

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de
La recherche scientifique
Centre universitaire Abdelhek Ben Hammouda-Jijel-
Institut des sciences de la nature

057

MB. 11. 2003

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme
d'études supérieures en biologie
Option : Microbiologie

01
02

THEME

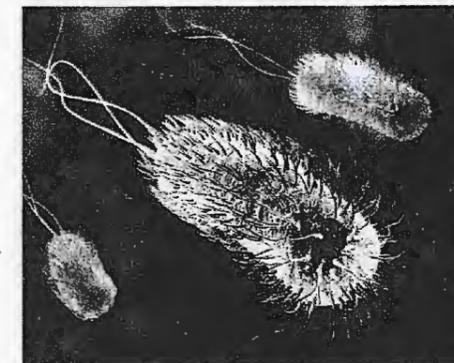
**Effet de cinq types d'huiles essentielles de
Thymus vulgaris sur dix souches d'*Escherichia
coli* avec détermination de la CMI**

Membres de jury :

IDOUI Tayeb : Président
ROULA Sadjia : Examineur
BOUDJERDA Djamel : Encadreur

Présenté par :

BOUTOBZA Badaoui
AZZOUZ Wassila



Promotion 2003

N°d'ordre :

Remerciements

Au terme ce travail, il nous est agréable de remercier tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à son élaboration et nous tenons à exprimer nos plus sincères remerciements et notre profonde gratitude à Mr. Boudjarda. D, qui n'a jamais cessé de nous témoigner et de nous prodiger ses précieux conseil.

Nous remercions les professeurs : Mr.Idoui.T, et Mme Roula. S, pour avoir bien voulu s'intéresser à ce travail et le juger.

Nous tenons aussi à passer nos vifs remerciements à Mr.Idoui.T, Mr.Lahouel.M qui ont mis à nous disposition les informations et documents nécessaires à l'élaboration de ce travail.

Sans oublier de remercier les personnels du laboratoire de biologie et ceux du laboratoire d'hygiène de la Wilaya de JIJEL, pour leur aide.

En fin, que soient remerciés bien vivement tous ceux qui chacun à sa manière, nous ont aidé dans ce travail.

Sommaire

SOMMAIRE

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction.....	1
-------------------	---

CHAPITRE I : LES HUILES ESSENTIELLES

I-Les huiles essentielles.....	2
1-Définition.....	2
2-Historique.....	2
3-Origine des HE.....	2
4-Les principaux constituants des HE.....	3
4-1- Les terpenoïdes.....	3
4-2- Les composés azotés de métabolisme secondaire.....	3
4-3- Les composés phénoliques.....	3
5-Méthodes d'extraction des HE.....	3
5-1- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	3
5-2- Extraction par expression des épicarpes de citrus.....	4
6-Facteur de variabilité des HE.....	4
6-1- Existence de chimiotypes.....	4
6-2- Période de récolte.....	4
6-3- Facteurs extrinsèques.....	4
6-4- Procédé d'obtention.....	4
7-Conservation des HE.....	5
II-Les HE de <i>Thymus vulgaris</i>.....	5
1-<i>Thymus vulgaris</i>.....	5
1-1- Etude phytologique.....	5
1-2- Classification et étude écologique.....	7
1-3- Les chémotypes.....	7

1-4- Les parties utilisées et période de récolte.....	7
1-5- Constituant chimique.....	7
2-Les HÉ de <i>T. vulgaris</i>	7
2-1- Constituant.....	7
2-2- Extraction.....	8
2-3- Propriétés des HÉ de <i>T. vulgaris</i>	8
2-3-1- Propriétés antibactériennes.....	8
2-3-2-Propriétés antifongiques.....	9
2-3-3- Propriétés antivirales.....	9
2-3-4- Propriétés insecticides.....	9
2-3-5- Propriétés anti-infectieuses.....	9
2-3-6- Effet sur les organes et les fonctions biologiques.....	10
2-3-7-Importance dans l'industrie agro-alimentaire.....	10
2-4- La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).....	11
2-4-1- La CMI.....	11
2-4-2- La CMB.....	11

CHAPITRE II: LES ENTEROBACTERIES.

I- La famille <i>Enterobacteriaceae</i>	12
1- Généralités.....	12
2- Caractères bactériologiques et morphologiques.....	12
3- Habitat.....	12
4- Caractères antigéniques.....	12
5- Classification.....	12
 II- <i>Escherichia coli</i>	13
1- Habitat.....	13
2- Caractères morphologiques.....	13
3- Caractères biochimiques.....	13

4- Caractères cultureux.....	13
5- Caractères antigéniques.....	13
6- Pathogénicité de <i>E. coli</i>	13
6-a- Facteurs de pathogénicité.....	13
6-b- Les infections dues à <i>E. coli</i>	14
6-b-1- Les entérites.....	14
6-b-2- Les infections urinaires.....	14
6-b-3- Les septicémies et méningites néo-natales.....	14
6-b-4- Les intoxications alimentaires.....	14
6-c- Mode de contamination.....	14
6-d- Traitement des infections dues à <i>E. coli</i>	14

PARTIE PRATIQUE

MATERIEL ET METHODES

I- Matériel et Méthodes d'étude bactériologique.....	15
A-Matériel.....	15
1- Origine des souches.....	15
2- Milieux de cultures.....	15
B-Méthodes.....	15
1- Purification.....	15
2- Identification.....	16
2-1- Etude morphologique.....	16
2-2- Etude métabolique.....	17
2-2-1- Etude du métabolisme glucidique.....	17
2-2-1-1- Attaque du mannitol.....	17
2-2-1-2- Fermentation des sucres en milieu TSI.....	17
2-2-1-3- Recherche de dérivés de l'acide. Pyruvique sur milieu Clark et Lubs.....	18
2-2-2- Etude du métabolisme des acides organiques.....	19

2-2-2-1- Utilisation de citrate de simmons.....	19
2-2-3- Etude du métabolisme protéique.....	19
2-2-3-1- Recherche de l'uréase.....	19
2-2-3-2- Recherche de l'indole.....	20
2-2-3-3-Recherche de TDA.....	20
2-2-4- Etude du métabolisme des acides aminés :	
Recherche de ODC, LDC et ADH.....	20
II- Matériel et Méthodes de détermination de la CMI.....	21
A-Matériel.....	21
1- Origine de HE.....	21
2- Milieux de cultures.....	21
B-Méthodes de diffusion sur gélose.....	21

RESULTATS ET DISCUSSION

I-Résultats de l'étude bactériologique.....	23
1-Purification.....	23
2-Identification.....	23
3-Tests biochimiques.....	23
II- Résultats de la détermination de la CMI.....	27
III-Résultats de l'analyse statistique.....	28
Discussion générale.....	38
Conclusion générale.....	39

Annexes

Annexe 1

Annexe 2

Références

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Hydrodistillateur de laboratoire.....	4
Figure 2: <i>Thymus vulgaris</i>	6
Figure 3: Confection des puits sur gélose Mueller-inton.....	22
Figure 4 : Aspect des colonies sur gélose Hektoen	24
Figure 5 : Résultats des tests biochimiques.....	25
Figure 6 : Les zones d'inhibition de <i>E.coli</i> par les HE de <i>T.vulgaris</i>	28
Figure 7 : Le témoin d'huile de Vaseline.....	28
Figure 8 : La CMI des souches en fonction de l'HE.....	30
Figure 9 : Pourcentage de la CMI en fonction de l'HE et la souche.....	31
Figure 10 : Les diamètres des zones d'inhibition en fonction e la souche et de l'HE.....	32
Figure 11 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition en fonction de la dilution et la souche.....	33

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : L'activité antifongique de quelques composés de l'HE <i>T.vulgaris</i>	9
Tableau 2 : Préparation des dilutions.....	21
Tableau 3 : Aspect des colonies purifiées sur gélose Hektoen.....	23
Tableau 4 : Les caractères biochimiques des souches étudiées.....	26
Tableau 5 : Les pourcentages des CMI selon les dilutions.....	27
Tableau 6 : Diamètre des zones d'inhibition pour l'HE1.....	34
Tableau 7 : Diamètre des zones d'inhibition pour l'HE2.....	34
Tableau 8 : Diamètre des zones d'inhibition pour l'HE3.....	35
Tableau 9 : Diamètre des zones d'inhibition pour l'HE4.....	35
Tableau 10 : Diamètre des zones d'inhibition pour l'HE5.....	36
Tableau 11 : Résultats de l'analyse de variance.....	37

ABREVIATIONS

ADH : Arginine dihydrolase

Cit (milieu): Citrate de Simmons

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimal inhibitrice

D : Dilution

DO : Densité optique

E : *Escherichia coli*

ECA : Entérobactériel common antigen (antigène commun des entérobactéries)

HE : Huile essentielle

Ind : Indole

Lac : Lactose

LDC : Lysine décarboxylase

LPS : Lipopolysaccharide

LT(toxine) : Thermolabile

Man : Manitol

Mob : Mobilité

ONPG : Ortho-nitro-phényl galactosidase

RM : Rouge de méthyle

SLT : Shiga-like toxin

ST(toxine): Thermostable

TDA : Tryptophane désaminase

TSI(milieu) : Triple sugar-iron agar:gélose glucosé-lactose-saccharose-SH₂

VP : Voge-Proskaur

Introduction

Introduction:

Les huiles essentielles sont des concentrées de composés aromatiques connues pour leurs propriétés thérapeutiques.

Elles sont utilisées depuis des millénaires notamment en Inde, Chine et le bassin méditerranéen. [40]

L'utilisation des HE en aromathérapie a été envisagée pour la première fois par **Gatefossé M. (1928)**. [37]

Les HE de *Thymus vulgaris* sont utilisées en Aromathérapie en raison de leurs multiples propriétés pharmacologiques importantes, notamment leur pouvoir antibactérien aussi bien sur les gram positif que les gram négatif [35], les doses actives déterminées par expérimentation sont généralement faibles. [31]

Dans le but d'une contribution à l'étude de l'effet antibactérien des HE du *T. vulgaris*, nous nous sommes proposés à faire ce travail qui se divise en deux parties :

Dans la première partie nous avons fait une étude bibliographique portant sur les entérobactéries et l'espèce *E.coli* d'une part et les connaissances acquises sur les HE, en particulier les HE de *T.vulgaris* avec une description phytologique de la plante.

La deuxième partie expérimentale a pour but l'estimation de l'activité antibactérienne de cinq extraits de *T. vulgaris* obtenus par hydrodistillation sur dix souches de *E.coli* identifiées avec détermination de la CMI par la méthode de diffusion sur gélose. Il faut noter que l'origine des plantes de *T. vulgaris* est la wilaya de Bechar et qui est située au sud-ouest de l'Algérie.

Partie
bibliographique

CHAPITRE I
LES HUILES ESSENTIELLES

I. Les Huiles essentielles.

1. Définition.

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires des végétaux d'odeur et de saveur généralement fortes. [7,35] Elles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles " fixes" [7].

