



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme du Docteur Vétérinaire

Intitulé :

Etude de l'activité antibactérienne de trois huiles essentielles sur quelques germes responsables des mammites bovines.

Présenté par

**MOHAMMED AZIZI ABDELHAK
BOURELAF FATMA ZOHRA INES**

Devant le jury :

Président(e) :	BERBAR . A	Professeur	Université Blida01
Examineur :	METREF .Kh	Maître Assistant A	Université Blida01
Promoteur :	KABIR. W	Ingénieur du laboratoire	Université Blida01

Année : 2015/2016

Remerciement

Avant toute chose, je remercie **Dieu**, le tout puissant,

pour m'avoir donnée la force et la patience.

Ma vive reconnaissance s'adresse à **Mme KABIR W.** ingénieur de laboratoire à l'université SAAD DAHLEB de Blida qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour sa patience, la liberté d'action qu'elle m'a l'aisée tout le long de ce projet, ses conseils scientifiques judicieux et la disposition inconditionnelle de tous ses moyens Je la remercie également pour leur compréhension et disponibilité.

A **Mr KAIDI R.** à qui j'exprime mes profonds remerciements pour sa gentillesse et sa disponibilité et de m'avoir accepté au sein de son laboratoire de recherche de reproduction vétérinaire.

J'exprime mes remerciements aux honorables membres du jury :

Mr BERBER A. Professeur à l'université de Blida, d'avoir accepté de présider le jury de ce projet de fin d'étude.

Mr METEF Kh. Maitre Assistant A à l'université de Blida, d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Dédicace

Nous dédions ce modeste travail :

À nos **chers parents** que dieu nous les garde, pour vos mains qui ont tant travaillé

Pour votre cœur qui nous a tant donné

Pour votre sourire qui nous a tant réchauffé

Pour vos yeux qui furent parfois Mouillés

À tous ceux qui m'ont tant encouragé et aidé avec leur présence et leur sourire

A toute nos familles et nos amis

et surtout :

Nadjia, Soumia, Rym, Naima, Rachida,

Nassima, Hamid, Amine, Ahmed,

Naziha ,Chafika, Dr Flej Malika

Résumé

La présente étude avait deux principaux volets : le premier étant l'identification des bactéries responsables de mammite chez quelques vaches laitières. En suite l'étude de l'activité antibactérienne de trois huiles essentielles (l'huile essentielle de *Mentha spicata* (Menthe verte), *Myrtus communis* (Myrthe), et *Citrus aurantium* (le Bigaradier) sur les souches isolées. Pour cela, 06 échantillons de lait provenant des quartiers infectés de 06 vaches ont été prélevés et acheminés au laboratoire sous régime de froids. Les isollements ont été réalisés par ensemencement de lait sur 3 types de géloses : gélose nutritive, gélose Chapman, et gélose Hektoen. L'identification des bactéries a été faite à l'aide des galeries Api 20. Les genres bactériens isolés étaient : *Staphylococcus* (40%), *Micrococcus* (20%), *Klebsiella* (10%), *Choromobacterium* (10%), *Pseudomonas* (10%), et un genre non identifié (10%).

L'étude du pouvoir antibactérien des trois huiles essentielles citées sur les souches bactériennes isolées par technique de contacte indirecte (aromatogramme) montre que l'HE de *mentha spicata* avait l'effet le plus remarquable, surtout contre les staphylocoques et les microcoques. Par contre, l'HE de bigaradier et de l'HE de myrte avaient un effet modéré mais qui reste remarquable.

Mots clés : mammites, bactéries, huile essentielle, effet antibactérien.

ملخص

كان لهذه الدراسة هدفين رئيسيين: الأول هو التعرف على البكتيريا المسببة لإلتهاب الضرع عند بعض الأبقار تليها دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لثلاثة زيوت أساسية (النعناع، الريحان، و البرتقال المر) على السلالات البكتيرية المعزولة. لهذا تم جمع 06 عينات حليب من 06 أبقار مصابة ونقلها إلى المختبر مع نظام البرودة، تم وضع الحليب في 03 انواع اجار (اجار مغذي، شابمان، هكتوان). تم تحديد البكتيريا باستعمال واجهة برمجة تطبيقات ابي 20

كانت الأجناس البكتيرية المعزولة المكورات العنقودية 40% ، ميكروكوكس 20%، كليبيلا 10%، الزائفة 10%، كروموبكتيريوم 10% ، ونوع لم يحدد 10%

دراسة قوة مضادة للجراثيم لثلاثة الزيوت الأساسية المذكورة على سلالات بكتيرية معزولة عن طريق الاتصال تقني غير مباشر تبين أن النعناع الأخضر كان الأكثر تأثيرا ، وخاصة ضد المكورات العنقودية ومكورات. و من البرتقال الحامض والاس وكان لديه تأثير معتدل ولكن لا يزال لافت للنظر

كلمات البحث: البكتيريا التهاب الضرع، الزيوت الأساسية، تأثير مضاد للجراثيم.

Abstract

The present study had two main aims : The first being the identification of the bacteria responsible for mastitis in some dairy cows. Subsequently, the study of the antibacterial activity of three essential oils (The essential oil of *Mentha spicata* (spearmint), *Myrtus communis* (myrtle), and *Citrus aurantium* (the bitter orange) on isolated bacteria. For This, 06 milk samples from infected quarters of 06 cows were collected and transported to the laboratory under cold conditions. The isolates were made by inoculating milk on 3 types of agar : Nutrient agar, Chapman agar, and Hektoen agar.

The identification of the bacteria was made using the Api 20 galleries. The isolated bacterial genera were: *Staphylococcus* (40%), *Micrococcus* (20%), *Klebsiella* (10%), *Choromobacterium* (10%), *Pseudomonas* (10%), and one unidentified genus (10%).

The study of the antibacterial power of the three essential oils mentioned on the bacterial strains isolated by indirect contact technique (aromatogram) shows that the EO of *mentha spicata* had the most remarkable effect. Especially against staphylococci and micrococci. On the other hand, bigaradier's EO and Myrtle' EO had a moderate effect, But which remains remarkable.

Keywords: Mastitis, bacteria, essential oil, antibacterial effect.

Sommaire

Inroduction	01
-------------------	----

Partie bibliographique

chapitre 01 : Mammites

1. Définition et classification.....	03
1.1 Mammite clinique.....	03
1.2 Mammite subclinique.....	03
2. Germes responsables des mammites.....	04
3. Description des germes.....	04
3.1 Staphylocoques.....	04
3.2 Streptocoques.....	05
3.3 Les entérobactéries.....	06
4. Les réservoirs de germes dans l'élevage.....	06
5. Contamination de la mamelle.....	07
6. L'échec d'antibiothérapie.....	08

chapitre 02 : les huiles essentielles

1. Généralités	09
2. Composition chimique.....	09
2.1 Les terpénoïdes	09
2.2 Les composés aromatiques.....	10
2.3 Composés d'origines divers.....	10
3. Caractérisation des huiles essentielles.....	10
4. Critères déterminants la qualité des huiles essentielles.....	11
5. Propriétés antimicrobiennes et mode d'action des huiles essentielles.....	12

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel.....	13
1.1 Matériel biologique.....	13
1.2 Matériel non biologique.....	13

2. Méthodes.....	13
2.1 Prélèvement du lait.....	13
2.2 Préparation des milieux de culture	14
2.3 Isolement des germes	14
2.4 Conservation des germes.....	15
2.5 Identification des germes.....	15
2.6 Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur les souches bactériennes.....	17

Résultats

3. Résultats.....	19
3.1 Résultats d'isolement.....	19
3.2 Résultats d'identification.....	19
3.3 Composition chimique des HE.....	21
3.4 Résultats d'aromatogramme.....	21
4. Discussion	26
5. Conclusion.....	28

Référence.....	30
-----------------------	-----------

Annexes.....	38
---------------------	-----------

Liste des tableaux

Titre des tableaux	Page
Tableau 01 : Nature des réservoirs de germes (Bramley 1984).....	07
Tableau 02 : Identification des vaches à mammites.....	14
Tableau 03 : Classification des bactéries (De Billerbeck 2007).....	18
Tableau 04 : Description macroscopique des colonies.....	19
Tableau 05 : Identification des germes isolés dans milieu Chapman.....	20
Tableau 06 : Identification des germes isolés dans milieu Hektoen.....	20
Tableau 07 : la sensibilité des souches.....	23
Tableau 08 : Nombre des bactéries selon le degré de sensibilité.....	24

Liste des figures

Titre des figures	page
Figure 01 : Ensemencement du lait mammiteux sur gélose.....	15
Figure 02 : Pourcentages des germes identifiés.....	21
Figure 03 : Diamètres des zones d'inhibition de l'HE de la menthe verte en mm.....	22
Figure 04 : Diamètres des zones d'inhibition de l'HE de myrte en mm.....	22
Figure 05 : Diamètres des zones d'inhibition de l'HE du bigaradier en mm.....	23
Figure 06 : Taux des bactéries selon leurs degré de sensibilité vis-a-vis l'huile essentielle de la menthe verte.....	24
Figure 07 : Taux des bactéries selon leurs degré de sensibilité vis-à-vis l'huile essentielle de myrte.....	25
Figure 08 : Taux des bactéries selon leurs degré de sensibilité vis-à-vis l'huile essentielle de bigaradier.....	25

Listes des abréviations

HE : huile essentielle

CCS : comptage des cellules somatiques

CMT : le test de mammite de Californie

E.coli : *Escherichia coli*

ATP : Adinosine Tri Phosphate

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé

MAAF: Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt

ZIPHEE.bio : ZIDANE PRODUCTION HUILES ESSENTIELLES & ENGRAIS BIOLOGIQUES

EO : Essential oil

C° : Degré Celsius

TDA : Tryptophane Désaminase

VP : Voges–Proskauer

NIT : Nitrate

Introduction

Introduction

En Algérie, comme dans la plupart des pays, les mammites bovines constituent une pathologie dominante dans les élevages bovins laitiers. Cependant, et malgré la fréquence des mammites subcliniques et cliniques dans les élevages bovins laitiers en Algérie, il faut signaler le manque d'études approfondies, indispensables pour cerner les facteurs de risque associés à ces infections mammaires ainsi que la connaissance des bactéries responsables. **(Bouaziz et al,2000 ; Niar et al, 2000 ; Benmounah, 2002).**

Les mammites cliniques représentent une pathologie dominante en élevage laitier, et leur traitement repose habituellement sur l'administration d'antibiotiques. **(Lefevre, 2009)**. Or, le développement et l'acquisition de la résistance bactérienne envers ces antibiotiques est devenu un sujet d'inquiétude et l'une des préoccupations des scientifiques. **(Patrick, 2003 ; Perry et al,2004 ; Yadegarnia et al, 2006 ;)**. Pour cela, la recherche d'alternatives aux molécules d'antibiotiques pour le traitement des infections mammaires bovines est une pratique de plus en plus courante **(MAAF,2008)**. Cette nouvelle démarche consiste à s'intéresser à la recherche des principes actifs dans les produits naturels d'origine végétale, plus particulièrement les métabolites secondaires à savoir les huiles essentielles (HE), issues de plantes aromatiques qui sont utilisées depuis longtemps pour traiter des pathologies et pour améliorer la santé et le bien-être. **(Meyer,1994)** D'où le terme d'aromathérapie, qui a apparue en 1937 **(Gattefossé, 1937)**

C'est dans cette optique que s'articule notre étude qui a pour objectif d'isoler et identifier des germes responsables des mammites bovines, et d'étudier l'activité antibactérienne de trois huiles essentielles sur ces derniers.

