botanique de *N. sativa L.*, *N. damascena L.* et *N. arvensis L.*

Les nigelles sont des plantes annuelles, plumeuses, leurs segments plus ou moins linéaires, avec des feuilles très découpées (Zohary, 1983). Leur système racinaire est une racine principale allongée et persistante, la fleur est actinomorphe (régulières) et les graines peuvent être plates, ou triquètres, à caractères lisses et constants (Zohary, 1983).

2.3.1. *Nigella sativa L.* :

C'est une plante à floraison annuelle atteignant 20 à 90 cm de hauteur, avec des feuilles finement divisées, les fleurs sont de couleur blanche, jaune, rose, bleu pâle ou violet pâle, à 5-10 pétales (sultana *et al.*., 2015).

Ses fruits sont des follicules cornés partiellement, sessiles et fréquemment renflés, s'épanouissent entre avril et juin, et sont récoltés avant maturité complète pour conserver les graines à l'intérieur qui sont dures et noires (Lemaoui, 2010) (Figure 1). Les graines sont petites dicotylédone, trigone, angulaire, tuberculeuse, noire à l'extérieur et blanc à l'intérieur, odeur légèrement aromatique et goût amer (Sultana *et al.*., 2015)(Figure 2). C'est un remède naturel pour de nombreuses pathologies, notamment pour le traitement de l'asthme, de l'inflammation, de la toux, de l'eczéma et des états grippaux (Benkaci-Ali *et al.*, 2011) .

2.3.2. *Nigella damascena* L.:

Elle fleurit en juin-juillet. Cette très jolie fleur se distingue des autres espèces par son involucre dont les feuilles les plus hautes s'approchent des fleurs (Zohary, 1983). Son fruit est une capsule renflée très ornementale (Orsi-Llinares, 2013) (Figure 1).

2.3.4. *N. arvensis* L. :

Plante à rameaux écartés, à grande fleur isolée sans involucre, de couleur bleu clair strié de vert. Elle fleurit en juin-juillet (Orsi-Llinares, 2013). Les feuilles sont alternes, rarement simples. Les graines angulaires ou discoïdes (Zohary, 1983)



Figure 1 : Différentes espèces de Nigelle : *Nigella damascena*, *Nigella sativa*
(Orsi-Llinares, 2013)

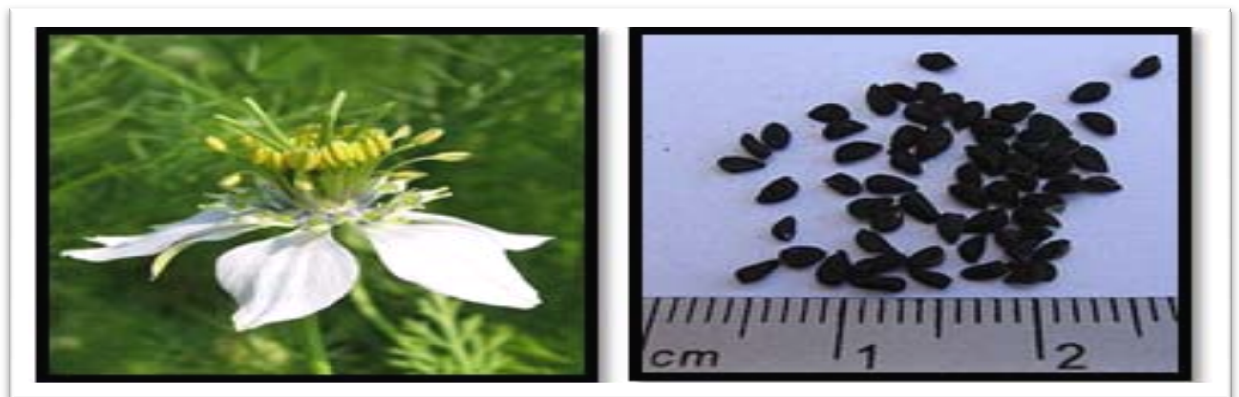


Figure 2 : Aspect des graines de *Nigella sativa* (Al-Khalaf et Ramdan, 2013)



Figure 3 : *Nigella arvensis* (Orsi-Llinares, 2013)

2.4. Composition chimique des graines

Les graines du *Nigella sp.* contiennent de 36 à 38% d'huiles fixes (HF) est constituée de acides gras, des stérols et des polyphénols (Benkaci-Ali *et al.*, 2011), de protéines, alcaloïdes, saponine et 0,4-2,5% d'huiles essentielles (HE). les huiles de graines composées d'acide oléique (39-44,5%), acide linoléique (36-37,6%), acide palmitique (6,31%), acide myristique (0,26%), acide stéarique (2,45%) et linoléique acide (1,9%). L'analyse des HE extraites par la distillation à la vapeur d'eau contenait principalement du nigellon, du 2-méthyl-4-l'isopropyl-p-quinone et la thymoquinone (Tanis *et al.*, 2009). Les constituants actifs les plus importants chez l'espèce de *N.sativa* sont thymoquinone (30% -48%) thymohydroquinone, dithymoquinone, p-cymène (7% -15%), le carvacrol (6% -12%), de 4-terpinéol (2% -7%), tanethol (1% -4%), sesquiterpène longifolène (1% à 8%) α -pinène et le thymol, etc. (Sultana, 2016). L'huile fixe est constituée de acides gras, des stérols et des polyphénols (Benkaci-Ali *et al.*, 2011).

- **L'extrait N-Hexane**

L'extraction de l'**extrait N-Hexane** est faite par un appareil de type soxhlet. L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première.

Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au-dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant. La séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide de l'appareil appelé Rotavapor (Penchev, 2010).

- **Activités antimicrobiennes de l'extrait N -Hexane**

Les acides gras fonctionnent comme les principaux ingrédients des additifs alimentaires antimicrobiens qui inhibent la croissance des microorganismes indésirables. Outre les acides gras normaux, les dérivés d'acides gras présentant de puissantes activités antimicrobiennes existent dans la nature. Ceux-ci se trouvent principalement dans les microorganismes, les algues ou les plantes, qui peuvent servir de médiateur à la défense chimique contre les microorganismes. Ces actions antibactériennes d'acides gras sont habituellement attribuées à des acides gras insaturés à longue chaîne, y compris l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide linoléique, tandis que les acides gras saturés à longue chaîne, y compris l'acide palmitique et l'acide stéarique, sont moins actifs (Zhenga *et al.*, 2005).

2.5. Activités pharmacologiques

Selon Saultan *et al.*, (2009), les activités biologiques des graines de *N.sativa* sont principalement dues à la thymoquinone, composé majoritaire de l'huile essentielle et présent dans l'huile fixe. Les graines de la nigelle révèlent un large spectre d'activités pharmacologiques, notamment des immuno-stimulants, diurétique, antihypertenseur (Dehkordi et Kamkhah, 2008) bronchodilatateur, gastroprotective, hépatoprotecteur, antidiabétiques et anticancéreux (Khan *et al.*, 2011), anti-hépatotoxique, antinéphrotoxique; analgésiques et anti-inflammatoire, antispasmodique, antioxydantes; antiparasitaire et antimicrobienne (Ghedira, 2006; Afrin *et al.*, 2016).

Activité antimicrobienne : Les différents extraits des graines de *N. sativa* présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes. L'huile essentielle même diluée à 1%, la dithymoquinone ainsi que l'extrait méthanolique exercent une importante activité antimicrobienne sur des germes Gram positif et Gram négatif. Son huile essentielle a été démontré une activité contre les bactéries comme *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *S. aureus*, *S.abony*, *E.coli* (Hadjazi *et al.*, 2015). De même, l'huile fixe de *Nigella sativa* présente une excellente activité antifongique, notamment sur *Aspergillus niger*

(**Tembhurne et al., 2014**). En plus des activités antibactériennes et antifongiques, l'huile de *Nigella sativa* possède aussi un effet antiviral vis-à-vis de virus de l'herpès, des propriétés anti-cestodales et anti-nématiques comparables à celles de la pipérazine (antiparasitaire) (**Meziti, 2008**).

2.6. Toxicité

Études toxicologiques sur *N. sativa* et la thymoquinone révélé une toxicité extrêmement faible (**Bamosa, 2015**). L'Administration des graines de *N. sativa*, poudre des graines, huile des graines, extraits de graine à des doses prescrites ne conduire à une toxicité pour l'organisme animal ou humain. Les recherches expérimentales présentées très bas toxicité pour l'administration de graines de cumin noir ou consommation (**Ahmadi et al., 2016**).

3. *Thymus algeriensis* (Thym)

3.1. Généralités

Le thym fait partie du genre *Thymus* défini comme un ancien groupe tertiaire, ayant son origine dans le sud-est de l'Espagne (**Passet, 1979**). C'est une plante aromatique spontanée appartenant à la famille des Lamiacées, se retrouve principalement dans la région méditerranéenne, l'Asie, l'Europe du Sud et l'Afrique du Nord. Elle est appelée communément Zaâitra par les populations locales (**Zayyad et al., 2014**).

Dans la médecine traditionnelle algérienne, les feuilles et les branches en fleurs sont utilisées comme condiment, diaphorétique, antispasmodique spécifiquement pour la coqueluche, stimulant pour la circulation sanguine et aphrodisiaque (**Benkiniouar et al., 2007**).

Les huiles essentielles de thym sont largement utilisées dans la médecine alternative grâce à leurs propriétés antiseptiques, antispasmodiques et antimicrobiennes (**Panizzi et al., 1993 ; Van Den Broucke et Lemli, 1981 et Zayyad et al., 2014**).

3.2. Systématique

Règne : Plantae (végétal)

Ordre : Lamiales ou Labiales

Sous-règne : Tracheobionta

Famille : Lamiaceae (Labiaceae)

Embranchement : Spermatophyta

Genre : *Thymus*

Sous embranchement : Magnoliophyta

Espèce : *Thymus algeriensis* (**Madi, 2009**)

Classe : Magnoliopsida

3.3. Description botanique

Le thym est un arbuste qui peut atteindre 20-50 cm de hauteur. Ils possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur verte foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de mono-terpènes. Les calices et les jeunes tiges sont aussi couverts de ces structures qui libèrent l'essence par simple contact, bien qu'en plus faible densité sur les tiges. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par la rose (figure 4) (Zouari *et al.*, 2012).



Figure 4. *Thymus algeriensis* Anonyme 1

3.4. Composition chimique

De nombreux travaux ont été réalisés sur l'HE de thym. Le tableau I nous donne une étude comparative de principaux composés de l'HE de *Thymus algeriensis*.

Tableau I : Compositions chimique de l'huile essentielle de *T. algeriensis*

Pays	Composés majoritaire	Référence
Maroc	Camphre (27,7 %) et l' α -pinène (20,5 %).	Amarti <i>et al.</i> , 2014
	bornéol (28%), camphène (20,9%) et le camphre (15,7%).	Hamdani <i>et al.</i> , 2015
Algérie	Thymol (71%) et de carvacrol (4%)	Chemat <i>et al.</i> , 2012
	Camphène (12,78%), Bornéol (11,16%)	Ouakouak <i>et al.</i> , 2015

3.5. Activités pharmacologiques

Dans la littérature, il a été rapporté que le *Thymus algeriensis* présente des propriétés antiseptiques (Jaafari *et al.*, 2007), antispasmodiques, anti oxydant (El Hadj Ali *et al.*, 2015 ; Hazzit *et al.*, 2009 ; Ouakouak *et al.*, 2015), antifongique et antibactérienne (Touhami *et al.*, 2016 ; Zayyad *et al.*, 2014 ; chemat *et al.*, 2012).

II. Généralités sur les huiles essentielles

1. Les huiles essentielles

1.1. Définition

L'huile essentielle (HE) est définie comme étant la fraction odorante volatile issue de métabolites secondaires. Il s'agit d'un concentré de nombreuses molécules synthétisées par les plantes pour se défendre contre les agressions de l'environnement, aussi bien contre les agents physiques (l'ardeur du soleil notamment) que contre les agents biologiques (bactéries, virus, champignons, insectes, vers...) (Thierry Foliard *et al.*, 2014 ; Lopez-Romero *et al.*, 2015).

Ces huiles peuvent être stockées dans divers organes ; fleurs (origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore), fruits (badiane) ou grains (carvi). Les HE doivent leur nom à ce qu'elles sont très réfringentes, hydrophobes et lipophiles. Elles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau. Par contre, elles sont solubles dans les solvants des lipides (acétone, sulfure de carbone, chloroforme, etc.) et, à l'inverse des glycérides, dans l'alcool (Nestor Bassolé, 2012 ; Firenzuoli *et al.*, 2014 ; El Abed *et al.*, 2014 ; Reyes-Jurado *et al.*, 2015).

1.2. Compositions chimiques et principes actifs

1.2.1. Compositions chimiques

Varie largement en fonction de la situation géographique emplacement, origine botanique, génétique, et les techniques d'extraction (Zhiri et Baudoux, 2005 ; Firenzuoli *et al.*, 2014).

Les composés volatils : Ce sont des mélanges complexes variables de constituants appartenant de façon quasi-exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane beaucoup moins fréquent d'autre part (Bakkalia *et al.*,

2008 ; Nestor Bassolé *et al.*, 2012).Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (Lamara, 2008).

Les composés terpéniques : Ils sont formés par la combinaison de 5 atomes de carbone (C₅) nommée : isoprène (Lakhder, 2015) Caractérisés par bas poids moléculaire et dotées de certaines activités résumées dans le Tableau III (Annexe I). Il convient à souligner que seuls les terpènes de faible masse moléculaire (mono – et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles leur conférant un caractère volatil et des propriétés olfactives (Svoboda et Hampson, 1999 ; Nazzaro *et al.*, 2013).

Le thymol, le carvacrol, le linalol, le menthol, le géraniol, l'acétate de linalyle, citronellal et piperitone sont les terpénoïdes les plus courants et bien connus (Nazzaro *et al.*, 2013).

Les composés aromatiques : Ce sont des composés dérivés à partir de phénylpropane (mélanges d'aldéhydes, d'alcools, de phénols, dérivés méthoxy, et des composés méthylènedioxy) (Bakkalia *et al.*, 2008 ; Bilia *et al.*, 2014 ; Lopez-Romero *et al.*, 2015). Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthol, l'estragole et bien d'autres (Bakkalia *et al.* ; 2008).

Les chémotypes : Un chémotype, ou encore race chimique, désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce. En effet, une même espèce végétale peut fournir des HE de compositions chimiques différentes (Mebarki, 2010). Biochimiquement différents, deux chémotypes issus d'une même plante présenteront non seulement des activités thérapeutiques différentes, mais aussi des toxicités variables. Par exemple, pour le thym (*thymus vulgaris*), l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* Les chémotypes *thujanol* possède des propriétés anti-infectieuses avec une action stimulante et régénératrice au niveau hépatique, alors que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* chémotypes *thymol* est antibactérien mais hépatotoxique à doses élevées (Thompson *et al.*, 2003 ; Zhiri et Baudoux, 2005).

1.2.2. Principes actifs

Selon Dorman et Deans (2000) ; Nestor Bassolé (2012), il a été rapporté que les HE contenant des aldéhydes ou des phénols tels que le cinnamaldéhyde, le citral, carvacrol, l'eugénol ou thymol comme principaux composants, ont montré l'activité antibactérienne la plus élevée, suivie par les HE contenant des alcools terpéniques. D'autres HE, contenant des cétones ou des esters, tels que les β -myrcène, ou l'acétate de géranyle avaient une faible activité.

1.3. Procédés d'extraction des huiles essentielles

La première mention enregistrée des techniques et des méthodes utilisées pour produire des huiles essentielles est censé être celui d'Ibn al-Baitar (1188-1248) (**Firenzuoli et al., 2014**). Plusieurs procédés d'extractions sont connus et utilisées à ce jour, dont l'expression à froid, l'extraction par solvant organique volatil, l'extraction à l'eau surchauffée, l'extraction à CO₂ supercritique, par micro-ondes, par ultrasons, par l'entraînement à la vapeur d'eau et par l'hydrodistillation (**Mebarki, 2010 ; Reyes-Jurado et al., 2015 ; Ouis, 2015**).

Hydrodistillation : C'est l'un des procédés le plus simple et le plus ancien (**Benteaud, 2011 ; Guinoiseau, 2010**). Les échantillons séchés à l'air sont broyés, puis soumis à une hydrodistillation pendant trois heures en utilisant un appareil de type Clevenger (**Rami et Zheng-Guo, 2011 ; Bencheqroun et al., 2012 ; Said Hassane et al., 2011**). La solution obtenue circule dans un serpentín où elle se condense en refroidissant. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau, elle reste en surface. On obtient ainsi deux phase non miscibles que l'on peut séparer par décantation : les huiles essentielles et les eaux aromatiques (ou hydrolats) chargées des parties ; hydrosolubles des essences distillées (**Mebarki, 2010**). Afin d'éliminer toute l'eau, les huiles extraites sont traitées avec du sulfate de sodium anhydre, puis filtré et conservé à l'obscurité à 4 °c (**Rami et Zheng-Guo, 2011 et Bencheqroun et al., 2012**).

1.4. Activité biologique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont couramment utilisées en parfumerie, dans l'industrie cosmétique, la pharmacie et l'agroalimentaire. Ils peuvent être utilisés comme naturels alternatives aux préparations synthétiques, ils ont été largement utilisés comme bactéricide, virucide, fongicide, antiparasitaire, insecticides et autre propriétés médicinales telles que analgésiques, sédatifs, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antispasmodique etc... (**Firenzuoli et al., 2014 ; Bilia et al., 2014 ; Lopez-Romero et al., 2015**).

1.5. Activité antimicrobienne et mode d'action

Compte tenu du nombre de différents groupes de composés chimiques présents dans les HE, 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 (**Goetz et Ghedira, 2012**). Les principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles sont indiquées dans la figure 5.