La pharmacopée française (1965) définit les HE comme des produits de composition généralement assez complexe renfermant les molécules volatiles contenues dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation [7].

La norme AFNOR NFT75-006 (1987) a donné la définition suivante: " Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des *Citrus*, soit par distillation à sec. L'HE est en suite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques" [7]. Cette définition par procédé restrictive exclut aussi bien les produits obtenus par l'extraction à l'aide des solvants que ceux obtenus par tout autre procédé [7].

Les HE ne sont pas des huiles au sens où on l'entend généralement. Elles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales [37].

2. Historique.

L'utilisation des plantes médicinales existait dans des textes chinois datant de plus de 5000 ans avant J.C. Les inscriptions cunéiformes prouvent que le pavot était déjà recherché il y a plus de 2000 ans avant J.C. le papyrus médical d'Ebers (environ 1500 ans avant J.C) est le premier recueil consacré aux plantes médicinales. De son côté, l'épanouissement de la culture arabe (VIII^e – XV^e siècles) fournissait d'excellents médecins et pharmaciens qui furent à l'origine d'importantes préparations des essences par distillation [35]. Au cours des siècles la médecine par les plantes s'est appelée phytothérapie, puis grâce à **M. Gatefossé** en 1927 à Lyon " Aromathérapie"[37].

Autre pionnier, **Max fesneau** s'intéresse à l'utilisation des HE en 1925, avec **Melin** et **Seveling** dans des congrès où ils poussent le développement de l'Aromathérapie. Actuellement la science Aomathérapique voit son developpment s'accroître grâce à des thérapeutes non traditionalistes. **Seveling** et un de ceux qui ont le mérite de lancer des spécialités pharmaceutiques naturelles avec des HE en les utilisant par vois orale [37].

3. Origine des HE.

On trouve les HE en qualité appréciable chez environ 2000 espèces de plantes, réparties dans 60 familles [29].

Ces HE peuvent être stockées dans tous les organes végétaux: Fleurs, feuilles et moins habituellement dans des écorces, des bois, des racines, des fruits, des grains et des rhizomes [7].

La synthèse et l'accumulation des HE sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante [7].

4. Les principaux constituants des HE.

4-1. Les terpenoides.

Dans la règle générale ils ne sont constitués que de carbone, d'oxygène et d'hydrogène. Chaque groupe de terpenoides est issu de la condensation tête à queue d'un nombre variable d'unités en C₅ (isoprène) [7, 23, 29].

4-2. Les Composés azotés du métabolisme secondaire.

4-2-1. Les Acides aminés non constitutifs des protéines.

Les amino-acides, les imino-acides et les amides se forment par décarboxylation des amines végétales ou par transfert du groupe amine d'un acide aminé sur un aldéhyde [7,29]. Ils ont une action antimétabolite et beaucoup entre eux sont toxiques [7].

4-2-2. Glucosinolates et hétérosides cyanogènes.

Le glucosinolates existent sous forme de sel de potassium. La structure comporte un glucose, un groupe sulfate et une génine variable. Elles ont un effet protecteur contre les substances cancérigènes. Les hétérosides cyanogènes sont utilisés dans les traitements des affections broncho-pulmonaires [7].

4-3. Les composés phénoliques.

Ils sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont principalement issus d'un métabolisme de l'acide shikimique ou/et de celui d'un polyacétate [7] avec au moins une fonction hydroxyle [7,23].

5. Méthodes d'extraction des HE.

Depuis le 9^{ème} siècle, le principe d'obtention des HE est inchangé. L'HE est obtenue par entraînement à la vapeur des composés volatils contenus dans la matière végétale. Parallèlement aux procédés traditionnels, diverses assistances technologiques peuvent être mises en œuvre comme l'ultrasons qui activent l'extraction [16].

5-1. Par entraînement à la vapeur d'eau.

Elle est appelée aussi « L'hydrodistillation » : elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou broyé) dans l'eau qui ensuite portée à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes et chargées de l'HE sont entraînées vers le haut où elles sont condensées sur la paroi réfrigérante et l'HE se sépare par différence de densité [7,16].

D'autres méthodes utilisant la vapeur d'eau sont utilisables comme la distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion où le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau [7,15].

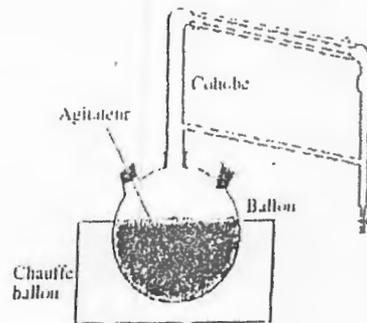


Fig.1 : Hydrodistillateur de laboratoire. [16]

5-2. Par expression des épicarpes de *citrus*.

Les procédés classiques consistent à exercer, sous un courant d'eau, une action abrasive sur la surface du fruit. Après élimination des déchets solides, l'HE est séparée de la phase aqueuse par centrifugation. D'autre rompent les poches par dépression et recueillent directement l'HE [7].

6. Facteurs de variabilité des HE.

6-1. Existence de chémotypes.

Les chémotypes sont très fréquents chez les plantes à huiles essentielles, l'un des exemples les plus démonstratifs est celui du thym (*Thymus vulgaris* L) [7].

6-2. Période de récolte. [37]

Des études ont permis de définir le moment optimal de la récolte des plantes :

- Les racines au moment du repos végétatif (automne, hiver).
- Les parties aériennes le plus souvent au moment de la floraison.
- Les feuilles justes avant la floraison.
- Les fleurs à leur plein épanouissement, voire en bouton.
- Les graines, lorsqu'elles ont perdu la majeure partie de leur humidité.

6-3. Facteurs extrinsèques.

Il s'agit de l'incidence des facteurs de l'environnement et des pratiques culturales. Ces facteurs exercent une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles [7].

6-4. Procédé d'obtention.

Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire des réarrangements, des isomérisations, des oxydations ... etc., ce qui montre que la composition des HE obtenues est le plus souvent différente à celle initialement présente dans la plante [7].

7. Conservation des HE.

La relative instabilité des molécules constitutives des HE rend leur conservation difficile, mais il est possible de la limiter en utilisant de flacons de faible volume en aluminium, en acier inoxydable ou en verre brun, entièrement remplis et fermé de façon étanche [7].

L'usage des matière plastique doit être proscrit [35], stockage à basse température, il est possible de recourir à l'adjonction des antioxydants [7].

II. Les HE de *Thymus vulgaris*.

1. *Thymus vulgaris*.

1-1. Etude phytologique.

Sous-arbrisseau vivace, aromatique, ramifié, à tiges ligneuses dressées atteignant 30 cm de hauteur [35], les rameaux blanchâtres, portent des feuilles opposées, lancéolés ou linéaires, enroulées sur les bords la face supérieure est grisâtre, la face inférieure tomenteuse [7] d'une longueur de 4 à 12 mm sur 3 mm de large [35]. Les fleurs à calice velu et à corolle bilabée rosée ou blanchâtre sont groupées en glomérules ovoïdes [7].

L'examen microscopie montre des cellules épidermiques à paroi anticlinales sinueuses, des poils à forme triangulaire à la face supérieure de la feuille contient souvent des fines aiguilles d'oxalate de calcium. Les poils sont deux types tecteurs et sécréteurs [35].

1-2. Classification et étude écologique.

Thymus vulgaris appartient à :

- Embranchement : *Angiospermes*
- Classe : *Dicotylédones*
- Sous classe : *Gamopetals*
- Ordre : *Lamiale*
- Famille : *Lamiaceae*
- Genre : *Thymus vulgaris*

Thymus vulgaris pousse sur les terrains secs et ensoleillés, il est sensible au gel. De nombreuses espèces et variétés se sont multipliées en Europe centrale et du sud, en Afrique orientale, en Amérique du nord et en Inde [35].

1-3. Chémotypes.

On compte pour l'espèce *T. vulgaris* sept chémotypes [6] : à thymol (65%) et à carvacrol (5%) ; à cavacrol (80%) ; à linalol (90%) à geraniol (95%), à terpineol, à terpineol -4 et trans-thuyanol -4 [7,35], et à cinéol [7].

1-4. Parties utilisées et période de récolte.

Les parties utilisées sont les feuilles et les sommités fleuries. Le moment optimal de la récolte est l'été (mois de juillet) [5]

1-5. Constituant chimique.

T. vulgaris contient de 0.5 à 2.5 % d'HE. Elle contient aussi autres constituants comme l'acide rosamarinique et caféique, les tanins, les flavonoïdes, les triterpène et dérivés des phénols d'origine monoterpéniques [7,35]

2. Les HE de *Thymus vulgaris*.

2-1. Constituant.

L'HE de *T. vulgaris* renferme surtout des isomères monoterpéniques : Le thymol= méthyl-5 isopropyl-2 phénol (25 à 50%) et le carvacrol= méthyl-6 isopropyl-3 phénol sont majoritaire par rapport au linalol. Une faible part de phénols est également présente sous forme d'hétérosides, autres monoterpènes ; p-cymène, γ - terpinène, camphre et limonène. Cependant, cette composition chimique varie selon le chémotypes considéré [35].

Les formules chimiques de quelques composés sont représentées ci après.

2-3-6. Effets sur les organes et les fonctions biologiques.

- **Spasmolytiques** : Elle exerce une activité spasmolytique attribuée le plus souvent aux phénols [7, 32, 35]. in-vitro **Leml et Van Den Broucke** ont montré que ces phénols s'opposent effectivement aux contractions provoquées sur l'iléon et la trachée du cobaye – par l'histamine, l'acétylcholine et autres cathécholamines. Ces auteurs ont montré aussi que l'activité spasmolytique de ces HE est liée à la présence des polyméthoxyflavones [7]. Elle est aussi spasmolytique bronchique [35].
- **Expectorant** : Par voie interne, principalement utilisée dans les bronchites aiguës et les coqueluches. L'activité résulte à la fois d'une augmentation des sécrétions qui sont véhiculées par les mouvements ciliaires des branches, car l'HE est partiellement excrétée par les poumons [35].
- **Cicatrisant et stimulant** : [7, 32, 35] Elle entre dans la formulation de certains médicaments cicatrisants [7], de plus elle a une action stimulante tissulaire et régénératrice des cellules hépatiques, à forte dose elle est hépatotoxique [39]. Elle stimule aussi le système immunitaire, mais contre indiquée durant la grossesse car elle est un stimulant utérin [32,35].
- **Anti-inflammation et antalgique** : Elle est utilisée contre les douleurs rhumatismales, les elongation et les inflammations des voies respiratoires supérieures [32,35].
- **Anti-oxydant** : La propriété anti-oxydante de l'HE de *T.vulgaris* est prouvée par plusieurs expérimentations. **Kuresh A. et al (1999)** ont montré que les HE diminuent significativement l'activité du superoxyde dismutase dans le cœur des vieux rats [36]. De son côté **Dorman H. J. D. et al (2003)** ont montré que ces HE inhibent ou retardent l'oxydation des lipoprotéines à faible densité du corps humain. Cette capacité anti-oxydante est due à l'acide rosmarinique [11].
- L'HE de *T.vulgaris* a de plus la propriété accélératrice de la circulation locale, antitussive, excellente contre les problèmes digestifs et l'état de faiblesse et irritante de la muqueuse [32].