Le présent manuscrit se divise en trois parties :

La première partie consiste en une synthèse bibliographique qui a pour objet :

- Définition et étiologie bactérienne des mammites bovines.
- L'échec d'antibiothérapie.
- Définition et caractéristique antibactérienne des huiles essentielles

La deuxième partie s'attaque au protocole expérimental, et comporte :

- Isolement et identification des germes responsables des mammites bovines.
- Etude in vitro de l'activité antibactérienne des trois huiles essentielles sur les souches isolées.

La troisième partie :

Dans cette partie, nous discuterons les résultats obtenus lors de cette étude, une conclusion résumera le parcours expérimental.

Partie
Bibliographique

Chapitre 01

Mammites

1. Définition et classification :

Chez la vache, les infections mammaires se manifestent principalement par deux formes :

1.1 Mammite clinique :

Une mammite clinique est définie comme une glande mammaire ayant des sécrétions lactées modifiées (plus aqueuse, présence de grumeaux) plus ou moins les signes cardinaux de l'inflammation (enflure, douleur, rougeur, et chaleur). Elle sera considérée aiguë ou suraiguë dans la situation de changements soudains, et chronique lorsque la situation est récurrente ou continue. Elle peut aussi être qualifiée de mammite clinique bénigne (sécrétions lactées modifiées sans inflammation du pis) ou modérée (sécrétions lactées modifiées avec inflammation du pis). Lorsque la mammite cause des signes cliniques en dehors de la glande mammaire tels que la fièvre, une déshydratation de l'animal, une baisse ou un arrêt de l'appétit, de la faiblesse), cette condition est généralement considérée comme une mammite clinique aiguë ou suraiguë sévère et toxique (**Erskine, 2004**).

1.2 Mammite subclinique :

Au stade de la mammite subclinique, la vache commence à réagir à l'infection, mais aucun signe clinique n'est perceptible ; le lait et le quartier semblent normaux. Comme on ne peut percevoir l'infection, il est nécessaire de faire un test pour la détecter ; le comptage des cellules somatiques (CCS) et le test de mammite de Californie (CMT) sont les plus souvent utilisés.

L'infection subclinique peut alors guérir spontanément ou rester à ce stade plusieurs mois. Elle peut aussi s'aggraver. Dans ce cas, des signes visibles apparaissent et on parle maintenant d'un cas clinique.

Selon le type de pathogène présent dans le troupeau, les cas de mammite subclinique sont de 2 à 20 fois plus fréquents que les cas de mammite clinique (**Lévesque, 2006**).

2. Germes responsables des mammites :

De nombreux germes ont été isolés et rendus responsables de mammites, et sont présentés dans Annexe 01. Ils se distinguent en germes contagieux et en germes d'environnement.

- **Germes contagieux :** Les germes pathogènes majeurs contagieux comprennent : *Streptococcus agalactiae* et *Staphylococcus aureus* à coagulase positive. Et les pathogènes mineurs renferment le *Staphylocoque* à coagulase négative et le *Corynebacterium bovis*.

- **Germes d'environnement :** Les germes pathogènes majeurs englobent *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Klebsiella sp* tandis que les germes pathogènes mineurs regroupent les champignons et les levures.

D'autres germes responsables de maladies infectieuses contagieuses induisent également de temps à autre des troubles mammaires : *brucella*, *mycobactérium tuberculosis*, *bacillus anthracis*, *virus de la leucose* et de la fièvre aphteuse (**Hanzen,2010**).

3. Description des germes :

3.1 Staphylocoques :

Les Staphylocoques sont Gram positif, aérobie, catalase positive, oxydase-négatif, immobiles, non sporulés, et fermentaire (**Carter et autres, 1995**).

Le Staphylocoque coagulase + est l'un des principaux germes responsables de mammites dans l'espèce bovine. Son danger vient de ce qu'il se manifeste dans 80 % des cas par des mammites sub-cliniques. Sa présence est souvent associée à celle de lésions cutanées au niveau des mains du trayeur (**Vestweber et Leipold., 1993**).

Staphylococcus aureus fait partie du groupe de coagulase positive qui comprend *S. Intermedius* et certaines souches de *S. hyicus*.

Staphylococcus aureus peut être trouvée sur la peau de la mamelle, sur les trayons, dans le tissu intra mammaire (**McDonald, 1977 ; Cullor et Tyler, 1996**). La plupart des infections dues à

S. aureus sont des infections subcliniques chroniques, bien occasionnelles cliniques, cas de la plupart bénins à gravité modérée peuvent survenir **(Cullor et Tyler, 1996)**.

Une mammite aigue gangreneuse peut résulter de l'infection intra mammaire à *S. aureus* **(Bramley, 1992)**.

Cependant, *Staphylococcus aureus* est difficile à éliminer, il peut survivre pendant de longues périodes sur la peau **(McDonald, 1977)**, et dans les neutrophiles dans la glande où il est protégé contre les antibiotiques **(Craven et Anderson, 1979 ; Sandholm et al, 1990)**.

- **Pathogénie :**

Staphylococcus aureus (hémolytique et coagulase +) produit des exotoxines (hémolysines, leucocidines) et des enzymes (coagulase, hyaluronidase, DNase, Beta lactamase, staphylokinase, phosphatase, nucléase, lipase). Certaines hémolysines sont particulièrement toxiques car elles provoquent une vasoconstriction entraînant une gangrène par ischémie (mammite gangréneuse) **(Hanzen,2010)**.

3.2. Streptocoques :

Les streptocoques sont des Gram positif, la plupart sont anaérobie facultatif et certains sont strictement anaérobie, catalase négative, oxydase-négatif, immobiles, non sporulés, et fermentaire **(Carter,1995)**.

Avec le Staphylocoque, *Streptococcus agalactiae* constitue la principale cause de mammite subclinique. A l'inverse de celle provoquée par le *Staphylococcus aureus*, la durée de l'infection est plus courte. C'est le seul germe qui fait augmenter de manière significative le comptage bactérien du lait.

- **Pathogénie :**

Qu'elles soient dues au *Streptococcus agalactiae* ou *dysgalactiae*, les infections de la glande mammaire se traduisent par une réaction inflammatoire endéans les 3 à 5 jours. Il existe cependant de larges variations selon les individus et la virulence des germes. Le processus d'invasion et d'inflammation présente initialement une phase de multiplication rapide du germe dans les canaux lactifères suivie d'un passage des bactéries dans les vaisseaux

lymphatiques et les ganglions rétro mammaires. A ce stade, les lésions épithéliales des acini se traduisent par une diminution de la production laitière. **(Hanzen, 2010)**

3.3 Les entérobactéries :

Ce sont des bacilles aérobie et anaérobie facultatif, catalase positive, oxydase négative, non sporulée, et généralement mobiles **(Carter et autres, 1995)**. Encore appelées coliformes, Ce groupe rassemble les bactéries Gram - du tube digestif **(Hanzen, 2010)**. Les coliformes se réfèrent généralement à des bacilles de la famille des entérobactériaceae fermentant le lactose **(Eberhart, 1984)**. Ce groupe comprend *Escherichia coli* (pathogène majeur), *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* et *aérogènes*, *Hafnia sp*, et *Citrobacter freundii* (pathogènes mineurs).

- **Pathogénie :**

Le pouvoir pathogène des *entérobactériacées* repose essentiellement sur la production d'endotoxines, molécules complexes formées de phospholipides, lipopolysaccharides et de protéines. Libérée lors de la lyse des colibacilles par les polynucléaires, cette endotoxine provoque la transformation de l'histidine en histamine. Cette dernière, dont le premier effet étant une augmentation de la perméabilité vasculaire, serait à l'origine d'une véritable réaction allergique. Cette perméabilité étant augmentée, il se produirait alors un épanchement de plasma dans la mamelle et un passage d'endotoxine dans le sang, expliquant les symptômes généraux observés **(Hanzen, 2010)**.

4. Les réservoirs de germes dans l'élevage :

Il existe une distribution très large des germes pathogènes au sein d'un élevage. Cependant, pour chaque germe, il est possible de reconnaître des sites privilégiés appelés réservoirs primaires (mamelle et litière), et des sites annexes appelés réservoirs secondaires, dans lesquels les germes ne séjournent habituellement que de manière transitoire mais à partir desquels se fera leur transmission vers la mamelle (matériel de traite) (tableau 01) **(Hanzen, 2010)**.

Tableau 01 : Nature des réservoirs de germes (Bramley 1984).

Germes	Mamelle infectée	Lésions des trayons	Litière
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+++	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+++	+++	-
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	+++	+++	-
<i>Streptococcus uberis</i>	++	+	+++
<i>Streptococcus faecalis</i>	+	+	+++
Entérobactéries	+	+	+++

- : Absence

+ : Peu répandu

++ : Répandu

+++ : Très répandu

5. Contamination de la mamelle :

La préparation des mamelles pour la traite peut entraîner la contamination de la peau des trayons d'un animal sain. Les principaux véhicules de germes sont les mains du trayeur et les linges utilisés pour la préparation.

La contamination de la mamelle se fait pratiquement toujours par le canal du trayon, elle peut se faire de manière active par multiplication ou passive et impliquer dans ce cas la machine à traire et/ou le trayeur (Hanzen, 2010).