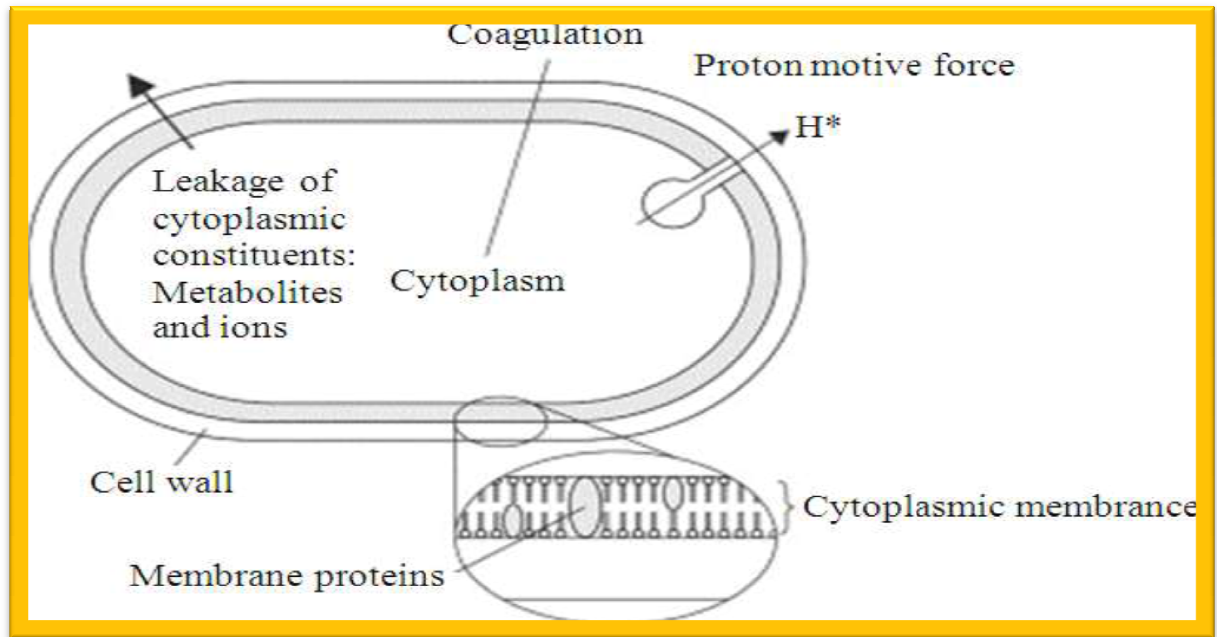


Figure 5. Principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles (Burt, 2004 et Goetz et Ghedira, 2012)

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

- L'altération de la paroi cellulaire et des protéines membranaires
- La dégradation de la membrane cytoplasmique
- La fuite du contenu cellulaire
- La coagulation du cytoplasme
- L'épuisement de la force de mouvement des protons (Goetz et Ghedira, 2012; Nazzaro *et al.*, 2013; Boukhatem *et al.*, 2014)

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne (Goetz et Ghedira, 2012 ; El Amri *et al.*, 2014). Il dépend aussi du type de microorganismes ; en général, les Gram - sont plus résistantes que les bactéries Gram + grâce à la structure de leur membrane externe (El Amri *et al.*, 2014).

1.6. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles peut être estimé par deux méthodes principales : technique de contact direct (en milieu solide ou en milieu liquide) et technique de micro-atmosphère.

1.6.1. Technique par contact direct

Les techniques par contact direct consistent à mettre en contact l'huile essentielle et les micro-organismes, puis à observer la croissance de ces derniers. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé (milieu solide) ou dans un bouillon (milieu liquide) (**Lamara, 2008**).

La méthode des disques et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), sont les deux méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles auquel nous nous intéressons.

Méthode des disques (Aromatogramme) : Le procédé de diffusion en disque sur gélose, généralement utilisé comme une vérification préliminaire, a été employé pour étudier l'activité antimicrobienne des HE (**Boukhatem et al., 2014**). C'est une méthode ancienne mais toujours d'actualité, utilisée pour déterminer la létalité d'HE contre les micro-organismes (**Guesmi et al., 2014**). Il est utilisé avec des micro-organismes aérobies ou microaérophiles (**Reyes-Jurado et al., 2015**).

Ce test est réalisé par dépôt de l'huile essentielle, à l'aide de disques imprégnés d'une quantité connue de l'huile essentielle. Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenues sur géloseensemencée (**Belaiche, 1979 ; Hulin et al., 1998 ; El Amri et al., 2014**).

Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) : Une solution contenant des concentrations connues des fractions à tester est diluée dans un volume connu de gélose de MH en surfusion ; après solidification, une suspension bactérienne est déposée à la surface du milieu gélifié (**Basli et al., 2012**). L'adjonction d'un émulsifiant (Tween 80), inerte, stable et dépourvu d'action synergique antibiotique, peut être réalisée pour améliorer la solubilité de l'huile essentielle et sa diffusion dans la gélose (**Lakhder, 2015**).

1.6.2. Technique des micro-atmosphères

Cette méthode consiste à déposer un disque de papier filtre imprégné de l'huile essentielle au centre du couvercle d'une boîte de pétri, sans que l'huile essentielle entre en contact avec la géloseensemencée par les micro-organismes. La boîte est hermétiquement

fermée et placée couvercle en bas à l'étuve à 37°C (pour les bactéries) et 25°C pour les champignons.

Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées, donc l'essence n'agit qu'à l'état des vapeurs qu'elle développe à 37°C. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non de l'inoculum (**Benjilali et al., 1986**). Cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, elle montre seulement l'activité des constituants volatils à température d'incubation (**Hulin et al., 1998**).

IV. Généralités sur les bactéries étudiées et antibiorésistance

1. Généralités sur les bactéries étudiées

Dans son environnement, l'homme est entouré d'un grand nombre de microorganismes colonisant sa peau, ses muqueuses, son tube digestif et même son système respiratoire et son appareil urinaire. Parmi ces microorganismes, les bactéries qui peuvent être des saprophytes comme la flore digestive ou pathogènes déterminant une infection chez l'hôte (**Ouis, 2015**). Le choix des bactéries étudiées dans notre travail a été porté sur les souches fréquemment isolées en pathologie humaine. On a sélectionné deux groupes de bactéries :

Bactéries à Gram négative : Famille des *Entérobacteriaceae*, *Pseudomonaceae* et *Neisseriaceae*

Bactéries à Gram positif : Famille des *Micrococcaceae* et *Streptococaceae*

1.1. Bactéries à Gram négative

1.1.1. Famille des Entérobacteriaceae

Cette famille regroupe une variété d'espèces bactériennes. La majorité de ces espèces sont des hôtes normaux du tube digestif. Elles sont retrouvées dans le sol et l'eau, mais le plus souvent sur les muqueuses intestinales, ou elles se multiplient rapidement et montrent une résistance particulière aux antibiotiques à spectre large et les antibiotiques actifs sur les Gram + (penicillines, macrolides), ce qui justifie largement leur implication en pathologie infectieuse (**Carbonnelle et al., 1987**).

Plusieurs processus métaboliques caractérisent cette famille bactérienne. Il s'agit notamment de la capacité de réduire les nitrates en nitrites (en vue de générer de l'énergie), de fermenter le glucose avec ou sans production de gaz, de ne pas avoir de cytochrome-oxydase,

d'être aérobies ou anaérobies, mobiles par une ciliature péritriche ou immobile (**Denis et al., 2007; Chafiaa, 2011; Elliott et al., 2011 et Kenneth et al., 2014**)

La famille des Enterobacteriaceae comporte 44 genres qui sont regroupés en cinq tribus, d'après leurs propriétés fermentatives : *Escherichiae*, *Klebsielleae*, *Proteae*, *Yersinia* et *Erwiniae*. Les genres contenant les espèces les plus virulents pour l'homme sont *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, et *Yersinia*. D'autres genres moins courants mais médicalement importants sont *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella* et *Providencia* (**Denis et al., 2007; Kenneth et al., 2014**).

1.1.2. Famille des Pseudomonaceae

La famille des Pseudomonaceae comporte dix genres dont les genres *Pseudomonas* et *Flavimonas* (**Delarras et al., 2010**). Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles Gram négatifs, mobiles (à ciliature polaire), aérobies stricts, cultivant facilement sur les milieux usuels. En fonction de la nature des antigènes O (portés par le lipopolysaccharide) on distingue différents sérotypes. (**Nauciel et Vildé, 2007**).

Pseudomonas aeruginosa ou bacille pyocyanique est une bactérie ubiquiste, saprophyte dans les eaux douces et marines, dans l'air, dans les sols humides ou sur les végétaux. Elle se rencontre dans l'environnement hospitalier au niveau de matériel médical ou chirurgical. Chez l'homme, cette bactérie est l'agent du pus bleu, des septicémies, d'endocardites ect... (**Nauciel et Vildé, 2007**). Ce germe est aussi caractérisé par sa résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques (**Avril et al., 1992**).

1.1.3. Famille des Neisseriaceae

Selon **Avril et al., (1992)**, la famille des *Neisseriaceae* est une famille hétérogène, qui inclue des bacilles, des coccobacilles et des cocci à gram négatifs. Elle comprend classiquement les genres : *Acinetobacter*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Kingella* et *Oligella*.

Genre *Acinetobacter* : Il s'agit de coccobacilles, courts, souvent en diplocobacilles, immobiles, aérobies stricts, souvent encapsulés (**Avril et al., 1992**)

1.2. Cocci à Gram positif

1.2.1. Famille des Micrococcaceae

Elle est composée de 4 genres: *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus* et *Staphylococcus*. Les espèces retrouvées en pathologie humaine appartiennent presque exclusivement aux genres *Micrococcus* et *Staphylococcus* (**Denis et al., 2007**).

Staphylocoques : Les staphylocoques sont des cocci Gram positifs immobiles, en générale groupés en amas, catalase(+), aérobies facultatives fermentant les glucides. Ils peuvent être répartis en souches pathogènes et relativement non pathogènes sur la base de la synthèse de coagulase. L'espèce coagulase-positif *Staphylococcus aureus* est l'agent le plus pathogène pour l'être humain. Les Staphylocoques coagulase-négative *Staphylococcus epidermis* ne produisent pas de coagulase, et sont non-pigmentés et généralement moins invasifs (**Willey et al., 2008**).

Les staphylocoques sont des germes ubiquistes qui peuvent vivre comme bactéries saprophytes dans la nature (sols, air, aliments..), comme bactéries commensales sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux, comme bactéries pathogènes, agents d'infections humaines qui peuvent être redoutables (**Rafati et al., 2014**).

1.2.2. Famille des Streptococaceae

Les streptocoques sont des coques ovoïdes ou sphériques à Gram positif, immobiles, non sporulé, souvent disposés en paires (diplocoque) et / ou en chainettes plus ou moins longues. Ce sont des anaérobies facultatifs, ubiquistes, saprophytes et commensaux. En plus des membres relativement inoffensifs de la flore oropharyngée, les espèces les plus pathogènes chez l'homme sont : Les streptocoques du groupe A, les pneumocoques et les Les streptocoques du groupe B (**Kenneth et al., 2014**).

2. Antibiotiques et résistance aux antibiotiques

2.1. Antibiotiques

2.1.1. Définition

Les antibiotiques sont définis comme toute substance antibactérienne d'origine biologique, synthétique ou semi synthétique, capable d'inhiber la multiplication ou détruire les micro-organismes (**Caron et al., 2014**).

Les antibiotiques agissent à un niveau précis dans les structures bactériennes et chaque famille possède son site d'action propre (figure 6). Ils agissent notamment en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire, des acides nucléiques, des protéines ou sur l'inhibition de voies métaboliques (**Yala et al., 2001**).

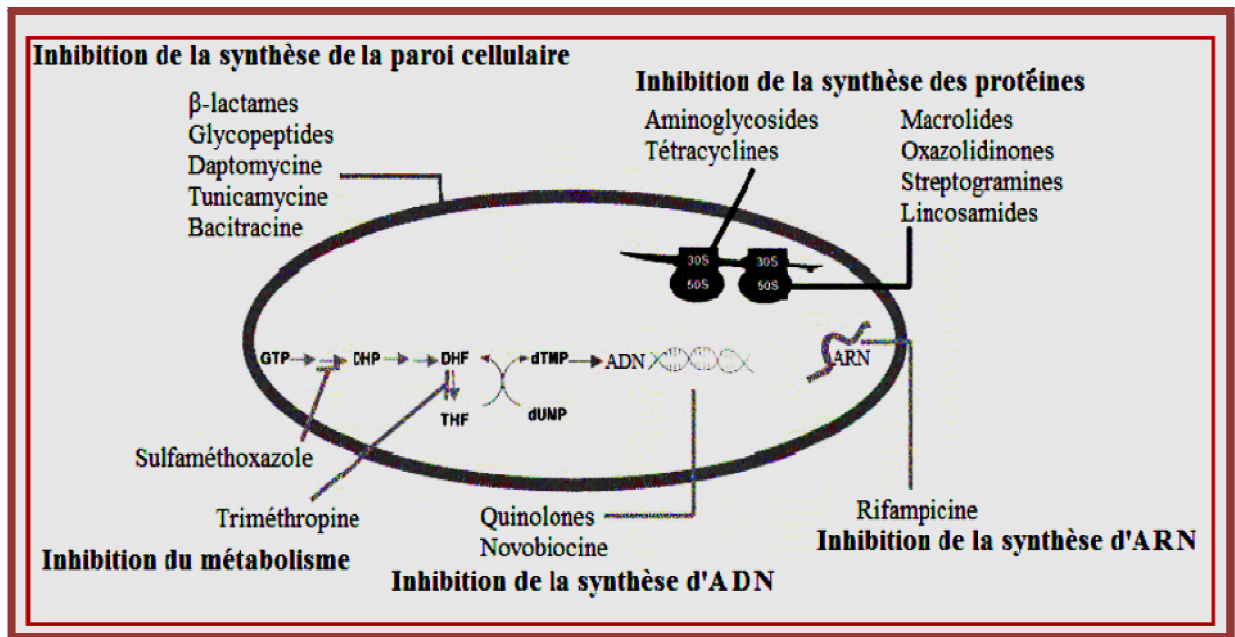


Figure 6. Mécanisme d'action de principaux antibiotiques
(Yala *et al.*, 2001)

2.2. Résistance aux antibiotiques

Le résistance bactérienne se définit par la capacité d'un micro-organisme à se développer en présence d'un agent antimicrobien, dont l'action empêche ou ralentit normalement sa croissance. Elle est dite naturelle lorsqu'elle est liée aux caractères génétiques normaux de l'espèce bactérienne. Elle est dite acquise lorsqu'elle atteint des souches au sein d'une espèce bactérienne normalement sensible.

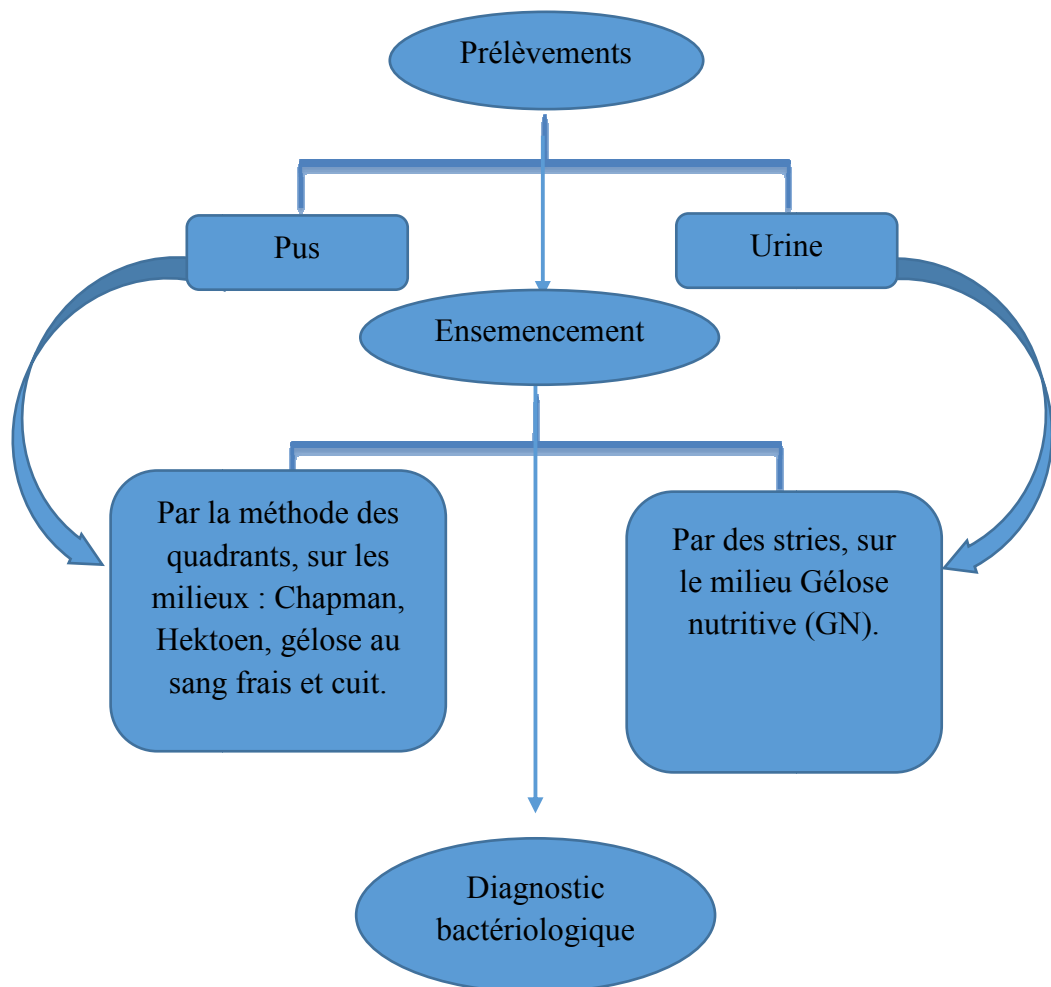
Les bactéries ont, par ailleurs, démontré leur capacité à croître leur résistance aux antibiotiques par une multitude de mécanismes dont la nature et l'efficacité varient suivant les espèces et les produit. Les principales stratégies connus sont de quatre types (Levinson, 2014 Paolozzi et Liébart, 2015). Le premier est la production d'enzymes inactivatrices des antibiotiques (béta-lactamase), le second est la modification des cibles des antibiotiques empêchant l'action de ce dernier, le troisième mécanisme est la diminution de la perméabilité. Le dernier mécanisme est la réduction des concentrations intracellulaires d'antibiotiques. Ce phénomène peut être du à un transport actif vers l'extérieur de la cellule via des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux (Cattoir, 2004).