2-3-6. Importance des HE dans l'industrie agro-alimentaire.

Les HE et leurs composants, actuellement employées comme arômes alimentaire, sont également connus pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir de conservateurs alimentaires, d'autant plus qu'elles sont classées généralement comme saines et approuvées comme additifs alimentaire par le Food and Drug administration (FAD, USA) [9].

Le Thym est très utilisé comme épice et dans la fabrication de liqueur [35], mais son HE pourrait être proposée comme agent dans les traitements alimentaires, en raison de leur activité antifongique pour prévenir le développement des moisissures et la production des aflatoxines ou pour inhiber ou éliminer certaine germes responsables d'intoxications alimentaires comme *E.coli*, *Staphylococcus*, *Salmonella* et *Bacillus* [9].

2-4. La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).

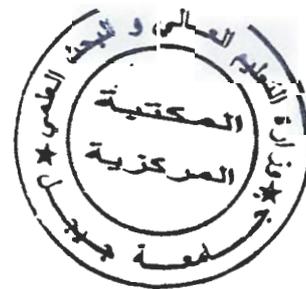
Pour caractériser l'activité antimicrobienne d'une HE, il est nécessaire de définir des paramètres préliminaires. Pour l'activité antimicrobienne, les plus courantes sont la CMI et la CMB. Dans le cas générale, ces dernière différent d'une HE à une autre [9].

2-4-1. La concentration minimale inhibitrice.

La CMI est définie comme la plus faible concentration de la substance antibactérienne inhibant, en 18 à 24 heures, la multiplication des bactéries (bactériostase). Cette valeur permet de classer une souche bactérienne dans les catégories sensible, résistante ou intermédiaire. La détermination de la CMI peut être réalisée en recourant à une méthode par dilution ou par diffusion [6].

2-4-2. La concentration minimale bactéricide.

La CMB est définie comme la plus faible concentration de la substance antibactérienne détruisant, après 18 à 24 heures de contact à 37°C, 99.99% (99.9% pour les Anglo-saxons) d'une population bactérienne. La détermination de la CMB s'effectue par une méthode de dilution (essentiellement en milieu liquide) [6].



CHAPITRE II
LES ENTEROBACTERIES

I. La famille des *Entérobacteriaceae*.

I-1. Généralités.

Les *Entérobacteriaceae* constituent la famille des bacilles gram négatif aérobie-anaérobies facultatif. Cette famille présente un intérêt médical, scientifique, économique et écologique. Environ 60% des bactéries isolées et identifiées dans les laboratoires d'analyse médicales appartiennent à cette famille [14].

1-2. Caractères bactériologiques et morphologiques.

Les caractères biochimiques et morphologiques généraux et communs à toutes les espèces des entérobactéries sont [2, 14, 21,22] :

- Gram négatif
- Mobiles au moyen d'une ciliature de type pérétriche ou immobiles.
- Aérobie-anaérobies facultatives.
- Pousent rapidement en milieux ordinaires.
- Elles fermentent le glucose avec ou sans production de gaz.
- Réaction d'oxydase négative
- Réduisent les nitrates en nitrites

I-3-. Habitat.

Les entérobactéries sont nommées ainsi par ce que la plupart des espèces sont des parasites du tube digestif de l'homme et des espèces animales à sang chaud et à sang froid.

Les entérobactéries sont aussi dites : germes ubiquistes [3, 14, 22,27].

I-4. Caractères antigéniques.

La détermination du serotype ne peut être entreprise que pour des souches dont l'identification est certaine [2].

- L'antigène somatique O : Localisé au niveau de la paroi bactérienne. Il constitue une endotoxine de nature glucido-lipido-protéique. Leur agglutination est lente, difficilement dissociable par agitation [2,21].
- L'antigène H : antigène flagellaire présent chez les souches mobiles, il se constitue d'une protéine, la flagelline, thermolabile [14], rapidement agglutinable et facilement dissociable par agitation [2].
- L'antigène K: capsulaire de nature polysaccharidique [2].
- L'antigène commun des entérobactéries (ECA) ou antigène de Kunin est retrouvé chez toutes les entérobactéries à l'exception d'*Erwinia chrysanthemi* [14].
- Les antigènes d'adhérences ou adhésines de nature protéique, portés par les pili communs (*fimbriaes*). Ils sont classés parmi les antigènes K (K₈₈, K₉₉) [22].

I-5. Classification.

La famille des *Entérobacteriaceae* se subdivise en cinq tribus *Escherichiae*, *klebsiellae*, *Proteae*, *Yersineae*, *Erwiniae* [2, 3,22].

Le tribu d'*Escherichiae* comprend 5 genres principaux dont le genre *Escherichia* [8]

II. *ESCHERICHIA COLI*.

II-1. Habitat.

E.coli est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux où elle est présente à raison de 10^7 à 10^9 bactéries par gramme de selles [2]. Elle peut être trouvée au niveau d'autres muqueuses [39]. Sa présence dans les aliments est le témoin d'une contamination fécale récente [19].

II-2. Caractères morphologiques.

E.coli est un bacille gram négatif, le plus souvent mobile, sa taille est de 1- 1.5x 2-6 μm [2,14].

II-3. Caractères biochimiques.

En plus des caractères généraux des entérobactéries, *E.coli* possède les caractères spécifiques suivants [14, 21,22].

Tests	Gaz	Lac	ONPG	H ₂ S	Man	Cit	Urée	Ind	LDC	ODC	RM	VP	Mob
<i>E.coli</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	d	d	+	-	+/-

+ : Réaction positive

- : Réaction négative

d : Variable

II-4. Caractères culturaux.

E.coli se développe en 24 heures à 37°C sur milieux ordinaires, en donnant des colonies non pigmentées, de 2 à 3 mm de diamètre, sur gélose au sang elles peuvent être hémolytiques [2, 6]. De plus elle a une grande tolérance au variation de pH avec un optimum de 7.5 [39].

II-5. Caractères antigéniques.

La structure antigénique de *E.coli* est caractérisée par la présence de l'antigène O: somatique, l'antigène H : flagellaire et l'antigène K : Capsulaire [2, 14, 22,27].

II-6. Pathogénicité de *E.coli*.

Certaines souches de *E.coli* sont virulentes capables de déclencher spécifiquement chez l'homme et certaines espèces animales des infections plus ou moins graves. D'autres sont des souches pathogènes opportunistes [6].

6-a. Facteurs de pathogénicité.

- La capsule : Elle s'oppose à la phagocytose [14].
- Les protéines de la membrane externe et les LPS : Elles donnent aux bactéries la capacité d'échapper à l'activité bactéricide du sérum de l'hôte en s'opposant à la fixation du complément [2, 6].
- Système de captation de fer (sidérophores) : aerobactine [24,33].
- Les adhésines : Elles sont portées le plus souvent par des pili communs permettant l'adhésion aux cellules épithéliales qui constitue une étape essentielle de la pathogènes des infections dues aux bactéries entériques [1].
- Les toxines : on dénombre :

Partie
pratique

I. Matériel et méthodes d'étude bactériologique.

A. Matériel.

1. Origine des souches.

Les souches d'*E. coli* sont fournies par le laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Jijel sur des milieux gélosés.

2. Milieux de cultures.

Les milieux de cultures nécessaires sont : gélose Hektoen, gélose T.S.I, milieu au citrate de Simmons, milieu Clarck et Lubs, milieu mannitol-mobilité, milieu moeller, milieu urée-indole(voire annexe).

B. Méthodes.

1. Purification.

A partir des cultures fournies par le laboratoire d'hygiène de la wilaya de Jijel, on purifie les souches d'*E. coli* par épuisement en quatre quartiers sur gélose Héktoen, puis on incube à 37°C pendant 24 heures. Les souches qui se présentent sur l'Héktoen sous forme de petites ou moyennes colonies, rugueuses ou lisses avec une coloration rose (lactose positif) et sans centre noir (H₂S négatif) sont purifiées et identifiées.

2. Identification.

2-1. Etude morphologique.

2-1-1. Coloration de Gram.

a. Technique :

- Etaler une goutte de la suspension bactérienne sur une lame.
- Fixer le frottis en séchant à température ambiante.
- Recouvrir la lame de la solution de violet de gentiane et laisser agir pendant une minute (coloration).
- Rincer à l'eau courante.
- Fixer le violet de gentiane avec du lugol.
- Décolorer l'étalement par l'alcool- acétone.
- Laver à l'eau.
- Recolorer par la solution de fuchsine et laisser agir 30 secondes
- Après rinçage, sécher le frottis au papier et examiner à l'objectif (x100)

b. Lecture.

Les bactéries à gram positif sont colorées en violet.

Les bactéries à Gram négatif sont colorées en rose.

2-2. Etude métabolique.

Les tests biochimiques reposent sur la recherche d'enzymes responsables de certaines réactions biochimiques, l'utilisation d'un substrat particulier ou la recherche des produits issus du métabolisme bactérien.

2-2-1. Etude du métabolisme glucidique.

2-2-1-1. Attaque du mannitol.

a-Principe.

La dégradation du mannitol est identique à celle du glucose, dont l'attaque aboutit à des acides à chaînes très courtes comme l'acide acétique et l'acide formique le milieu mannitol mobilité permet de rechercher aussi bien la fermentation du mannitol que la mobilité bactérienne.

b. Technique.

Ensemencer le milieu mannitol-mobilité par piqûre centrale avec la souche à étudier puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

c. Lecture.

La fermentation du mannitol entraîne un virage de la couleur du milieu au jaune. La mobilité se traduit par un développement bactérien sous forme de nuage autour de la piqûre.

2-2-1-2. Fermentation des sucres en milieu TSI.

a. principe.

Le milieu TSI est un milieu complexe qui permet la mise en évidence des enzymes qui sont responsables de la dégradation du glucose, du lactose et des acides aminés.

Après l'ensemencement de ce milieu, les bactéries pourvues d'enzymes constitutives nécessaires à l'utilisation du glucose, elles l'épuisent du milieu entraînant une acidification de ce dernier. A ce stade, deux cas sont possibles :

Les bactéries capables de synthétiser les enzymes adaptatives nécessaires à l'utilisation du lactose elles le fermentent et acidifient le milieu.

Les bactéries dépourvues d'enzymes nécessaires au métabolisme du lactose, elles se dirigent vers les acides aminés, dont le métabolisme engendre la formation des radicaux d'ammoniums qui alcalinisent le milieu.