6. L'échec d'antibiothérapie :

Malgré une antibiothérapie raisonnée et appropriée, des échecs thérapeutiques ou la non guérison bactériologique ne sont pas rares (**GUERIN-FAUBLEE *et al*, 2003**). Les échecs de l'antibiothérapie des mammites peuvent être expliqués par un ou plusieurs phénomènes, on peut citer :

- Les antibiotiques n'atteignent pas le site de l'infection à une concentration adéquate.
- Limites pharmacocinétiques :
 - Absorption, disponibilité, élimination,
 - Séquestration due à l'ionisation,
 - Interactions biologiques avec les constituants du lait (protéines, Ca^{2+}),
 - Obstacles à la diffusion pendant les traitements intra mammaires (œdèmes, formation de micro-abcès, fibrose).
- Facteurs liés aux bactéries :
 - Latence bactérienne : les bactéries ne se multiplient pas, ne sont pas sensibles à la plupart des antibiotiques.
 - Localisation des bactéries : la localisation intracellulaire et l'invasion tissulaire de certaines bactéries (notamment *Staphylococcus aureus*) peuvent constituer un obstacle à leur atteinte par les antibiotiques.
 - Résistance intrinsèque (naturelle) assurée par les gènes chromosomiques;
 - Résistance acquise ou émergence de nouvelles résistances aux antibiotiques.

Cependant, de récentes études menées sur les caractères de sensibilité ou de résistance des principaux germes responsables d'infections mammaires ont montré que ceux-ci demeurent majoritairement sensibles aux principaux antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites. De ce fait, les échecs thérapeutiques devraient plutôt être imputés à des facteurs d'ordre pharmacologique, à la localisation intracellulaire de certains germes ou encore à la constitution, provoquée par certaines bactéries (*S. aureus* notamment), de micro-abcès difficilement curables (**Hanzen, 2006**).

Chapitre 02

Les huiles essentielles

1. Généralités

Le terme huile essentielle (HE) s'agit d'un extrait pur et naturel provenant de plantes aromatiques (**Roulier ,1990 ; Wegrzyn et Lamendinh, 2005**). Elle concentre l'essence de la plante, autrement dit son parfum. Il s'agit de substances odorantes, volatiles, de consistance huileuse, très concentrées, offrant une forte concentration en principes actifs (**Lardry et Haberkorn, 2007**).

Les HE sont produites par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages (**Csesk et Kaufman ,1999**). Elles sont composées de molécules volatiles odorantes, majoritairement issues de la famille des terpénoïdes. Elles s'accumulent dans des glandes et tissus spécialisés des végétaux tels que les cellules épidermiques des pétales chez les rosaceae et les oleaceae, les glandes épidermiques des lamiaceae, les poches sécrétrices des rutaceae ou canaux sécréteurs des apiaceae (**Gilly, 1997**).

On ne peut définir une HE ou bien une essence sans définir sa méthode d'extraction.

« Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » (**Pharmacopée européenne, 2008**).

2. Composition chimique :

Les HE sont des mélanges naturels complexes et variables, formées de constituants qui appartiennent à deux groupes de molécules : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane d'autre part (**Djeddi, 2012**).

2.1. Les terpénoïdes :

Terpénoïdes ou terpènes sont des dérivés de l'isoprène (méthyl-2-butadiènes); chaque groupe de terpènes est issu de la condensation d'un nombre d'unités isopréniques (C₅H₈)_n. Les terpènes sont généralement distribués dans tout le règne végétal. Toutes les plantes vertes ont la capacité de produire des terpènes. Mais cette spécificité n'est pas absolue car **Robbers et al**

(1996) mentionnent que les terpènes sont rencontrés également chez les champignons, certains animaux marins (Spongiaires), ainsi que chez certains insectes.

Selon le nombre d'unités isopréniques les terpènes sont classés en : monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tétraterpènes ou polyterpènes (C40). (Djeddi, 2012).

2.2. Les composés aromatiques :

Dérivés du phénylpropane, ces composés aromatiques sont beaucoup moins présents dans la composition des HE. (Bakkali *et al.*, 2007 ; Bruneton, 2005).

2.3 Composés d'origines divers :

Des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles. Elles sont entraînables par la vapeur d'eau. Ce sont des Composés issus de la dégradation d'acides gras et des Composés issus de la dégradation des terpènes. (BRUNETON J, 2005).

3. Caractérisation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînables à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau (AFSSAPS, 2008). Elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé. Elles sont pour la plupart colorées. Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation. Par conséquent, leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité. De ce fait, l'utilisation de flacons en verre opaque est conseillée. (Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

De nombreux facteurs peuvent modifier les essences provenant du végétal. Les HE sont des composées très altérables car ils renferment des composées oxydables sous l'action de l'air et de la lumière. Ils s'altèrent en se résinifiant, ce qui entraîne une modification de leur parfum, leur saveur et leurs constantes physiques et chimiques en les rendant impropres à l'utilisation. La normalisation des HE concerne :

-Les propriétés organoleptiques : odeur, couleur, aspect, saveur.

-Les caractéristiques chimiques : indice d'acide et d'ester.

-Le profil chromatographique et la quantification relative des différents constituants.

(Taleb-Toudert , 2015)

4. Critères déterminants la qualité des huiles essentielles :

a) La sélection de plante qui est tributaire du genre et de l'espèce botanique.

b) Le chémotype (chimiotye) représentant les différents panels de molécules chimiques que les plantes de la même espèce peuvent produire si elles sont placées dans des conditions de culture différentes. Le chémotype dépend de l'ensoleillement, de la température, de l'humidité, de la nature du sol, de la pression atmosphérique, la localisation géographique, de la photo période ...etc.

c) La partie de la plante considérée pour l'extraction est déterminante pour la qualité de l'huile. En effet, les différentes parties d'une plante ne possèdent pas un équipement enzymatique uniforme, ce qui entraîne une différence de composition dans les constituants produits. Il est donc impératif de préciser la partie considérée lors de l'extraction de l'HE.

d) La période de récolte : la récolte doit se faire au moment où les principes actifs les plus intéressants produits par la plante sont à leur concentration maximale.

e) La conservation des huiles essentielles : elle doit se faire dans des flacons en verre opaques et hermétiques, dans un endroit frais, à l'abri de la lumière et de la chaleur pour éviter leur oxydation et la polymérisation de leurs composants **(Jouault, 2012)**.

5. Propriétés antimicrobiennes et mode d'action des huiles essentielles :

Les propriétés médicinales des huiles essentielles sont nombreuses : antispasmodique, expectorantes, rafraîchissantes, diurétiques, antiseptiques.... (**Belletti et al, 2008 ; Safaei-Ghomi, 2010**).

Cependant, dans le présent travail, nous allons nous limiter à leurs propriétés antimicrobiennes qui constitueront l'essentiel de notre projet.

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (**Dorman et Deans, 2000; Ultee et al., 2002**).

Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools (α -terpinéol, terpinène-4-ol et linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les terpènes (**Cosentino et al., 1999; Dorman et Deans, 2000**).

Les alcools agissent généralement en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation (**Dorman et Deans, 2000**).

Les aldéhydes peuvent induire des réactions de transferts d'électrons et réagir avec des composés nitrés vitaux pour la bactérie : protéines et acides nucléiques (**Dorman et Deans, 2000**).

Les phénols sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. En effet, la plupart des études avancent que le principal site d'action des huiles essentielles est la membrane plasmique (**Shunying et al., 2005**), car le caractère hydrophobe des huiles essentielles leur permet de se lier avec les lipides de la membrane plasmique (**Burt, 2004**) qui perd sa structure et devient plus perméable aux ions potassium et proton. Ceci entraîne une diminution du gradient pH, du potentiel membranaire et une inhibition de la synthèse d'ATP, qui s'ensuit par la mort de la bactérie (**Ultee et al., 1999 ; Ultee et al., 2000 ; Burt, 2004**). En outre, **Walsh et al. (2003)** rapportent que le thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles, il provoque des fuites d'ions potassium K.

Partie

Expérimentale

Materiel
Et
Méthodes

1. Matériel :

1.1. Matériel biologique :

Le matériel biologique utilisé est :

- Le lait mammitiqueux.
- Trois huiles essentielles qui sont: huile essentielle de *Mentha spicata* (la menthe verte), *Myrtus communis* (le myrthe), et de *Citrus aurantium* L (le bigaradier).

1.2. Matériel non biologique :

L'ensemble des réactifs, consommables, milieux de culture et appareils sont présentés dans l'annexe n°2.

2. Méthodes :

2.1 Prélèvement du lait :

Après un examen clinique complet, cherchant à identifier des signes généraux d'une mammitite bovine (hyperthermie, abattement), fonctionnels (présence de caillots, modification de la qualité et la quantité de la sécrétion) et locaux (réaction ganglionnaire, induration de la mamelle, œdème, rougeur, douleur).

En fin, 06 vaches ont été sélectionnées.

À partir de chaque quartier atteint, aux environs de 10 ml du lait mammitiqueux ont été prélevés dans des pots stériles. (**Shyaka, 2007**) en respectant certaines conditions d'asepsie pour éviter que le lait soit contaminé.

Mode opératoire

- Désinfecter les mains de l'opérateur.
- Nettoyer la mamelle à l'aide de coton trempé dans de l'alcool éthylique.
- Les premiers jets du lait étaient jetés afin de nettoyer le canal galactophore de tous les débris qui auraient pu rentrer dans le pis par voie ascendante.
- Enfin, Les échantillons de lait ont été collectés dans des flacons stériles.

-Etiqueter chaque flacon en identifiant : date et heure du prélèvement, âge, et nombre lactation). Tous cela, est représenté dans le tableau 02.

-Par la suite, les prélèvements ont été transférés au laboratoire dans une glacière et conservés dans un congélateur à - 40°C, en vue d'analyses ultérieures. (**Bind *et al*, 1980 et Mialot 1983**).

Tableau 02 : Identification des vaches à mammite.

Vache	Lieu de prélèvement	Date de prélèvement	Heure de prélèvement	Age	Nombre de lactation
01	Abattoir d'El Harrach	12/12/2015	10 :00	6 ans	02
02	Abattoir d'El Harrach	12/12/2015	10 :00	10 ans	04
03	Boguera	13/12/2015	12 :30	4 ans	01 (8 mois de gestation)
04	Boguera	22/12/2015	14 :00	5 ans	03
05	Boguera	08/01/2016	11 :30	5 ans	03
06	Boguera	08/01/2016	11 :30	4 ans	02

2.2 Préparation des milieux de culture

Mode opératoire

-Mettre les flacons contenant des géloses dans un autoclave jusqu'elles deviennent liquide.

-dans une zone stérile, couler les géloses dans des boites de Pétri et laisser refroidir jusqu'elles solidifient.

2.3 Isolement des germes

L'isolement a été réalisé par ensemencement du lait décongelé sur gélose nutritive, gélose Chapman et Hektoen.

Mode opératoire :

- A l'aide d'une pipette pasteur, déposer quelques gouttes de lait dans chaque boîte.
- Etaler le lait sur toute la surface du milieu à l'aide d'une pipette râteau comme représenté dans la figure 01.
- Incuber les boîtes ensemencées dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

Expression des résultats :

La lecture est effectuée après 24h d'incubation.

- Par la suite, toutes les colonies apparues ont été décrites sur le plan macroscopique. (Forme, Taille, couleur,...) (**Ferney et al., 1966; Quin et al., 1994**).



Figure 01 : Ensemencement du lait mammitieux sur géloses.

2.4 Conservation des germes :

Après l'examen macroscopique, les souches pures ont été conservées dans des géloses de conservation par piqure centrale, en vue d'analyses ultérieures.

2.5 Identification des germes :

Les souches conservées ont été repiquées par technique des 04 séries de stries, et ont été incubés à 37°C pendant 18-24 heures, afin d'obtenir des cultures jeunes. (**Bent Mohamed et Sidi Baba, 2007**),

Les bactéries isolées sur milieu Chapman ont été identifiées à l'aide des galeries Api 20 Staph, tandis que Les bactéries isolées sur milieu Hektoen ont été identifiées par galerie Api 20E

Mode opératoire :

Préparation des galeries :

- Répartir environ 05ml d'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum :

- A l'aide d'une pipette pasteur, prélever une seule colonie de chaque culture jeune, et l'introduire dans le médium ou dans de l'eau physiologique stérile.
- En suite, homogénéiser la suspension bactérienne.

Inoculation de la galerie :

- A l'aide d'une pipette, remplir les tubes des galeries (et parfois les cupules aussi) avec de la suspension bactérienne déjà préparée.
- Renfermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 37°C pendant 18-24 heures.

Expression des résultats :

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture présenté dans l'annexe 03 et 04 et l'identification est obtenue à l'aide d'un manuel d'identification. (**Ferney *et al.*, 1966; Quin *et al.*, 1994**).

6. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur les souches bactériennes :

Il existe plusieurs méthodes employées pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes classées selon la nature du contact de l'extrait avec le germe (Aromatogramme, Micro-atmosphère, méthode de dilution à partir des disques, méthode des puits ainsi que les méthodes sur milieu liquide ...etc.).

Aromatogramme :

L'aromatogramme est l'équivalent de l'antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles.

Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d'huile.

Cette méthode utilisée par plusieurs auteurs (**Deans et Ritchie, 1987 ; Zaika, 1988 ; Carson et Riley, 1995 ; De Billerheck. 2007; Bendahou, 2007**) est la technique que nous avons utilisée.

Mode opératoire :

a. Préparation du milieu de culture :

Le milieu de culture utilisé est gélose Muller-Hinton, qui doit être fondu et coulé en boîte de Pétri puis laissé se solidifier.

Les géloses doivent être séchées avant l'emploi pour éliminer toute trace d'humidité.

b. Préparation de l'inoculum :

- A partir du milieu de conservation contenant la souche conservée et à l'aide d'une pipette Pasteur,ensemencer une boîte de Pétri contenant une gélose nutritive puis incubé (24h, 37°C).

- A partir d'une culture pure sur milieu d'isolement et à l'aide d'une pipette Pasteur, racler quelques colonies identiques.

- Préparer une suspension bactérienne en déchargeant la pipette dans l'eau physiologique stérile 0.9%, homogénéiser.

c. Ensemencement

A l'aide d'une pipette pasteur, prélever environ quelques gouttes de la suspension bactérienne, les étaler sur toute la surface de la gélose à l'aide d'une pipette râteau. Et le surplus de la suspension est aspiré.

d. Application des disques

Des disques de papier Wattman n°3 de 9 mm de diamètre sont stérilisés précédemment à la chaleur humide.

Après les avoir imprégnés par les huiles essentielles, déposer ces derniers sur la gélose déjà ensemencée par l'inoculum avec une répétition, c.à.d. que chaque boîte doit contenir deux disques d'une même huile essentielle testée.

e. Lecture

Après incubation à 35-37°C pendant 24 heures, et à l'aide d'une règle, on mesure les diamètres des zones d'inhibition (zone circulaire stérile autour du disque), puis on calcule la moyenne des diamètres d'inhibition de chaque deux disques identiques (répétitions), et en se basant sur cette moyenne, la souche étudiée est alors classée : (tableau 03).

Tableau 03 : Classification des bactéries (De Billerbeck 2007).

Caractère	Diamètre
Résistant	$D < 9 \text{ mm}$
Intermédiaire	$9 < D < 16 \text{ mm}$
Sensible	$16 \text{ mm} < D$

1. Matériel :

1.1. Matériel biologique :

Le matériel biologique utilisé est :

- Le lait mammiteux.
- Trois huiles essentielles qui sont: huile essentielle de *Mentha spicata* (la menthe verte), *Myrtus communis* (le myrthe), et de *Citrus aurantium* L (le bigaradier).

1.2. Matériel non biologique :

L'ensemble des réactifs, consommables, milieux de culture et appareils sont présentés dans l'annexe n°2.

2. Méthodes :

2.1 Prélèvement du lait :

Après un examen clinique complet, cherchant à identifier des signes généraux d'une mammite bovine (hyperthermie, abattement), fonctionnels (présence de caillots, modification de la qualité et la quantité de la sécrétion) et locaux (réaction ganglionnaire, induration de la mamelle, œdème, rougeur, douleur).

En fin, 06 vaches ont été sélectionnées.

À partir de chaque quartier atteint, aux environs de 10 ml du lait mammiteux ont été prélevés dans des pots stériles. (**Shyaka, 2007**) en respectant certaines conditions d'asepsie pour éviter que le lait soit contaminé.

Mode opératoire

- Désinfecter les mains de l'opérateur.
- Nettoyer la mamelle à l'aide de coton trempé dans de l'alcool éthylique.
- Les premiers jets du lait étaient jetés afin de nettoyer le canal galactophore de tous les débris qui auraient pu rentrer dans le pis par voie ascendante.
- Enfin, Les échantillons de lait ont été collectés dans des flacons stériles.

-Etiqueter chaque flacon en identifiant : date et heure du prélèvement, âge, et nombre lactation). Tous cela, est représenté dans le tableau 02.

-Par la suite, les prélèvements ont été transférés au laboratoire dans une glacière et conservés dans un congélateur à - 40°C, en vue d'analyses ultérieures. (**Bind *et al*, 1980 et Mialot 1983**).

Tableau 02 : Identification des vaches à mammite.

Vache	Lieu de prélèvement	Date de prélèvement	Heure de prélèvement	Age	Nombre de lactation
01	Abattoir d'El Harrach	12/12/2015	10 :00	6 ans	02
02	Abattoir d'El Harrach	12/12/2015	10 :00	10 ans	04
03	Boguera	13/12/2015	12 :30	4 ans	01 (8 mois de gestation)
04	Boguera	22/12/2015	14 :00	5 ans	03
05	Boguera	08/01/2016	11 :30	5 ans	03
06	Boguera	08/01/2016	11 :30	4 ans	02

2.2 Préparation des milieux de culture

Mode opératoire

-Mettre les flacons contenant des géloses dans un autoclave jusqu'elles deviennent liquide.

-dans une zone stérile, couler les géloses dans des boites de Pétri et laisser refroidir jusqu'elles solidifient.

2.3 Isolement des germes

L'isolement a été réalisé par ensemencement du lait décongelé sur gélose nutritive, gélose Chapman et Hektoen.

Mode opératoire :

- A l'aide d'une pipette pasteur, déposer quelques gouttes de lait dans chaque boîte.
- Etaler le lait sur toute la surface du milieu à l'aide d'une pipette râteau comme représenté dans la figure 01.
- Incuber les boîtes ensemencées dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

Expression des résultats :

La lecture est effectuée après 24h d'incubation.

- Par la suite, toutes les colonies apparues ont été décrites sur le plan macroscopique. (Forme, Taille, couleur,...) (**Ferney et al., 1966; Quin et al., 1994**).



Figure 01 : Ensemencement du lait mammitieux sur géloses.

2.4 Conservation des germes :

Après l'examen macroscopique, les souches pures ont été conservées dans des géloses de conservation par pique centrale, en vue d'analyses ultérieures.

2.5 Identification des germes :

Les souches conservées ont été repiquées par technique des 04 séries de stries, et ont été incubés à 37°C pendant 18-24 heures, afin d'obtenir des cultures jeunes. (**Bent Mohamed et Sidi Baba, 2007**),

Les bactéries isolées sur milieu Chapman ont été identifiées à l'aide des galeries Api 20 Staph, tandis que Les bactéries isolées sur milieu Hektoen ont été identifiées par galerie Api 20E

Mode opératoire :

Préparation des galeries :

- Répartir environ 05ml d'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum :

- A l'aide d'une pipette pasteur, prélever une seule colonie de chaque culture jeune, et l'introduire dans le médium ou dans de l'eau physiologique stérile.
- En suite, homogénéiser la suspension bactérienne.

Inoculation de la galerie :

- A l'aide d'une pipette, remplir les tubes des galeries (et parfois les cupules aussi) avec de la suspension bactérienne déjà préparée.
- Renfermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 37°C pendant 18-24 heures.

Expression des résultats :

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture présenté dans l'annexe 03 et 04 et l'identification est obtenue à l'aide d'un manuel d'identification. (**Ferney *et al.*, 1966; Quin *et al.*, 1994**).

6. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur les souches bactériennes :

Il existe plusieurs méthodes employées pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes classées selon la nature du contact de l'extrait avec le germe (Aromatogramme, Micro-atmosphère, méthode de dilution à partir des disques, méthode des puits ainsi que les méthodes sur milieu liquide ...etc.).

Aromatogramme :

L'aromatogramme est l'équivalent de l'antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles.

Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d'huile.

Cette méthode utilisée par plusieurs auteurs (**Deans et Ritchie, 1987 ; Zaika, 1988 ; Carson et Riley, 1995 ; De Billerheck, 2007; Bendahou, 2007**) est la technique que nous avons utilisée.

Mode opératoire :

a. Préparation du milieu de culture :

Le milieu de culture utilisé est gélose Muller-Hinton, qui doit être fondu et coulé en boîte de Pétri puis laissé se solidifier.

Les géloses doivent être séchées avant l'emploi pour éliminer toute trace d'humidité.

b. Préparation de l'inoculum :

- A partir du milieu de conservation contenant la souche conservée et à l'aide d'une pipette Pasteur,ensemencer une boîte de Pétri contenant une gélose nutritive puis incubé (24h, 37°C).

- A partir d'une culture pure sur milieu d'isolement et à l'aide d'une pipette Pasteur, racler quelques colonies identiques.

- Préparer une suspension bactérienne en déchargeant la pipette dans l'eau physiologique stérile 0.9%, homogénéiser.

c. Ensemencement

A l'aide d'une pipette pasteur, prélever environ quelques gouttes de la suspension bactérienne, les étaler sur toute la surface de la gélose à l'aide d'une pipette râteau. Et le surplus de la suspension est aspiré.

d. Application des disques

Des disques de papier Wattman n°3 de 9 mm de diamètre sont stérilisés précédemment à la chaleur humide.

Après les avoir imprégnés par les huiles essentielles, déposer ces derniers sur la gélose déjà ensemencée par l'inoculum avec une répétition, c.à.d. que chaque boîte doit contenir deux disques d'une même huile essentielle testée.

e. Lecture

Après incubation à 35-37°C pendant 24 heures, et à l'aide d'une règle, on mesure les diamètres des zones d'inhibition (zone circulaire stérile autour du disque), puis on calcule la moyenne des diamètres d'inhibition de chaque deux disques identiques (répétitions), et en se basant sur cette moyenne, la souche étudiée est alors classée : (tableau 03).

Tableau 03 : Classification des bactéries (De Billerbeck 2007).

Caractère	Diamètre
Résistant	$D < 9 \text{ mm}$
Intermédiaire	$9 < D < 16 \text{ mm}$
Sensible	$16 \text{ mm} < D$

Résultat

3. Résultats :

3.1 Résultats d'isolement :

Le tableau 04 résume la taille, la forme, et la couleur des colonies isolés dans les 03 types des milieux de culture.

Tableau 04 : Description macroscopique des colonies.

Prélèvement	Gélose nutritif	Gélose Chapman	Gélose Hektoen
01			-
02	-Petite, Ronde, Blanchâtre		-Moyenne, Ronde, Jaune-orangé -Petite, Ronde, Verdâtre
03	1-Moyenne, Ronde, avec un centre clair 2-Petite, Ronde, A un centre opaque	-Petite, Ronde, Blanchâtre.	-
04			
05			-Petite, Ronde, Verdâtre
06	-Petite, Ronde, Blanchâtre		Moyenne Ronde Verdâtre

3.2 Résultats d'identification :

Les germes isolés et identifiés sont répertoriés dans les deux tableaux suivants (tableau 05 et 06).

Tableau 05 : Identification des germes isolés dans milieu Chapman.

Le prélèvement	Code de la souche	Identification biochimique
01	6731250	<i>S.lentus</i>
02	0006001	<i>Micrococcus spp</i>
03	6736010	<i>S . sciuri</i>
04	6732430	<i>S. sciuri</i>
05	0044000	<i>Micrococcus spp</i>
06	6736012	<i>S.intermedius</i>

Tableau 06 : Identification des germes isolés dans milieu Hektoen.

Le prélèvement	Code de la souche	Identification biochimique
02	2243000	<i>Chromobacterium Violaceum</i>
02	5244572	<i>Klebsiella oxytoca</i>
05	2241000	<i>Pseudomonas spp</i>
06	0000000	Non identifié

A partir des tableaux 05 et 06 nous avons trouvé que quatre staphylocoques (40%), deux microcoques (20%), une *Pseudomonas* (10%), une *Klebsiella* (10%), une *chromobacterium* et une bactérie non identifiée (10%) ont été isolés (le pourcentage est calculé à partir du nombre total des germes isolés ; soit 10). Par la suite, nous avons répertorié ces pourcentages dans la figure 02.

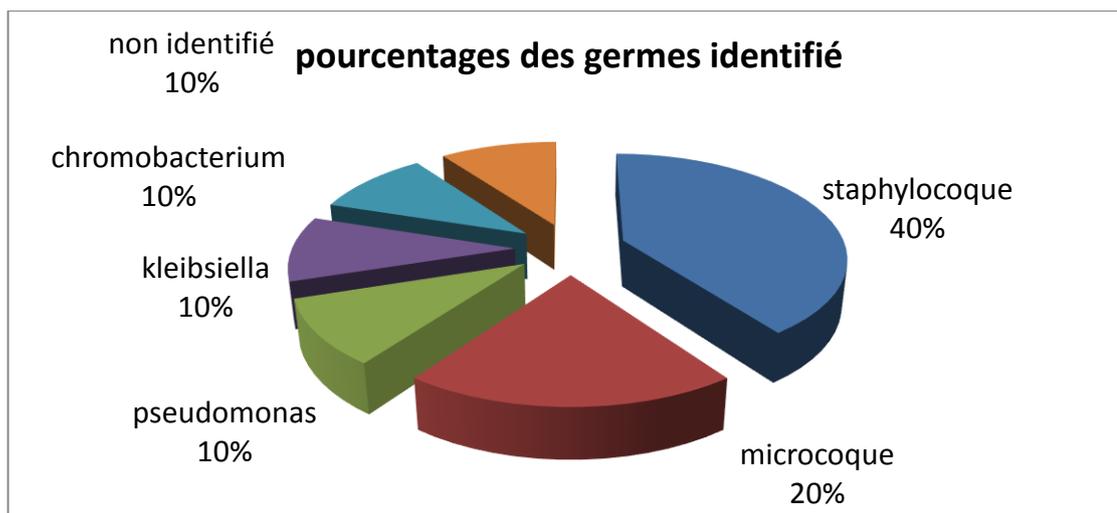


Figure 02 : Pourcentages des germes identifiés.

3.3 Composition chimique des HE :

Vu que les trois HE ont été achetées, Leurs compositions a été fournie par l'organisme ZIPHE bio malheureusement nous ne pouvons recevoir que les fiches techniques de deus HE uniquement, et qui sont représentées dans l'annexe 05.

3.4 Résultats d'aromatogramme :

Dans la recherche des méthodes alternatives de lutte antibactérienne, le règne végétal offre beaucoup de possibilités. De nombreuses études se développent actuellement pour isoler et identifier des composés de plantes qui ont une activité antibactérienne, antioxydante, antifongique et insecticide. (**Djenane *et al*, 2002 ; Bouzouita *et al*, 2008 ; Djenane *et al*,2011**) A cet effet, nous avons testé trois HE vis-à-vis quelques germes isolés à partir du lait mammitieux.

L'activité antibactérienne des HE a été effectuée en suivant la technique d'aromatogramme.

La mesure des diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne a montré- après calcule des moyennes- des valeurs enregistrées et représentées dans la figure 03 pour l'huile essentielle de la menthe, la figure 04 pour l'huile essentielle du myrthe et enfin la figure 05 concernant l'HE du bigaradier.

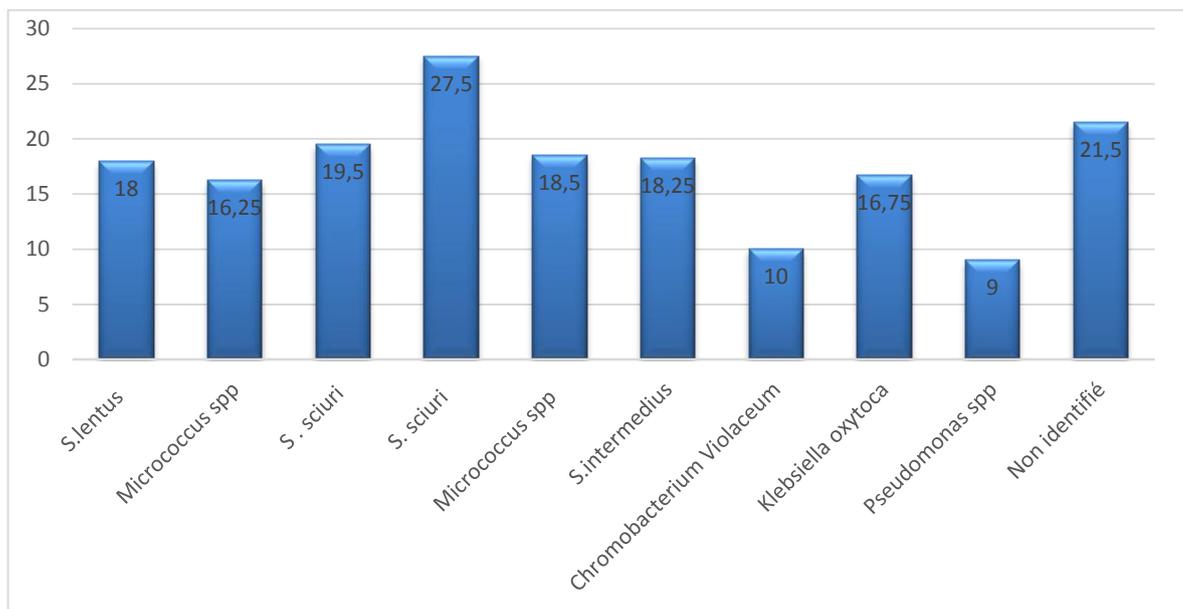


Figure 03 : Diamètres des zones d'inhibition de l'HE de la menthe verte en mm.

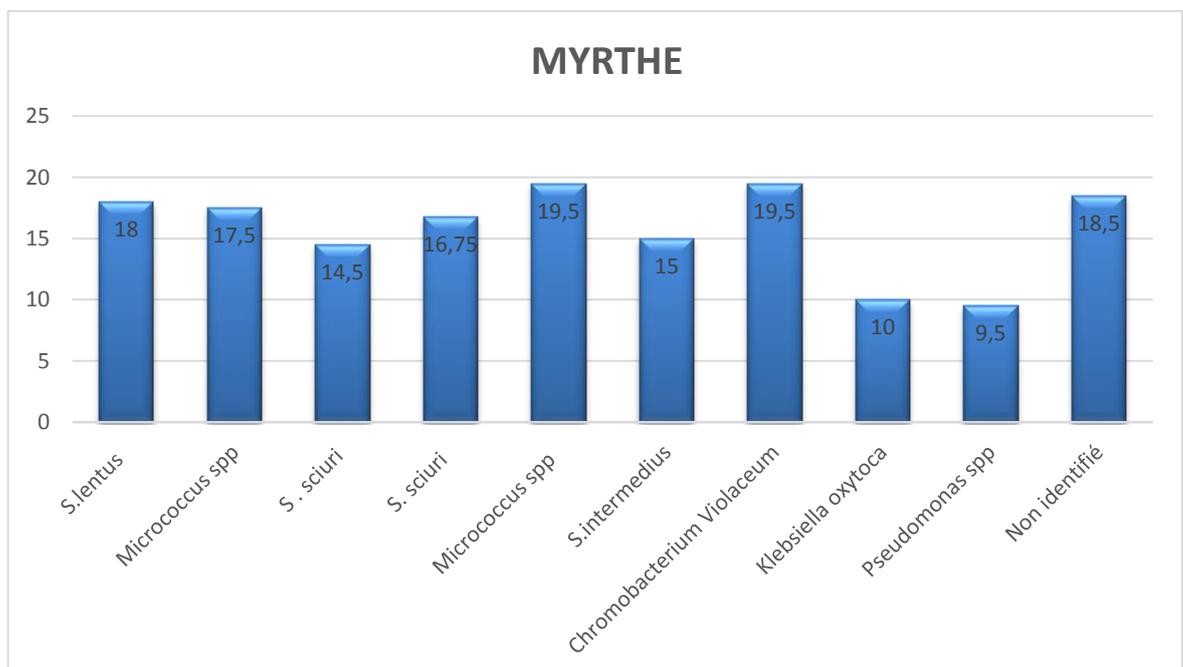


Figure 04 : Diamètres des zones d'inhibition de l'HE de myrthe en mm

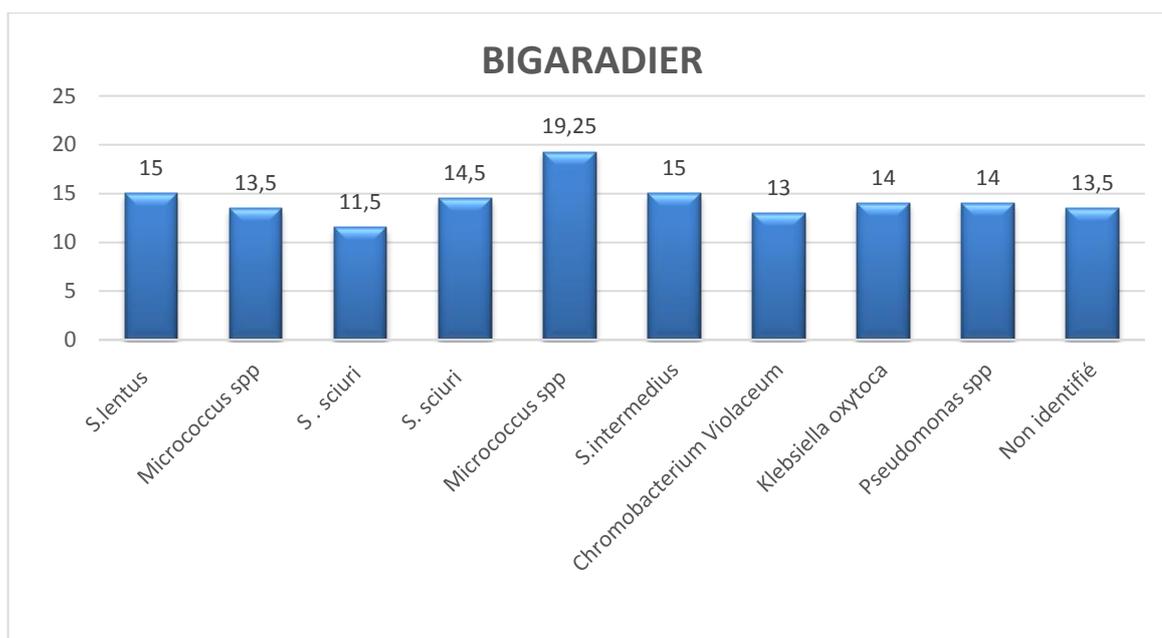


Figure 05 : Diamètres des zones d'inhibition de l'HE du bigaradier en mm

La sensibilité des bactéries aux HE est déterminée selon le diamètre de l'halo d'inhibition et les résultats sont consignés dans le tableau 07.

Tableau 07 : La sensibilité des souches.

Germes	Menthe	Myrte	Bigaradier
S.lentus	Sensible	Sensible	Intermédiaire
Micrococcus spp	Sensible	Sensible	Intermédiaire
S. sciuri	Sensible	Intermédiaire	Intermédiaire
S. sciuri	Sensible	Sensible	Intermédiaire
Micrococcus spp	Sensible	Sensible	Sensible
S.intermedius	Sensible	Intermédiaire	Intermédiaire
<i>Chromobacterium Violaceum</i>	Intermédiaire	Sensible	Intermédiaire
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Sensible	Intermédiaire	Intermédiaire
<i>Pseudomonas spp</i>	Résistant	Intermédiaire	Intermédiaire
Non identifié	Sensible	Sensible	Intermédiaire

A partir du tableau 07 et après le calcul du nombre total des bactéries sensible, résistante et intermédiaire, nous avons pu élaborer le tableau 08.

Tableau 08 : Nombre des bactéries selon le degré de sensibilité.

	Menthe verte	myrte	bigaradier
Sensible	08	06	01
Intermédiaire	01	04	09
Résistant	01	00	00

La figure 06 montre le taux des bactéries selon leurs degré de sensibilité vis-à-vis l'huile essentielle de la menthe verte, de myrte (figure 07) et de bigaradier (figure 08).

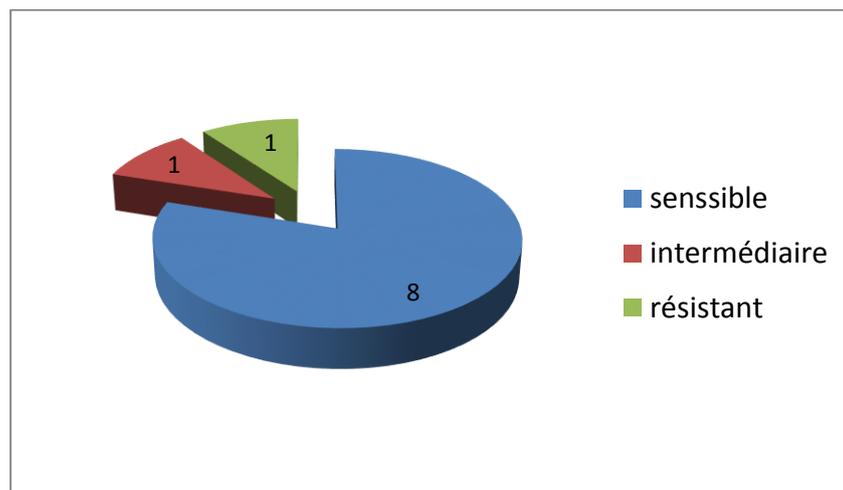


Figure 06 : Taux des bactéries selon leurs degré de sensibilité vis-a-vis l'huile essentielle de la menthe verte

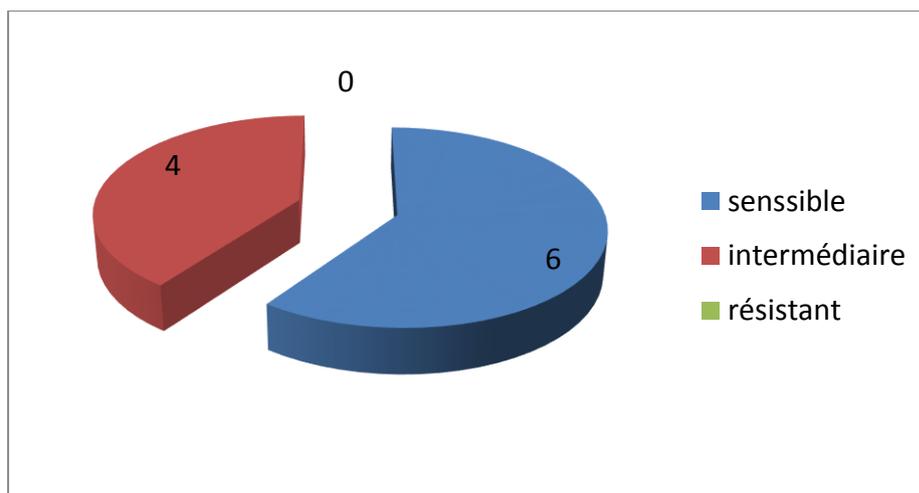


Figure 07 : Taux des bactéries selon leurs degré de sensibilité vis-à-vis l'huile essentielle de myrte

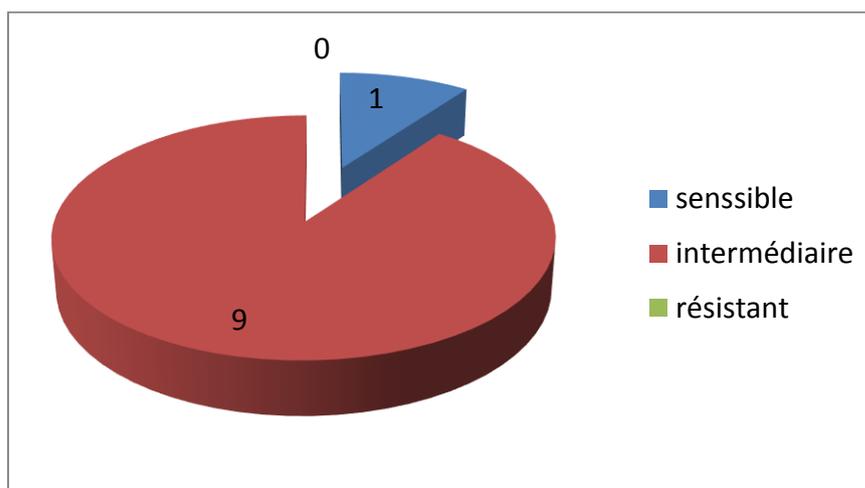


Figure 08 : Taux des bactéries selon leurs degré de sensibilité vis-à-vis l'huile essentielle de bigaradier.

Discussion

5. Discussion :

Contrairement à la plupart des études réalisées sur les mammites cliniques des bovins, où les principaux germes demeurent *S. aureus*, *Streptococcus uberis*, *dysgalactiae* et *agalactiae*, nous n'avons pas trouvé ces germes dans nos prélèvements.

Cela pourrait s'expliquer par La mise en place d'un traitement, qui détruit le germe majeur responsable de l'inflammation en laissant la place à un autre germe (**Durel et al., 2003**).

La disparition de certains germes due à la congélation, ou la non identification suite à nos techniques de laboratoire non adaptées à certains germes. La congélation est connue pour entraîner la disparition notable d'*E. coli* et de *Actinomyces pyogenes* dans les prélèvements (**Schukken et al., 1989**).