Chapitre II : Matériel te méthodes

Notre étude a été réalisée entre Mars et septembre 2016. Les différentes expérimentations ont été effectuées au niveau des structures suivantes :

- CRIA-Blida où nous avons fait l'extraction de l'huile essentielle et fixe de la nigelle.
- Laboratoire de bactériologie de l'Établissement Public Hospitalier (EPH) de Boufarik (Blida) dans le but d'isoler, d'identifier et tester la sensibilité des bactéries vis-à-vis des ATB, ainsi que tester l'effet antibactérienne des huiles de la nigelle et de l'huile essentielle de thym.

Démarche expérimentale : Le présent travail est structure selon la démarche expérimentale illustré sur la figure n° 7



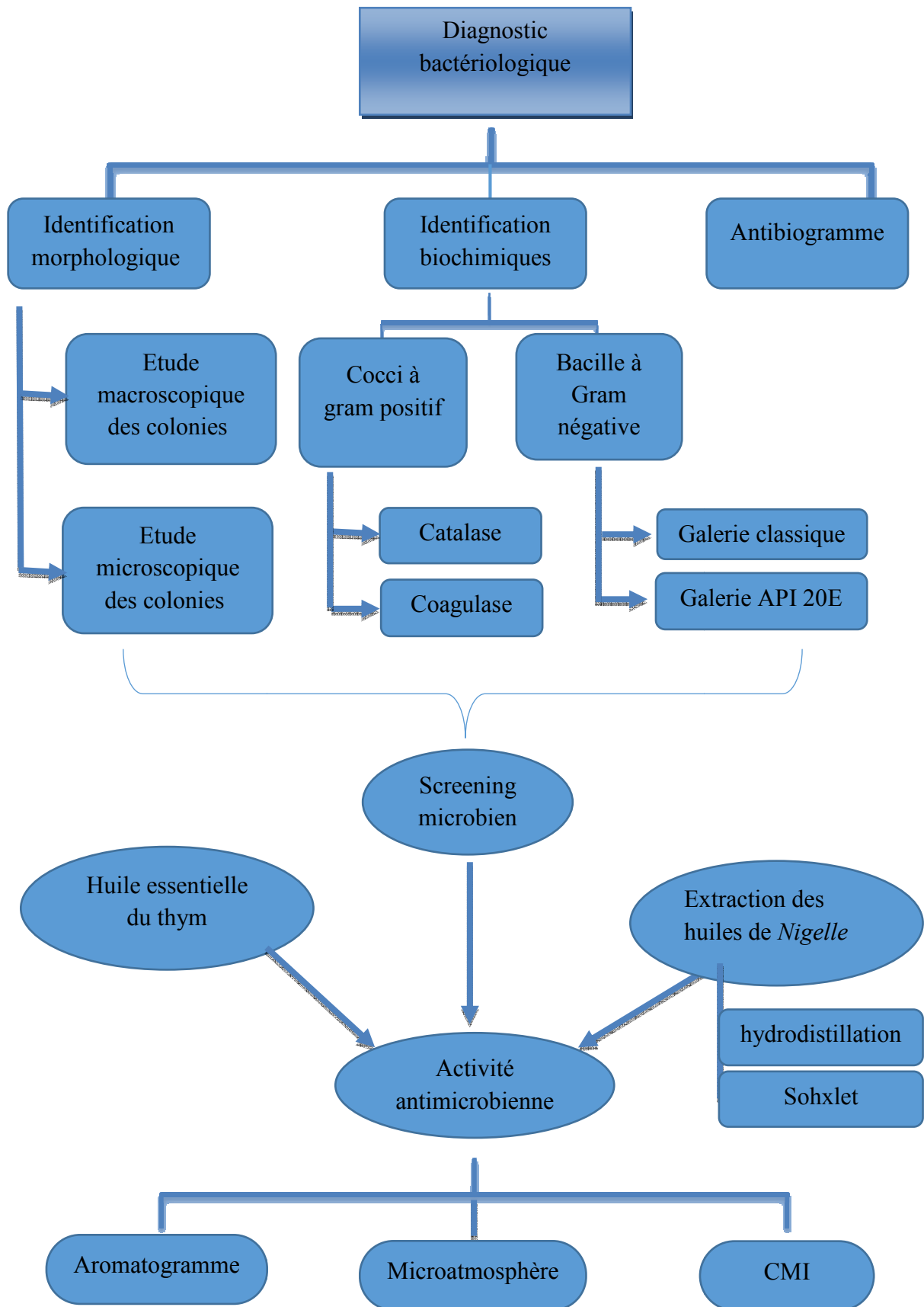


Figure 7: Démarche expérimentale

Chapitre II : Matériel te méthodes

II.1 Matériel

1.1 Matériel non biologique

Le matériel non biologique englobe toute la verrerie de laboratoire, les milieux de culture et les réactifs chimiques utilisés au sein de l'étude expérimentale et illustré dans l'annexe N°I.

1.2. Matériel biologique

Échantillonnage : Cette étude porte sur 353 prélèvements d'urine et 41 prélèvements de pus de pied diabétique, cutanée, d'oreille et d'abcès issus des patients hospitalisés dans les différents services de EPH de Boufarik (Pédiatrie, Maternité, Médecine interne, Maladies infectieuses, Chirurgie générale, Urgences) de la wilaya de Blida et aussi des malades consultés à titre externe.

Matériel végétal : Le matériel végétal est constitué de :

- Graines de *Nigella sp.* achetées sous forme séchées, chez un herboriste dans la commune de Birkhdem. Selon ce dernier, ces graines sont importées de Pakistan.
- L'huile essentielle du *Thymus algeriensis* qui a été achetée chez le même herboriste. Cette huile est produite par la société « Ultra-Bio » spécialisée dans la production des HE sise à Boumerdés (Alger). L'HE a été extraite à partir de la partie aérienne fraîche de la plante durant la période de floraison (Mai 2014). Le matériel végétal provient de la wilaya d'Annaba. L'HE est certifiée « 100% naturelle » car n'ayant été additionnée ou mélangée à aucun solvant organique pendant la production. Elle a été conservée teintées à 4°C et à l'abri de l'air et de la lumière pendant toute la durée de notre travail pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation ou de contamination.

II.2 Méthodes

2. Méthodes d'isolement et identification des souches

2.1. Examen utilisée (Examen cyto bactériologique des urines, et de pus)

➤ Examen cyto bactériologique des urines

L'examen cyto bactériologique des urines (ECBU) autorise le diagnostic de certitude d'une infection urinaire ou on isole le microorganisme responsable (bactérie ou levure)

Chapitre II : Matériel et méthodes

pour permettre de déterminer la sensibilité de la ou des bactéries isolées aux antibiotiques (antibiogramme).

La mise en culture :

Choix des milieux : la très grande majorité des bactéries responsables d'infections urinaires ne sont pas exigeantes et sont cultivées sur géloses ordinaires (**Bonacorsi, 2007**).

Modes d'ensemencement : il existe plusieurs méthodes d'ensemencement, la méthode originale de Kass, la méthode simplifiée de Véron, la méthode à l'anse calibrée et la méthode de lame immergée. Dans notre travail nous avons utilisé la méthode à l'anse calibrée. Une anse calibrée à 10 μ l est utilisée pour ensemercer les géloses nutritives. On prélève verticalement avec l'anse calibrée et par capillarité une goutte d'urine que l'on ensemece par stries sur la boîte de gélose. Une strie centrale est ensemencée puis perpendiculairement réalisant un isolement de haut en bas de la boîte en desserrant légèrement les dernières stries (**Djennane et al., 2009**).

➤ **Examen cytobactériologique de pus**

Les prélèvements de pus sont très divers dans leur localisation anatomique. Ces prélèvements arrivent au laboratoire sous plusieurs aspects : écouvillonnages (furoncles, escarres, morsures), biopsie (cutanées, tissulaires), pièces opératoires, liquides prélevés de préférence à la seringue (**Poly et Denis, 2007**). Les prélèvements acheminés au laboratoire ont fait l'objet d'une étude bactériologique pour la recherche des germes présents.

La mise en culture :

Choix des milieux : les prélèvements sont ensemencés sur les milieux de cultures : Chapman, Hektoen, gélose au sang frais et sur gélose au sang cuit.

Modes d'ensemencement : Nous avons ensemencé les prélèvements par la méthode des quadrants. Le premier quadrant est ensemencé par l'écouvillon chargé de prélèvement par des stries serrées. Après avoir tournée la boîte de 90°, des stries serrées sont à nouveau effectuées à l'aide d'une pipette pasteur boutonné. Le dernier quadrant est ensemencé sans rentrer au contact des quadrants précédents. Cette technique permet d'isoler

Chapitre II : Matériel et méthodes

les différentes bactéries contenues dans un mélange et d'obtenir dans le dernier quadrant des colonies bien isolées.

2.2. Identification

Les cultures positives ont fait l'objet d'une identification bactérienne par une étude morphologie et par une étude biochimique.

2.2.1. Étude morphologique

L'étude morphologie des microorganismes est investiguée en deux examens, un examen macroscopique et un examen microscopique.

➤ **Examen macroscopique** : C'est l'étude de l'aspect des colonies. Son but consiste à observer à l'œil nu la forme du relief (bombée, semi-bombée, plate), la taille, la couleur (pigmentation), l'aspect (collant, filamenteux...), l'odeur, l'opacité (opaque, translucide, transparentes), forme régulier ou dentelés, la consistance, la pigmentation, et l'aspect de la surface (lisse ou rugueuse).

➤ **Examen microscopique** : Permet de définir certain caractères morphologiques et organisationnels des bactéries

Technique : Déposer une goutte de la suspension entre lame et lamelle et observer sous microscopique à l'objectif(x40).

2.2.2. Identification biochimique

Cette identification repose sur l'utilisation de galeries spécifiques permettant d'identifier le genre et l'espèce bactérienne en s'appuyant sur ces caractères biochimiques après orientation à partir de caractères cultureux et morphologiques. Nous avons utilisé la galerie biochimique miniaturisée Api20E et parfois la galerie classique selon la disponibilité ainsi que deux autres tests, le teste de catalase et le teste de coagulase pour l'identification des bactéries Gram (+).

2.2.2.1. La galerie biochimique classique

Des tests biochimiques conventionnels de métabolisme respiratoire, glucidique ou protéique sont utilisés en pratique courante au laboratoire.

a) Étude de type respiratoire

Test d'oxydase : L'oxydase ou Cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaine chaines respiratoires cytochromiques bactériennes (Delarras, 2007 et Delarras, 2014).

Chapitre II : Matériel et méthodes

La recherche de cette enzyme est utile dans le repérage des colonies de *Neisseriaceae* et dans le diagnostic des bacilles à Gram négatif (voir tableau II).

Tableau II : Utilité de test oxydase (Delarras, 2014)

Test oxydase	Genres bactériens
Oxydase +	<i>Pseudomonas</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Aeromonas</i> ...
Oxydase -	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pasteurella</i> ...
Oxydase variable	<i>Brucella</i> ...

Technique : Il faut déposer, sur une lame porte-objet propre, un disque Oxydase et imbibé avec une goutte d'eau distillé ou l'eau physiologique stérile, puis prélever une partie de la colonie à étudier à l'aide d'une pipette pasteur stérile et l'étaler sur le disque.

Lecture : La réaction est instantanée à la formation d'un complexe violet au contact de cette enzyme indiquant un test positif. La bactérie est dite oxydase positive. La réaction tardive ou absence de couleur indique un test négatif.

b) Etude de métabolisme protéique

Recherche de décarboxylase : Les décarboxylases bactériennes sont des enzymes qui catalysent les réactions de décarboxylation des acides aminés. Trois décarboxylases sont fréquemment recherchées : La lysine décarboxylase (LDC), l'Ornithine Décarboxylase (ODC) et l'Arginine Dihydrolase (ADH) (**Lanotte et mereghetti, 2007**).

Technique : Le test est réalisé dans 4 tubes différents : Le premier constitue le témoin. Les autres tubes contiennent l'un des trois acides aminés suivant : Arginine, Lysine ou Ornithine. Après ensemencement, quelques gouttes d'huile de vaseline sont ajoutées dans chaque tube et le tout sera incubé à 37°C pendant 24h.

Lecture : Virage de couleur de témoin de violet au jaune et le tube d'acide aminé reste violet : décarboxylase positive.

- Le témoin devient jaune et le tube d'acide aminé jaune : décarboxylase négative.

Chapitre II : Matériel et méthodes

- Si le témoin reste violet : test à refaire.

c) Etude du métabolisme glucidique

Milieu mannitol- mobilité : Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant entre autres du mannitol, du rouge de phénol comme indicateur du pH.

Technique : Le milieu estensemencé par piqure centrale.

Lecteur : lorsque l'indicateur passe du rouge au jaune ce qui correspond à l'acidification du milieu, le mannitol a été utilisé. Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble qui envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la piqure centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqure centrale (**Lanotte et mereghetti, 2007**).

Milieu TSI : La gélose TSI ou Triple-Sugar-Iron Bio-Radest permet de mettre en évidence

L'attaque du glucose, du lactose et /ou du saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré et du gaz (**Delarras, 2007**).

Technique: A partir de la culture pure,ensemencer la pente du milieu par des stries et le culot par piqure à l'aide d'une pipette Pasteur, puis incubé à 37°C pendant 24h.

Lecture: La lecture de ce milieu se fait au niveau du culot pour le glucose et au niveau de la pente pour le lactose et/ou le saccharose.

- Virage de couleur de la pente vers le jaune : fermentation de lactose et/ou saccharose.
- Virage de couleur du culot vers le jaune : fermentation de glucose.
- Noircissement de du milieu : production de H₂S.
- Formation de bulles de gaz dans la masse du culot : production de gaz.

• Étude de la dégradation du lactose (test d'ONPG)

L'orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG) est un analogue structural du lactose. Ce substrat synthétique incolore peut être scindé en galactose et en orthonitrophénol (composé soluble jaune) en présence d'une des enzymes appelées ONPG hydrolase (**Delarras, 2014**).Ce test est réalisé pour étudier l'existence d'une Bêta-Galactosidase chez la bactérie, donc la possibilité de la fermentation effective du lactose indépendamment de la perméase bactérienne.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Technique : Prélever une colonie à partir d'une culture bactérienne pour faire une suspension dense d'eau déminéralisée stérile et homogénéiser la suspension. Puis, il faut placer un disque d'ONPG (disque de papier filtre stérile imprégné de tampon et d'ONPG) est placé avec la suspension. Après il faut le mettre à l'étuve à 37°C pendant 24h.

Lecture : L'apparition d'une coloration jaune indique un test positif : la bactérie est dite ONPG +. Absence de coloration indique un test négatif : la bactérie est dite ONPG négative

- **Citrate de Simmons**

L'utilisation de citrate se traduit par une culture sur la gélose et plus Souvent cette croissance s'accompagne d'une libération d'ammoniaque à partir des sels d'ammonium ce qui traduit par un virage du bleu de bromothymol au bleu (**Lanotte et mereghetti, 2007**).

Technique : La moitié du milieu sera ensemencée par des stries serrées ascendantes avec une goutte de la suspension bactérienne, l'autre moitié servira comme témoin, puis incubé à 37°C pour 24h.

Lecture : Le virage de couleur de vert au bleu se traduit par l'utilisation du substrat comme source de carbone (Citrate positive).

- **Urée-indole**

Le milieu Urée-tryptophane (improprement dit Urée-indole) contient du Tryptophane de l'urée et du rouge de phénol comme indicateur de pH . Il permet de réaliser 3 tests :

- Test Uréase : L'urée, sous l'action d'une uréase bactérienne va être transformée en carbonate d'ammonium entraînant une coloration rouge de milieu (**Lanotte et mereghetti, 2007**).

-Test d'Indole : certaines bactéries dégradent le tryptophane en indole grâce à une Tryptophanase.

- Test TDA : le « Tryptophane désaminase » agit sur le tryptophane en donnant l'acide indole pyruvique.

Technique : Additionner quelques gouttes de la suspension bactérienne à étudiée dans le milieu puis incubé à 37°C pour 24h.

Chapitre II : Matériel te méthodes

Lecture : Changement de coloration de jaune au rose indique que l'Uréase (+).
Absence de virage de couleur indique que l'Uréase (-), formation d'anneau rouge après l'addition de Kovacs : Indole (+) et virage de couleur au rouge-brun après ajout du TDA : TDA(+).

d) Recherche de catalase

Le catalase est une enzyme présente chez la plupart des aérobies strict et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage pour compléter l'identification des bactéries cocci à Gram positifs. **(Delarras, 2014)**

Technique : Il faut déposer sur une lame porte objet propre une goutte d'eau oxygénée et émulsionner un peu de la colonie suspecte.

Lecture : Dégagement immédiate de gaz indique la présence de catalase

e) Recherche de coagulase

Ce test permet la différenciation entre l'espèce *staphylococcus aureus* et les autres espèces de staphylocoque.

Technique : Dans un tube à essai, mettre 2ml de plasma humaine, et ajouter quelques colonies bactériennes, puis incuber dans l'étuve à 37°C pendant 24h. Un tube témoin va servir comme un contrôle du test et pour valider le résultat (Dans un tube à essai, mettre 2ml de plasma humaine, et ajouter quelques colonies de la souche *S.aureus* de référence).

Lecture : S'il y a une coagulation de plasma la bactérie est dite coagulase positive.

2.2.2.2. Mini galerie API 20^E

C'est un système standardisé qui permet d'identifier aujourd'hui 22 genres d'entérobactéries et 18 autres genres de bacilles de Gram- dont les *Pseudomonas*, les *Aeromonas* et *Vibrio*...etc. Elle est composée de 20 microtubes (surmontés cupules) contenant des substrats déshydratés, qui permet de réaliser 21 tests biochimiques de métabolisme respiratoire, glucidique et protéique.

Technique : Réunir le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, puis placer la galerie dans la boîte d'incubation.

Chapitre II : Matériel et méthodes

- Prélever quelques colonies et préparer une suspension bactérienne dans l'eau distillée stérile.
- Remplir les tubes et cupules des tests CIT, VIP et GEL avec la suspension bactérienne et uniquement les tubes des autres tests.
- Réaliser une anaérobiose dans les tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE en remplissant leur cupule d'huile de vaseline.
- Refermer la galerie et l'incuber à 37°C pendant 24H.
- Après incubation, noter sur la fiche de résultat, toutes les réactions spontanées. La révélation des trois TDA, VP et indole est faite par l'ajout des réactifs nécessaires (TDA, VP1, VP2 et KOVACS).