L'H₂S est formé à partir des acides aminés soufrés.

b. Technique.

Le culot du milieu TSI est ensemencé par piqûre centrale et la pente par stries, ensuite on incube à 37° durant 24 heures.

c. Lecture.

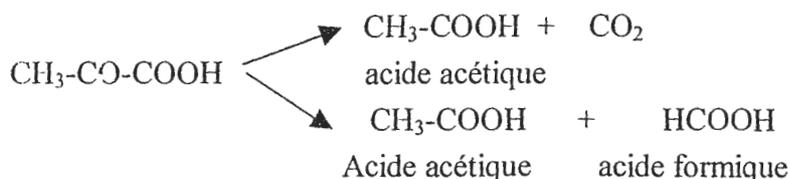
- Fermentation du glucose: le culot vire au jaune.
- Production de gaz : formation des bulles, déplacement ou séparation de la masse du milieu.
- Dégagement d' H_2S : noircissement de la pente et de culot

2-2-1-3. Recherche des dérivés de l'acide pyruvique sur milieu Clark et Lubs.

Ce milieu permet de distinguer les entrobactéries qui ont une fermentation butandiolique de celles qui ont simplement une fermentation acide mixte.

A. Réaction de rouge de méthyle (RM).**a. principe.**

Cette réaction permet de différencier les entérobactéries productrices d'acides et celles qui sont faiblement productrices. On obtient à partir de l'acide pyruvique des acides organiques à courtes chaînes.



Lorsqu'ils sont produits, ces acides organiques maintiennent le pH de la culture à un degré suffisamment bas pour que le rouge de méthyle garde sa coloration rouge ($\text{pH} < 5$).

b. Technique.

On préleve 1ml d'une culture âgée de 24 heures en milieu Clark et lubs, puis on ajoute quelques gouttes de rouge de méthyle.

c. Lecture.

- Réaction RM (+) : coloration rouge.
- Réaction RM (-) : coloration jaune.

B. Réaction de voges- Proskauer (VP).**a. Principe.**

L'acide pyruvique est décarboxylé en acétoïne ou acétyl-méthyl-carbinol par la voie de fermentation butandiolique



Cette dernière forme un complexe coloré en rose ou rouge avec les composés guanidine du peptone. La réaction est plus rapide en présence de α naphthol.

b. Technique.

On prélève 1ml de la culture en milieu Clark et lubs agée de 24 heures puis on ajoute 0.5ml de réactif α naphtol et 0.5 ml de NaOH à 16%. On agite et on laisse agir 10 à 15 minutes.

c. Lecture.

- Réaction VP (+): coloration rouge ou rose.
- Réaction VP (-): aucun changement de couleur

2-2-2. Etude du métabolisme d'un acide organique.**2-2-2-1. Utilisation de citrate de Simmons.****a. Principe.**

Les bactéries possédant une citrate-perméase, utilisent le citrate comme seule source de carbone dans le milieu, l'utilisation de cette substance engendre la libération des ions d'ammonium (NH_4) qui seront ensuite converties en (NH_3) puis en (NH_4OH), cela entraîne l'alcalinisation du milieu de culture qui est révélée par le virage de l'indicateur coloré (bleu de bromothymol).

b. Technique.

Ensemencer le milieu de Simmons aux citrates en surface par des stries, puis on incube à 37°C pendant 24 heures.

c. Lecture.

L'utilisation du citrate se traduit par un développement bactérien accompagné d'un virage de la couleur du milieu de vert au bleu.

2-3. Etude du métabolisme protéique.**2-2-3-1. Recherche de l'urease.**

Les micro-organismes utilisant l'urée comme seule source d'azote, possèdent une urease très active. Ils transforment l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium. Cette réaction se traduit par une alcalinisation du milieu. Les autres germes ne font qu'hydrolyser l'urée et doivent disposer d'un composé stimulant comme le glucose.

b. Technique.

A partir d'une culture pure, on ensemence par anse de platine le milieu urée- indole et on incube a 37°C pendant 24 heures.

c. Lecture.

La dégradation de l'urée se traduit par le virage de l'indicateur au rouge.

Dans un premier temps les bactéries fermentent le glucose et les milieux s'acidifient (virage au jaune) ; à pH acide, les décarboxylases présentent une activité maximale. Dans un second temps, lorsque les bactéries possèdent ces enzymes, les métabolites aminés formés à partir des amino-acides alcalinisent les milieux et font virer l'indicateur de pH.

b. Technique.

Ensemencer 1ml des milieux Moeller additionné de l'argénine, de la lysine ou de l'ornithine par une culture sur milieu gélosé.

Recouvrir par l'huile de parafine.

Porter à l'étuve à 37°C pendant 24 heures

c. Lecture.

L'apparition d'une couleur violette : LDC (+), ODC (+) ou ADH (+).



II. Matériel et Méthodes de détermination de la CMI.

1. Matériel.

1-1. Origine des HE.

Les différents types d'HE utilisés ont été préparés par hydrodistillation au niveau de l'Université de Tlemcen à partir de la plante de *T. vulgaris* (feuilles et tiges).

Les plantes ont pour origine la région de Bechar et elles étaient récoltées en fin de printemps de cinq régions différentes.

1-2. Milieux de cultures.

Les milieux de cultures utilisés sont l'eau physiologique et la gélose Muller-Hinton (voir annexe).

2. Technique de diffusion sur gélose.

2-1. Préparation du milieu de culture.

On coule la gélose mueller-Hinton dans des boîtes de pétri et on laisse refroidir. Avant l'utilisation des géloses, on doit les sécher 15 minutes à 37°C.

2-2. Préparation de l'inoculum.

A partir de la souche pure d'*E. coli*, on dilue à l'aide de l'anse de platine, dans 10 ml de l'eau physiologique stérile à 0.9% et on homogénéise la suspension bactérienne.

L'opacité de la suspension doit être équivalente à 0.5 MC Farland ou à une D.O de 0.8 à 0.10 à 625 nm. Cela est fait par une comparaison avec un témoin.

***RESULTATS
ET
DISCUSSION***

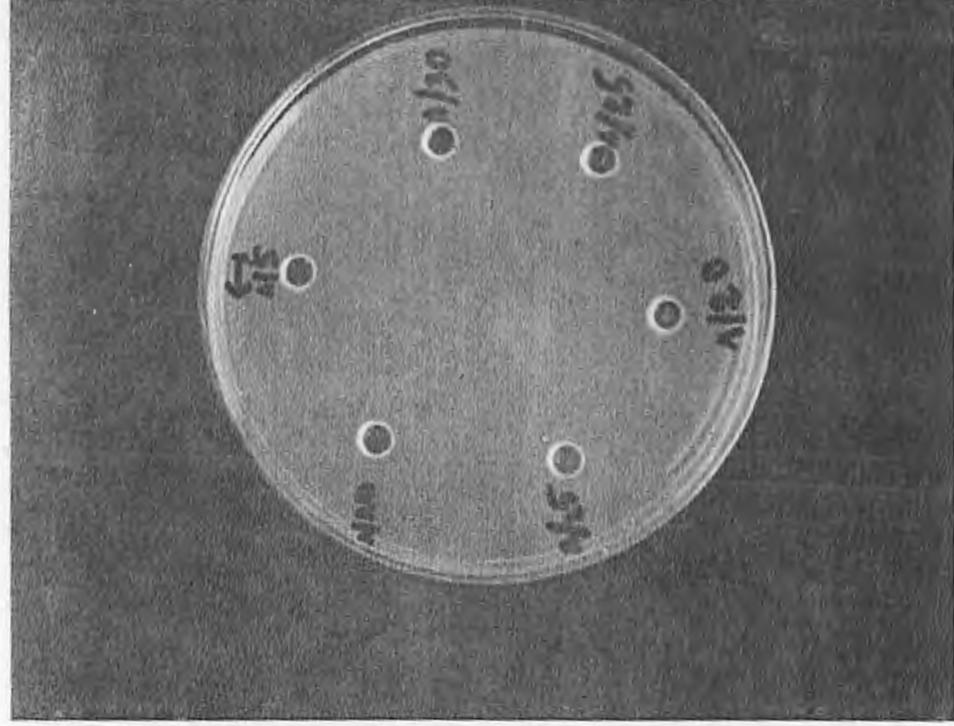


Fig.5: Confection des puits.

I. Résultats de l'étude bactériologique.

1. Purification.

Toutes les colonies purifiées sur la gélose HeKtoen sont lactose positif et H₂S négatif avec des tailles et des aspects plus ou moins variables (Fig.3 et Tbl.3).

2. Identification.

2-1. Etude morphologique.

Les 10 souches étudiées sont des bacilles ou coccobacilles Gram négatif.

2-2. Tests biochimiques.

Les souches ont généralement le même profil métabolique. Certaines d'entre elles présentent quelques tendances métaboliques variables (fig.5 et Tbl.4).

Cette variation pourrait être expliquée par l'induction de la synthèse de certaines enzymes métaboliques [10].

Conclusion partielle.

Les résultats obtenus montrent que les 10 souches identifiées appartiennent à l'espèce *E.coli*. Les variations entre les souches sont probablement dues à l'existence de nombreux chimotypes [12].

Tbl.3 : Aspect des colonies purifiées sur gélose HeKtoen.

Souches	Gram	Lactose	H ₂ S	Taille et aspect des colonies
E1	-	+	-	Moyenne, lisse, brillante
E2	-	+	-	Moyenne, rugueuse, mat
E3	-	+	-	Moyenne, rugueuse, mat
E4	-	+	-	Moyenne, rugueuse, mat
E5	-	+	-	Petite, lisse, brillante
E6	-	+	-	Petite, lisse, brillante
E7	-	+	-	Moyenne, rugueuse, mat
E8	-	+	-	Petite, lisse, brillante
E9	-	+	-	Moyenne, rugueuse, mat
E10	-	+	-	Moyenne, rugueuse, mat



Fig.4: Aspect des colonies sur gélose Hektoen.

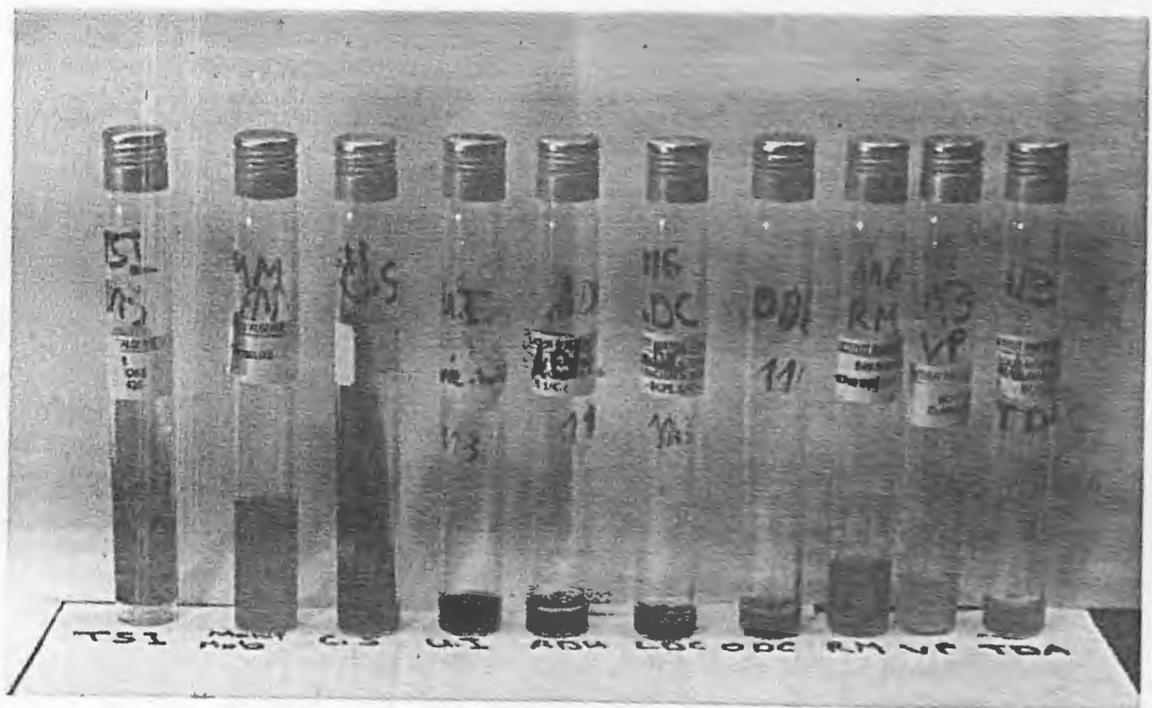


Fig.5: Résultats des tests biochimiques.

Tbl.4 : Les caractères biochimiques des souches étudiées.-

Souches	Tests	Manitol-mobilité		TSI			Urée- indole		Cit.	Clark et Lubs		LDC	ODC	ADH	TDA
		Man	Mob.	Lac.	H ₂ S	GAZ	Urée	Ind.		RM	VP				
E1		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	±	-	-
E2		+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-
E3		+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
E4		+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-
E5		+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
E6		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	±	-	-
E7		+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
E8		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	±	-
E9		+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	±	-	-
E10		+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-

+ : test positif

- : test négatif

II. Résultats de la détermination de la CMI.

Le test de diffusion sur gélose révèle qu'il y a une inhibition de la multiplication bactérienne pour les 10 souches de *E.Coli* vis à vis les 5 types d'HE utilisés (fig. 6), alors que les témoins de l'huile de vaseline ne présentent pas une inhibition bactérienne (fig. 7).

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux : 6 , 7, 8, 9, 10.

Le diamètre de la zone d'inhibition est inversement proportionnel par rapport à la dilution de l'HE.

Les résultats de la détermination de la CMI a montré qu'elle se situe généralement entre les dilutions 1/15 et 1/30 (Tab.5, fig. 8 et fig.9).

Tbl. 5 : les pourcentages de CMI selon les dilutions.

Dilutions Type HE	Pourcentage (%) de la CMI						
	1/5	1/10	1/15	1/20	1/25	1/30	>1/30
HE1	0	10	20	0	70	0	0
HE2	0	0	10	20	60	10	0
HE3	0	20	20	30	20	10	0
HE4	0	0	0	20	10	60	10
HE5	0	0	0	20	20	50	10

Remarque: nous avons considéré par convention le diamètre de la zone d'inhibition de 12mm comme un seuil de la CMI.

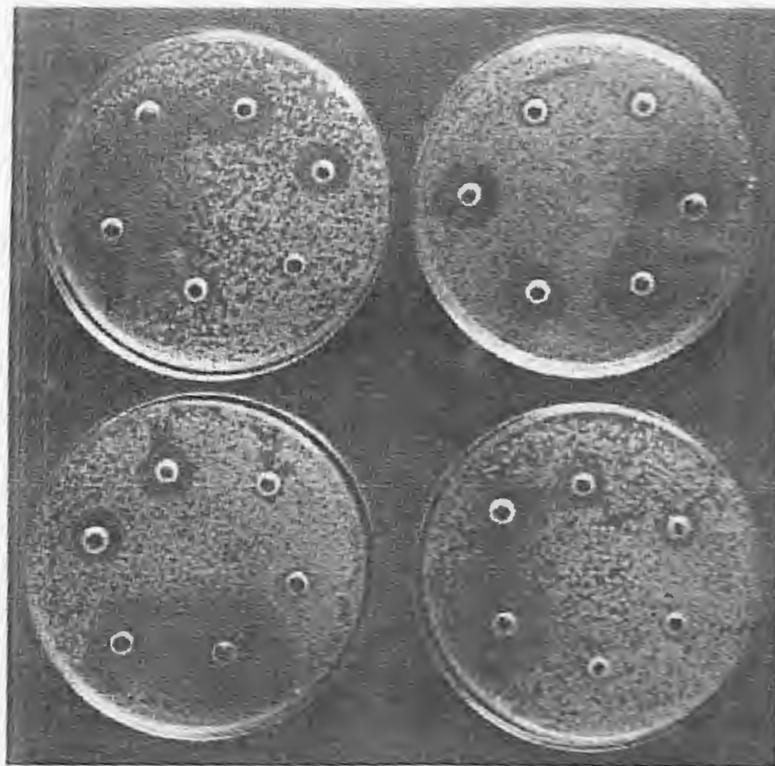


Fig. 6: Les zones d'inhibition de *E.coli* par les HE de *T.vulgaris*.



Fig.7 : Le témoin de l'huile de Vaseline.

III. Résultats de l'analyse statistique.

1. L'effet doses.

L'analyse de la variance entre les zones d'inhibition retrouvées pour les différentes doses de chaque HE a montré une variabilité hautement significative (à 1%) (Tbl.11 et fig.10).

Ce résultat pourrait être expliqué par la dépendance de l'inhibition bactérienne de la dilution utilisée [20].

2. L'effet HE.

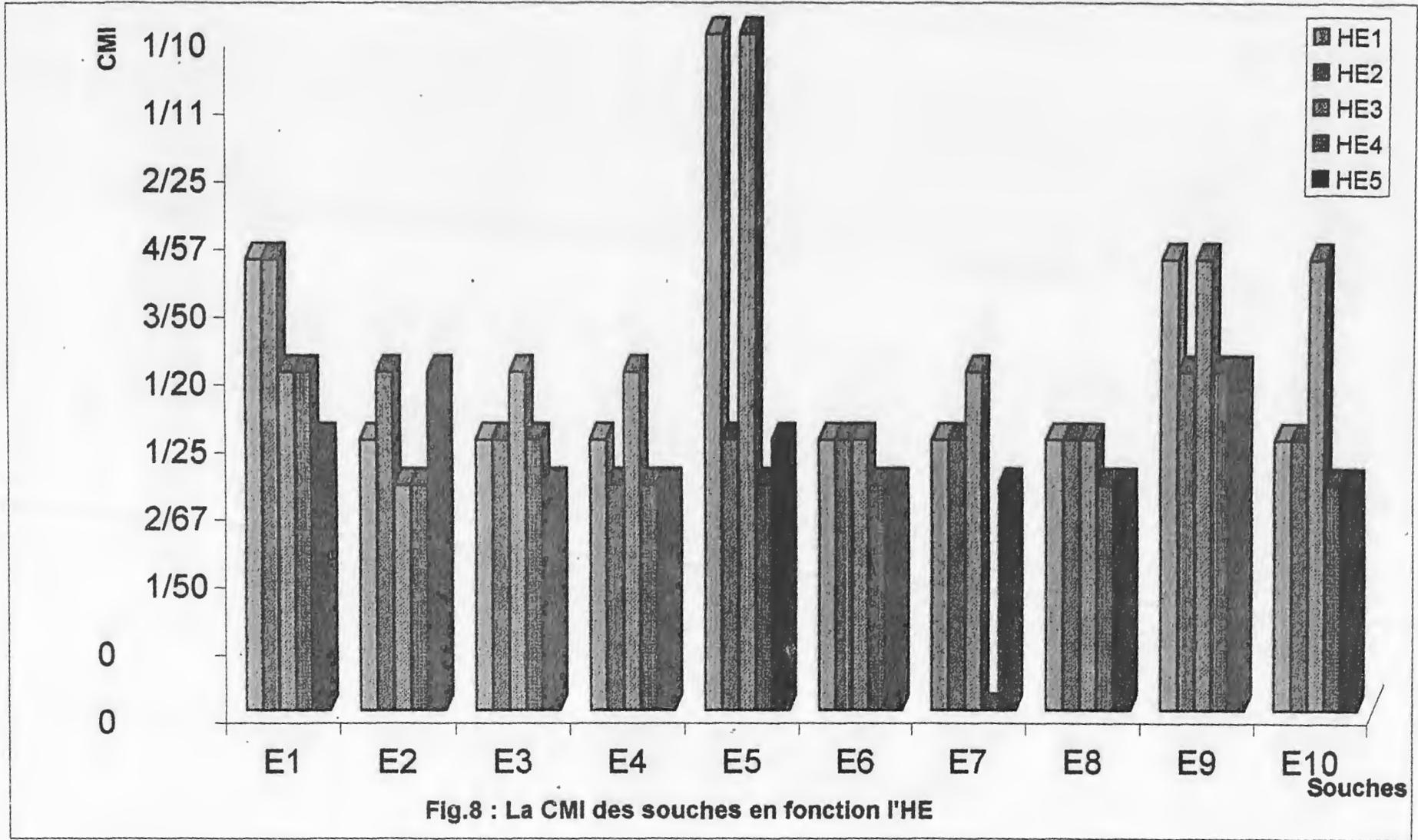
L'analyse de la variance entre les zones d'inhibition obtenues pour les 5 types d'HE a montré une différence hautement significative (à 1%) (Tbl. 11 et fig.11) Ce qui pourrait être expliquée par la variabilité de la composition chimique des HE en principes actifs [26] et qui dépend elle-même de l'état physiologique et le cycle végétatif des plantes de *T.vulgaris* mais aussi des facteurs de l'environnement et enfin la méthode d'obtention de ces HE. En effet les travaux de **Hudaib M. et al (2002)** ont montré par l'analyse de la composition de l'HE de *T.vulgaris* qu'elle varie selon la période de la récolte et l'âge des plantes [17].

De son côté **Owen S. M. et al (2002)** ont montré que la composition des plantes de *T.vulgaris* en composés organiques volatils varie selon la température et la lumière [25].

De plus l'influence de la méthode d'obtention sur la composition de ces HE est affirmé par **Derrick A. et al (1999)** et **Sàez F. (1995)** [4,30].

3. L'effet souches.

Le résultat de l'analyse de la variance entre les valeurs des zones d'inhibition pour les différentes souches de *E.coli* a montré une différence hautement significative (à 1%) (Tbl.11 et fig.10). Cela pourrait être expliqué par la différence de la sensibilité de 10 souches envers les HE utilisées. Le résultat rapporté par **Sagdiç O. (2003)** révèle que l'activité antibactérienne d'un même HE de *T.vulgaris* sur *E.coli* ATCC 25922 et *E.coli* 0157:H7 ATCC33150 diffère selon la sensibilité de ces souches et la CMI obtenue par la méthode de diffusion sur gélose varie entre les dilutions 1/4 et 1/10 [31].



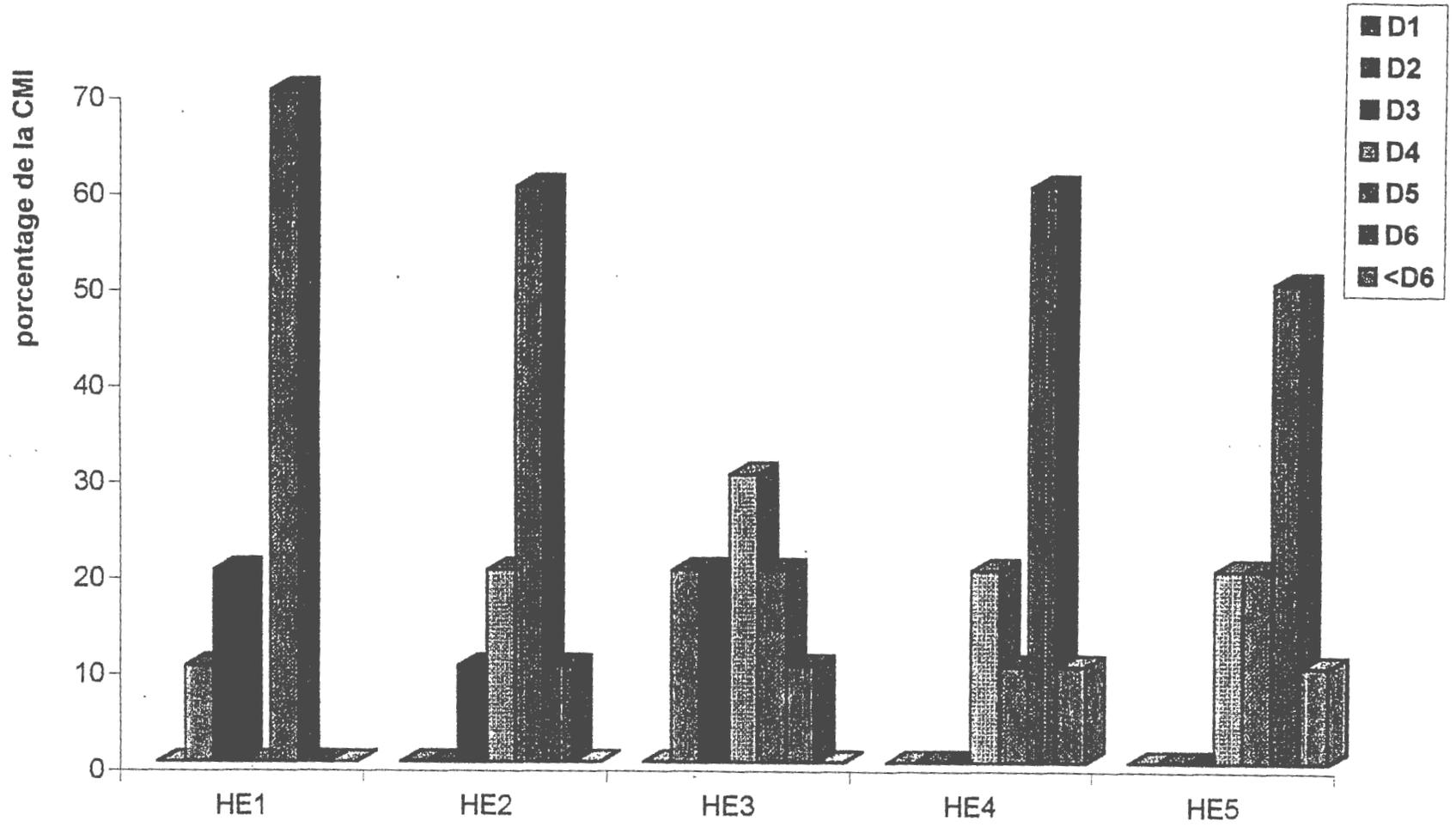


Fig.9 :Pourcentage de la CMI en fonction de l'HE et la souche.

huiles essentielles

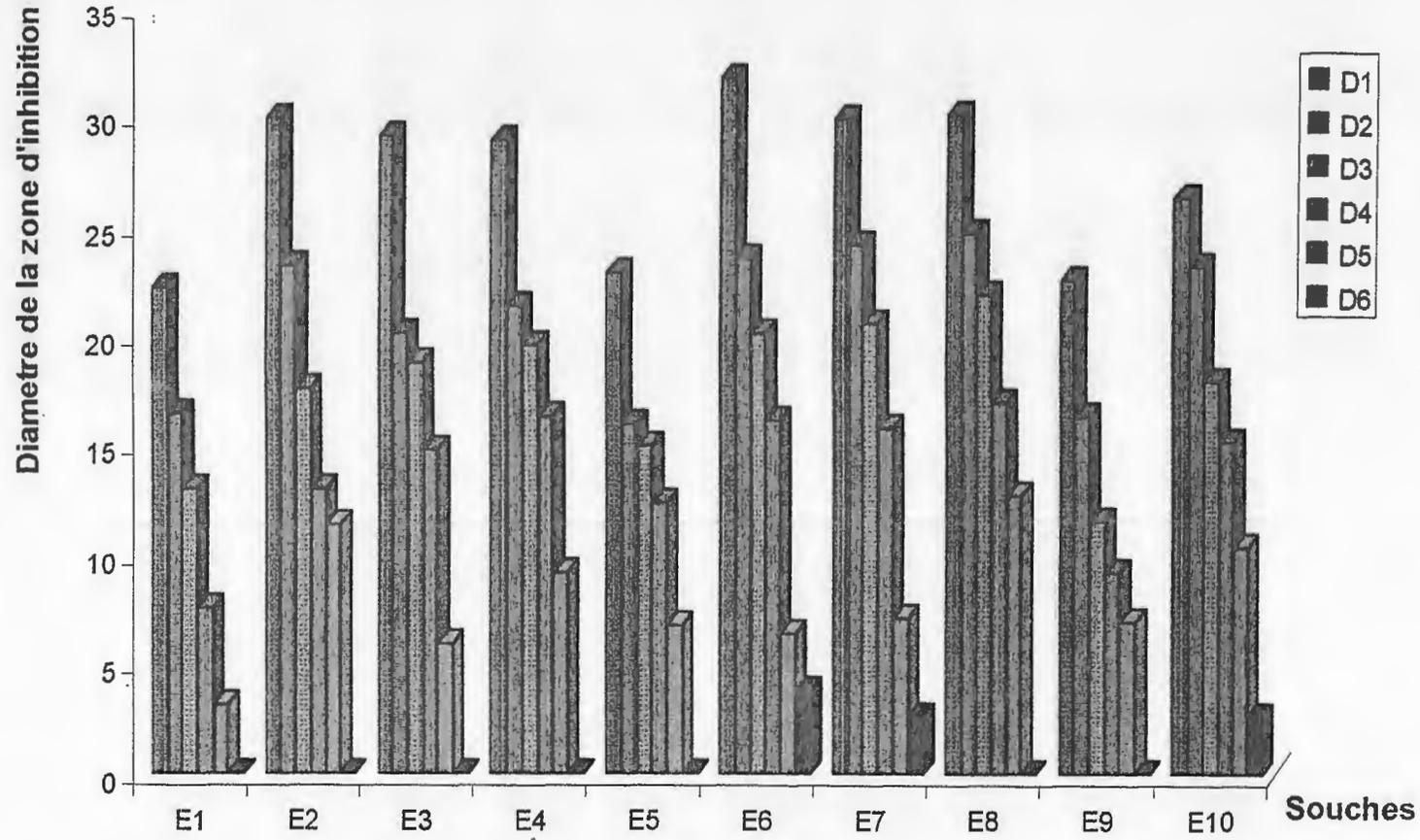


Fig.10 : Diamètres des zones d'inhibition en fonction de la dilution et la souche.

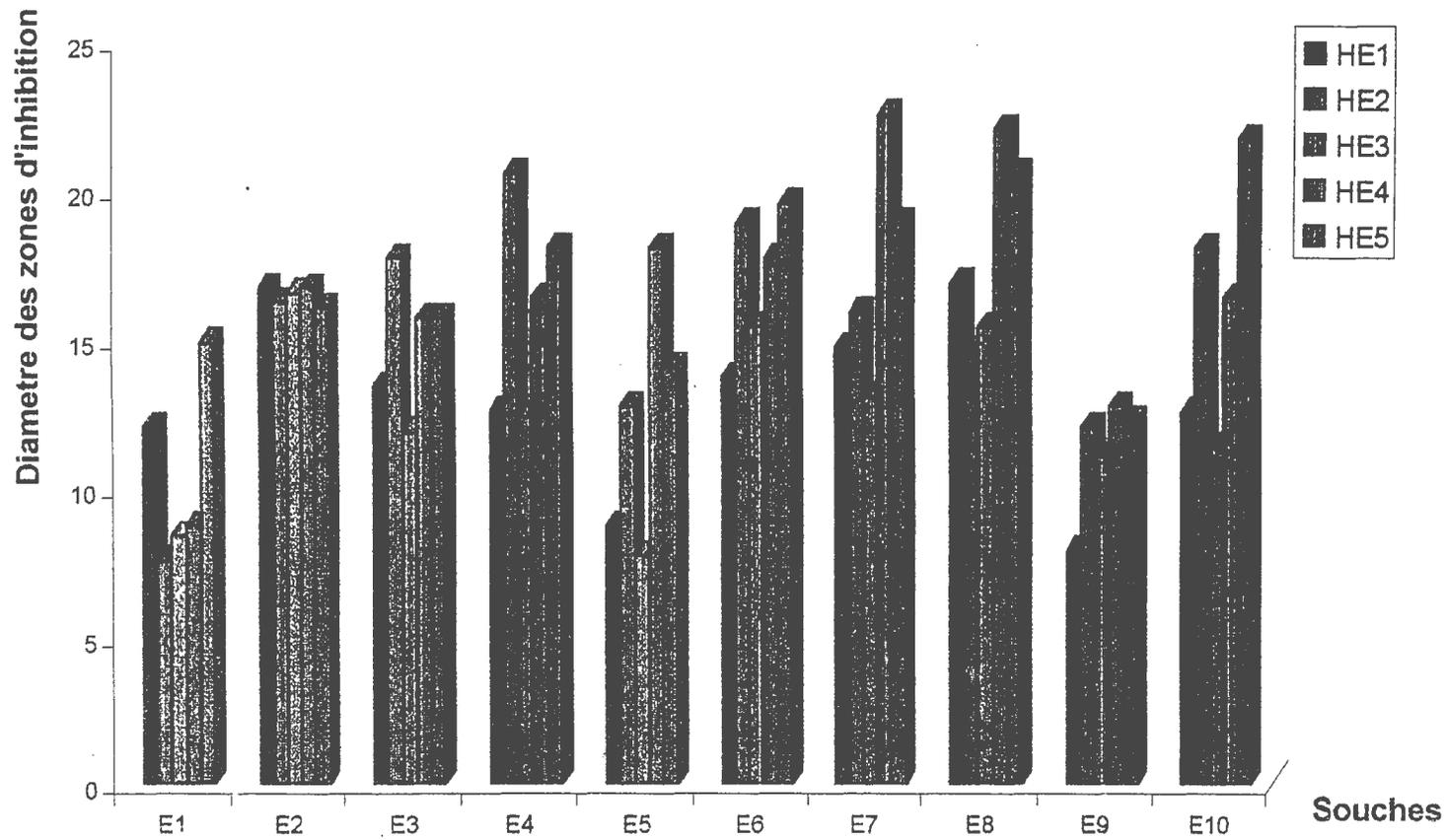


Fig.11 : Moyenne des diametres des zones d'inhibition en fonction de la souche et l'HE

Tbl.6 : diamètre des zones d'inhibition pour l'HE 1.

D souches	1/5	1/10	1/15	1/20	1/25	1/30
E1	28	20	10	8	6	0
E2	34	28	15	12	11	0
E3	28	17	20	15	0	0
E4	30	18	15	12	0	0
E5	22	11	10	9	0	0
E6	30	21	16	15	0	0
E7	30	20	16	15	0	0
E8	30	25	20	15	11	0
E9	20	12	10	5	0	0
E10	25	17	14	13	6	0

Tbl.7 : diamètre des zones d'inhibition pour l'HE 2.

D souches	1/5	1/10	1/15	1/20	1/25	1/30
E1	16	13	10	6	0	0
E2	26	21	15	10	9	0
E3	32	24	21	19	10	0
E4	32	30	28	21	12	0
E5	22	17	15	12	10	0
E6	33	30	25	17	8	0
E7	30	28	23	14	0	0
E8	25	20	17	15	9	0
E9	24	18	12	10	8	0
E10	32	30	21	16	9	0

Tbl.9 : diamètre des zones d'inhibition pour l'HE 3.

D souches	1/5	1/10	1/15	1/20	1/25	1/30
E1	23	15	14	0	0	0
E2	30	22	19	15	14	0
E3	30	25	23	16	0	0
E4	28	20	19	18	13	0
E5	28	25	22	18	15	0
E6	31	20	18	16	12	9
E7	32	30	25	20	15	13
E8	32	30	28	22	20	0
E9	23	19	13	11	10	0
E10	25	23	19	16	15	0

Tbl.10 : diamètre des zones d'inhibition pour l'HE 4.

D souches	1/5	1/10	1/15	1/20	1/25	1/30
E1	25	20	19	15	10	0
E2	30	25	20	11	10	0
E3	30	20	17	15	12	0
E4	30	24	22	20	12	0
E5	23	19	18	15	9	0
E6	27	25	22	21	12	10
E7	30	28	23	20	12	0
E8	32	30	28	20	13	0
E9	25	15	12	11	10	0
E10	29	27	25	22	14	13

Tbl.10 : diamètre des zones d'inhibition pour l'HE 5.

D souches	1/5	1/10	1/15	1/20	1/25	1/30
E1	25	20	19	15	10	0
E2	30	25	20	11	10	0
E3	30	20	17	15	12	0
E4	30	24	22	20	12	0
E5	23	19	18	15	9	0
E6	27	25	22	21	12	10
E7	30	28	23	20	12	0
E8	32	30	28	20	13	0
E9	25	15	12	11	10	0
E10	29	27	25	22	14	13

Tbl.11 : Résultats de l'analyse de variance.

Facteurs	Type de L'IE	CM	Facteur observé
Facteur doses (+)	1	1005,54	123,22
	2	1020,69	99,28
	3	787,22	80,9
	4	844,31	69,20
	5	846,45	112,20
Facteur souches (+)	1	52,17	6,39
	2	90,04	8,75
	3	51,04	5,24
	4	97,64	8
	5	56,22	7,49
Facteur IE (+)		48,09	8,82

(+) : Effet hautement significatif (à 1 %)

discussion générale

Discussion générale.

Dans le souci d'une contribution à l'estimation des effets antibactériens de 5 types d'HE obtenus par hydrodistillation à partir des plantes de *T. vulgaris* récoltées à la fin du printemps au niveau de différentes régions de la Wilaya Bechar, nous avons procédé dans une première étape à la purification et l'identification de 10 souches de *E.coli*, les résultats obtenus ont montré l'existence de différents chimiotypes bactériens de l'espèce *E. coli* [12]

Dans une deuxième étape, nous avons fait la détermination de la sensibilité de 10 souches bactériennes de *E.coli* aux HE par la méthode de diffusion sur gélose [8].

La CMI se situe généralement à la dilution 1/25 et reste inférieure à celle rapportée par Sagdiç O. (2003), (1/4 à 1/10).

Les valeurs retrouvées pour la CMI varient d'un type d'HE à un autre. Ces résultats sont en relation avec les travaux de Essawi T. et Srour M. (2000) [13].

L'étude statistique par l'analyse de la variance, selon la méthode de Fisher (voire annexe), entre les valeurs des zones d'inhibition montre qu'il y a une différence significative (à 1%) pour les facteurs dosés, HE et souches. Cela pourrait être expliqué par une activité antibactérienne variable selon le type d'HE considéré [17] et selon les souches de *E.coli* retrouvées. Ce travail et en rapport avec ceux de Sagdiç O. (2003) [31].

Dans le but d'approfondir nos connaissances sur les possibilités de la valorisation de ces résultats, la détermination de la composition chimique des HE et la possibilité de leur incorporation dans les produits alimentaires comme conservateurs et anti-oxydant sont envisageables.

Conclusion
Générale

Conclusion générale:

Les HE de *T.vulgaris* sont connues depuis la nuit des temps pour leurs propriétés thérapeutiques notamment leur pouvoir antiseptique. L'effet antibactérien a été déjà rapporté par un bon nombre d'auteurs. [13]. Les germes testés ne développent généralement aucune résistance, ce qui peut résoudre le problème de la multirésistance e germe aux antibiotiques. [28]

Notre travail à pour but la détermination de la CMI de 5 types d'HE de *T.vulgaris* pour 10 souches différentes *E.coli* par la méthode de diffusion sur gélose.

Ces dernières ont manifesté une sensibilité variable selon les souches bactériennes et les HE, en effet la CMI se situe entre les dilutions 1/15 et 1/30.

Dans le but de valoriser nos résultats et d'approfondir nos connaissances sur les effet pharmacologiques et toxicologiques, d'autres travaux pourrait être effectués pour la détermination de la CMB ou la composition de ces HE, voire même leur incorporation dans les produits alimentaires autant que conservateurs, antioxydants et même dans des préparations officinales.

ANNEXES

ANNEXE1

Milieux de cultures

Eau physiologique

Chlorure de sodium	8.5g
Eau distillée	1000ml

Gélose Hektoen

Protéose-peptone	12g
Extrait de levure	3g
Chlorure de sodium	5g
Thiosulfate de sodium	5g
Sels biliaires	9g
Citrate de fer ammoniacal	1.5g
Salicine	2g
Lactose	12g
Saccharose	12g
Fuschine acide	0.1g
Bleu de bromothymol	65g
Gélose	13mg

pH7.5

Gélose T.S.I

Peptone	20g
Extrait de viande	3g
Extrait de levure	3g
Chlorure de sodium	5g
Glucose	1g
Lactose	10g
Saccharose	10g
Citrate de fer	0.5g
Hyposulfite de sodium	0.5g
Rouge de phénol	0.025g
Gélose	12g

pH 7.6

Milieu au citrate Simmons

Sulfate de magnésium	0.2g
Phosphate monoammonique	1g
Phosphate bipotassique	1g
Citrate de sodium	5g
Bleu de bromothymol	0.08g
Gélose	15g
Eau distillée	1000ml

pH 7-7.2

Milieu Clark et Lubs

Peptone tryptique de caséine	5g
Phosphate bipotassique	5g
Glucose	5g
Eau distillée	1000ml

pH 7

Milieu manitol-mobilité

Peptone pancréatique de viande	20g
Agar-agar	4g
Manitol	2g
Nitrate de potassium	1g
Rouge de phénol en solution à 1%	4ml
Eau distillée	1000ml

pH 8.1

Milieu de Moeller

Milieu de base : milieu témoin

NaCl	5g
Extrait de levure	3g
Glucose	1g
Bromocrésol pourpre en solution à 1%	1.5ml
Eau distillée	1000ml

pH 6.3

Milieu Mueller-Hinton

Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysate de caséine	17.5g
Amidon	1.5g
Gélose	10g

pH7.4

Milieu urée-indole

L Tryptophane	3g
Phosphate monopotassique	1g
Phosphate dipotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Urée	20g
Alcool à 95°	10ml
Solution de rouge de phénol à 1%	2.5ml
Eau distillée	1000ml

pH 6.7

Réactifs, solutions et colorants**Fuchsine de Ziehl**

Fuchsine basique	1g
Alcool éthylique à 90%	10ml
Phénol	5g
Eau distillée	100ml

Réactif de Kovacs

Alcool amylique ou isoamylique	150ml
P. diméthylaminobenzaldéhyde	10g
Acide chlorhydrique concentré	50g

Lugol

Iode	1g
Iodure de potassium	2g
Eau distillée	300ml

α naphitol

α naphitol	6g
Alcool éthylique à 60%	100ml

Réactif au rouge de méthyle

Rouge de méthyle	0.5g
Alcool éthylique à 60%	100ml

Violet de gentiane

Violet de gentiane	1g
Ethanol à 90%	10ml
Phénol	2g
Eau distillée	100ml

ANNEXE 2

Dispositif mono-factoriel en bloc de l'analyse de l'analyse de la variance selon la méthode de FISHER

$$tCG = \frac{\left(\sum_1^{t.b} x\right)^2}{t.b} \quad SCE_T = \sum^{t.b} x^2 - tCG$$

$$SCE = \frac{\sum_1^t \left(\sum_1^b x_t\right)^2}{b} - tCG$$

$$SCE = \frac{\sum_1^b \left(\sum_1^t x_p\right)^2}{b} - tCG$$

$$SCE_r = SCE_T - (SCE_{f.E} + SCE_{f.C})$$

Analyse de la variance

$\sum CE$	SCE	ddl	CM	F_{abs}
ToT		$(t.b) - 1$		
$f.E$		$t - 1$	$\frac{SCE_{f.E}}{t - 1}$	$\frac{CM_{f.E}}{CM_r} = a$
$f.C$		$b - 1$	$\frac{SCE_{f.C}}{b - 1}$	$\frac{CM_{f.C}}{CM_r} = b$
r		$(t - 1)(b - 1)$	$\frac{SCE_r}{(t - 1)(b - 1)}$	

t : Nombre de traits

b : Nombre de blocs

tCG : Taux globale

SCE : La somme des carrés des écarts

$f.E$: Facteurs étudiés

$f.C$: Facteurs contrôlés

r : Écart résiduelle

SCE_r : La somme des carrés des écarts résiduelle

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- [1] **Acar J., Armengand M., Lartholary O.**, Maladies infectieuses. VIGOT, 1995, P: 537-539.
- [2] **Avril J. L., Dabernat H., Denis F., Monteil H.**, Bactériologie clinique. 2^{ème} ed. Ellipses Paris, 1992, P:149-158.
- [3] **Avril J. L.**, Dictionnaire pratique de bactériologie clinique. Ellipses Paris, 1991, P: 42-45.
- [4] **Balladin D. A., Headley O.**, Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris* Linné) herbs, Renewable energy, Vol. 17, Issue 4, 1999, P: 523-531.
- [5] **Benabbes, Yahiaoui, Boullalouab**, Rapport sur l'avancement du programme U.I.C.N.: Plantes médicinales, U.C.D. de Batna, 1999.
- [6] **Berche P., Gaillard J. L., Simonet M.**, Bactériologie. Flammarion et C^{ie} Paris, 1981, P: 100-110, 593-600.
- [7] **Bruneton J.**, Pharmacognosie "phytochimie plantes médicinales". 2^{ème} ed. Tech. Et doc. Lavoisier, 1993, PP: 893.
- [8] **Carbonelle B., Denis F., Marmonier A., Penon G., Vargues R.**, Bactériologie médicale "Techniques usuelles". SIMAP S. A. Paris, 1988, P:121-125, 237-239, 249-250.
- [9] **Djazzar S., Kious T.**, Effet d'extraits d'huiles essentielles d'alliums alimentaires (oignon: *Allium cepa* L et ail: *Allium sativum* L) sur les micro-organismes. Cas des bactéries (*S. aureus*, *S. enteridis*) et les moisissures (*A. niger*, *P. oxysporium*); Mémoire de fin d'étude d'ingénieur d'état en génie biologie. Université de Mostaganem, 2001, P: 15-25.
- [10] **Djelouat S.**, Le diagnostic biochimique bactérien. Sciences et technique. Constantine.
- [11] **Dorman H.J.D., Peltoketo A; Hiltunen R; Tikkanen M. J.** Caractérisation of the antioxidant proprieties of de-odourised aqueous extracts from selected *Lamiaceae* herbs, food chemist, Available Online, 2003.
- [12] **Dissi M., Chikhi A.**, Chimiotypes des colibacilles d'une ferme d'élevage de Tlemcen, Recherche agronomique INAA, 2000, P: 1-6.
- [13] **Esawi T., Srour M.**, Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity, Journal of Ethnopharmacology, vol.70, issue 3,2000, P:343-349.
- [14] **Eyquem A., Alouf J., Montanier L., et al**, Traité de microbiologie clinique. PICCIN NUOVA Libreria S.P.A. Padoue, Italie, 1998, P: 369- 375, 388, 391.
- [15] **Gilly G.**, Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse. L'Harmatton, Paris, 1997, P : 20- 30.
- [16] **Gueguen J.**, Volarisation non-alimentaire du grandes productions agricoles. INR Nante, 1994, P: 44- 46.

- [17] **Hudail M., Speroni E., Pietra A. M. D., Cavrini.,** GC/MS Evaluation of thyme (*Thymus vulgaris L.*) oil composition and variations during the vegetative cycle, Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis, Vol.29 , Issue 4 , 2002, P: 691- 700.
- [18] **Isman M.B., Wan A.J. , Passreiter C.M. ,** Isecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* , Fitoterapia, Vol.72, Issus 1, 2001, P: 65- 68.
- [19] **Joffin C., Joffin J.N.,** Microbiologie alimentaire. 5^{ème} ed. CRDP d'Aquitaine Bordeaux, 1993, P: 34, 61.
- [20] **Lall N., Meyer J.-J. M. ,** invitro inhibition of drug- resistant and drug- sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected south African plants, Journal of Ethnopharmacology, Vol. 66, Issue 3, 1999, P: 347 – 354.
- [21] **Larpent J.P., Larpent-Gourgand M.,** Elements demicrobiologie. Hermann France, 1985, P: 199- 207.
- [22] **Larpent J.P., Larpent- Gourgand M.,** Mementotechnique de microbiologie. 3^{ème} ed. Tec.et doc. Lavoisier, 1997, P: 340-345, 350-353.
- [23] **Luttge U., Kluge G., Baner G.,** Botanique, 2^{ème} ed. Tec. et doc. Lavoisier, 1996, P: 207- 220.
- [24] **Neidhardt F. C., Ingraham J. L., Schaechter M.,** Physiologie de la cellule bacterienne " une approche moléculaire ". Masson Paris, 1994, P: 430- 431.
- [25] **Owen S.M., Harley P., Couenther A., Hewitt C.N.,** Light dependency of VOC emissions from selected Mediterranean plants species, Atmospherie Environment, Vol-36, Issue 19, 2002, P: 3147- 3159.
- [26] **Panizzi L., Flamini G., Cioni P. L., Morelli I.,** Composition and antimicrobial propriété of essential oils of flour mediterranean *Lamiaceae*, Journal of Ethnopharmacology, Vol. 39, Issue 3, 1993, P: 167- 170.
- [27] **Quevanvilliers J., Fingerhat A.,** Dictionnaire médicale 3ème ed. Masson Paris, 2001, P:333- 351.
- [28] **Rahl K., Tali-Maamar H. -, Boudouane M.,** Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 3^{ème} rapport d'évaluation, 2001, P: 123.
- [29] **Richter G.,** Metabolisme des végétaux " physiologie et biochimie" Presses polytech. et universitaire romande CH- 1015 lausans, 1993, P: 287- 544.
- [30] **Sàez F.,** Essential oil variability of *Thymus hyemalis* growing wild in south eastern spain, Biochemical systématique and ecology, Vol 23, Issue 4, 1995, P: 431-438.
- [31] **Sagdiç O.,** Sensitivity of four pathgènic ba téria to Turkish thyme and oregano hydrosols; lebensmittel wissenschaft und-technologie, Available Online, 2003.



- [32] **Sélection de Reader's digest** (Paris, Bruxelles, Zurich), Les plantes médicinales encyclopédie pratique, New interlitho Milan, 1995,P: 104.
- [33] **Singleton P.**, Bactériologie, 2^{ème} cycle. 4^{ème} ed. Dunod Paris, 1999, P: 239-241, 257-262, 386-387.
- [34] **Stutra L., Federighi M.; Jauve J. L.**; Manuel de bactériologie alimentaire. Polytechnica paris, 1998, P: 80-93.
- [35] **Wichl M., Anton R.**, Plantes thérapeutiques "tradition, pratique officinale, science et thérapeutique" 3^{ème} éd. Tech. et doc. Lavoisier, 1993, P: 554-557; XXII-LIV.
- [36] **Youdim K. A., Deans S. G.**, Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxydant status in liver, kidney and heart tissues, mechanisms of ageing an development, Vol. 109, Issues 3, 1999, P: 163-175.

Sites d'Internet

- [37] Anonyme (2003) **Belaiche P.**, Huiles végétales: EMPIRE D'ESSENCE.
www.biogassendi.com
- [38] Anonyme (2002): *E.coli* associée aux colibacillooses animales.
www.mesdvet.umeontreal.ca/ecoli.html
- [39] Anonyme (2000): **Peiffer B.**, Gastro-entérites dus à *E.coli*.
www.Chez.com/guatemalt/Esche.html
- [40] Anonyme (2003): **Pelletier M.-L.**, Aromathérapie: L'essentiel des plantes.
www.Lenaturel.ca/fi/

Présenté par : BOUTOBZA Badaoui
AZZOUZ Wassila

Date de soutenance : 30/06/2003

Titre : Effet de cinq types des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* sur dix souches de *Escherichia coli* avec la détermination de la CMI.

Résumé:

T. vulgaris est une plante connue pour sa richesse en HE [35]. Son utilisation en aromathérapie a été démontré et rapporté pour plusieurs auteurs [7, 39].

Dans le but de contribuer à l'étude de l'activité de 5 types d'HE de *T. vulgaris* sur 10 souches de *E. coli* ; identifiées.

Nous avons procédé à la détermination de la CMI par la méthode de diffusion sur gélose[8].

L'identification a montré que les 10 souches de *E. coli* appartiennent à des différents chimiotypes.[12] Ces souches répondent avec une sensibilité variable envers le HE.

La CMI se situe généralement entre les dilutions 1/15 et 1/30 avec certaines exceptions (1/10 et >1/30) et elle varie selon le type d'HE et la souche considérées.

Summary

T. vulgaris is a plant known for his wealth in essential oils [35]. Its use in Aromatherapy has been demonstrated and has been reported by several authors [7, 39].

With a in the goal to contributing to the study of the activity of 5 types of essential oils of *T. vulgaris* on 10 stumps of *E. coli*; identified.

We proceeded to the determination of the CMI by the method of diffusion on aggar. [8]

The identification has shown that the 10 stocks of *E. coli* belong to the different chimiotypes [12]. These stumps react with a variable sensitivity towards essential oils.

The CMI is generally located between dilutions 1/15 and 1/30 with certain exceptions (1/10 and > 1/30) and she varies according to the type of essential oil and the stocks considered.

ملخص

Thymus vulgaris هي نبتة معروفة بغناها بالزيوت الأساسية. استعمالها في التداوي بالزيوت

الأساسية تم اثباته من طرف العديد من الباحثين [7,39].

ومن أجل المساهمة في دراسة نشاط 5 أنواع من الزيوت الأساسية لـ *T. vulgaris* و تأثيرها على 10 سلالات بكتيرية من *E. coli*. قمنا بتحديد الـ CMI بطريقة الانتشار على الجلوز [8].

التعرف اكد بان السلالات العشرة لـ *E. coli* تنتمي الى انواع كيميائية مختلفة [12]. هذه

السلالات تستجيب بحساسية مختلفة اتجاه الزيوت الاساسية.

CMI تقع بصفة عامة بين التخفيفات 1/5 و 1/30 مع بعض الاستثناءات (1/10 و < 1/30) و

تختلف حسب نوع الزيت الاساسي و السلالة المعنية.

Mots –clés : plante de *Thymus vulgaris*- Les huiles essentielles- *Escherichia coli*-
La CMI.

Responsable de recherche :

Mr. BOUDJERDA Djamel.