Arrivant à l'effet antibactérien des HE sur les germes isolés, nous remarquons que la souche la plus sensible à l'action de l'HE du *Myrtus comminus* (myrte) est *Micrococcus spp.* Nos résultats concordent avec ceux de **Ela et al (1996)** et **Meena et Sethi (1994)**, ainsi que **Delaurentis et al (2005)**, **Yadegarina et al (2006)** qui ont rapporté une activité antibactérienne très remarquable vis-à-vis les staphylocoques et les microcoques. Cette activité est probablement due à la richesse de notre huile essentielle du myrte en alpha pinène, cinéol-1,8 et /ou à la synergie de tous les composés d'HE qui sont présentées dans l'annexe 05. Cependant, on note plus de résistance pour les bactéries à Gram négatif. Cette résistance est en relation avec la nature de la membrane externe qui est composée de lipopolysaccharides. Ces derniers forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes (**Ali-Stayeh et al, 1998**).

L'Huile essentielle du *Citrus aurantium* (bigaradier) a présenté une activité antibactérienne modérée. Les mêmes résultats ont été déclaré par **Hellal (2011)**. Cette activité est probablement due à limonène qui constitue le composé majoritaire de notre l'HE. Nos observations rejoignent celles qui ont été faites par **INOUYE et al. (2001)**, que les H.Es contenant du phénol ou de l'alcool comme composés majoritaires étaient plus actives, que celles contenant le limonène (hydrocarbure monoterpénique) comme composé majoritaire. Ces mêmes observations ont été également partagées par **DORMAN et DEANS, (2000)**, qui ont montré que les hydrocarbures monoterpéniques, abondants dans les

H.Es de Citrus contenant le limonène comme constituant principal est faiblement inhibiteur contre les microorganismes.

D'une autre part, nous avons obtenu une forte activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Mentha spicata*. Ce résultat concorde avec ceux de **SCHERER *et al* (2013)**, qui ont rapporté que cette activité antimicrobienne remarquable est due à la forte concentration du carvone (67%). Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir la fiche technique correspondant à la composition de cette HE.

A la lumière de tout ça, nos résultats ont montré que l'effet inhibiteur varie selon la souche testée. Nos résultats concordent avec ceux **Elgayar *et al* (2001)** confirmant que chaque HE est unique dans sa composition et que chaque bactérie diffère considérablement en structure et en fonctionnalité. Plusieurs études testant l'activité antibactérienne des HE confirment ce phénomène (**Pool, 2001 ; Bekhechi *et al*, 2008**).

D'après **OUSSALAH *et al* (2007)**, il a été rapporté que les activités antibactériennes des HE peuvent être liées à la concentration, à la nature et le contenu, aux groupements fonctionnels, à la configuration des composés, et leur interaction synergique possible.

Conclusion

Conclusion et perspectives

Les H.Es sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés antimicrobiennes très intéressantes à mettre à profit dans d'éventuels traitements contre les maladies d'origine bactérienne notamment les mammites.

Les travaux menés par notre étude ont permis de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles de: *Mentha spicata* (la menthe verte), *Myrtus comminus* (le myrte), et *Citrus aurantium* (le bigaradier) sur 10 souches bactériennes isolées à partir de 06 échantillons provenant de 06 vaches laitières infectés par des mammites.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Mentha spicata* ont montré qu'elle est fortement inhibitrice contre *staphylococcus lentus*, *S. intermedius*, *S. sciuri*, et *micrococcus spp*, par contre elle est légèrement inhibitrice contre *Pseudomonas spp*, *Klebsiella oxytoca*, et *Chromobacterium violaceum*.

Quant aux résultats de l'activité antibactérienne de l'HE du *Myrtus comminus*, nous avons remarqué que cette essence est fortement inhibitrice contre *Staphylococcus lentus*, *Chromobacterium violaeum*, et *Micrococcus spp*, mais elle est légèrement inhibitrice contre *S. sciuri*, *S. intermedius*, *Klebsiella oxytoca*, et *Pseudomonas spp*.

Concernant l'huile essentielle de *Citrus aurantium*, nous avons constaté qu'elle est fortement inhibitrice contre *Micrococcus spp* seulement, et légèrement inhibitrice contre les autres bactéries.

A la lumière des résultats obtenus, nous pensons que d'autres recherches plus poussées peuvent s'orienter vers l'étude de l'activité antibactérienne de ces HE et d'autres HE non seulement *in vitro* qu'*in vivo*. Ça serait plus intéressant de faire leur extraction et notamment leur caractérisation en terme de composition par CGSM. Aussi, l'étude du pouvoir antibactérien des HEs utilisées seules ou leurs composants majoritaires, mais également en mélange, sur d'autres souches et sur des souches de référence serait également intéressant. Et pour l'essai d'élaboration d'un éventuel traitement de mammite, il serait utile, quoique nécessaire, de faire des essais comparatifs de l'effet antibactériens de quelques antibiotiques standards communément utilisés dans l'antibiothérapie des mammites.

Recommandations :

Enfin, nous recommandons:

- S'assurer que tous le matériel nécessaire est disponible avant de commencer le travail.
- il est préférable d'effectuer chaque analyse (surtout l'identification) dès que le prélèvement soit disponible.
- En cas d'achat d'une HE, il faut s'assurer que sa fiche technique (composition) sera fournie.
- Pour une meilleure identification de la souche isolée, effectuer la coloration de Gram.

Références

Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (AFSSAPS).
Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Mai 2008.

Ali Stayeh M.s -yaghmour r.m-faidi y.r(1998) "antimicrobial activity of 20 plants used in folklorie medicine in the palestinian Area" p66.

BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, IADORMA M. (2008). Biological effects of essential oils. Food and Chemical- Toxicology. 46. 446-475.

Bekhechi c , Ait K Bekkaraf, abdelouahid D.E,2008 >>composition et activité antibactérienne des HE d'origanum glandulosum d'Algerie,phytotherapie>>p 153-159

Belletti N., Lanciotti R., Patrignani F., Gardini F. Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit-based salads. J Food Sci 2008; 73: 331-8

Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, Benyoucef M, Desjobert J M, Bernardins A F, costa J 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of origanum glandulosum desf essential oil and extract obtained by microwave extraction : comparison with hydrodistillation. Food chemistry 106: 132-139.

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

Bent Mohamed A et mint Sidi Baba A ; 2007 ; MANUEL DE TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE ;

Bind JL, Leplatre J, Poutrel B. 1980. Les mammites:l'échantillon et son exploitation. Bull. GTV., 80-6-B : 17-27

Bouaziz O, Aïmeur R, Kabouia R, Bererhi EH, Smati F. 2000. Enquête sur les mammites bovines dans la région de Constantine – Résultats préliminaires.4 ème Séminaire International de Médecine Vétérinaire Constantine 21-22 novembre 2000.

Bouzouita N., Kachouri F., Benhalima M., et Chaabouni M., "Composition chimique et activités: antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*", *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10, (2008), 119-125.

Bramley 1984 Bramley, A.J. and Dodd, F.H. (1984) Reviews of the progress of Dairy Science: Mastitis control - progress and prospects. *Journal of Dairy Research* 51, 481-512

Bramley A J. (1992) Mastitis. In: *Bovine Medicine - Diseases and Husbandry of Cattle* (eds. Andrews A. H., Blowey R. W., Boyd H., Eddy R. G.). Blackwell Scientific Publications: Oxford, 289-300

BRUNETON J 2005. *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales*. 3e édition 2005. Editions Tec & Doc. Editions médicales internationales.

Burt S. A. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International J of food Microbiology*, 94: 223 - 253.

Carson, C.F. and Riley, T.V. (1995) Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 264–269.

Carter, J. M., Hutcheson, A. M., and Quinlan, R. A. (1995) In vitro studies on the assembly properties of the lens proteins CP49, CP115: coassembly with alpha-crystallin but not with vimentin. *Exp Eye Res*, 60(2), 181-92.

Cosentino S., Palmas F. (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 130— 135.

Couic-Marinié F., Lobstein A. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques* 2013; 52 (525) : 18-21

Craven, N. and Anderson, J.C. (1979) The location of *Staphylococcus aureus* in experimental chronic mastitis in the mouse and the effect on the action of sodium cloxacillin. *British Journal of experimental pathology* 60, 453-459

Csek.J et Kaufman.PB, 1999.how and why these compounds are synthesized by plants.Natural products from plants.CRC press, Boca Raton FL p 37-90

Cullor, J.S. and Tyler, J.W. (1996) Mammary Gland Health and Disorders. In: Large Animal Internal Medicine, ed. Smith Bradford P., 2nd ed., Mosby, St. Louispp. 1178-1193

Deans, S. G. & Ritchie, G. (1987): Antibacterial properties of plant essential oils. International Journal of Food Microbiology 5: 165-180.

DE BILLEBERCK (V.-G). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. Phytothérapie (2007) 5: 249-253.

Delaurentis , N , Rosato A,Gallo L, Leone et Milillo,M.A,2005"chemical composition and antimicrobial activity of myrtus comminus".Revue E.P.P.O.S. N°39.p3-8

Djeddi S, 2012, les huiles essentielles : « Des mystérieux métabolites secondaires », manuel de formation destiné aux étudiants de Master.

Djenane D., Sánchez-Escalante A., Beltrán J.A., et Roncalés P.," Ability of a Tocopherol, taurine and rosemary in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere", Food Chemistry. 76, (2002), 407-415.

Djenane D., Yangüela J., Montañés L., DJerbal M.,& Roncalés P.,"Antimicrobial activity of pistacia lentiscus and satureja montana essential oils against Listeria monocytogenes CECT 935 using laboratory media, efficacy and synergistic potential in minced beef", Food control,222, (2011),1046-1053.

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

Durel C.E., Parisi L., Laurens F., van de Weg W.E., Liebhard R., Jourjon M.F., 2003. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of Venturia inaequalis in apple. Genome 46: 224-234.

Eberhart, R.J. (1984) Coliform mastitis. Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice 6, 287-300

Ela d, et Meena A, Sethi F. << antimicrobial activity >> Comité française microbiologique (fiche technique).

Elgayar M, draughon f.A; Golden D, et Mount J.R, 2001 "antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. J Food protect" p1019-1024

Erskine, R. 2004. Philosophical approach to antibiotic therapy : Know the cow, bug, and grub. Proceedings of the annual meeting of the National Mastitis Council : 8-11.

Ferney J, Oudar J, De Saint Aubert G. 1966. Diagnostic bactériologique des mammites. Rev. Med. Vet., 117 : 845-858.

Gattefossé RM (1937) L'Aromathérapie – Les HE hormones végétales. Librairie des sciences Girardot, Paris.

Gilly G, 1997, Les plantes à parfum et huiles essentielles à grasse. Ed : L'Harmattan. p 97-104

GUERIN-FAUBLEE V. ; CARRET G. ; et HOUFFSCHMITT P., 2003. In vitro activity of 10 agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis. The Veterinary Record, 466-471.

Hanzen Ch. 2010. La pathologie infectieuse de la glande mammaire. Etiopathogénie et traitements. Approche individuelle et de troupeau.

HANZEN Ch., 2006. Pathologie infectieuse de la glande mammaire. « En ligne ». Accès Internet : <http://ulg.ac.be/oga/formation/chap30/index.htm?page=30-0.htm>. (Consultée le 19 Mars 2007).

Hellal, 2011, Contribution à l'étude des propriétés antibactérienne et anti oxydante de certains HE extraite de citrus. Application sur la sardine. Magistère en biologie

Jouault.S,2012 : La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de doctorat d'état en pharmacie. Université de Lorraine.Faculté de pharmacie. France.137p

Lardry J-M, Haberkorn V. L'aromathérapie et les huiles essentielles. Kinesither Rev 2007; 61 : 14-7.

LEFEVRE.C. 2009. Traitement des mammites à partir d'huiles essentielles : Thymus saturoïdes et Rosmarinus officinalis. Fiche n°20.

Lévesque P. 2006. La classification des mammites. Le producteur de lait Québécois. Volume 26, numéro 10 : 30-33.

MAAF, plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire. Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la forêt, 2011, [En line]. http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/plan_ABR-171111.pdf (page consultée le 15.01.2013)

Marshall, A.B. (1981) Summer mastitis. In: National Institute for Research in Dairying Technical Bulletin 4 – Mastitis control and herd management. pp. 80

McDonald, J.S. (1977) Streptococcal and Staphylococcal Mastitis. Journal of the American Veterinary Medical Association 170, 10(2), 1157-1159

Meyer A., Deiana J., Leclerc H. (1994). Cours de microbiologie générale. Ed. Dom,

Mialot JP. 1983. Technique de prélèvement de lait pour examen bactériologique. Rec. Méd. Vét., numéro spécial - les prélèvements en médecine vétérinaire : 1057.

Morresey, P.R. (1999) Bovine mastitis. In: Current Veterinary Therapy 4 Food Animal Practice, ed. Howard, J.L. and Smith, R.A., W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 563-566.

Niar A, Ghazy K, Dahache SY. 2000. Incidence des mammites sur les différents élevages bovins de la wilaya de Tiaret. 4^{ème} Séminaire International de Médecine Vétérinaire Constantine 21-22 novembre 2000.

Oussalah M, Caillet S, Sarcier L. et Lacroix M 2007 << inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria : *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *staphylococcus aureus*, et *Listeria monocytogene*. Food control, 18,414-420

Patrick G L. 2003. Chimie Pharmaceutique, traduction de la deuxième édition anglaise, édition De Boeck, Belgique.

Perry J J, Staley J T, Lory S 2004. Microbiologie, cours et questions de révision. Édition Dunod, Paris, France.

Pharmacopée européenne. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (Afssaps) Mai 2008.

Pool K (2001) "multidrug resistance in G- bacteria current opinion in microbiology" p500-508

Quin PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, London, 648 p

Robbers et al. (1996) in Djeddi S, 2012, les huiles essentielles : « Des mystérieux métabolites secondaires », manuel de formation destiné aux étudiants de Master.

Roulier G. Les huiles essentielles pour votre santé : traité pratique d'aromathérapie. Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. Editions Dangles, 1990

Safaei-Ghomi J., Ahd AA. Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. Pharmacogn Mag 2010; 6:172-5.

Sandholm, M., Kaartinen, L., and Pyorala, S. (1990) Bovine mastitis - why does antibiotic therapy not always work? An overview. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 13(3), 248-60

SCHERER R., FUMIERE LEMOS M., COIMBRA MARTINELLI G., LOPES MARTINS J-D., SILIVA A-G., 2013: Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.) *Industrial Crops and Products* 50 408– 413.

Schukken Y.H., Grommers F.J., Van De Geer D., Brand A., "Incidence of clinical mastitis farms with low somatic cell counts in bulk milk", *Vet. Rec.*, 79, (1989), pp. 1906-1908.

Shunying Z., Yang Y., Huaidong Y., Yue Y., Guolin Z. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J of Ethnopharmacology*, 96: 151 - 158.

SHYAKA A; 2007; DIAGNOSTIC DES MAMMITES CLINIQUES ET SUBCLINIQUES EN ELEVAGE BOVIN LAITIER INTENSIF (CAS DE LA FERME DE WAYEMBAM) ;

STephy, Syaph aur ,four pathogenic bacteria : Ecoli O157,H7, listeria monocytogene food control p414-420.

Taleb-Toudert K, 2015, Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabyle (nord algérien). Evaluation de leurs effets sur le bruche de niébé. Thèse de doctorat en science biologique. Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques. Université MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou, p12,

Ultee A., Kets E. P. W., Smid E., J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the Foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4606 — 4610.

Vestweber, J.G. and Leipold, H.W. (1993) *Staphylococcus aureus* Mastitis. Part 1. Virulence, defense mechanisms and establishment of infections. *The Compendium of Continuing Education Food Animal* 15, 1561-1569.

Walsh S. E., Maillard J. Y., Russell A. D., Catrenich C. E., Charbonneau D. L., Bartolo R. G. (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and —negative bacteria. *J of Applied Microbiology*, 94: 240 —247.

Wegrzyn R., Lamendinh H. Huiles essentielles et aromathérapie bucco-dentaire. *Chir. Dent. Fr* 2005; 1225 :62-66.

Yadgarina D , Gachkar L,Rezaei M.B Taghizadeh M,Astaneh S.A,Rasoolim I.2006"biochemical activities of Iranian Mentha piperita I and Myrtus comminus essential oils"J phytochemistry.Vol 67.p 1240-1270.

Yadegarnia d, gachkar l, rezaei m b, taghizadeck m, astaneh s a, rasooli l 2006.Biochemical activities of Iranian menthe piperita l and myrtus communis l essential oils.Phytochemistry 67, 1249-1255.

Zaika, L. L. 1988. Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. J. Food Safety. 9:97-118.

Annexes

Annexe 01 : Germes responsables de mammites dans l'espèce bovin (Watts . Etiological agents of bovine mastitis. Vet Microbiol.,1988, 16, 41-66).

Genre	Espèce	Genre	Espèce
Staphylococcus	aureus	Pseudomonas	pyocyaneus
	epidermidis	Bacteroides	funduliformis
	hyicus	Serratia	marcescens
	hominis	Acheloplasma	laidlawii
	xylosus	Nocardia	astéroïdes
	sciuri		brasiliensis
Streptococcus	uberis		farcinia
	dysgalactiae	Peptococcus	indolicus
	zooepidemicus	Bacteroides	melaniogenicus
	faecalis	Eubacterium	combesii
	pyogenes	Clostridium	sporogenes
	pneumoniae	Fusobacterium	necrophorum
Escherichia	coli	Trichosporon	sp
Actinomyces	pyogenes	Aspergillus	fumigatus
	ulcerans		nidulans
	bovis	Pichia	sp
Campylobacter	jejuni	Candida	sp
Haemophilus	somnus	Cryptococcus	neoformans
Klebsiella	sp	Saccharomyces	sp
Enterobacter	aerogenes	Torulopsis	sp
Mycobacterium	bovis	Prototheca	trispora
	lacticola		zopfii
	fortuitum	Leptospira	interrogans serovar
	bovis		pomona
	bovigenitalium		interrogans hardjo
	alkalescens	Bacillus	cereus
	canadensis	Pasteurella	multocida

Annexe 02: Matériel non biologique.

1.Réactifs :

TDA, VP1 et VP2, Kovacs, NIT 1 et NIT 2, ZYM A et ZYM B.

2.Consommables :

Eau, Alcool, Eau physiologique stérile, Eau de Javel, Papier à usage unique, Flacons stériles, Boîtes de Pétri, Galerie biochimique Api 20 E et Api 20 Staph, Disque de papier Wathman n° 03 à 09mm de diamètre, Huile de vaseline.

3.Milieux de culture :

Gélose nutritive, Gélose Chapman, Gélose Hektoen, Gélose Mueller Hinton, Gélose de conservation.

4.Appareils :

Glacière avec des cubes de glaces, Bec bunsen, Congélateur, Réfrigérateur, Autoclave, Etuve, Pipette pasteur/râteaux, Bêchers,

Annexe 03 : Tableau de lecture pour Api staph.

Tests	Résultat négatif	Résultat positif
0	rouge	-
GLU	rouge	jaune
FRU		
MNE		
MAL		
LAC		
TRE		
MAN		
XLT		
MEL		
NIT	incolore-rose pale	rouge
PAL	jaune	violet
VP	incolore-rose pale	Violet-rose
RAF	rouge	jaune
XYL		
SAC		
MDG		
NAG		
ADH	jaune	orange-rouge
URE	jaune	Rouge-violet

Annexe 04 : Tableau de lecture pour Api 20 E :

Test	Résultat négatif	Résultat positive
ONPG	incolore	jaune
ADH LDC ODC	jaune	Rouge/ orangé
CIT	Vert pale/ jaune	Bleu-vert/ bleu
H2S	Incolore/ grisâtre	Dépôt noir
URE	jaune	Rouge/ orangé
TDA	jaune	Marron-rougeâtre
IND	Incolore/vert pâle /jaune	rose
VP	Incolore/rose pâle	Rose/rouge
GEL	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Bleu/bleu vert	Jaune/jaune gris
MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA	Bleu/bleu vert	jaune

Annexe 05 : composition chimique d'HE de *Myrtus communis*.

Constituants principaux	Pourcentage %
Pinène alpha	46.7
1,8-cinéol	22
Limonene	5.5
Linalol	2.6
Para-cymène	1.2
Myrtényle acétate	14
Terpényle acétate	1.30
Myrténol	0.55
Alpha térpinol	2.10
Acétate de géranyle	2.50
Cis-béto-ocimène	0.14
Terpinène-4-ol	0.35
Méthyl eugénol	0.70
Beta-caryophyllène	0.36

Annexe 06 : composition chimique d'HE de *Citrus aurantium* :

Constituants principaux	%
Pinene alpha	0.75
Pinene beta	0.62
Sabinene	0.28
Myrcene	2.79
Limonene	89.0
Ocimene trans	0.27
Linalol	0.32
Decanal	0.22
Linalyl propionate	0.97
Geranyl acetate	0.27
Caryophyllene beta trans	0.18
Germacrene D	0.21
Nerolidol trans	0.20
Nootkatone	0.33
Osthol	0.26