Lecteur : La lecture des galeries API se fait en appliquant le tableau de lecteur de catalogue analytique selon les indications du fournisseur, après codification des réactions en un profil numérique (On obtient un nombre de 7 chiffres).

A- Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

L'antibiogramme est l'examen biologique destiné à mesurer l'interaction entre chacune des molécules antibactériennes utilisables et une souche bactérienne susceptible d'être pathogène, isolée d'un patient.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé Mueller-Hinton selon les normes préconisées par le CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) recommandées par l'OMS et agréées par de nombreux pays, cité par **Rahal *et al.*, 2014**.

Technique :- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum 0,5 Mac Farland de turbidité et essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.

-Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées et Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois.

-Pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- Appliquer les disques d'antibiotiques : elle se fait manuellement avec une pince stérile.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm.

- Incuber les boîtes à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.

Lecture : La lecture a été faite par la mesure avec précision des différents diamètres des zones d'inhibition, en comparant ces résultats aux valeurs critiques. Les bactéries ont été classées dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistance.

2. 3. Extraction de l'huile essentielle de *Nigella sp.* par hydrodistillation

L'extraction des huiles essentielles des graines de *Nigella sp.* est effectuée par hydrodistillation avec un appareil de Clevenger (Clevenger, 1928) (Figure 8) dans le laboratoire du CRIA.

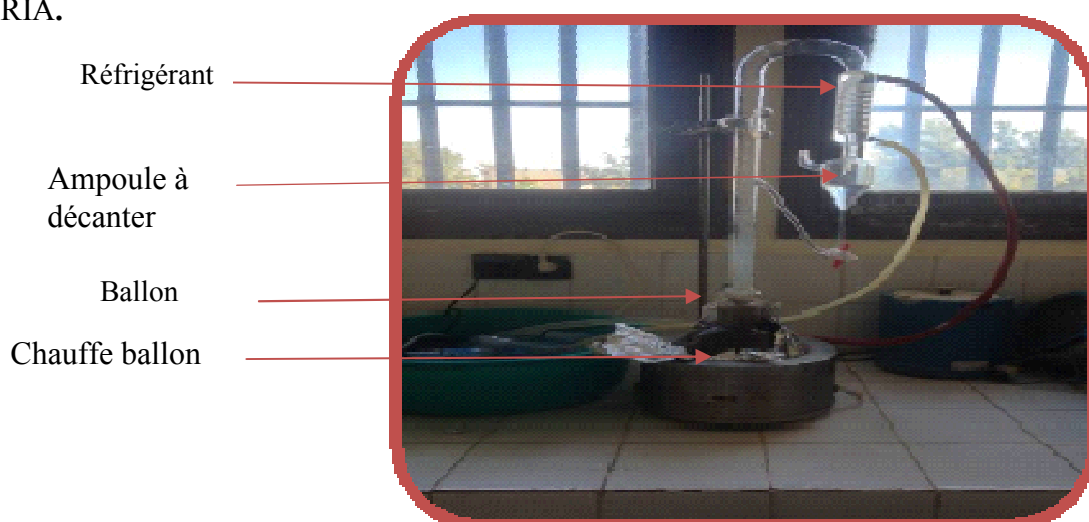


Figure 8: Schéma d'un dispositif clevenger. (Originale, 2016)

Technique : Au préalable, 100 g des graines sont débarrassées des débris terreux et végétaux puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique et mettre dans le ballon rempli 2/3 de l'eau distillée. La durée d'extraction est de l'ordre de 90 minutes. Trois expériences au moins sont réalisées (El Arch *et al* ; 2003). L'HE est récupéré dans un flacon stérile entouré par le papier aluminium et mise en contact avec l'éther de pétrole pour éliminer toute trace d'eau puis conserver à 4 °C à l'abri de la lumière.

2.4. L'extrait N-Hexane de la nigelle

L'extraction par un solvant d'échantillons solides, qui est communément appelée extraction solide-liquide, est l'une des méthodes les plus anciennes pour le prétraitement des échantillons solides (Luque *et al.*, 2000).

Chapitre II : Matériel te méthodes

Technique : Au préalable, les graines sont débarrassées des débris terreux et végétaux puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique. Un poids donné (30 g) de ce broyat est disposé dans une cartouche cellulosique, puis la cartouche est introduite dans l'extracteur «soxhlet » équipé à sa base d'un ballon contenant 250 ml de n-hexane. Le solvant est porté à ébullition à l'aide d'une chauffe ballon pendant 3 heures. La figure 9 représente un schéma d'un dispositif Soxhlet.



Figure 9 : Schéma d'un dispositif Soxhlet.(Originale,2016)

Les huiles contenues dans la phase organique sont récupérées après évaporation rotative par un appareille dite ROTADEST.

$$R (\%) = (\text{poids de l'huile fixe obtenue} / \text{poids des graines utilisées}) \times 100$$

2. 5. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits étudiés in vitro

L'évaluation des propriétés antimicrobiennes consiste à estimer l'inhibition de la croissance des germes soumis à l'HE du thym et l'extrait N-Hexane de la nigelle. Dans un premier temps, deux méthodes qualitatives et complémentaires (aromatogramme et micro-atmosphère) ont été utilisées afin de sélectionner les souches sensibles à l'action inhibitrice des deux huiles testée. Une seule méthode quantitative (méthode de dilution en milieu gélosé) a été abordée sur les souches fortement sensibles sélectionnées afin de déterminer les CMI.

Préparation de l'inoculum : des colonies bien isolées ont été transférées dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité voisine à celle de 0.5 McFarland (10⁶ UFC/ml) en utilisant un agitateur de type

Chapitre II : Matériel et méthodes

vortex. Toutes les souches ont été cultivées sur Mueller- Hinton Agar (MHA) sauf les streptocoques sont cultivées sur gélose au sang frais.

2.5.1. Technique de l'aromatogramme (diffusion en milieu solide)

Cette méthode est utilisée par plusieurs auteurs (**Mebarki, 2010 ; Tyagi et Malik, 2011 ; Boukhatem et al, 2014 ; Chahboun et al, 2015 ; Waleed Al Abbasyet al, 2015 ; Touhami et al, 2016**).

Dans notre étude, nous avons testé l'activité antimicrobienne des huiles selon la méthode de **Boukhatem et al., 2014** illustrée dans la figure 10. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des HE sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte Pétri en créant un gradient de concentration décroissante au fur et à mesure de l'éloignement du disque.

Technique : Cette technique permet de mettre en évidence la diffusion des composants volatils des HE à l'intérieur d'une boîte de Pétri.

-Ensemencer les boîtes par la suspension bactérienne standardisée à 0.5 McFarland.

-Déposer les disques stériles de 9 mm au centre de la boîte.

-Imprégner les disques par 3 doses croissantes à savoir 20, 40 et 60µl par disque à l'aide d'une micropipette. Ceci a été fait dans le but d'apprécier l'action « Dose-Dépendante » des huiles sur l'inhibition de la croissance des souches testées. Maintenir les boîtes à température ambiante pendant 30 min, ensuite incuber dans l'étuve à 37 ° C.

Lecteur : A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque et dont le Diamètre de la Zone d'Inhibition (DZI) est mesuré (y compris le diamètre du disque de 9 mm) pour les souches d'essai comparativement aux témoins négatifs, et exprimé en mm. Pour chaque souche, des disques sans échantillons ont été utilisés comme contrôle négatif et les témoins positifs sont les disques d'ATB qui vont servir comme référence afin de comparer leur pouvoir inhibiteur avec nos échantillons des huiles.

2.5.2. Technique de microatmosphère (diffusion en phase vapeur)

Cette méthode est utilisée par certains auteurs (**Tyagi et malik, 2011 ; Ajjouri, 2013 ; Boukhatem et al, 2014**). Nous avons utilisé cette méthode dans le but d'apprécier les propriétés inhibitrices de la phase volatile de l'HE. La différence entre cette méthode et l'aromatogramme réside dans la position et la taille du disque imprégné. Ce dernier est déposé

Chapitre II : Matériel et méthodes

au centre du couvercle de la boîte Pétri préalablement ensemencé par une souche bactérienne, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé (Figure 10).

Technique : De la même manière que l'aromatogramme, nous avons appliqué 3 doses croissantes en HE. En premier lieu, 20 μ l d'HE est déposée sur un disque de papier filtre stérile de 20 mm de diamètre. Dans le 2^{ème} essai, un disque de 40 mm a été imprégné par 40 μ l d'HE alors que pour le dernier, un disque de 60 mm a été chargé par 60 μ l l'HE. Le diamètre du disque diffère selon la quantité d'HE à imprégner afin d'obtenir un bon étalement et, par conséquent, une meilleure évaporation de l'HE. L'incubation et la lecture des résultats ont été menées de la même manière que la première méthode.

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne évalué par les deux méthodes est citée par Mutai (**Mutai *et al* ; 2009**) :

Tableau III : L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne (Mutai *et al* ; 2009)

Non inhibitrice	Légèrement inhibitrice	Modérément inhibitrice	Fortement inhibitrice	Très fortement inhibitrice
D < 10mm	11 \leq D \leq 15mm	21 \leq D \leq 29mm	16 \leq D \leq 20 mm	D \geq 30 mm

2.5.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice par dilution en milieu gélosé

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont définies comme la dernière ou la plus basse concentration d'un agent antimicrobien qui peut inhiber visiblement la croissance d'un microorganisme après 24 h d'incubation pour les bactéries. Cette CMI a été déterminée selon la méthode de dilution dans un milieu gélosé Muller Hinton pour les bactéries.

Technique : Préparer une suspension de 0.5 McFarland (10⁶ UFC/ml) à partir d'une culture microbienne de 24h.

-Liquéfaction de 200 ml du MH et SAB à 95°C dans un bain marie ; en lui additionnant 1 ml de tween 80, puis on le laisse 10 mn dans l'étuve à 45°C.

-Préparer une série de dilution de chaque extrait allant de 2 jusqu'à 0.03% dans les précis.

Chapitre II : Matériel et méthodes

La réalisation des dilutions se fait comme suit :

-1ml d'extrait est diluée dans 50 ml de milieu dans un premier flacon ce qui donne une dilution de 2% (2 ml d'extrait dans 100 ml du milieu).

-Verser la moitié du 1^{er} flacon dans 2^{ème} flacon et ajuster avec 25 ml de milieu pour la dilution 1%.

-Procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 0.03%.

-Verser chaque dilution sur la boîte de Pétri et laisser les milieux solidifier.

-Ensemencer les boîtes par spotage à l'aide d'une micro seringue à raison de 1 – 2 µl des suspensions microbiennes puis incubé à 37°C pendant 24h

Préparer les boîtes témoin (positif) contenant le MH avec tween sans extrait.

La lecture : Se fait visuellement, en observant l'apparition d'une éventuelle croissance microbienne, en comparaison avec une boîte témoin. La CMI se définit comme étant la plus petite concentration de l'huile pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

A noter que les CMI ont été déterminées uniquement pour quelques souches ayant manifesté une grande sensibilité à l'action inhibitrice de l'HE par les méthodes préliminaires, et à cause de manque des milieux de culture.

Chapitre II : Matériel te méthodes

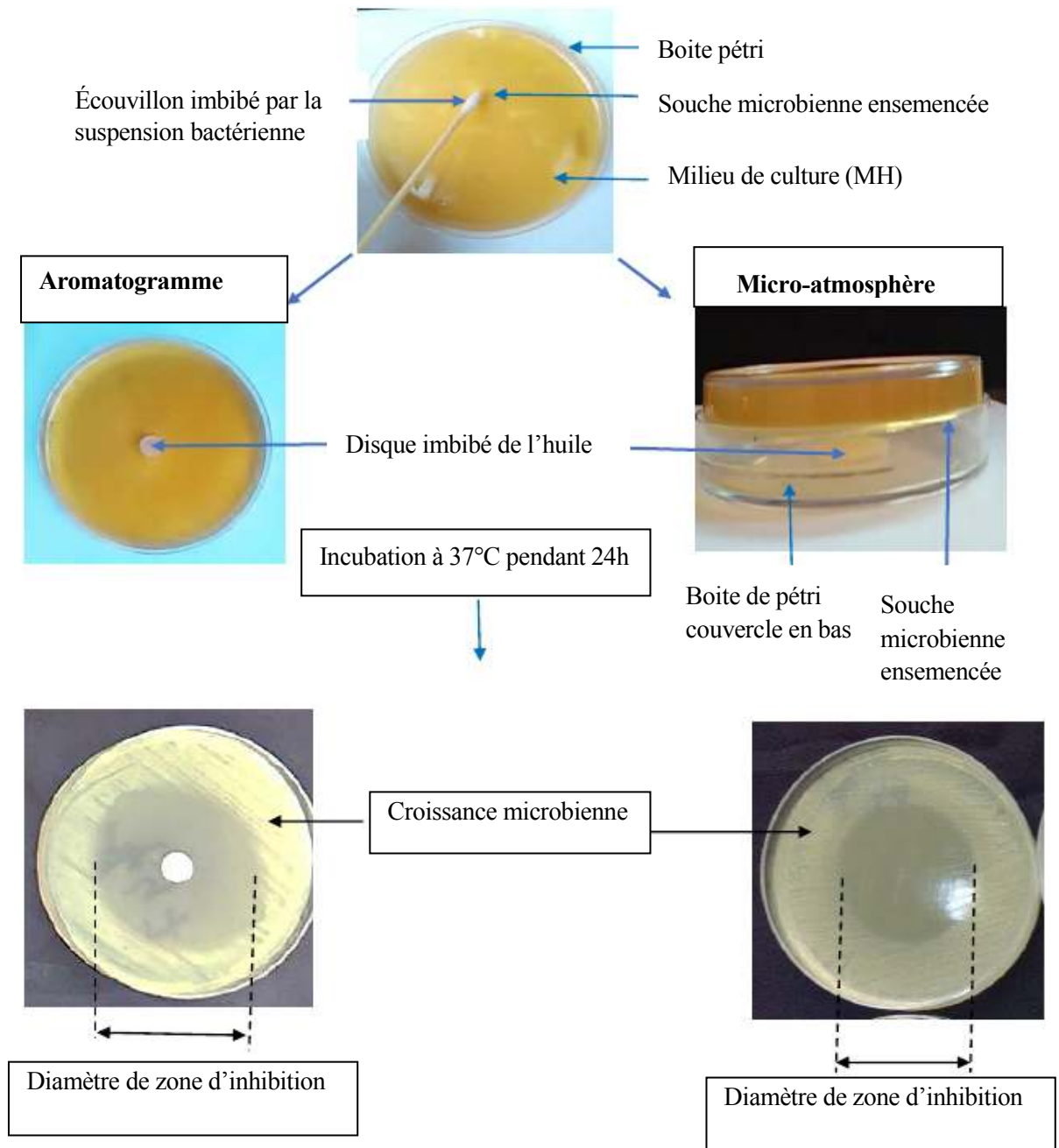


Figure 10. Illustration de la méthode aromatogramme et micro-atmosphère
(Originale. 2016)

III. Résultats et discussion

1. Répartition globale des prélèvements d'urine

Parmi 347 Prélèvements reçus de différents services (maladie infectieuse, Médecine interne, Chirurgie, Pédiatrie, Maternité, l'urgence et à titre externe) l'examen bactériologique montre que 52 prélèvements se sont révélés positifs (14.98%), 220 négatifs (63.40%), et 75 contaminés (21.61%).

La figure 11 représente la répartition globale des prélèvements d'urine.

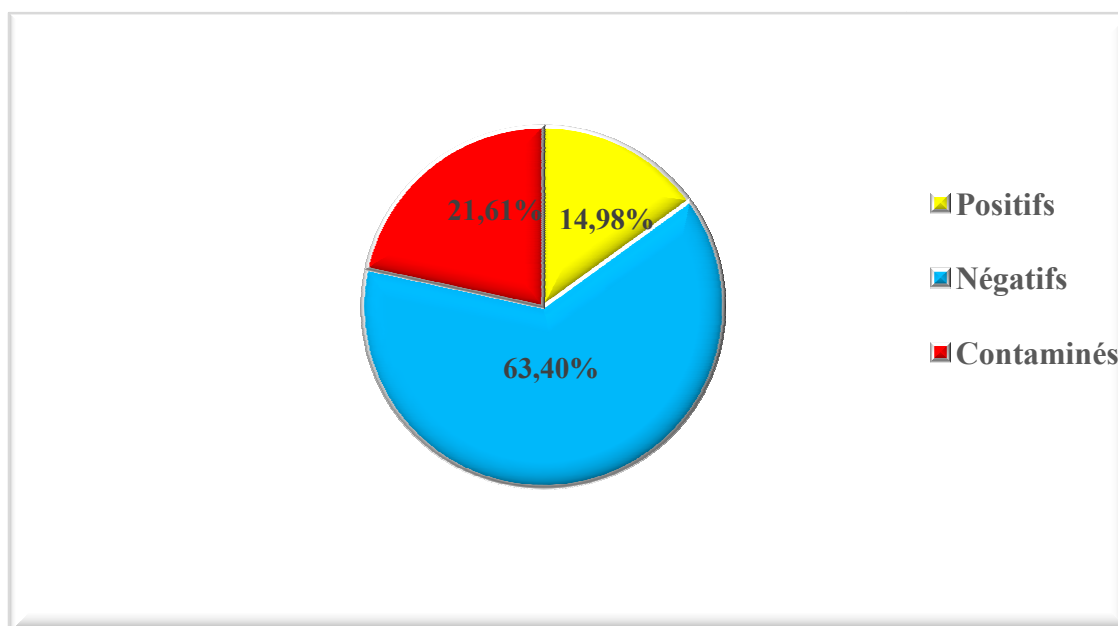


Figure 11. Répartition globale des prélèvements d'urine

2. Répartition globale des prélèvements de pus

Parmi 42 Prélèvements reçus de différents services (maladie infectieuse, Médecine interne, Chirurgie, Pédiatrie, Maternité, l'urgence et à titre externe), l'examen bactériologique montre que 26 prélèvements sont révélés positifs (61.90%) (Dont 17 prélèvements sont des cultures monomicrobiennes (un seul espèce Bactérienne), et 9 prélèvements sont des cultures polymicrobiennes (plusieurs espèces Bactériennes) et 16 négatifs (38.1%), et aucun prélèvement contaminé (0%). La répartition globale des prélèvements de pus est représentée dans la figure 12.

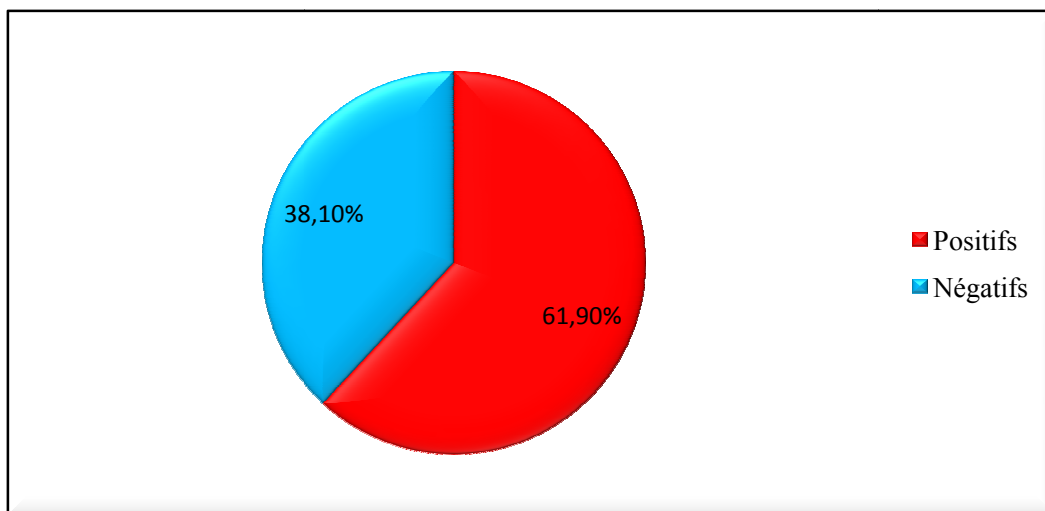


Figure 12 : Répartition globale des prélèvements de pus

3. Isolement et identification des souches

3.1 Répartition des souches par groupe bactérien et par espèces

A partir des 93 prélèvements positifs, on a identifié 80 bactéries à Gram négatif (dont 77,41% (72/93) sont des entérobactéries, 7,52% (7/93) sont des *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* et *Pseudomonas* sp) et 1,07% (1/93) sont des *Acinetobacter baumannii*), et 13 bactéries à Gram positif (dont 11,82% (11/93) sont des staphylocoques (*S. aureus* et SCN) et 2,15% (2/93) sont des streptocoques. La figure 13 montre la répartition des différents groupes bactériens.

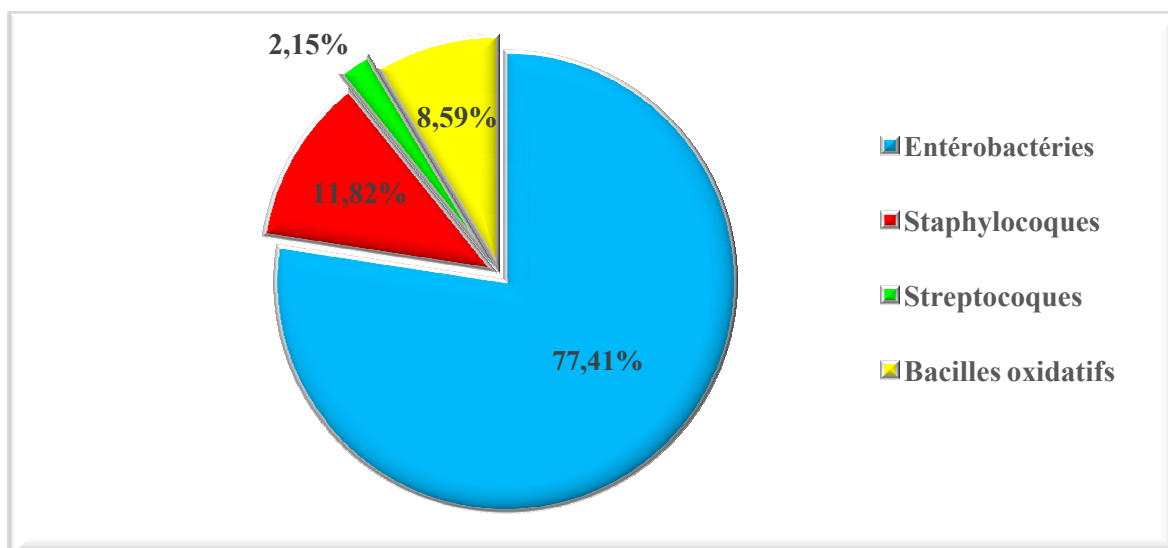


Figure 13. Répartition des souches par groupe bactérien

La répartition des germes isolés et leur taux de résistances est mentionnée dans le Tableau récapitulatif IV ci-dessous.

Tableau IV. Répartition des germes isolés et leur taux de résistances

Espèce	Souches résistantes	Taux	Souche sensibles	Nombre total	Taux
<i>Escherichia coli</i>	25	26,88%	12	37	39.78%
<i>Proteus mirabilis</i>	10	10,75%	6	16	17.20%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	4,30%	3	7	7.52%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0%	7	7	7.52%
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2,15%	2	4	4.30%
<i>Proteus vulgaris</i>	2	2,15%	1	3	3.22%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1,07%	1	2	2.15%
<i>Morganella morganii</i>	1	1,07%	1	2	2.15%
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1,07%	0	1	1.07%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0%	1	1	1.07%
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3,22%	7	10	10.75%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	1,07%	0	1	1.07%
<i>Streptococcus sp</i>	1	1,07%	1	2	3.22%
Total	51/93	54.83%	42/93	93	100%

D'après les résultats illustrés dans le tableau IV, le taux des bactéries résistantes est de (54.83%) (51/93). Ces résultats confirment l'émergence des bactéries résistantes dans les milieux hospitaliers. *E.coli* est l'espèce la plus fréquemment isolées (**39,78%**) avec un taux de résistante de **26,88%**, suivi par *P.mirabilis* avec un taux de résistante de **17,20%**. Selon l'étude faite par **Sekhsokh et al., (2008)**, les microorganismes isolées étaient surtout des entérobactéries (**85 %**) dont *Escherichia coli* sont les plus fréquemment isolées avec un taux (**44,7 %**).

3.2. Identification morphologique et biochimique

Les résultats de l'examen macroscopique et microscopique des souches et les résultats des tests biochimiques sont présentés dans l'Annexe N°II.

Tableau V : Les souches microbiennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau V : Les souches microbiennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

Souche bactérienne	Origine	Souche bactérienne	Origine
<i>Escherichia coli</i> BLSE (Ec1)	ECBU	Kp2 BLSE	Pus cutanée
<i>E. coli</i> BLSE (Ec2)	Pus	Kp3 BLSE	ECBU
<i>E. coli</i> (Ec3)	ECBU	Kp4 BLSE	LCR
<i>E. coli</i> (Ec4)	ATCC (25922)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ECBU
<i>E. coli</i> (Ec5)	Hémoculture	<i>Proteus mirabilis</i> Pm1	Pus d'oreille
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE(Kp1)	Pus du pied diabétique PPD	<i>P. mirabilis</i> Pm2	PPD
<i>P. mirabilis</i> (Pm3)	PPD	<i>Citrobacter freundii</i>	PPD
<i>P. mirabilis</i> (Pm4)	ECBU	<i>Enterobacter cloacea</i>	PPD
<i>Proteus vulgaris</i>	PPD	<i>Serratia liquifaciens</i>	ECBU
<i>Salmonella sp.</i>	Coproculture	<i>Serratia marcescens</i>	ECBU
<i>Shigilla sonnie</i>	Coproculture	<i>Acinetoobacter baumannii</i>	ECBU
<i>Pseudomonas sp.</i>	Pus cutanée	<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa1)	Pus cutanée
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa1)	ECBU	<i>S. aureus</i> (Sa2)	PPD
<i>P. aeruginosa</i> (Pa2)	Hémoculture	<i>S. aureus</i> (Sa3)	Pus d'abcès
<i>P. aeruginosa</i> (Pa3)	ATCC	<i>S. aureus</i> (Sa4)	PPD
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ECBU	<i>S. aureus</i> (Sa5)	ECBU
<i>Streptococcus sp.</i>	PPD	<i>S. aureus</i> (Sa6)	ATCC(25923)
<i>Streptococcus sp.</i>	PPD		

Parmi les bactéries isolées, nous avons sélectionnées quelques souches pour étudier l'effet d'huile essentielle de thym et l'huile fixe de la nigelle sur ces isolas. Le tableau V présente les souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

NB. L'étude bactériologique des prélèvements de LCR, Hémoculture et coproculture sont faite par les techniciens de laboratoire.

4. Extraction et rendement en huile essentielle de la nigelle

Aucun rendement n'a été obtenu par l'hydrodistillation des graines sèche de la nigelle menée dans un appareil Clevenger. Ceci pourrait s'expliquer par la faible contenance des graines en huile essentiel, leur rendement varie de 0,18 à 1,7% du poids total (**Benkaci-Ali et al., 2007**). De plus, les rendements les plus élevés des huiles essentielles ont été recueillis pendant la période de pleine floraison (de Mai à Juin). D'autre part, nous avons fait 7 extractions avec une quantité de 100g à cause du manque de matériel (Ballon de 2 litres).

5. Extraction et rendement de L'extrait N-Hexane de la nigelle

Le rendement en huile, extraite des graines de la nigelle est de **42.11%** obtenu d'une prise d'essai de 30g constituée par des gaines sèche. Cependant, ce taux est comparable à celui rapporté par **Hadjazi et al., 2015**, (40%). La variation de rendement en l'huile peut être attribuée l'origine de la plante, le climat, la nature du sol, le temps de collecte et le mode d'extraction. L'huile obtenue a une consistance liquide un peu visqueuse avec une couleur marron et une odeur fortement épicé.

6. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait N-Hexane de la nigelle

L'activité antibactérienne de l'extrait est évaluée par la méthode de diffusion du disque (aromatogramme seulement) sur 6 souches à Gram négatifs et 2 souches à Gram positifs. La sensibilité des différentes souches vis-à-vis l'huile étudiée est déterminé selon le diamètre d'inhibition observé. A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul. Pour ce test, 3 doses croissantes en l'huile ont été utilisées (une goutte, 2gottes, 3gouttes/disque) pour apprécier l'action « Dose-Dépendante » de l'extrait de la nigelle. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau VI.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau VI. Résultats de la méthode d'aromatogramme

Méthode utilisée	Aromatogramme			Antibiogramme
	1 gtte	2 gttes	3 gttes	Les disques d'ATB
Bactéries à Gram-				
Souches testées	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
<i>E. coli</i> (Ec 4)	-	-	-	AMC=15; SXT=25; GM=20; CL=R; C=22; AK= 23; CT _x =35; C _x =25; AM=R ;
<i>E.coli</i> (Ec3)	-	-	13	CN=25 ;NA=25 ;COT=32 ; AK=20 ; SXT=R ; CL=R
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	11	AML=R ; GM=22 C=30 ; CN=R ; IPM=36 ; TCC=32 ; CT _x =40
<i>Pseudomonas aerogenosa</i> (Pa3)	-	-	-	ATM=30; IPM=30 ; CAZ=18 ; GM=16 ; PIP=30 ; AK = 25 ; TOB=22
<i>Salmonella sp.</i>	-	-	12	CT _x = 32; C=28; CZ=24; GM=20; AM=R
<i>Shigilla sonnei</i>	-	12	15	C=30 ;AM=R ; GM=19; CZ=23; FOX=23;
Bactéries à Gram+				
<i>S.aureus</i> (Sa6)	30	40	40	OX ₁ =R ; P=36 ; FOX=30 ; GM=21 ; C=36 ; K=21 ; TE=32 ;VA =20 ; CD=31 ;E=30 ; AK=26 ; SXT=28 ; OX ₅ =41
<i>Streptococcus sp.</i>	25	30	35	P=R ; VA=18 ; CD=35 ; RA=30 ; LVX=28 ; GM=35; TE=R ; E=30 ; AM=25 ; COT =35 ; C=34.

nd : non déterminé ;(-) : absence des zone d'inhibition ; ATB : Disque d'antibiotique (contrôle positif) ; AMP/AM/AML= Amoxicilline/Ampicilline; AMC = Amoxicilline + Ac. Clavulanique ; AK = Amikacine; C = Chloramphénicol; CAZ = Ceftazidime ; CN30 =Céfalexine ; CIP = Ciprofloxacine ; CL=Colistine ; COT = Cotrimoxazole ; CTX = Céfotaxime / Ceftriaxone ; CZ = Cefazoline ; E= Erythromycine ; FA= Acide Fusidique ; FOX/CX = Céfoxitine ; GM = Gentamicine ; IPM = Imipénèm ; K = Kanamycine ; LVX = Lévofloxacine ; NA = Acide nalidixique ; OX = Oxacilline ; P = Pénicilline ;RA= Rifampicine ; TE = Tétracycline ; TCC =Ticarcilline + Acide Clavulanique ; VA = Vancomycine.

D'après le tableau VI, on constate que l'huile de la nigelle est fortement inhibitrice sur *S. aureus* (Sa6) et *Streptococcus sp.* avec une zone d'inhibition (ZI) (ZI= 30mm, ZI = 25mm) respectivement pour la faible dose de l'huile et exerce une activité légèrement inhibitrice sur les souches *P. vulgaris*, *Salmonella sp.* et *E. coli* pour la grand dose avec une zone d'inhibition (ZI=11mm, ZI=12mm, ZI=13mm, ZI=15mm) respectivement. Notons aussi que la souche *Shigella sonnei* est légèrement inhibée avec une zone d'inhibition ZI=12 pour la dose (2 gouttes /disque). Par contre, nous avons remarqué que les deux souches *E. coli* (*Ec 4*) et *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa3*), ont présenté une résistance vis-à-vis l'huile testée.

Par ailleurs, une étude comparative a été faite avec les contrôles positifs, à l'aide d'une gamme d'antibiotiques. En égard des résultats obtenus, il en ressort que notre échantillon d'huile possède un bon pouvoir antibactérien contre *S. aureus* et *streptococcus sp.*

Dans notre étude, l'extrait N-Hexane a été jugé plus efficace sur les bactéries à Gram + que les bactéries à Gram - ce qui est conforme avec des études antérieures où les composés dérivés de plantes présentent souvent une activité considérable contre les bactéries Gram positif mais pas contre les espèces Gram négatives (**Toama et al ; 1974 ; El amri et al., 2014 ; Nor Aishah et al.,2013 ; Rafati et al., 2013 ; Salman et al.,2008 ; Akloul et al., 2014 ; Karrouchi et al ; 2014**)

Les bactéries à Gram négatives ont une efficace barrière de perméabilité, constituée de la membrane externe, ce qui limite la pénétration des composés amphipatiques et les pompes multirésistance qui expulsent les toxines à travers cette barrière. Il est possible que l'apparente de l'inefficacité de l'activité antimicrobienne de la plante vis-à-vis ces bactéries est en grande partie en raison de cette barrière de perméabilité. (**Salman et al., 2008**)

Selon l'étude de **Tuaseef Suaultan et al., 2009**, la composition chimique de l'HF de la nigelle cultivée en Pakistan e montrent qu'elles est composées d'acide gras insaturés ,dont les plus dominantes sont les acides linoléique, oléique et palmitique respectivement ,des acide gras monoinsaturés et des acides gras polyinsaturés. De plus l'HF contient des composants fonctionnels comme le Thymoquinone qui représente aussi le composant major de l'HE de la nigelle. Grâce à des études antérieures, il a été la preuve que la Thymoquinone est dotée d'une activité antimicrobienne (**Forouzanfar et al., 2014 ; Aftab et al., 2015 ; Salman et al.,2008 Kahsai Welderufael, 2002**). Le thymoquinone inhibe significativement la synthèse des protéines et de l'ARN dans *S. aureus* (**Kahsai Welderufael, 2002**). On outre **Zheng et al., 2005** démontrent pour la première fois que l'action antibactérienne des acides gras insaturés est médiée par l'inhibition de la synthèse des acides gras insaturés a longue chaine , tels que l'acide linoléique, qui montrent une activité antibactérienne et sont les ingrédients clés des additifs alimentaires antimicrobiens et des herbes antibactériennes.

Cependant, le mécanisme précis de cette activité antimicrobienne reste incertain. Dans cette étude ils ont constaté que l'acide linoléique inhibe la protéine réductase bactérienne enoyl-acyl (FabI), un composant essentiel de la synthèse bactérienne d'acides gras, qui a servi de cible prometteuse pour les médicaments antibactériens. Des acides gras insaturés additionnels, y compris l'acide palmitoleique, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide arachidonique ont également montré l'inhibition de FabI.

Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité antibactérienne des composants de l'HF (Thymoquinone et acide gras). Nos résultats sont en concordance avec ceux présentés dans le tableau VII mais notre huile est plus efficace surtout contre *S.aureus* et *Streptococcus* avec une DZI (40 mm et 35mm) respectivement.

Tableau VII. Résultats de quelque étude sur l'activité antibactérienne de la nigelle

Souches testées	DZI	Référence
Bactéries à Gram positive	Entre 9,5mm et 35mm	Akloul <i>et al.</i> ,2014
<i>E.coli</i>	14mm	
<i>S.aureus</i>	25mm	Zwidah <i>et al.</i> ,2015
<i>E.coli . Pseudomonas</i>	9mm10mm	
<i>S. aureus, B. cereus, E. coli, S. typhi, E. aerogenes, P. aeruginosa. P. vulgaris</i>	32, 15, 14.14, 13 mm respectivement	Hadjazi <i>et al.</i> ,2015

7. Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du Thym

L'activité antibactérienne de l'HE du *Thymus algeriensis* est évaluée par la méthode de diffusion du disque (aromatogramme) et la méthode de micro-atmosphère. Pour ce test, 3 doses croissantes en HE ont été utilisées (20, 40 et 60µL /disque) pour apprécier l'action « Dose-Dépendante » de l'HE. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau VIII.

Tableau VIII. Résultats de l'aromatogramme et microatmosphère de *Thymus algeriensis*

	Aromatogramme		Microatmosphère			Antibiogramme			
	Quantité HE 20.40.60 (µL /disque)	Diamètre des zones d'inhibition	25	32	75		60	65	85
<i>E. coli (Ec 1)</i>			25	32	75	60	65	85	AK=21; NA=25; GM=20; C _x =25; FF=27; SXT=25; COT=R; AMC=R; CT _x =R; AMP=R
<i>Ec2</i>			35	68	75	40	60	76	AK=19; GM=18; FF=26; SXT=R; CZ =11; CT _x =25; TCC=12 ;AML=R ;
<i>Ec3</i>			30	60	70	40	65	75	AMC=15; AML= R; FF=24; CZ=26; SXT=25; CN=20; CL=R; CIP=35; C=22;
<i>Ec 4</i>			62	70	81	50	60	77	CT=12 ;NA=25 ;AML=20;STX=22;CZ=22 ;IPM=35 ;CT _x =31 ;COT=33
<i>K. pneumoniae (Kp1)</i>			30	50	70	30	54	72	AMC=R; AML=R; CZ=R; SXT=R ; AK =R; GM=R; CIP=R; NA=16; CT _x =R;
<i>Kp 2</i>			40	75	85	50	70	85	AML=R ; CZ=R ;AMC=24 ;GM=20 ;COT=11 ;C _x =24 ;CT _x =15 ;SXT=R
<i>Kp 3</i>			21	48	70	35	55	80	AMC=R; AML=R; CZ=R; SXT=R ; AK =21; CIP=21; NA=16; CL= R; C _x =R
<i>Kp 4</i>			30	64	85	45	70	85	CZ=35 ; FOX=26 ; CIP=42;AK =30CT _x =40;AMC=30; C=40; GM=25
<i>K. oxytoca</i>			45	60	67	40	52	62	AML=R ; TCC=20 ; SXT=25 ; AK=20 ;NA=20 ; CT _x = 35 , ; CZ=21 ;CL=R
<i>P.mirabilis (Pm1)</i>			30	35	70	40	60	72	C=R ; FF=R ; AML= R ; GM=R ; CL=R ; CZ=R ; AMC=R ; SXT=R ; CIP=R
<i>Pm 2</i>			45	65	75	40	70	82	AMC =R; GM= R; CT _x = 33; CL=R; AK=26; COT= 21; AMP=29; CN = 26
<i>Pm 3</i>			30	45	70	40	60	70	C = R; AMC =R; AK=R; CT _x = 13; AML=R; GM=R; SXT=R ; CZ=R
<i>Pm 4</i>			35	56	74	65	85	85	; CT _x = 44; CL=R; IPM=32; AK=22; COT= 21; NA=R; FOX=30,TCC=30

<i>P. vulgaris</i>	30	40	50	45	60	70	SXT=R ; FOX=24 ; AK=28 ; CL=R ; AML=R ; GM=22 C=30 ; CN=R
<i>Pseudomonas aerogenosa (Pa1)</i>	25	40	55	nd	nd	nd	ATM=25;TCC=25;IPM=30 ; GM=15 ; PI=30 ; TOB=21 CT _x = 28; FF=18
<i>Pa 2</i>	35	40	60	Nd	Nd	nd	AML=R; ATM=26; IPM=38 ;GM=15 ;PI=27 ; TOB=21 . CT _x = 28;
<i>Pa3</i>	0	14	25	-	-	-	ATM=30;IPM=30 ; GM=16 ; PI=30 ; AK = 25 ; TOB=22
<i>Pseudomonas sp</i>	15	20	25	-	-	-	PI= 21 ; ATM = 23 ; GM=15 ; CIP=23 ; TCC=20 ; TOB=18 ; IPM=15;
<i>Acinetobacter baumani</i>	42	60	78	50	85	85	CIP=27; SXT=18 ; CL=R ; GM=20;IPM=40; TOB =22; TCC=22 ; CAZ=15
<i>Citrobacter freundii</i>	20	50	60	40	75	85	AML=R ; TCC=R ; CT _x =R ; FOX=R ; FF=29 ; CZ=R
<i>Enterobacter cloacea</i>	30	60	70	60	85	85	AML=R ; GM=R ; AMC=R ; CT _x =R ; CZ =R ; C= R FOX= R ; SXT=R
<i>Serratia marcescens</i>	27	32	76	30	53	74	AML=R ; CZ=R ; CL=R ; CT _x =15 ; AK=21 ; FOX= R ; GM=20 ; FF=21 ; IPM=35
<i>Serratia liquifaciens</i>	35	50	70	57	62	85	AML=R ; CZ=R ; CL=R ; TCC=25 ; CT _x 18 ; NA=25 ;
<i>Salmonila sp</i>	28	35	70	nd	nd	nd	CT _x = 32; C=28;CZ=24; GM=20; AM=R ; FOX =28
<i>Shigilla sonnei</i>	25	35	40	35	65	85	C=30 ; AML=23; GM=19; CZ=23; FOX=23; FF=21
<i>Staphylococcus aureus (Sa 1)</i>	40	55	84	45	85	85	GM=R ; K=R ; P=R ; C=30 ; OXA ₅ =R ; FA=R ; C _x =R ; TE=32 ; FA= R ; RP =23
<i>Sa2</i>	50	75	85	60	85	85	E=33 CD=33 ; K=25 ; P=20 ; VA=20 ; SXT=28 ; TE=34 ; C _x =33 ; OXA ₅ =30

Sa3	36	42	85	50	70	85	;CD=34 ; E=20 ; OXA ₁ =R ; VA=25 ; SXT=30 ; TE=R ; OXA ₅ =40 ; RP=20
Sa 4	20	25	30	50	79	85	FOX=R GM=R ; K=R ; OX ₁ =R ; OX ₅ =R ; FA=R ; P=R ; CIP=R ; TE=18
Sa 5	55	60	85	50	70	85	OX ₁ =R ; P=R ; FA=R ; FOX=R ; GM=32 ; C=28 ; K=30 ; TE=30 ; VA =22 ; CD=20 ; RP=40 ; OX ₅ =38
Sa 6	72	85	85	80	85	85	OX ₁ =R ; P=36 ; FA=37 ; FOX=30 ; GM=21 ; C=36 ; K=21 ; OX ₅ =41
S. epidermidis	42	52	75	53	70	78	TE=38 ; OX ₁ = 17 ; K =30; VA =25 ; E=R; SXT=R ; OX ₅ = 45;; RP=R
Streptococcus sp.	35	40	70	45	67	75	E =R ; CD=R ; RP =R ; TE=18 ; P=42 ; RIF=34

nd : non déterminé ; (-) : absence des zone d'inhibition ; ATB : Disque d'antibiotique (contrôle positif) ;

AMP/AM/AML= Amoxicilline/Ampicilline; AMC = Amoxicilline + Ac. Clavulanique ; AK=Amikacine; C= Chloramphénicol CAZ /
 = Ceftriaxone ; CN30 =Céfalexine ; CIP = Ciprofloxacine ; CL = Colistine ; COT = Cotrimoxazole ; CTX = Céfotaxime
 Ceftriaxone ; CZ = Cefazoline ; E= Erythromycine ; FA= Acide Fusidique ; FOX/CX = Céfoxitine ; GM = Gentamicine ; IPM
 =Imipénèm ; K =Kanamycine ; LVX = Lévofloxacine ; NA = Acide nalidixique ; OX = Oxacilline ; P = Pénicilline ;
 RA= Rifampicine ; TE = Tétracycline ; TCC =Ticarilline + Acide Clavulanique ; VA = Vancomycine.

D'après le **tableau VII**, nous pouvons constater que la quasi-totalité des souches bactériennes étudiées sont sensibles vis-à-vis l'huile essentielle de thym, dont le diamètre des zones d'inhibition augmentent en fonction du dose d'huile essentielle et oscillent entre 15 et 72 mm pour les disques imprégnés de 20 μ L d'HE, entre 20 et 85 mm avec les disques imprégnés de 40 μ L d'HE et entre 25 et 85 mm avec les disques imprégnés de 60 μ L d'HE. *S.aureus* (Sa6) demeure l'espèce la plus sensible avec un diamètre inhibition de 72 mm à la plus faible dose en HE. Une inhibition totale de la croissance a été notée pour la quantité d'HE de 60 μ L /disque pour les bactéries *S.aureus* (Sa2, Sa3, Sa5, Sa6) et *K.pneumoniae* (Kp2).

En plus, une activité légèrement inhibitrice a été observée pour *Pseudomonas aeruginosa* (Pa1 et Pa2). Ces souches possèdent un potentiel de résistance élevé vis-à-vis les huiles essentielles testées. Cette résistance n'est pas surprenante. Ceci a été confirmé par plusieurs études antérieures (**Dorman et Deans, 2000**).

Par ailleurs, une action « dose-dépendante » a été aussi enregistrée pour la majorité des isolats étudié. On note aussi que l'HE de thym est actif sur tous les souches peu importe leur site d'infection, et leur pathogénicités, donc on peut dire que HE de thym un antibactérien à large spectre d'action.

L'étude comparative qui a été faite avec le contrôle positif (ATB) permet confirmer que notre échantillon d'HE de thym est doué d'un fort pouvoir antibactérien, largement supérieur à celui du témoin positif où les DZI obtenus ne dépassent pas la valeur de 45 mm.

Notre étude montre qu'il n'y avait pas de différence significative de effet antibactérienne de l'He sur les bactéries à Gram- et les bactéries à Gram +

Une étude menée par **Dob et al., 2006** sur les thymus d'Afrique de nord a démontré que le composé majoritaire était le thymol chez les espèces d'Algérie et du Maroc et le carvacrol chez les espèces de Tunisie.

De nombreux travaux ont été réalisés sur l'HE du thym. Le tableau IX nous donne une étude comparative de la composition chimique de thym.

Selon **Dormans et Deans., 2000** l'activité antibactérienne des HE ainsi que leur mode d'action sont directement influencés par la nature et la proportion de leurs constituants qui entrent dans leur composition. Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée

Notre recherche révèle que l'activité inhibitrice de *T. algeriensis* est très forte sur toutes les souches rassemble avec les travaux de **Chemmat et al., 2012**. Cette activité elle est due à la nature des principaux composants actifs. le thym étudié par **chemmat et al., 2012** se

caractérise par un contenu riche de ces composés phénoliques tels que le thymol (71%) et le carvacrol (4%) qui exerce une forte activité antibactérienne.

De plus, les études antérieures de (**Dob *et al.*, 2000 ; Amarti *et al.*, 2010 ; Zouari *et al.*, 2012 ; Hazzit *et al.*, 2009 ; Ben El Hadj Ali *et al.*, 2015 ; Zayyad *et al.*, 2014 ; Ouakouak *et al.* ; 2015) réalisés sur l'HE du thym révèle que ce dernier est doté par une forte activité antimicrobienne qui varie selon la composition chimique dont le plus puissant ceux qui est riche en composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol.**

Il a été rapporté que les HE contenant des aldéhydes ou des phénols, tels que cinnamaldéhyde, le citral, carvacrol, l'eugénol ou thymol comme principaux composants ont montré l'activité antibactérienne la plus élevée, suivie par HE contenant des alcools terpéniques. Les autres, contenant des cétones ou des esters, tels que les β -myrcène, α -thuyone ou l'acétate de géranyle avaient une activité beaucoup plus faible. Tandis que les huiles volatiles contenant des terpènes hydrocarbures étaient généralement inactives (**Nestor Bassolé et Juliani, 2012**).

Des études ont montré que le thymol interagit avec les membranes cellulaires. L'interaction affecte la perméabilité de la membrane, ce qui a été documenté par la perte de potentiel de la membrane, l'absorption cellulaire du bromure d'éthidium et la fuite d'ions potassium, d'ATP et de carboxyfluorescéine (**Hyldgaard *et al.*, 2012**).

En conclusion, les résultats que nous avons obtenus sont très prometteurs pour une éventuelle utilisation de la fraction aromatique du thym comme principe actif, dans des préparations galéniques à visée thérapeutique pour lutter contre différentes infections bactériennes.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de thym sont colligés dans le **Tableau VII**. En concordance avec les résultats obtenus en chromatogramme, la phase vapeur de l'essence a exhibé une action inhibitrice sur la croissance de toutes les bactéries à l'exception de l'espèce *Pseudomonas* où les DZI obtenus varient entre 30 et 80 mm à la plus faible quantité en HE. Nous pouvons constater que la quasi-totalité des souches à l'exception de *Pseudomonas* bactériennes sont fortement sensibles, dont le diamètre des zones d'inhibition augmentent en fonction du volume des huiles essentielles des plantes avec une grande zone d'inhibition marquée pour *S. aureus* (80mm) pour un volume de 20 μ l d'huile essentielle de thym. De plus, une action bactéricide a été notée sur la croissance de bactéries suivantes : *S. aureus* (Sa1, Sa2, Sa3, Sa4, Sa5, Sa6), *E. coli* (Ec1), *K. pneumoniae* (Kp2 et Kp4), *P. mirabilis* (Pm4), *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens* et *Shigella sonnei* à la grande dose.

En revanche, pour d'autres germes microbiens, c'est la phase liquide qui présente une certaine efficacité par rapport à la vapeur, C'est l'exemple de *Klebsiella oxytoca* et *E.coli* (Ec5).

Pour ce qui de l'action antibactériennes de la phase vapeur des HE en générale, et celle de thym en particulier, il existe quelques études ont été réalisées à ce jour (**Tyagi et Malik, 2011 ; Kloucek et al., 2012 ; Laird et al., 2012., Inouye et al.,2001 ; Boukhatem et al., 2014**) ont mis en exergue l'efficacité de la phase vapeur sur l'inhibition de la croissance des germes par rapport à la phase liquide. Ceci a été confirmé, lors de notre étude, notamment sur les bactéries à Gram+ (voire figure 12). Cependant l'une des raisons pour lesquelles la phase vapeur est plus efficace est que les molécules lipophiles dans la phase aqueuse s'associe pour former des micelles et suppriment ainsi la fixation des HE à l'organisme, alors que la phase vapeur permet une fixation gratuite (**Laird et Phillips., 2012**).

Il existe de plus en plus des preuves que les HE en phase vapeur sont des systèmes antimicrobiens efficaces et qu'ils ont avantages sur l'utilisation d'HE en phase liquide comme augmentation de l'activité, utilisation à des concentrations plus faibles, capacité à être utilisé dans une gamme d'environnements, par exemple, comme décontaminant de l'air ambiant ou les systèmes de ventilation dans le milieu hospitalier pour limiter la propagation des germes microbiens et lutté contre les infections nosocomiales.

9. Résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La détermination des CMI a été accomplie uniquement pour les souches bactériennes ayant montré une grande sensibilité vis-à-vis de l'action inhibitrice des huiles essentielles. On s'est intéressé au 05 bactéries à cause de manque des milieux de culture.

Pour facilite la diffusion de l'huile essentielle qui sont également non miscibilité dans la gélose, nous avons incorporées un dispersant (tween 80) pour une bonne diffusion à travers le milieu gélosé. Par ailleurs, la gamme de dilutions en HE utilisée, lors de cette étude, varient entre 2% à 0.03%. Les résultats de cette analyse sont mentionnés dans le **Tableau IX**.

Tableau IX. Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI, µL/mL)

Souches bactériennes	CMI (µL/mL)
<i>S. aureus</i> (Sa6)	CMI < 0.03
<i>E.coli</i> (Ec4)	0.25
<i>Salmonella sp</i>	0.06
<i>Shigilla sonnei</i>	0.06

À l'égard de l'essence de *T. algeriensis* : Toutes les bactéries testées sont très sensibles à l'action inhibitrice de l'HE du thym, avec des valeurs de CMI de l'ordre de 0.06µL/mL pour *Salmonella sp* et *Shigilla sonnei*, de 0.25 µL/mL pour *E.coli*, et inférieur à 0.03 pour *S.aureus*. Nos résultats diffèrent de ceux trouvés par Dob et al., dont la CMI d'*E.coli* est à l'ordre de 5 µL/mL et la CMI de *S.aureus* est d'ordre de 2 µL/mL. De plus l'étude de **Amarti et al., 2010** montre que l'espèce d'*E.coli* et de *S.aureus* elles ont été inhibées à une CMI de l'ordre de 1/100 v/v. Cette variété de la CMI est probablement due à la grande variabilité de la composition chimique des essences du genre *Thymus* ainsi que l'interaction entre les antimicrobiens dans une combinaison peut avoir trois résultats différents, synergiques, additifs ou antagonistes. La synergie survient lorsqu'un mélange de deux composés antimicrobiens a une activité antimicrobienne supérieure à la somme des composants individuels. Un effet additif est obtenu lorsque la combinaison d'antimicrobiens a un effet combiné égal à la somme des composés individuels. L'antagonisme se produit lorsqu'un mélange de composés antimicrobiens a un effet combiné inférieur à celui appliqué séparément (**Hyldgaard et al., 2012**).

9. Etude comparative : aromatoigramme vs microatmosphère

Une étude comparative entre l'aromatoigramme et la microatmosphère a été réalisée afin de vérifier l'efficacité de l'action antimicrobienne de la phase vapeur de l'essence.

A la lecture comparative des résultats des deux méthodes, il apparaît que, d'une manière générale, certaines souches bactériennes sont plus sensibles à l'action inhibitrice de la phase vapeur que la phase liquide. C'est le cas notamment du *E.coli* (Ec1), *Proteus mirabilis* (Pm4), *Serratia Liquifaciens* et *Citrobacter freundii* où les DZI obtenus, en microatmosphère, sont deux fois plus supérieurs que ceux de l'aromatoigramme (**Figure 14**). En revanche et avec d'autres isolats (*S. aureus* (Sa1), *Acinitobacter*, *K. pneumoniae* et *Serratia marcescens*), aucune différence notable n'a été signalée. En plus, une activité légèrement inhibitrice a été observée sur *Pseudomonas aeruginosa*. Ces souches possèdent un potentiel de résistance élevé vis-à-vis l'huile testée.

Les études réalisées par **Tyagi et Malik (2010,2011)**, **Laird et Phillips (2012)** et (**Mandras et al., 2016**) ont mis en évidence l'efficacité de la phase vapeur sur l'inhibition de la croissance des germes par rapport à la phase liquide.

De plus, il est de plus en plus évident que les HE en phase vapeur sont des systèmes antimicrobiens efficaces et qu'ils pourraient présenter des avantages par rapport à leur utilisation en phase liquide, en particulier en milieu hospitalier. En fait, nos études démontrent une meilleure activité en phase vapeur (**Mandras et al., 2016**). Ceci a été confirmé, lors de notre étude, notamment sur les bactéries à Gram-.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

La différence d'activité antimicrobienne en phase liquide et en phase vapeur pourrait être due aux caractéristiques des HE telles que leur forte hydrophobicité et leur volatilité. En fait, lorsqu'il est ajouté à un milieu, l'OE se répartit plus ou moins dans la phase aqueuse en fonction de son hydrophobie relative. En phase liquide, l'activité dépend de la diffusibilité et de la solubilité des HE dans le milieu, tandis que dans le dosage en phase vapeur, elle dépend de la volatilité (Laird et Phillips 2012).

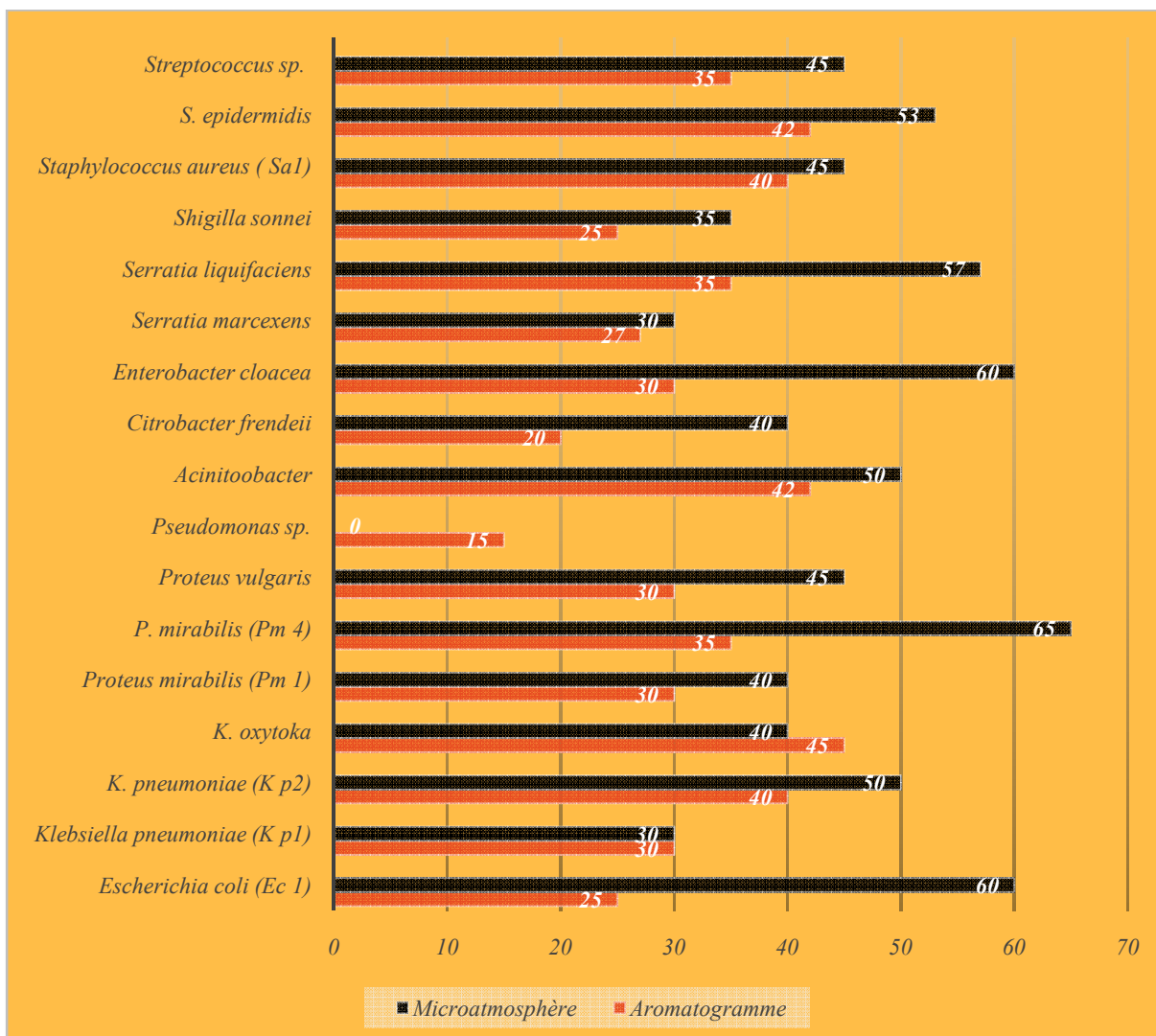


Figure 14. Etude Comparative: Aromatogramme Vs Microatmosphère de l'huile de thym (20 µl)

CONCLUSION

Conclusion

L'objectif de notre travail est de mettre en évidence l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et fixe de la nigelle et l'huile essentielle du thym *in vitro* sur nombreuse souches bactériennes, standardisées ou isolées cliniquement de différents prélèvements (urine, pus, sang, liquide céphalo-rachidien).

En résumé, nous avons obtenu au cours de notre étude les résultats suivants :

Au total 93 souches ont été isolées et identifiées, dont 80 sont des bacilles à Gram négatif (77.41% (72/93) sont des entérobactéries, 7.52% (7/93) sont des *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* et *Pseudomonas* sp) et 1.07% (1/93) sont des *Acinetobacter baumannii*), et 13 bactéries à Gram positif (dont 11,82% (11/93) sont des staphylocoques (*S.aureus* et SCN) et 2.15% (2/93) sont des streptocoques. L'étude de la sensibilité de ces souches aux antibiotiques a permis de sélectionner 51 souches résistantes à ces molécules avec une dominance des entérobactéries. Ces résultats confirment l'émergence des bactéries résistantes dans les milieux hospitaliers

Aucun rendement en huile essentielle n'a été obtenu par l'hydrodistillation des graines sèche de la nigelle menée dans un appareil Clevenger, par contre le rendement de l'extrait N-Hexane était de 42.11%.

L'activité antibactérienne de l'extrait de la nigelle est évaluée par la méthode de diffusion du disque (aromatogramme seulement) sur 6 souches à Gram négatif et 2 souches à Gram positif, isolées cliniquement et certaines souches de référence. Dans notre étude, l'extrait a été jugé plus efficace sur les bactéries à Gram + (*S.aureus* (Sa6) et *Streptococcus* sp) que les bactéries à Gram - (*P.vulgaris*, *Salmonella* sp et *E.coli*).

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Thymus algeriensis* est évaluée par la méthode de diffusion du disque (aromatogramme) et la méthode de micro atmosphère. D'après les résultats obtenus, la quasi-totalité des souches bactériennes étudiées sont sensibles vis-à-vis l'huile essentielle de thym, dont le diamètre des zones d'inhibition augmentent en fonction du dose d'huile essentielle. En plus, une activité légèrement inhibitrice a été observée sur *Pseudomonas aeruginosa* (Pa1 et Pa2). Ces souches possèdent un potentiel de résistance élevé vis-à-vis les huiles essentielles testées.

A la lumière de ces résultats obtenue dans la phase vapeur de l'huile essentielle de thym, on peu utilisées cette essence pour assainir l'air ambiant ou les systèmes de ventilation dans le milieu hospitalier pour limiter la propagation des germes microbiens et lutté contre

CONCLUSION

les infections nosocomiales. L'autre conclusion à souligner consiste à dire que l'HE du Thym a présenté de meilleurs résultats comparativement aux ATB utilisés comme référence.

Les résultats obtenus laissent entrevoir des perspectives d'application pharmaceutiques de l'extrait N-Hexane de la Nigelle et l'essence du thym comme une source potentielle des molécules naturelles bioactive dans le traitement des maladies infectieuses et même comme conservateurs dans les aliments.

Comme perspectives, il serait intéressant :

D'identifier et de quantifier les constituants de des huiles testées par des analyses chromatographiques.

Étudiée l'activité antifongique et antioxydant.

Evaluation de l'activité antimicrobienne in vivo. Le mode d'action des huiles au niveau cellulaire des germes microbiens a été rarement abordé. De même que la cinétique d'inhibition au cours de la croissance microbienne. Pour améliorer la compréhension des altérations cellulaires observées, un travail plus approfondi, impliquant les molécules actives des HE devra être entrepris. L'observation des effets produits sur l'ultra-structure bactérienne devra être réalisée en microscopie électronique à transmission.

En définitive, l'objectif premier de notre travail a été atteint puisque nous avons contribué à valoriser la fraction aromatique de thym et de la nigelle en aromathérapie anti-infectieuse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Afrin S, Kaur J, Khan MU, Khalilullah H, Osman G. (2016). *Nigella sativa* pleiotropism: A momentary gawk. European Journal of Pharmaceutical and Medical Research 3(6):244-247.
2. Ahmadi M, Scurtu M, Tulcan K, Boldura O-M, Milovanov O, Hutu I, Mircu C, Radulov I, Dronca D. (2016). *Nigella sativa* – a Plant with Personality in Biochemistry and Experimental Medicine Researches. Bulletin UASVM Veterinary Medicine 73 (2)
3. Akloul R, Benkaci-Ali F, Zerrouki M, Gauthier E. (2014). Composition and biological activities of the essential oil of *Nigella sativa* seeds isolated by accelerated microwave steam distillation with cryogenic grinding. American Journal of Essential Oils and Natural Products. 1 (3): 23-33
4. Al-Khalaf M.I and Ramadan KS. (2013). Antimicrobial and Anticancer Activity of *Nigella sativa* oil –A Review. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 7(7): 505-514.
5. Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A, Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M., Abdelaziz CH. (2010). Composition Chimique Et Activité Antimicrobienne Des Huiles Essentielles De *Thymus Algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus Ciliatus* (Desf.) Benth. Du Maroc. Biotechnol Agron. Soc. Environ., 141-148
6. Anonyme I : <http://www.tela-botanica.org/isfan-nn-145352>.
7. Arch M., Satrani B., Farah A., Bennani L., Briky D., Fechtel M., Blaghen M., Talbi M. (2003). Chemical composition and antimicrobial and insecticidal activities of the essential oil in *Mentha rotundifolia* from Morocco. Acta Bot. Gallica 150 (3), p. 267–274 Benkiniouar. R., Rhouati S., Touil A., Seguin E and Chosson E. (2007). Flavonoids from *Thymus algeriensis*. Chemistry of Natural Compounds, volume 43, No. 3.
8. Avril JL., Dabernat H., Denis F., Monteil H. 1992. Bactériologie clinique. Paris : ISBN 2^{ème} édition. P 103.275.
9. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils a review. Food Chem Toxicol;46:446-75
10. Bamosa AO. 2015. A review on the hypoglycemic effect of *Nigella sativa* and thymoquinone. Saudi J Med Med Sci vol: 3:2-7.
11. Basli, A., Chibane, M., Madani, K., & Oukil, N. (2012). *Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10(1), 2–9.
12. Belaiche P. (1979) - Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

13. Benjlali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaïli-Alaoui M. et Ayadi A. (1986) – Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 20 (2): 155-167.
14. Bencheqroun H.K., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A Et Abdelaziz Chaouch A. (2012). *Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Artemisiamesatlantica, plante endémique du Maroc. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 81, 2012 p. 4 – 21*
15. Benkaci –Ali F., Baalioumer A ., Meklati BY et Chemat F. (2007). Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. Volume 22, Issue 2. *Flavour and Fragrance Journal*.
16. Benkaci-Ali, F., Baaliouamer, A., Wathelet, J.P. et al. *Chem Nat Compd* (2012) 47: 925. <https://doi.org/10.1007/s10600-012-0106-7>
17. Beneteaud E (2011). Les techniques d'extraction. Comité Français du Parfum. P3
18. Bilia A.R., Santomauro F., Sacco C., Camilla Bergonzi M and Donato R. (2014). Essential Oil of *Artemisia annua* L.: An Extraordinary Component with Numerous Antimicrobial Properties. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume 2014, Article ID 159819, 7 pages.
19. Bonacorsi S. (2007). Chapitre 14 : Examen cyto bactériologique des urines. *Bactériologie médicale Technique usuelles*. Edition Masson. Paris. P 135
20. Boukhatem, M, N., Ferhat, M, A., Kameli, A., Saidi, F., & Mekarnia, M. (2014). Liquid and vapour phase antibacterial activity of *Eucalyptus globulus* essential oil= susceptibility of selected respiratory tract pathogens. *American Journal of Infectious Diseases*, 10(3), 105-117
21. Burt, S (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 223-253.
22. Caron F ., Galperine T ., Etienne M ., Merens A., Flateau C. (2014). Thèse de doctorat : Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires de l'adulte.
23. Cattoir V. (2004). Infections à bacilles à Gram négatif résistants : nouvelles molécules, nouvelles associations. *Journal des Anti-infectieux*.^Edition Elsevier Masson.France. 15, 159-165.
24. Carbonnelle .B., Denis .F., Marmonier. A. (1987). *Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. SIMEP SA*. Paris.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

25. Chahboun A., Esmail H., Abedl M., Barrahil R., Amiyare M., Berrabeh H., Oudda M., Ouhssine J. (2015). Evaluation de l'activité bactériostatique d'huile essentielle de *la Lavandula Officinalis* vis-à-vis des souches d'origine clinique résistantes aux antibiotiques N. *Sci. 6 (4) 1186-1191 ISSN : 2028-2508 CODEN: JMESC� Maroc*
26. Chafiaa M. (2011). Caractérisation des phénotypes de résistance aux β -lactamines à large spectre des bacilles à Gram négatif isolés au niveau du laboratoire central mère et enfants du CHU Beni-Messous d'Alger. Thèse de doctorat. Université Abderrahmane MIRA – Béjaïa. P3
27. Chemat S , Cherfouh R., Meklati BY and Belanteur K. (2012). Composition and microbial activity of thyme (*Thymus algeriensis genuinus*) essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 24:1, 5-11, DOI:10.1080/10412905.2012.645303
28. Clevenger, J. F. 1928. *American Perfumer & Essential Oil Review*, 467-503 .
29. Dadandi M Y , Kokdil G, İlçim A and Ozbilgin B. (2009). Seed macro and micro morphology of the selected *Nigella* (Ranunculaceae) taxa from Turkey and their systematic significance. *Biologia* 64/2: 261—270, Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences.
30. Dehkordi FR, Kamkhah AF. (2008). Antihypertensive effect of *Nigella sativa* seed extract in patients with mild hypertension. *Fundam Clin Pharmacol.* 22:447–452.
31. Delarras C. (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire Recherche de bactéries et de levures-moisissures*, Éditions Lavoisier, Paris ISBN : 978-2-7430-1565-7
32. Delarras C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Edition Techniques et Documentation. Paris.
33. Denis F., Cécile M., Martin C., Bengen E., Quentin R. (2007). *Bactériologie médicale Technique usuelles*. Edition Masson. Paris. P 251. 295.
34. Djennane F., Mohammedi D., Tiouit D., Touati D et Rahal K. (2009). Examen Cytobactériologique Des Urines. *Techniques microbiologiques*. Institut Pasteur d'Algérie. P 35.
35. Dorman H.J.D. et Deans S.G. (2000). Antimicrobiens agents from plants : Antibacterial activity of plantevolatil oils. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 88 ; 308-316.
36. Dob, T., Dahmane, D., Agli, M., & Chelghoum, C. (2006). Essential oil composition of *Lavandulastoechas*. from Algeria. *Pharmaceutical Biology*, 44(1), 60-64
37. El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani., Amarti ., Rahouti M , Abderrahman Aafi A., Ismaili MR et Farah A. (2010). Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ciliatus (Desf.) Benth contre les champignons de pourriture du bois. *Acta Bot. Gallica*, 157 (2), 285-294. *Maroc*.
38. El amri J, Elbadaoui KH., Zair T., Bouharb H., Chakir S et Taj Imolk A. (2014) . Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. *J. Appl. Biosci*.
39. Elliott. W; Casey. A; Lambert. P et Sandoe. J. (2011). *Medical Microbiology and Infection*. Fifth Edition. London. P40.53.142.
40. El Hadj Ali I., Bahri R, Chaieb I., Boussaïd M et Harzallah-Skhiri F. (2015). Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Industrial Crops and products*. Volume 77. Pages 631-639
41. Firenzuoli F., Jaitak V., Horvath G et Nestor Bassolé IH, William N. Setzer, and Luigi Gori . (2014). *Essential Oils: New Perspectives in Human Health and Wellness. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 467363, 2 pages
42. Forouzanfar F., Bazzaz BS et Hosseinzadeh H. (2014). Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone): a review on Antimicrobial effect . *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 17(12):929-38.
43. Jaafari A ., H Ait Mouse H., El Mostapha R., Ait M'barek L., Tilaoui M, Benbakhta Ch., Boulli A., , Abbad A et Zyad A . (2007). Chemical Composition And Antitumor Activity Of Different Wild Varieties Of Moroccan Thyme. *Brazilian Journal Of Pharmacognosy* 17(4): 477-491.
44. Hadjazi, K. Larbi Daouadji F.Z.I., Reffas, M.L. Benine and B. Abbouni. (2015). Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Nigella sativa* L. against Pathogens Bacteria. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* 10 (2): 100-105.
45. Hulin V., Mathot A.G., Mafart P. et Dufossé L. (1998) - Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, 18: 563-582.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3:12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012
46. Iserin P., (2001). *Encyclopie des plantes médicinales ; identification, préparation, soin*. *Ed Larousse*, Paris. p 9-14-16.
47. Inouye, S., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 565–573.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

48. Hamdani I., El Ouariachi O., Mokhtari A., Salhi N., Chahboun B., Elmahi A., Bouyanzer A., Zarrouk B., Hammouti And Costa J. (2015). Chemical Constituents And Corrosion Inhibition Of Mild Steel By The Essential Oil Of *Thymus Algeriensis* In 1.0 M Hydrochloric Acid Solution. *Der Pharma Chemica*, , 7(8):252-264.
49. Ghedira K. (2006). L'extraction Des Molécules Aromatiques Peut Se Faire Par Différents Procédés Cultivated Black Cumin: *NigellaSativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie* 4: 220. Doi:1 0.1007/S10298-006-0187-1
50. Guinoiseau E. (2010). Molécules Antibactériennes Issues D'huiles Essentielles : Séparation, Identification Et Mode D'action. Thèse présentée pour l'obtention du grade de docteur de L'universite de e Corse. P45. 48
51. Goetz, P. et Ghedira, k. (2012). *phytothérapie anti-infectieuse*. Paris: Springer. 382p. P.203.204.
52. Guesmi F., Ben Farhat M., Mejri M and Landoulsi A. (2014). In-vitro assessment of antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of *Thymus hirtus* sp. *Algeriensis*. *Lipids in Health and Disease* .Volume 13.
53. Karrouchi K., Benlafya K., Charkaoui Y., Miloud El Karbane M and Ramli Y. (2014). Antimicrobial activity of aqueous, ethanolic, methanolic, cyclohexanic extracts and essential oil of *Nigella sativa* seeds. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 6(8):9-11. ISSN: 0975-7384.
54. -Khan MA, Chen HC, Tania M, Zhang DZ. Anticancer activities of *Nigella sativa* (black cumin). *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2011;8:226-232.
55. Kahsai, Alem Welderufael. (2002). "Isolation and Characterization of Active Ingredients from *Nigella Sativa* for Antibacterial Screening. Master's Thesis, Department of Chemistry, East Tennessee State University. Electronic Theses and Dissertations. Paper 692. <http://dc.etsu.edu/etd/692>
56. - Kenneth J R et George Ray C. (2004). *Sherris Medical Microbiology. An introduction to infectious diseases*.4th Edition. McGraw-Hill Companies. P 261. 343.344.
57. Kloucek P., Smid J, Frankova A, Kokoska L., Valterova I et Pavela R.. (2012) Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Journal of Food Research International*. 47 161–165
58. Kökdil G., İlçim A., Özbilgin B et Uygun C. (2006). Morphology and stem anatomy of some species of genus *Nigella* l. In turkey. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 35 (1) 19 – 41

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

59. Lakhdar.L. (2015). Thèse de doctorat évaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *aggregatibacter actinomycetemcomitans* : étude *in vitro* Faculte De Medecine Dentaire De Rabat. Thèse n° : 28/14 CSVS. P.32.44.
60. Laird, K., & Phillips, C. (2012). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?. *Letters in Applied Microbiology*, 54(3), 169-174.
61. Lamamra M. (2008). *Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de Tinguarrasicula (L.) Parl. et de Filipendula hexapetala Gibb.* Présenté à la faculté des Sciences Département de Biologie Pour l'obtention du Diplôme de magister.universite ferhat abbas-setif. P27.44.45.46.
62. Lanotte P et Mereghetti L. 2007. Chapitre 2 : Démarche de l'examen Bactériologique. Bactériologie médicale Technique usuelles. Edition Masson. Paris. Chapitre 2
63. Madi A. (2009). Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister. Université Mentouri Constantine. Alger. P12.13
64. Mandras N., Nostro A., Roana J., Scalas D., Banche G., Ghisetti V., Del Re S., Fucale G., Cuffini AM et Tullio V. (2016). Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *Candida albicans* and non-*albicans Candida*. *Journal of BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16:330
65. Mebarki N. (2010). Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanessii* et l'application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Magister en Génie des procédés chimique et pharmaceutiques. P1
66. Meziti A. (2008).Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa L.* Étude *in vitro* et *in vivo*. Pour l'obtention du diplôme de magister en biochimie appliquée. universite el-haj lakhdar Batna Alger. P37.38
67. Levinson. W. (2014). *Medical Bacteriology And Immunology*. Thirteenth Edition Mc graw-Hill Education. P245.246.258.259
68. Lemaoui A. (2010). Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa.L* Algérienne. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de magister. Université Ferhat Abbas –Setif.Alger. P45.48.49.
69. Lopez-Romero L C., González-Ríos H., Borges A and Simões M. (2015). Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Hindawi Publishing Corporation .Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2015, Article ID 795435, 9 pages.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

70. Luque de Castro M. D and Garcea Ayuso L. E. (2000). Soxhlet Extraction. Journal of Environmental Applications. University of Cordoba, Spain Copyright ©. Academic Press
71. Mutai C., Bii. C., Vagias C., Abatis D et Roussis V. (2009). Antimicrobial activity of acacia mellifera extracts and lupine triterpenes. Journal of Ethno pharmacology, pp 10-1016.
72. Nauciel. C et Vildé J-L. 2007. Bactériologie médicale. Elsevier Masson SAS. P 140.141.
73. Nestor Bassolé I H., et Rodolfo Juliani H. (2012). Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. Journal of *Molecules* 2012, 17, 3989-4006; doi:10.3390. ISSN 1420-3049.
74. Nor' Aishah H., Zaini Nawahwi M et Haslinda Ab. M. (2013). Antimicrobial Activity of *Nigella sativa* Seed Extract. Sains Malaysiana 42(2)(2013): 143–147
75. Orsi-Llinares F. (2013). La nigelle, une épice d'intérêt médicinal. Sciences pharmaceutiques. Thèse présentée pour l'obtention du doctorat en pharmacie. Université joseph fourier faculte de pharmacie de grenoble.
76. Ouis N. (2015). Étude chimique et biologique des huiles essentielles de Coriandre, de Fenouil et de Persil. Thèse de doctorat. Université d'Oran 1. P1.7.9
77. Paolozzi. L et Liébart. L. (2015). Microbiologie. Biologie Des Procaryotes Et De Leurs Virus. Chapitre 18. Edition Dnoud. Paris. P (450, 451, 452, 458, 459, 460)
78. Passet, J. (1979). La variabilité chimique chez le thym, ses manifestations, sa signification. Parfums, Cosmétiques, Aromes, 28, 39-42.
79. Panizzi L., Flamini G., Cioni P.L., and Morelli I. (1993). Composition and antimicrobial activity of essential oils of four mediterranean Lamiaceae. J. Ethnopharmacology, 39, 167 -170.
80. Penchev P.I. (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Doctorat De L'université De Toulouse. P 50.51.
81. Ploy M-C et Denis F. (2007). Chapitre 17 : Examen cyto bactériologique de pus. Bactériologie médicale Technique usuelles. Edition Masson. Paris. P 165.
82. Rami K and Zheng-Guo L. (2011). Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. African. Journal of Biotechnology Vol. 10(42), pp. 8397-8402
83. Rafati S, Niakan M, Naseri M. (2014). Anti-microbial effect of *Nigella sativa* seed extract against staphylococcal skin Infection. Med J Islam Repub Iran 2014 (8 June). Vol. 28:42.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

84. Randhawa.M- A. (2008). Black seed, *Nigella sativa*, deserves more attention. Journal of Ayub Med Coll Abbottabad. 20(2):1-2
85. Reyes-Jurado F., Franco-Vega A., Ramí'ez-Corona N., Palou E et Lopez-Malo A. (2015). Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. Food Eng Rev (2015) 7:275–297
86. Said Hassane S.O. , Satrani B., Ghanmi M., Mansouri N., Mohamed H et Chaouch A. (2011). Activité antimicrobienne et composition chimique de l'huile essentielle *Plectranthus aromaticus* Roxb. De l'Ile de la Grande Comore Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2011 15(2), 251-258
87. Sultana S., Asif H.M., Akhtar N., Asif I., Nazar H et Ur Rehman R. (2015) .*Nigella sativa*: Monograph. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 4(4): 103-106
88. Salman M T., Ali Khan R., Shukla I. (2008). Antimicrobial activity of *Nigella sativa* Linn. seed oil against multi-drug resistant bacteria from clinical isolate. Natural Product Radiance, Vol. 7(1), 2008, pp.10-14
89. Svoboda K. P. and Hampson J. B. (1999) – Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW .
90. Sultan, M.T., Butt M. S., Anjum F.M., Jamil, A., Akhtar S. et Nasir M. (2009). Nutritional profile of indigenous cultivar of black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. Pakistan Journal of Botany, 41(3), 1321-133.
91. Sekhsokh Y., Chadli M et El Hamzaoui SA. (2008). Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines. Med mal infect 2008; 38:324-327
92. Tanis, H., Aygan, A., Digrak, M., (2009). Antimicrobial activity of four *Nigella* species Grown in Southern Turkey. Int. J. Agric. Biol. 11,771–774.
93. Tembhrne, S., Feroz, S., More, B., & Sakarkar, D. (2014). A review on therapeutic potential of *Nigella sativa* (kalonji) seeds. Journal of Medicinal Plants Research, 8(3), 167-177.
94. Thierry Foliard. (2014). Le petite larousse des huiles essentielles. Edition Larousse 2014. P1.10.
95. Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., Linhart, Y.B et Ehlers, B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. Journal of Chemical Ecology, Vol. 29, No. 4.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

96. Toama Mohamed A., El-Alfy Taha S., And El-Fataty Hamed M. (1974). Antimicrobial Activity of the Volatile Oil of *Nigella sativa* Linneaus Seeds. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Aug. 1974, p. 225-226. Vol. 6, No. 2
97. Toparslan .C.À propos de *Nigella sativa* L. (2012). Thèse pour l'obtention de diplôme d'état de docteur en pharmacie par Université de Lorraine. P5
98. Touhami A., Chefrou A., Boukhari Abbes, Ismail Fadhel. (2016). Comparative Study Of Chemical Compositions And Antimicrobial Effect Of Different Genius Of *Thymus* Harvested During Two Period Of Development. *J App Pharm Sci*, 2016; 6 (08): 051-056. Algeria
99. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2010). Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogoncitratrus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 65.
100. Tyagi, A. K., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126(1), 228-235.
101. Van den Broucke C.O et Lemli J.A., (1981). Pharmacological and chemical investigation of Thym liquid extracts. *Planta Medica*, 41, 129-135.
102. Vercauteren J., 2012. Cours de pharmacognosie. édition 2011.p 9.
103. Waleed Al Abbasy D., Pathare1 N., Al-Sabahi J N et Khan1 S k. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimumbasilicum* Linn.) *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*.Dalia Waleed Al Abbasy et al./Asian Pac J Trop Dis 2015; 5(8): 645-649
104. Willey J M., Sherwood L M., Woolverton CJ., (2008). Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. Seventh Edition. Published by McGraw-Hill. P581
105. Yala D., Merad A.S., Mohamed D et OuarKorich M.N., (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb* n°91.
106. Zohary M. (1983). The Genus *Nigella* (Ranunculaceae) a Taxonomic Revision. *Plant Systematics and Evolution*, Vol. 142, No. 1/2 pp. 71-107.
107. Zouari N., Ayadi I.,Fakhfakh N., Ahmed Rebai A and Zouar S. (2012). Variation of chemical composition of essential oils in wild populations of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut a North African endemic Species. *Journal of Lipids in Health and Disease*.11:28. Tunisia.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

108. Zhiri A et Baudoux D. Aromathérapies scientifique. (2005). Essentielles chémotypées et leurs synergies Edition Inspir Development - rue Goethe, 1 - L-1637 Luxembourg. p8.
109. Zhang H., Lu Zhang L, Peng L.J, Dong. Di Wu X.W. Chi-Hua Wu V et Feng F-Q. (2012). Quantitative structure-activity relationships of antimicrobial fatty acids and derivatives against *Staphylococcus aureus*. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology) 2012 13(2):83-93 8
110. Zhenga CH.J., Yooa J-S., Hee-Young Choc T-G et Won-Gon Kima Y-H K. (2005). Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activityof unsaturated fatty acids. FEBS Letters 579 (2005) 5157–5162.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE I

Matériel de laboratoire et appareillage

Appareillage, Verrerie

Appareillage	Verrerie
- Bec bensen	- Disques d'ATB
- Portoir de tubes à essai	- Ecouvillons stérile.
- Etuve d'incubation	- Boite de Pétrie 90mm
- Réfrigérateur	- Disques vierge
- Microscope optique	- Lame et lamelle
- Agitateur	- Pipettes Pasteur
	- Tubes à essai stériles
	- Tubes secs

Milieux de cultures

Milieux de cultures		Réactifs et solutions
- Gélose ordinaire	-Milieu Urée – Tryptophane	- Réactifs de VP
- Gélose Hektoen	(Urée-Indole)	- Réactifs pour TDA
- Gélose au sang cuit	- Milieu LDC	- Réactifs de Kovacs
- Gélose au sang frais	- Milieu ODC	- L'huile à immersion
- Milieu Miller Hinton	- Milieu ADH	- L'huile de vaseline
- Mannitol – mobilité	- Milieu Clark et Lubs.	- Disques d'ONPG
- Milieu T.S.I		- Eau physiologique
- Milieu au citrate de Simmons		- Eau oxygénée
		- Huile de thym
		- Huile de la nigelle

ANNEXE II

Résultats de l'examen macroscopique et microscopique des souches

Espèce	Examen macroscopique	Examen microscopique
<i>Escherichia coli</i>	colonies rondes, lisses, abords réguliers, aplatie	Bacille
<i>Proteus mirabilis</i>	Colonie verdâtre avec un centre noire	Bacille
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	colonies rondes, bombées, mucoïde volumineuses, brillantes.	Bacille
<i>Klebsiella oxytoca</i>	colonies rondes, bombées, mucoïde volumineuses, brillantes.	Bacille
<i>Proteus vulgaris</i>	Colonie verdâtre avec un centre noire	Bacille
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonie verdâtre à contour irrégulier avec un odeur aromatique	Coccobacilles
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonie fine de couleur jaune-orange sur milieu Chapman	Cocci regroupé en amas
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Colonies fine de couleur blanchâtre sur milieu Chapman	Cocci
<i>Streptococcus sp</i>	petites colonies translucides	Cocci regroupé en chaînette

Résultats des tests biochimiques pour les staphylocoques

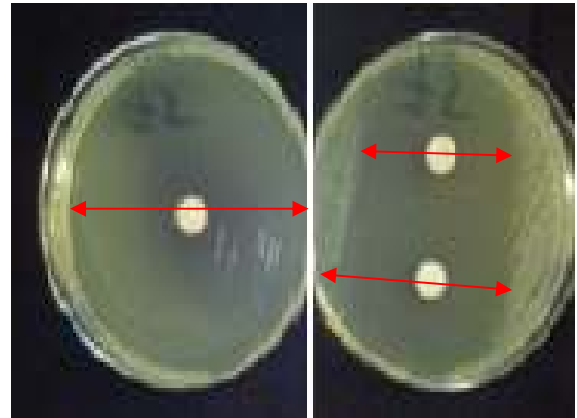
	Coagulase	Catalase
<i>S.aureus</i>	+	+
<i>S.epidermidis</i>	-	-

ANNEXE III

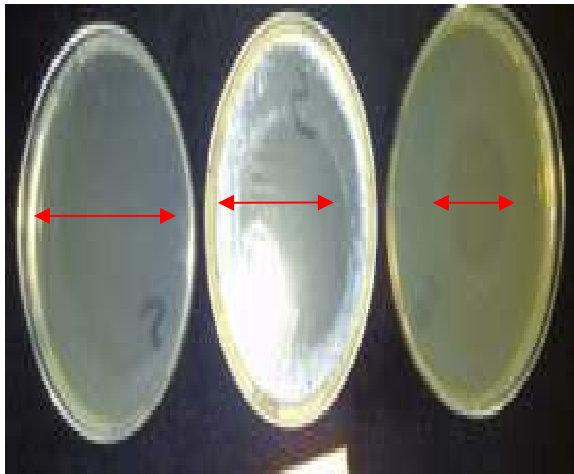
Résultats de l'activité antibactérienne de huile de thym



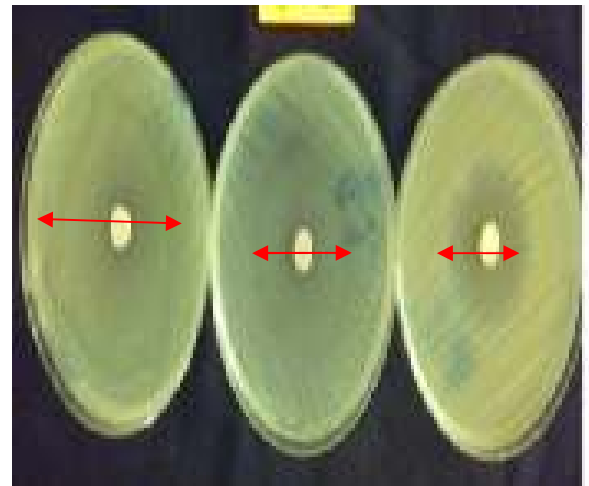
Saphylococcus aureus (Sa3)
(Micro-atmosphère)



Saphylococcus aureus (Sa3)
(Aromatogramme)



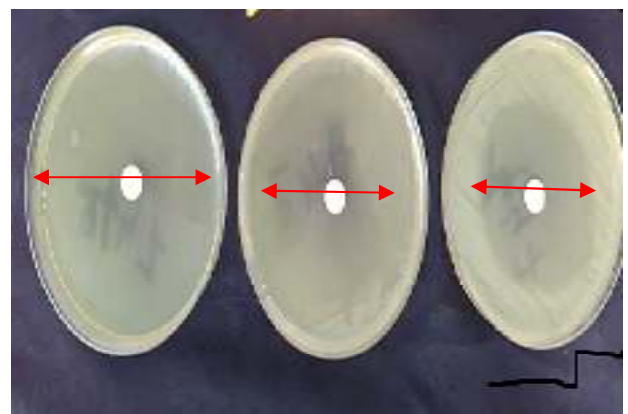
Citrobacter freundii (Micro-atmosphère)



Citrobacter freundii (aromatogramme)



Acinetobacter baumani
(Micro-atmosphère)



Acinetobacter baumani
(aromatogramme)



E. coli (Ec5) (Micro-atmosphère)



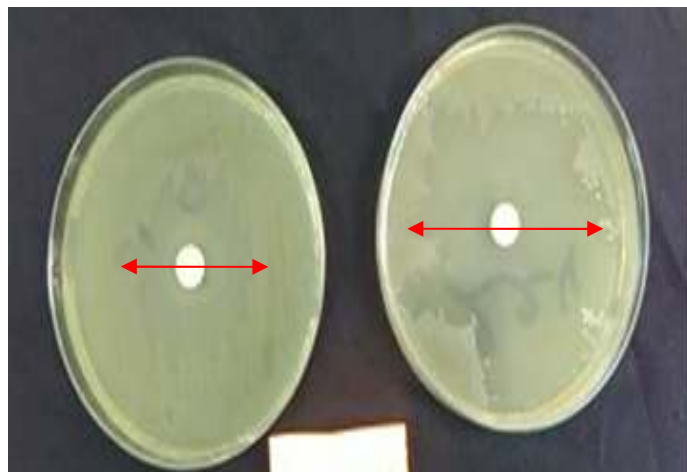
E. coli (Ec5) Aromatogramme



Klebsiella oxytoca (Micro-atmosphère)



Klebsiella oxytoca Aromatogramme



Pseudomonas aeruginosa Aromatogramme

INTRODUCTION

CHAPITRE I
RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE II
MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE III
RESULTAT ET DISCUSSION

CONCLUSION

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES