

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université du 8 Mai 1945 de Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Science de la Terre et de l'Univers

Département : Ecologie et Génie de l'Environnement.



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la vie

Filière : Microbiologie-Ecologie

Spécialité/Option : Santé, Eau et Environnement.

Thème :

*L'effet antibactérien de plantes médicinales
(*Teucrium polium* et *Thymus ciliatus*) sur des
souches isolées à partir du lait de vaches
atteintes de mammites.*

Présenté par :

NABETI HESNA
CHEKKATI AMAL

Membres de jury :

Présidente :	Boukamara H.	M.A.A (Université de Guelma).
Encadreur :	Boussadia M.I.	M.A.A (Université de Guelma).
Co-encadreur :	Hamdiken M.	M.A.A (Université de Guelma).
Examinatrice :	Ibn cherif H.	M.C.B (Université de Guelma).

Juin 2013

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I-	Les mammites.....	3
	1. Définition d'une mammite.....	3
	2. Classification.....	3
	2.1. Mammites cliniques (visibles)	3
	2.2. Mammites subcliniques (invisibles).....	4
	3. Les bactéries impliquées dans les mammites	4
	4. Les sources de contamination.....	4
	5. Mode de contamination.....	5
	6. Traitement.....	6
	7. Indice des mammites sur la qualité du lait	6
	8. La qualité bactériologique du lait.....	6
	8.1. La flore microbienne du lait	7
	8.2. Les normes d'acceptation des laits.....	8
	8.3. Les sources de contamination du lait.....	9
	8.3.1. Contamination d'origine mammaire.....	9
	8.3.2. Contamination du lait à l'extérieur de la mamelle.....	10
	9. Prophylaxie.....	11
II-	Plantes médicinales et polyphénols.....	12
	1. Définition des plantes médicinales.....	12
	1.1. Importance des plantes médicinales.....	12
	1.2. Applications des plantes médicinales.....	13
	2. La phytothérapie	14
	2.1. Avantage de la phytothérapie.....	15
	3. Polyphénols.....	15
	3.1. Définition des polyphénols.....	15
	3.2. Classification.....	15

3.3. Effets biologiques des polyphénols.....	15
4. Description des plantes sélectionnées.....	16
4.1. <i>Thymus ciliatus</i>	16
4.1.1. Description du <i>Thymus ciliatus</i>	16
4.1.2. Classification taxonomique.....	17
4.1.3. Origine géographique.....	17
4.1.4. Propriétés d'utilisation traditionnelles et médicales.....	17
4.1.5. Détermination des composés.....	18
4.2. <i>Teucrium polium</i>	18
4.2.1. Description du <i>Teucrium polium</i>	18
4.2.2. Classification taxonomique.....	19
4.2.3. Origine géographique.....	19
4.2.4. Propriétés d'utilisation traditionnelles et médicales.....	19
4.2.5. Détermination des composés	19

MATERIEL ET METHODES

1. Etude phytochimique.....	20
1.1. La récolte du matériel végétal.....	20
1.2. Tests préliminaires	23
1.3. Préparation des extraits.....	24
1.4. Analyse des extraits méthanoliques	25
2. Etude biologique	28
2.1. Prélèvement des échantillons	28
2.2. Méthode d'analyse	29
2.2.1. Examen direct	29
2.2.2. Etude bactériologique.....	30
2.2.3. Identification.....	33
3. Tests d'activité antibactérienne.....	48
3.1. Préparation des extraits.....	48
3.2. Origine des souches testées.....	48
3.3. Essais antibactériens.....	49
3.3.1. Test du méthanol (MeOH)	49
3.3.2. Tests de l'activité antibactérienne des extraits	50

3.3.2.1. Méthode de diffusion à partir d'un disque solide.....	50
3.3.2.2.Méthode de l'activité antibactérienne en milieu liquide.....	50
3.3.2.3.Méthode de puits	50
3.3.3. Tests de l'activité antibactérienne sur les souches cliniques.....	51
3.4. Lecture des résultats.....	53

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats d'activité phytochimique.....	54
1.1. Tests préliminaires de la composition chimique.....	54
1.2. Extraction des polyphénols.....	55
1.3. Analyse phytochimique des extraits méthanolique.....	56
2. Résultats d'étude biologique.....	60
2.1. Examen clinique des vaches mammitesuses.....	60
2.2.Examen direct du lait prélevé	60
2.3.Résultats de l'étude bactériologique	62
2.4.Résultats de l'identification biochimique	66
3. Résultats d'activité antibactérienne	71
3.1.Test du méthanol	71
3.1.1. Test de diffusion à partir d'un disque solide	71
3.1.2. Test de l'activité antibactérienne en milieu liquide	72
3.1.3. Test d'activité antibactérienne par la méthode de puits.....	73
3.2. Test d'activité antibactérienne sur les souches cliniques.....	75

CONCLUSION

RESUMES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Liste des abréviations

ADH	l'arginine dihydrolase
AMM	Autorisation Mise sur Marché
ATB	Antibiotique
ATCC	American type culture collection
BCP	<i>pourpre de bromocrésol</i>
CCM	Chromatographie sur couche mince
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPG	chromatographie en phase gazeuse
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
E	Escherichia
g	gramme
h	Heure
H₂S	sulfure d'hydrogène
HPLC	High-performance liquid chromatography
IND	Indole
LDC	lysine décarboxylase
MH	Muller – Hinton
min	minute
ml	millilitre
mm	millimètre
nm	nanomètre
ODC	l'ornithine décarboxylase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside
pH	Potentiel hydrogène
R	coefficient de corrélation
RF	Rapport frontal
S	Staphylococcus
SCP	les staphylocoques à coagulase positive
SCN	Staphylococcus coagulase négatif
SFM	Société française de microbiologie
SM	spectrométrie de masse
sp	espèce
T	Temperature
TDA	Tryptophane désaminase
TLC	Thin layer chromatography
TSI	tri-sugar-iron
UFC	Unité Formant Colonie
µg	microgramme
µl	microlitre
mg EqAG/mg d'ext	milligramme d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait.
mg Eq Q/mg d'ext	milligramme d'équivalent quercétine par gramme d'extrait.
%	Pourcentage
°	Degré
°C	Degré Celsius

Figure	Titre	Page
Figure1	Cas d'une Inflammation de la glande mammaire	03
Figure2	Effets biologiques des polyphénols	16
Figure3	Aspect morphologique de <i>Thymus ciliatus</i>	17
Figure4	Aspect morphologique du <i>Teucrium polium</i>	19
Figure5	Carte géographique de la wilaya de Guelma montrant les sites de récolte des deux plantes.	21
Figure6	Schéma récapitulatifs du Protocole expérimental	22
Figure7	le rot à vapeur	25
Figure8	le lyophilisateur	25
Figure9	Technique de prélèvement du lait pour examen bactériologique.	29
Figure10	Protocole d'isolement et d'identification des bactéries du lait mammitieux.	32
Figure11	Galerie API20E	41
Figure12	Galerie API 20Eensemencée.	41
Figure13	L'addition des additifs.	42
Figure14	Galerie API Staph	44
Figure15	Galerie API Staphensemencée.	44
Figure16	Galerie API 20Strep	46
Figure17	Galerie API 20Strepensemencée.	47
Figure18	Application de l'extrait de <i>Teucrium polium</i> et de <i>Thymus ciliatus</i>	51
Figure19	Synergie de deux extraits de <i>Teucrium polium</i> et de <i>Thymus ciliatus</i>	52
Figure20	Réalisation de l'antibiogramme pour les différentes souches	52
Figure21	Mélange d'ATB /extraits de <i>Teucrium polium</i> et de <i>Thymus ciliatus</i>	53
Figure22	Testes préliminaires des deux plantes	55
Figure23	Chromatographie sur couche mince des deux extraits	56
Figure24	Droite d'étalonnage des polyphénols	57
Figure25	Droite d'étalonnage des flavonoides	58
Figure26	Activité antioxydante des 2 extraits/ standard.	59
Figure27	Photographie d'une mammitite clinique.	60
Figure28	Aspect macroscopique des laits mammitieux	61
Figure29	Présence des leucocytes dans le quartier malade	62
Figure30	Absence des leucocytes dans le quartier sain	62
Figure31	la galerie API 20E après l'incubation à partir de prélèvement(4).	67
Figure32	Galerie API 20 Staph après l'incubation à partir de prélèvement (3).	69

Figure33	Galerie API 20Strep après l'incubation à partir de prélèvement (1).	69
Figure34	Activité de méthanol sur les deux souches de références.	71
Figure35	antibioaromatogramme d' <i>E. coli</i> ATCC	72
Figure36	antibioaromatogramme de <i>S. aureus</i> ATCC.	72
Figure37	Résultat des dilutions en milieu liquide	72
Figure38	Antibioaromatogramme de <i>S. aureus</i> ATCC.	73
Figure39	Antibioaromatogramme d' <i>E. coli</i> ATCC.	74
Figure40	l'antibioaromatogramme de <i>Str. agalactiae</i>	75
Figure41	Présentation graphique de l'Antibioaromatogramme de <i>Str. agalactiae</i>	75
Figure42	Présentation graphique de de l'effet ATB/Extraits sur <i>S. agalactia</i>	76
Figure43	Résultat de l'effet ATB/Extraits sur <i>St. agalactiae</i> .	77
Figure44	Présentation graphique de l'Antibioaromatogramme de <i>P. mirabilis</i>	78
Figure45	l'effet antibactérien des plantes sur <i>P. mirabilis</i>	79
Figure46	Présentation graphique de l'effet ATB/Extraits sur <i>Proteus mirabilis</i>	80
Figure47	Résultat de l'effet ATB/Extraits sur <i>P. mirabilis</i>	80
Figure48	Présentation graphique des l'Antibioaromatogramme de <i>S. aureus</i>	81
Figure49	l'effet antibactérien des extraits sur <i>S. aureus</i>	82
Figure50	Présentation graphique de l'effet ATB/Extraits sur <i>S. aureus</i>	82
Figure51	Aspect cultureux de l'effet ATB/Extraits sur <i>S. aureus</i>	83
Figure52	Présentation graphique de l'Antibioaromatogramme de <i>S. saprophyticus</i>	83
Figure53	l'Antibioaromatogramme de <i>S. saprophyticus</i>	84
Figure54	Présentation graphique de l'ATB/Extraits sur <i>S. Saprophyticus</i> .	84
Figure55	Aspect cultureux de l'effet ATB/Extrairts sur <i>S. saprophyticus</i>	85
Figure56	Présentation graphique de l'Antibioaromatogramme d' <i>E. coli</i>	86
Figure57	l'Antibioaromatogramme d' <i>E. coli</i>	86
Figure58	Présentation graphique de l'effet ATB/Extraits sur <i>E. coli</i>	87
Figure59	l'effet antibactérien d'ATB/Extraits d' <i>E.coli</i>	88
Figure60	Présentation graphique de l'Antibioaromatogramme de <i>Klebsiella oxytoca</i>	89
Figure61	Aspect cultureux de l'Antibioaromatogramme de <i>K. oxytoca</i> .	90
Figure62	Présentation graphique de l'effet ATB/Extraits de <i>Klebsiella oxytoca</i>	91
Figure63	l'effet antibactérien de l'ATB/Extraits sur <i>K. oxytoca</i> .	91

Tableaux	Titre	page
Tableau1	Caractéristiques générales des germes contagieux et germes d'environnement	5
Tableau 2	Les principaux antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites.	6
Tableau 3	Diverses facettes de la qualité du lait.	7
Tableau 4	La flore microbienne du lait.	8
Tableau 5	Critères microbiologiques utilisés pour les laits.	9
Tableau 6	Effets de certains principes actifs des plantes médicinales.	13
Tableau 7	Date et lieu de prélèvements	28
Tableau 8	L'aspect macroscopique des bactéries sur le milieu Hektoen	30
Tableau 9	Buts et les méthodes d'examen microscopiques.	34
Tableau10	Caractères de la galerie biochimique.	36
Tableau11	Caractères de test Béta-galactosidase.	39
Tableau 12	Caractères de test TDA.	39
Tableau 13	Recherche des lysines, ornithine décarboxylases.	40
Tableau 14	Tableau d'identification des staphylocoques.	43
Tableau 15	Les antibiotiques utilisés.	52
Tableau 16	Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition.	53
Tableau 17	Screening phytochimique des deux plantes.	54
Tableau 18	Différents caractères des deux plantes	56
Tableau 19	Aspect macroscopique du lait.	60
Tableau 20	caractères cultureux	63
Tableau 21	caractères microscopique	65
Tableau 22	Les caractères biochimiques des souches identifiées à partir des prélèvements du lait.	66
Tableau 23	Résultat de la galerie API 20E.	67
Tableau24	Les caractères biochimiques des souches identifiées	68
Tableau 25	Le résultat de la galerie API Staph.	68
Tableau 26	Résultat de la galerie API 20Strep.	69
Tableau27	les espèces isolés et identifiées ainsi leur emplacement.	70
Tableau28	Effet des extraits sur les souches de références	71
Tableau 29	Diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne en réponse aux extraits bruts étudiés (en mm)	73

Tableau 30	Les diamètres d'inhibition de l'Antibioaromatogramme de <i>Str. agalactiae</i>	75
Tableau 31	Résultat de l'effet ATB/Extrait sur <i>Streptococcus agalactiae</i>	76
Tableau 32	Les diamètres d'inhibition de l'Antibioaromatogramme contre <i>P. mirabilis</i>	78
Tableau 33	les diamètres d'inhibition des ATB/Extraits sur de <i>Proteus mirabilis</i>	79
Tableau 34	les diamètres d'inhibition de l'Antibioaromatogramme de <i>S. aureus</i>	81
Tableau 35	les diamètres d'inhibition des ATB/Extraits sur <i>S. aureus</i>	82
Tableau 36	les diamètres d'inhibition de l'Antibioaromatogramme de <i>S. saprophyticus</i>	83
Tableau 37	les diamètres d'inhibition de l'effet ATB/Extraits de <i>S. saprophyticus</i>	84
Tableau 38	les diamètres d'inhibition de l'Antibioaromatogramme d' <i>E. coli</i>	86
Tableau 39	les diamètres d'inhibition de des ATB/Extraits sur <i>E. coli</i>	87
Tableau 40	les diamètres d'inhibition de l'Antibioaromatogramme de <i>K. oxytoca</i>	89
Tableau 41	les diamètres d'inhibition des ATB/Extraits sur <i>Klebsiella oxytoca</i>	90

Le corps humain a toujours besoin d'un apport calorique pour le bien être. En raison de ce besoin, le lait est un partenaire important de notre alimentation quotidienne, et il joue un grand rôle dans le régime alimentaire des pays consommateurs et constitue le seul aliment des mammifères, nouveau-nés absolument indispensable pour assurer leur survie puis leur croissance. Sur la terre, environ 2000 espèces de mammifères de la souris à la baleine sont concernés par ce type d'alimentation. Il présente diverses propriétés, physiques, chimiques et bactériologiques.

La place du lait en nutrition humaine n'est pas le fruit du hasard, mais également régie par des potentialités génétiques.

Le lait de vache en particulier constitue l'idéal pour l'alimentation des "petits de l'homme". C'est un aliment qui contient tous les éléments de base nécessaires à la croissance des enfants, depuis les glucides jusqu'aux graisses, en passant par les protéines, les vitamines et les éléments minéraux. Il ne lui manque que le fer pour en faire un aliment complet.

Le lait peut êtreensemencé par de nombreuses espèces microbiennes, pour certaines, il constitue un bon milieu de culture, ce qui leur permet de s'y développer.

Des germes pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire peuvent être présents lorsque le lait est issu d'un animal malade (*Streptocoques, Entérobactéries, et des Staphylocoques*) qui sont des agents des mammites en plus des germes d'infection générale tels que : *Salmonella, Brucella*, et exceptionnellement *listeria monocytogene*.

Les mammites ou inflammation de la glande mammaire restent au début du XXIème siècle un des fléaux majeurs de l'élevage laitier et constituent un domaine pathogène dans les élevages laitiers où elles occasionnent des pertes économiques considérables, si elle n'est pas traitée, elle peut conduire à la détérioration du bien-être et de la santé de la vache, de la production laitière et de la qualité du lait et aboutir à la mise à la réforme des vaches affectées, voire à leur mort.

Grace aux antibiotiques, l'animal ainsi que l'être humain se trouvent sécurisés en face des maladies infectieuses, mais lors du traitement de mammites chez les vaches laitières avec ces substances, la santé humaine peut se trouver compromise par la présence d'agents pathogènes et ou des toxines ainsi que les résidus d'antibiotiques dans le lait.

La réglementation en élevage laitier biologique limite l'utilisation des produits de synthèse pour le soin des animaux et préconise les traitements à base d'extraits de plantes médicinales,

ces dernières sont largement utilisées, en raison de leur efficacité, des effets secondaires limités, et des coûts relativement bas.

Dans ces dernières années, les recherches scientifiques s'intéressaient aux composés bioactifs des plantes médicinales responsables de l'activité antibactérienne, certains composés sont isolés tel que : les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les stérols, les terpenoïdes ainsi que les polyphénols qui sont les principaux composants actifs responsables de diverses activités biologiques.

Les plantes les plus populaires et les plus utilisées actuellement dans le traitement des mammites bovines sont : le *Thymus vulgaris*, le *Thymus ciliatus*, le *Teucrium polium*, l'*Allium sativum*, la *Ruta chalepensis* et la *Quercus ilex*.....etc.

A fin d'essayer de minimiser l'emploi des antibiotique dans les traitements de mammites, et valoriser l'utilisation des extraits de plantes médicinales à diverses activités biologiques et principalement antibactériennes, nous nous sommes intéressé à étudier l'effet antibactérien des extraits bruts de deux plantes aromatiques, *Thymus ciliatus* et *Teucrium polium*, appartenant à la famille des " Lamiacées" connue par sa richesse d'une part en métabolites secondaires (polyphénols et flavonoïdes...) et d'autre part par son usage traditionnel connu et fréquent chez nos populations et en médecine vétérinaire.

Ce mémoire est scindé en 3 parties, l'une représente la synthèse des connaissances collectées sur le problème de mammite et son danger répercuté sur le lait associé, ainsi que les germes pathogènes en cause et les différentes sources de contamination possibles, en plus de l'important rôle des plantes médicinales ciblées dans le traitement.

La deuxième partie, renferme le matériel et les méthodes phytochimiques et bactériologiques employées pour la réalisation de l'expérience, et la dernière partie regroupe les résultats ainsi que leurs discussions possibles.

Et enfin nous terminons par une conclusion et des perspectives.

I. Les mammites

1. Définition de la mammite

La mammite est une inflammation d'un ou de plusieurs quartiers de la glande mammaire (fig.1). Elle résulte le plus souvent d'une infection provoqué par des microorganismes qui colonisent la glande mammaire et produisent souvent des toxines qui l'irritent en franchissant le canal du trayon, Ils vont retrouver au niveau du lait ou ils entraînent des modifications chimique et biochimique, En plus du nombre anormalement élevé des cellules somatique. **(Weisen, 1974)**



Figure 1: cas d'une Inflammation de la glande mammaire (3)

2. Classification des mammites

On peut classer les mammites selon : l'intensité de la réaction inflammatoire (Ben Moussa., 2007), les modifications de la mamelle (chaleur, douleur, rougeur, gonflement) et selon la composition du lait (grumeaux, couleur) **(Gabli, 2005)**.

Deux types de mammites sont distingués suivant leur sévérité en mammites cliniques (visibles) et subcliniques.

2.1. Mammites cliniques (visibles)

Les mammites cliniques sont caractérisées par la présence de symptômes fonctionnels (Modifications de la quantité et de la qualité du lait), de symptômes locaux inflammatoires

observés au niveau de la mamelle (douleur, chaleur, tuméfaction, etc.) et de symptômes généraux (hyperthermie, anorexie, arumination, etc.) (Poutrel, 2002).

2.2. Mammites subcliniques (invisibles)

Contrairement aux mammites cliniques, les mammites subcliniques ne s'accompagnent d'aucun symptôme, Elles ne sont diagnostiquées qu'à l'aide d'examens complémentaires qui mettent en évidence une augmentation du taux cellulaire du lait ou de la conductivité du lait et également une altération des propriétés chimiques du lait. (Poutrel, 2002).

3. Bactéries impliquées dans les mammites

Les espèces bactériennes impliquées dans les infections mammaires de la vache sont présentes sur et chez l'animale lui même ou dans son environnement. Par ailleurs, les bactéries responsables de mammites sont toutes capables de se multiplier dans le lait qui est un milieu nutritif suffisamment riche pour assurer leur développement.

Il est courant de distinguer deux types d'agent pathogènes pour la mamelle de la vache, majeurs et mineurs (Gabli, 2005).

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

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

4. Les sources de contamination

Les bactéries causant la mammité peuvent être classées selon qu'elles soient contagieuses (germes de réservoir mammaire) ou qu'elles proviennent de l'environnement (germes de réservoir environnement) (Descoteaux, 2008). (tab.1)

Tableau 1 : Caractéristiques générales des germes contagieux et germes d'environnement.

Caractéristiques	Mammites contagieuses	Mammites d'environnement
Germes principaux	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptocoque agalactiae</i> • <i>Staphylocoque aureus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Coliformes (<i>E.coli</i>, <i>Klebsiella</i>, <i>Serratia</i>, <i>pseudomonas</i>) • <i>Streptocoque uberis</i> • <i>Streptocoque dysagalactiae</i>
Germes « secondaires »	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Corynebacterium bovis</i> • Mycoplasmes 	<ul style="list-style-type: none"> • Champignons • Levures
Réservoir principal	<ul style="list-style-type: none"> • Pis des vaches infectées 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus uberis</i> : paille • Coliformes et <i>Klebsilla</i> : copeaux et sciure
Réservoir secondaire	<ul style="list-style-type: none"> • Lésions des trayons • Matériel de traite • Trayeur 	

5. Mode de contamination

Pour qu'un microorganisme cause une infection dans un quartier, il faut d'abord qu'il envahisse ce quartier et que la vache ne puisse s'en débarrasser avant qu'il ne se multiplie

Les étapes qui mènent à l'apparition d'une mammite sont :

1. Contact avec le microbe: Le nombre de microorganismes s'accroît près de l'orifice (ou sphincter) d'un ou plusieurs trayons. C'est là que l'hygiène et les procédures de traite ont un rôle important à jouer pour éviter que ces microbes pénètrent le quartier. **(1)**

2. Entrée du microbe dans le trayon: Cette entrée peut être forcée par la trayeuse mécanique, surtout en fin de traite. Les trayons endommagés (blessures, kératine abimée à l'intérieur du trayon) ou trop ouverts vont être plus facilement envahis. C'est à ce niveau que l'ajustement des trayeuses et la prévention des blessures est critique. **(1)**

3. Réponse immunitaire de la vache: la première ligne de défense de la vache consiste à envoyer plus de globules blancs (leucocytes) pour éliminer les microbes qui ont pénétré dans le trayon. Si cette réponse est insuffisante, le microbe se multiplie et la vache montre d'autres réponses immunitaires comme la fièvre. L'efficacité du système immunitaire de la vache dépend d'un grand nombre de facteurs. A ce niveau aussi, le vacher peut faire beaucoup pour assurer une bonne réponse immunitaire. **(1)**

6. Traitement

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

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

Tableau 2 : les principaux antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites.

<i>Staphylococcus aureus</i>	les streptocoques	<i>Escherichia coli</i>
<ul style="list-style-type: none"> ◆ les pénicillines M (cloxacilline, oxacilline), ◆ l'association amoxicilline / acide clavulanique, les céphalosporines, ◆ les associations pénicilline aminoside (streptomycine, néomycine, Gentamicine), ◆ les macrolides et apparentés (lincosamines, novobiocine). 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ les béta-lactamines (pénicilline G) ◆ Les aminosides en association avec les béta-lactamines. 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ les pénicillines A (ampicilline, amoxicilline), ◆ l'association amoxicilline / acide clavulanique, les céphalosporines, les aminosides, les fluoroquinolones et les polypeptides.

7. Indice des mammites sur la qualité du lait

Les mammites bovines occasionnent des pertes économiques considérables dans les élevages laitiers. Ces derniers sont confrontés à des frais supplémentaires et à des problèmes de qualité du lait fourni aux acheteurs. En outre, l'incidence annuelle de la mammite clinique est de 20 à 40% et elle représente la principale cause de l'utilisation d'antibiotique chez la vache (**Medefouni, 2006**)

De plus des risques engendrer par les microorganismes impliqués dans la mammite, leur traitement par les antibiotiques peut parfois constituer un danger pour le consommateur.

8. Qualité bactériologique du lait

La qualité du lait a une résonance bien particulière et différente selon qu'on s'adresse à un groupe de producteurs, de transformateur ou de consommateurs. Pour bien saisir toutes les nuances qu'elle comporte, il faut l'analyser sous plusieurs angles (tab.3).

Ce sont surtout les aspects chimiques et microbiologiques qui devraient retenir l'attention. La présence de microorganismes pathogènes, de résidus d'antibiotiques, de divers résidus

chimique associés au nettoyage ou à l'assainissement, représente les principales craintes des consommateurs et des transformateurs de lait (FAO, 1995).

Tableau 3 : Diverses facettes de la qualité du lait. (FAO, 1995).

Critère de la qualité	Contrôle
Aspect physique	Point de congélation, masse volumique, couleur, séparation de gras, chaleur spécifique, viscosité, etc.
Aspects chimiques	pH, pouvoir tampon (acidité), antibiotique, composition en protéines, gras, lactose, minéraux, etc.
Aspects microbiologiques	Bactéries, cellules somatiques, virus, etc.
Propriétés de conservation	Flore microbienne, enzymes, oxygène, etc.
Propriétés fonctionnelles	Stabilité à la chaleur, coagulation préserve, émulsification, foisonnement, etc.
Propriétés Biofonctionnelles	Valeur nutritive (teneur en vitamines, minéraux, oméga 3, probiotique, etc.) ; fermentation et hydrolyse enzymatique (peptides bioactifs, lactose hydrolysé, etc.)

8.1. La flore microbienne du lait

Le lait obtenu par une traite aseptique n'est pas stérile, il contient 1000 à 5000 microorganismes par millilitre, essentiellement des lactobacilles et des streptocoques lactique commensaux, du pis et des canaux galactophores, rappelons, d'autre part, que le lait peut être contaminé par divers micro-organismes de l'environnement : Entérobactéries, *Pseudomonas*, *Flavobactérium*, *Microcoque*, *Corynébactéries*, *Bacillus* Par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière.

Des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de *Clostridium*, d'entérobactéries, coliformes et éventuellement d'entérobactéries pathogènes : *Salmonella*, *Yersinia*, *Compylobacter*

Les laits d'animaux malades peuvent contenir des germes pathogènes pour l'homme : *Streptococcus agalactiae* et *Staphylococcus aureus* (agents de mammites infectieuses chez les vache et pathogènes pour l'homme), *Brucella* (agent de la fièvre de malte), *Bacillus anthracis* (agent du charbon), *Mycobacterium tuberculosis* (agent de tuberculose), *Coxiella burnetta*,

Listeria, ainsi que différents virus et parasites. Ceci explique l'importance d'un contrôle sanitaire rigoureux. (Leyler, 2001) (tab. 4)

Tableau 4 : la flore microbienne du lait (Leyler, 2001)

Flore constante		Flore accidentelle	
Bactéries des canaux galactophores	Bactéries contaminant le lait pendant et après la traite	Bactéries d'origine fécale	Bactéries présentes sur l'animal malade
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactbacillus</i> • <i>Streptocoques lactiques</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas</i>, • <i>Flavobacterium</i>, • Entérobactéries, • Microcoques, • Corynébactéries, • <i>Bacillus</i>, • <i>Streptococcus</i> • <i>Feacalis</i> • <i>Clostridium</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Clostridium</i> • Coliforme fécaux • <i>Salmonella</i>, • <i>Yersinia</i> • <i>Compylobacter</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus agalactiae</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Brucella</i> • <i>Listeria</i>

8.2. Les normes d'acceptation des laits


Le but principal de l'établissement des normes microbiologiques est de protéger la santé des consommateurs. En effet, la sécurité des consommateurs et la durée de conservation des denrées alimentaires, sont étroitement liées à leur flore microbienne. (tab. 5)


Tableau 5 : Critères microbiologiques utilisés pour les laits (Beerens, 2010).

Micro-organismes	Normes	
	Lait CRU	Lait Stérilisé U.H.T
- Micro-organismes aérobies à 30°C	2.105 g /ml	3 .104 g/ml
- <i>Coliformes fécaux</i>	100 g/ml	1 g/ml
- <i>Escherichia coli</i>	0 dans 1ml	0 dans 1ml
- <i>Streptocoques fécaux</i>	Non considéré	Non considéré
- Salmonelles	0 dans 25 ml	0 dans 25 ml
- <i>Staphylococcus aureus</i>	0 dans 0,1ml	1g /ML
- <i>Mycobactérium sp</i>	absence	Absence

8.3. Les sources de contamination du lait

Les microorganismes se trouvant dans le lait peuvent avoir deux origines. (Alais, 1961)

-  Origine mammaire

-  Origine externe : contamination à la traite et après la traite.

8.3.1. Contamination d'origine mammaire

A la sortie de la mamelle saine, même avec des précautions d'asepsie rigoureuse, il est rare d'obtenir un lait stérile, du moins chez la vache, il y a presque toujours à l'intérieur de la mamelle, des germes banaux qui contaminent le lait au moment de sa récolte.

Cette population originaire de la mamelle saine est, en général, peu nombreuse, elle dépasse rarement 1000germes /ml.

Lorsque le contenu microbien devient très élevé, on trouve souvent les germes typiques des mammites contagieuses : les Streptocoques et les Staphylocoques.

Cependant, il y a des animaux qui donnent, à la sortie de la mamelle, un lait à contenu microbien élevé : 100000 germes/ml, bien que la glande paraisse saine, c'est un défaut qui persiste, avec des variations larges, il ne peut être dépisté que par l'examen microbiologique du lait, puisque la mamelle est normale et la composition du lait aussi.

❖ Deux modes de pénétration possible des germes dans la mamelle :

- A. Voie ascendante, par le canal de trayon, c'est le chemin suivi le plus fréquemment par les germes banaux et certains germes pathogènes.
- B. Voie (endogène) certains microbes pathogènes peuvent atteindre la mamelle par la circulation sanguine, par exemple ceux de la tuberculose (*Mycobactérium tuberculosis*) et de la brucellose (*brucella abortus*) ; les streptocoques ne peuvent pas parvenir la mamelle de cette manière. (Alais, 1961).

Les germes banaux de la mamelle appartiennent principalement au genre *Corynbacterium* et *Micrococcus* ; ce sont des bactéries (commensales) que l'on trouve fréquemment sur la peau et dans les glandes ; elles ont des activités enzymatiques limitées.

8.3.2. Contamination du lait à l'extérieur de la mamelle

Elle est en générale massive par apport à la contamination d'origine mammaire. Elle est extrêmement variable en importance selon les conditions de production et de conservation du lait.

Les principales sources de contamination sont :

- **L'ambiance** : l'atmosphère des étables est chargée de germes provenant des excréments (Entérobactéries comme *Escherichia coli*), des aliments grossiers (foin), de la paille principalement *Bacillus* et *Clostridium*.
- **L'état de l'animal** : Durant la chute, au moment de la traite (Alais, 1961).

9. Prophylaxie

Les moyens "classiques" de lutte, par l'antibiothérapie (voie intra-mammaire et/ou voie générale), en fonction des germes en cause et du type de mammite, sont contraignants et coûteux et ne permettent pas la guérison totale de les mamelles en plus. La réglementation en élevage laitier biologique limite l'utilisation de ces produits de synthèse pour le soin des animaux et préconise les traitements à base d'extraits de plantes. **(Kammerer, 2001)**.

A raison de leur diverses propriétés biologique (antibactériennes, anti-inflammatoire, antioxydante,...) pourraient représenter une alternative intéressante (la phytothérapie, l'aromatothérapie, l'argilothérapie,) contre la mammite.

L'usage de ces thérapies alternatives, présente l'avantage de ne pas nécessiter le retrait du lait et coutent moins cher par rapport aux antibiotiques. De plus, plusieurs produits de la thérapie alternative sont plus rapidement biodégradables que des substances comme les antibiotiques.

(2)

II. Plantes médicinales et Polyphénols

Les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principe, voir l'unique recours de la médecine de nos grands parents, cependant, malgré le développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladie qui étaient souvent mortelles.

1. Définition des plantes médicinales

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

1.1. Importance des plantes médicinales

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

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques car elles contiennent des principes actifs (telles que les polyphénols et les flavonoïdes, tanins, huiles essentiels...) (tab. 6) qui sont douées de plusieurs propriétés physiologiques et biologiques surtout celles destinées à la santé humaine et qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie ; elles présentent, en effet, des avantages dont les médicaments sont dépourvus (Bruneton, 1999).

Tableau 6: Effets de certains principes actifs des plantes médicinales (**Benhamza, 2008**), (**Hivin, 2008**).

Principes actifs des plantes médicinales	Effets
Phénols	Anti-inflammatoires et antiseptiques.
Flavonoïdes	Anti-inflammatoires, antioxydants, antivirales et des effets protecteurs sur le foie.
Tanins	Astringentes, cytostatiques, anti-diarrhéique et bactéricides.
Terpènes	Antiseptique.
Anthocyanes	Puissants antioxydants nettoient l'organisme des radicaux libres et anti-œdémateux.
Coumarines	Fluidifier le sang, soigne les affections cutanées, et un puissant vasodilatateur coronarien.
Saponosides	Tensio-actives, angio-protectrices, antiseptiques, diurétiques, anti-inflammatoires et antiulcéreuses.
Arthraquinones	Ils contribuent à transférer les liquides des tissus et du système circulatoire vers les conduits urinaires
polysaccharaïdes	Utilisée pour calmer et protéger les tissus enflammés, ou la paroi des intestins enflammée et douloureuse.

1.2. Applications des plantes médicinales

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolismes secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale. Il y a en donc un réveil vers un intérêt progressif dans l'utilisation des plantes médicinales dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement, parce que les herbes fines guérissent sans effet secondaire défavorable (**Bruneton, 1999**).

Utilisation en médecine:

En tant que médicament pour l'homme :

En urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et désordre nerveux (**Svoboda et Hampson, 1999**).

- Système cardiovasculaire, exemple: Flavoce est un médicament constitué par la flavone non substitué en combinaison avec la rutine et isoquercetine est utile dans le traitement de l'athérosclérose (**Narayana, 2000**).
- Les maladies de stress, des activités antioxydantes, tel le thé noir, le thé vert et le cacao sont riches en composés phénoliques. (**Narayana, 2000**)
- Activité antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire: les produits naturels des plantes depuis des périodes très anciennes ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques ex: la quinine obtenue à partir du quinquina "*Cinchona*" employée avec succès pour traiter la malaria (**Dastidar, 2004**).

En agriculture:

Les huiles de certains arbres (l'arbre *Azadirachta indica*) ont des utilisations dans l'agriculture dans le contrôle de divers insectes et nématodes (vers parasites) (**Amjad Hossain, 2005**).

En alimentation:

Assaisonnements, des boissons, des colorants et des composés aromatiques. Les épices et les herbes aromatiques sont utilisés dans l'alimentation et considérées comme condiments et aromates. (**Svoboda et Hampson, 1999**).



Elles sont utilisées comme **Des suppléments diététiques**. (**Smallfield, 2001**).

En cosmétique:

Des produits de beauté, parfums et articles de toilette, produits d'hygiène (**Porter, 2001**).

2. La phytothérapie

La phytothérapie est une méthode thérapeutique qui utilise l'action des plantes médicinales dans le traitement des maladies. 2 types sont distingués :

-  Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement (**Max Wichd, 2003**). Selon l'OMS, cette phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays dont les pays en voie de développement. C'est une médecine parallèle du fait de l'absence d'étude chimique.
-  Une pratique basée sur les avancées scientifiques et la recherche des principes actifs des plantes. Cette phytothérapie est assimilée aux médicaments et selon les pays suit les mêmes réglementations, On parle alors de pharmacognosie. (**Max Wichd, 2003**).

2.1. Avantage de la phytothérapie

Malgré l'énormes progrès réalisés par la médecine moderne, actuellement les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît par rapport à la résistance des bactéries et des virus. (**Grosmond, 2001**)

3. Les polyphénols

3.1. Définition des polyphénols

Les polyphénols ou les composés phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 8000 structures connues différentes (**Bahorun, 1997**), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

3.2. Classification

Les polyphénols se trouvent dans toute la partie de la plante, ils regroupent une multitude de composés :

- Les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols ;
- Les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes ;
- Les acides phénoliques;
- les lignines, ainsi que d'autres qui existent en nombres considérables (**Bahorun, 1997**).

3.3. Effets biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Bahorun, 1997**).

Ces composés montrent des activités (fig.2) anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux anti-allergènes, vasodilatateurs et antioxydants (**Falleh et al., 2008**).

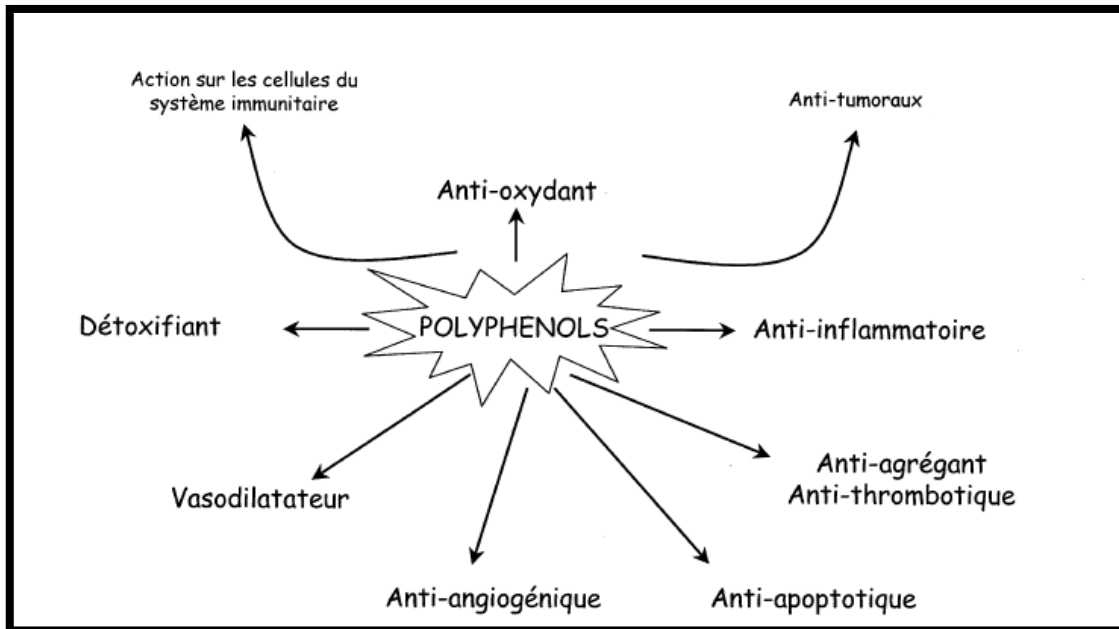


Figure 2 : Effets biologiques des polyphénols
(Martin et Andriantsitohaina, 2002)

4. Description des plantes sélectionnées

4.1 Le *Thymus ciliatus*

4.1.1 Description du *Thymus ciliatus*

Thymus ciliatus est l'une des espèces les plus importantes au sein de la famille des Lamiacées, c'est est une plante aromatique qui se trouve a l'état spontané, sous l'aspect d'un sous-arbrisseau très ramifié a la base, mais pouvant former des touffes bien étalées sur le sol Les feuilles qui présentent un polymorphisme remarquable (Braun Blanquet, 1975) pouvant atteindre 40cm de hauteur elles sont linéaires ciliées sur les marges, les florales sont largement ovales, vertes; les fleurs sont très grandes, rouges ou violacée, dépassant 1 cm de long (fig.3).

Cette plante est rencontrée dans les broussailles, matorrals, sur substrats calcaires et siliceux et sur sols rocailleux et bien drainés. (Kabouche et Ghannadi, 2009).

4.1.2 Classification taxonomique

Selon la classification classique des plantes (Quezel et Santa, 1963), le *Thymus* suit la classification suivante :

- Règne : *Plantae*
- Classe : *Magnoliopsida*
- Ordre : *Lamiales*
- Famille : *Lamiaceae*
- Genre : *Thymus*
- Espèce: *Thymus ciliatus*.
- Nom scientifique : *Thymus ciliatus*
- Nom vernaculaire (Français): Thym
- Nom vernaculaire (arabe) : زعيترة



Figure 3 : Aspect morphologique de *Thymus ciliatus*. (4)

4.1.3 Origine géographique

Le *Thymus* est très répandu dans le bassin méditerranéen : Maghreb, France, Espagne, Italie et dans le nord d'Algérie (Quezel et Santa, 1963). Les différentes espèces qui y existent sont réparties le long du territoire national, du Nord Algérois à l'Atlas saharien, et du Constantinois à l'Oranais (Kabouche et Ghannadi, 2009).

4.1.4 Propriétés d'utilisation traditionnelles et médicales

Les plantes du *Thymus ciliatus* sont parmi les plantes les plus populaires à travers le monde, couramment utilisés comme des tisanes, des agents aromatisants (condiment et épice). *Thymus ciliatus* possède des activités pharmacologiques importantes (Baba Aissa, 1991), Ces espèces ont été également utilisées comme carminative, diurétique, antiseptique urinaire et vermifuge.

Elles sont considérées aussi comme l'un des remèdes populaires les plus utiles et efficaces dans le traitement des affections respiratoires, rhume, grippe, et angine, elle est utilisée dans le nettoyage et la cicatrisation des plaies, et aussi à l'expulsion des gaz intestinaux. (Kabouche et Ghannadi, 2009).

4.1.5 Détermination des composés

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *Thymus ciliatus* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection).

La teneur en huile essentielle de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré (**Kabouche et al., 2004**) ; l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* a été analysée en utilisant la CPG couplée à une SM. (**Amarti et al., 2009**).

Le contenu phénolique total, flavonoides, catéchine, tritérpènes, tanins et anthocyanine dans l'infusion aqueuse préparée du *Thymus ciliatus* a été déterminé par des méthodes spectrophotométriques. (**Mau et al., 2004**).

Des composés polyphénoliques ont été identifiés dans l'infusion aqueuse de *Thymus ciliatus* par analyse HPLC notamment l'acide rosmarinique (17,45 mg/g = 1,7 % de la masse sèche de *Thymus ciliatus*) et l'acide caféique (0,02 mg/g). (**Mau et al., 2004**).

4.2 *Teucrium polium*

4.2.1 Description de *Teucrium polium*

Le genre *Teucrium*, encore dénommé les germandrées, regroupe environ 260 espèces de plantes herbacées ou de sous-arbrisseaux de la famille des Lamiacées. La *Teucrium polium* est une espèce très variable (fig.4) ; de nombreuses sous espèces ont été décrites dont certaines sont parfois érigées au rang d'espèce (**Naghibi et al., 2005**). C'est une plante herbacée vivace à odeur poivrée par frottement, les tiges sont de 10-30 cm de hauteur, blanches-tomenteuses portant des feuilles opposées sessiles, linéaires-lancéolées ou oblongues, en coin et entières à la base et à dents arrondies en haut, les fleurs forment des inflorescences compactes globuleuses ou ovoïdes serrées. Le calice brièvement tomenteux, à des dents courtes, la supérieure obtuse ; corolle à lèvre supérieure tronquée et à lobes supérieurs pubescents (**Boullard, 2003**).

4.2.2 Classification taxonomique

Selon la classification classique des plantes, la Germandrée suit la classification suivante (Quzel et Santa, 1963)

- Règne : *Plantae*
- Classe : (*Magnoliopsida*)
- Ordre : *Lamiales*
- Famille : *Lamiaceae*
- Genre : *Teucrium*
- Espèce: *Teucrium polium L.*
- Nom scientifique : *Teucrium polium*
- Nom vernaculaire (Français): Germandrée tomenteuse
- Nom vernaculaire (arabe) : قطابة او خياطة الجراح



Figure 4 : Aspect morphologique du *Teucrium polium* . (Prise personnelle)

4.2.3 Origine et répartition géographique :

La germandrée tomenteuse est originaire du sud-ouest d'Asie, d'Europe et d'Afrique du nord (abandonnée trouvée dans le secteur Irano-Turanien principalement méditerranéen et occidental). Elle pousse dans les pelouses arides, les rocailles de basse altitude, collines et les déserts arides (Abdollahi *et al.*, 2003).

4.2.4 Propriétés d'utilisation traditionnelles et médicales :

Plusieurs recherches ont démontré certains effets pharmacologiques attachés à l'utilisation de Germandrée tomenteuse, parmi lesquelles on invoque l'action antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire, anti-ulcerogène, anti-nociceptive, antispasmodique, antidiabétique, diurétique, hypolipidémique, antagoniste du calcium et cytotoxique (Abdollahi *et al.*, 2003).

4.2.5 Détermination des composés

Plusieurs chercheurs ont évalué la composition chimique de *T. polium* développée dans différents secteurs géographiques. La plupart de ces études, basées sur l'analyse des extraits par les méthodes CPG, ont indiqué la présence de plusieurs composés incluant principalement les flavonoïdes, les polyphénols (Proestos *et al.*, 2004), les tannins, les huiles essentielles et les alcaloïdes. (Parsae et Shafiee, 2006)

L'objectif de la présente étude est de tester l'effet antibactérien des deux plantes médicinales (*Teucrium polium*, *Thymus ciliatus*) sur des souches bactériennes isolées à partir de vaches atteintes de mammites.

- Pour cela deux études sont effectuées :

Une phytochimie réalisée dans laboratoire de biochimie université de Guelma, l'autre partie biologique effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie alimentaire du service d'hygiène de la direction de la santé et de la population (DDS) de Guelma.

1. Etude phytochimique

1.1. Récolte du matériel végétal

La récolte de la partie aérienne (les feuilles et les tiges) a été effectuée durant le mois de Février 2013 au niveau de deux régions (fig.5)

La région de HJER MANGOUB (Sud-est de la wilaya de Guelma) pour la *Teucrium polium*, et la région de RAS EL AKBA (Sud-ouest de la wilaya de Guelma) pour *Thymus ciliatus*.

L'identification botanique des deux plantes a été faite respectivement par les professeurs : ZAAFOUR et CHEFROUR (Faculté de sciences, faculté de médecine université badji mokhtar- Annaba.)

Les deux plantes ont été nettoyées, lavées avec de l'eau du robinet et séchées à l'abri de lumière à une température ambiante. Par la suite le broyat est conservé au réfrigérateur pour une ultérieure extraction de composés polyphénoliques et tests bactériens.

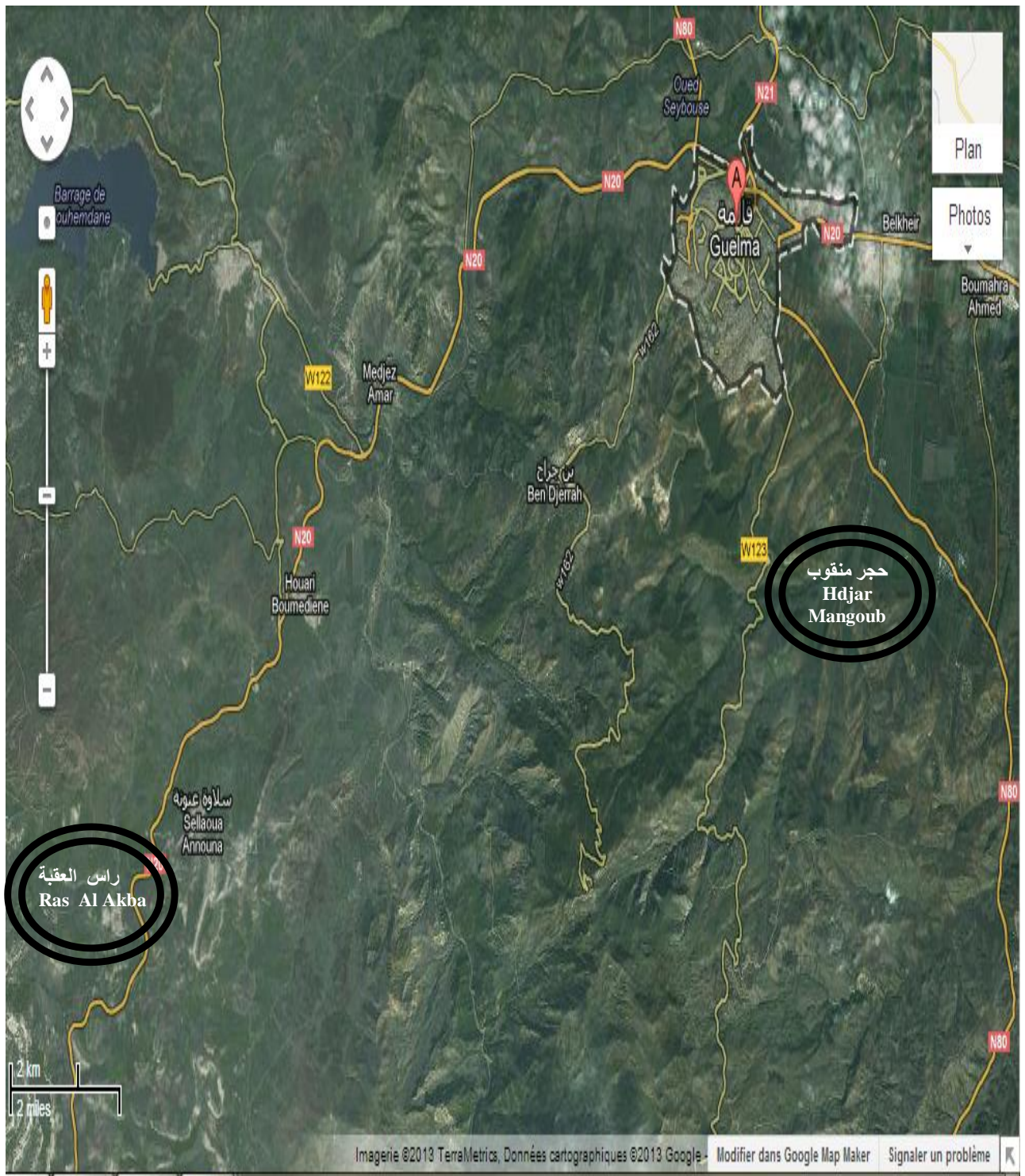


Figure 5: Carte géographique de la wilaya illustrant les deux régions de récolte de plantes.
(Google Map-Guelma, 2013)

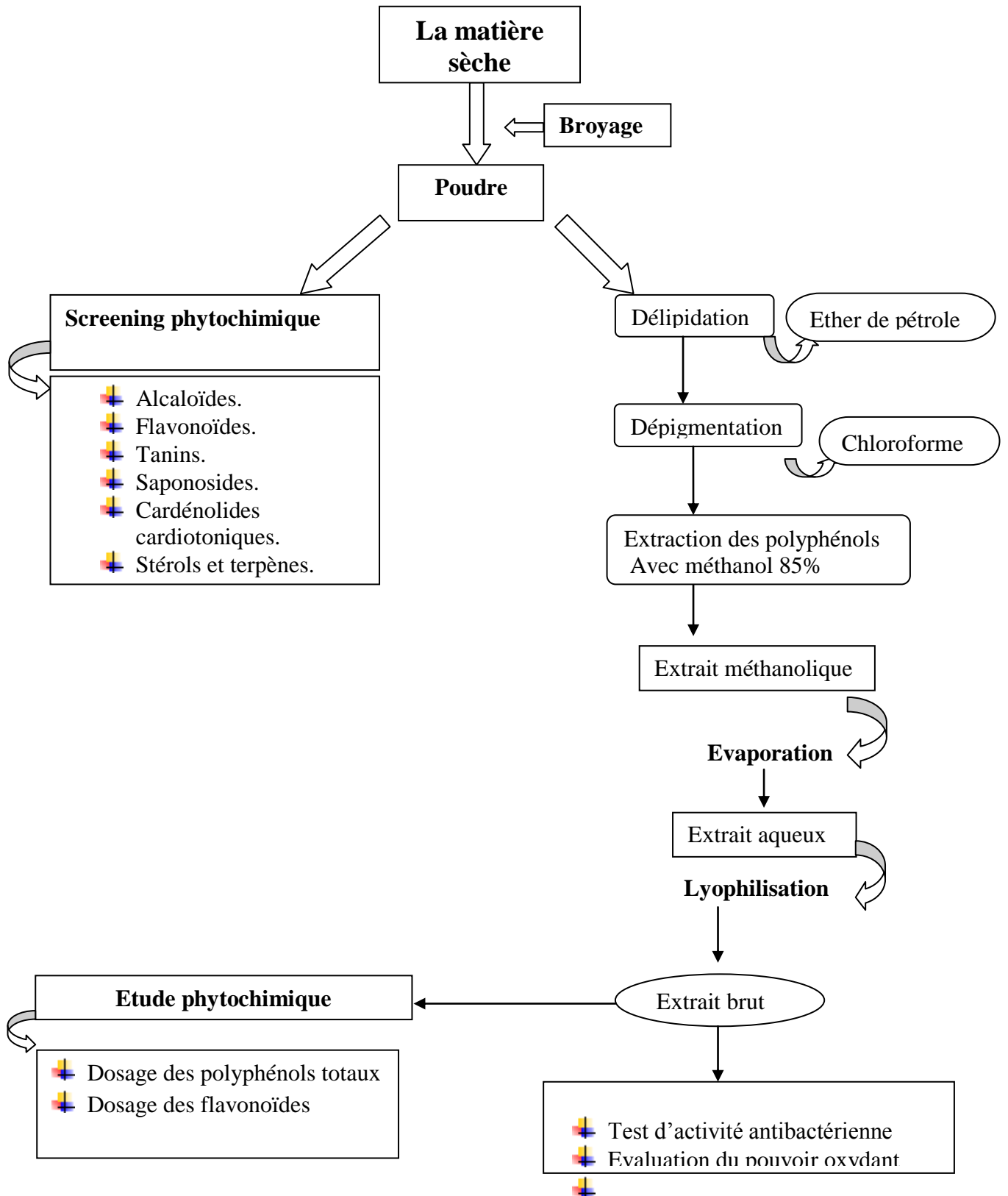


Figure 6: Schéma récapitulatif du Protocole expérimental

1.2. Tests préliminaires

❖ Mise en évidence des Alcaloïdes

5g de la poudre sont mélangés avec 15 ml d'HCl dilué à 1% dans un récipient et après une demi heure de macération, le mélange est filtré sur un papier filtre. Au filtrat obtenu, on additionne quelques gouttes de réactif de Mayer (5g de KI + 1,358g de HgCl₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée).

L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes. (**Dohou *et al.*, 2003**)

❖ Mise en évidence des flavonoïdes

Macérer 10g de la poudre sèche dans 150 ml d'HCl dilué à 1% pendant 24h, filtrer et procéder au test suivant : prendre 10 ml du filtrat, le rendu basique par l'ajout du NH₄OH.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure de tube à essai. (**Okmu, 2005**).

❖ Mise en évidence des tanins

Dans un Erlenmeyer, 10g de la plante sèche sont extraits par une solution hydro- alcoolique de l'éthanol (C₂H₅OH), puis le mélange est filtré et on ajoute au filtrat quelques gouttes de la solution de chlorure de fer FeCl₃.

L'apparition d'une couleur verte confirme la présence des tanins. (**Karumi, 2004**).

❖ Mise en évidence des saponosides

Dans une fiole renfermant 80 ml d'eau distillée bouillante on introduit 2g de la poudre, on maintient l'ébullition modérée pendant 30 min, puis on filtre le mélange. Après refroidissement on agite le filtrat verticalement.

L'apparition d'une mousse qui dure quelques instants indique la présence des saponosides. (**Karumi, 2004**).

❖ Mise en évidence des cardénolides cardiotoniques

Macérer 1g de la poudre dans 20 ml d'eau distillée et filtrer, prélever 10 ml du filtrat, l'extraire avec un mélange de 10 ml de chloroforme (CHCl₃) et de l'éthanol (C₂H₅OH). Evaporer la phase organique et dissoudre le précipité dans 3 ml de l'acide acétique

(CH₃COOH), ajouter quelques gouttes de FeCl₃ suivi de 1 ml de l'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré sur les parois du tube à essai.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur verte-bleu dans la phase acide (Dohou *et al.*, 2003)

❖ Mise en évidence des stérols et terpènes

Prendre 5g de la poudre, la dissoudre dans 210 ml d'éther de pétrole, filtrer puis évaporer ; le résidu obtenu est dissout dans 0,5 ml d'acide acétique et ensuite dans 0,5 ml de CHCl₃. les deux solutions sont transférées dans un tube essai, puis on ajoute 1 ml d'H₂SO₄ concentré.

La formation d'un cercle marron ou violet indique la présence des stérols terpéniques (Dohou *et al.*, 2003)

1.3. Préparation des extraits

Cette opération consiste à épuiser le matériel végétal par plusieurs solvants organiques. Cette méthode comprend les étapes suivantes :

a) Délipidation

100g de la poudre de *Thymus* et 50g de *Teucrium* sont macérés séparément dans l'éther de pétrole.

Cette macération est répétée 3 fois avec filtration et renouvellement du solvant, elle dure à chaque fois 24 heures.

b) Dépigmentation

Le résidu obtenu après la délipidation est macéré trois fois avec le chloroforme en filtrant à chaque fois

c) Extraction de polyphénols :

La poudre de deux plantes est macérée dans le méthanol à 85% à raison de 25% (P/V), et laisser macérer pendant 24h au réfrigérateur à 4°C. Après la filtration, le sédiment est subi deux macérations successives à raison de 50% (P/V).

Les trois filtrats sont mélangés et évaporés à basses température (40 °C) avec un rot à vapeur (R-215) (fig.7), le résidu récupéré dans des flacons hermétiquement fermés, puis lyophilisés pendant 24h (fig.8).



Figure 7 : le rot à vapeur



Figure 8: le lyophilisateur

1.4. Analyse des extraits méthanoliques

Dans le but de caractériser les extraits préparés à partir des deux plantes de *Thymus ciliatus* et *Teucrium polium*, des dosages ont été effectués et sont accompagnés par une chromatographie en couche mince (CCM).

✚ Chromatographie sur couche mince (CCM)

Support : plaques de silice (Silice a gel 60 F254, de 0,2cm d'épaisseur (10 x10 cm) déposées sur une feuille de plastique

Solution à examiner :

- Les deux extraits avec des concentrations convenables à de standard.

Solution de référence :

- La quercétine

Dépôts :

10µl de solution à examiner et de la solution de référence.

Solvants d'élution :

Mélange de solvants : Acétate d'éthyle (Ac OEt) - Méthanol (MeOH) - Eau distillée (H₂O) aux proportions de 100V : 135V : 10V.

Détection :

Le résultat de la CCM a été obtenu après 20min de migration du produit sur la plaque.

Après migration et séchage, on peut compléter par la pulvérisation avec un révélateur chimique *Ninhydrine*. (Marouf, 2002)

Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif Folin-Ciocalteu selon la méthode colorimétrique citée par (Wong et al., 2006).

➤ Principe

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu.

Brièvement 200µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes.

Après l'incubation 800 µl de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (75g/l) a été ajoutée. Le mélange final a été incubé pendant 2h dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre (JENWAY 6305) à 765 nm.

➤ Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (0-200µg/ml) et exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium est employée pour déterminer la teneur en flavonoïdes totaux dans nos extraits de *Thymus ciliatus* et *Teucrium polium*. (Yi et al., 2007)

➤ Principe

1 ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

➤ Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = a x + b$) réalisé par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations

(0-40 µg/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g).

Evaluation du pouvoir oxydant

➤ Test au DPPH

Le DPPH : est un radical stable et il présente en solution une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confère une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres.

L'activité du balayage des radicaux libres a été mesurée en employant le radical libre stable DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants

➤ Principe

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune. (**Tepe et al., 2005**).

Ce radical est un oxydant qui peut être réduit par l'antioxydant (AH) selon la réaction suivante :



Différentes concentrations comprises entre 0-2mg/ml des échantillons étudiés (les différents extraits) et le témoin (acide ascorbique)

Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol, 50 µl de solution des échantillons et témoins sont ajoutées à 1,950 ml de la solution de DPPH, après incubation de 30 min en obscurité à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 515 nm contre le blanc correspondant.

➤ Expression des résultats

L'activité antioxydante est estimée selon l'équation suivante :

« % d'activité antioxydante = [Abs contrôle - Abs échantillon / Abs contrôle] x 100.»

2. Etude biologique

2.1. Prélèvement des échantillons

Les échantillons du lait ont été prélevés à partir de vaches atteintes de mammites vivant dans différent endroits indiqués dans le tableau suivant :

Tableau 7: Date et lieu de prélèvements

N° du prélèvement	Date de prélèvement	Lieu de prélèvement
P1	24. 02. 2013 à 08h24.	L'ITMA
P2	03. 03. 2013 à 14h26.	Ferme privé
P3	04. 03. 2013 à 15h34.	Ferme Boussaha
P4	12. 03. 2013 à 10h18.	Ferme Mekhancha
P5	12. .03 2013 à 10h37.	Ferme Mekhancha

(p) : prélèvement

✓ Méthode de prélèvement

Avant de prélever le lait mammitieux on a fait un questionnaire qui comporte :

- l'identification du site de l'enquête qui pouvait être une ferme, ou village.
- le recueil des commémoratifs et par conséquent la description morphologique et clinique adéquate de l'animal. En d'autres termes, ressortir l'aspect clinique des mammites.
- Puis décrire le lait prélevé ; sa texture, sa couleur, sa consistance, son odeur et toutes autres anomalies constatées.

A partir de chaque quartier malade (fig.9), 20ml du lait sont prélevés aseptiquement comme suite :

- Lavage et séchage des trayons.
- Désinfection de l'orifice du trayon avec un coton imbibé d'alcool à 70°.
- Elimination des premiers jets.

- Remplir les supports (tubes/flacons) stériles avec du lait
- Etiquetage des supports : la date, le lieu de prélèvement, et l'heure.
- Par la suite Les prélèvements ont été transportés dans une glacière au laboratoire au vue d'une analyse ultérieure.



Figure 9: Technique de prélèvement du lait pour examen bactériologique.

2.2. Méthode d'analyse

2.2.1. Examen direct

+ Etude microscopique du lait

En vue de déterminer la présence ou l'absence des leucocytes au niveau du lait une coloration de Gram a été faite comme suite :

- Préparation d'un frottis :
 - sur une lame, ajouter une goutte d'eau distillée stérile.
 - prélever avec l'anse une goutte du lait a examiné, et mélanger le tout pour avoir une suspension homogène.
 - fixer le frottis en passant la lame sur la flamme.
 - mettre la lame dans l'acétone pendant 15min (pour l'éliminer la matière grasse), et laisser le frottis sécher a l'aire.
- Coloration de Gram
 - Recouvrir la lame avec le violet de Gentiane pendant 1 min, rincer la lame par l'eau.
 - Recouvrir la lame avec le Lugol pendant 1minute, au tout d'une minute rincer la lame à l'eau.
 - Décolorer le frottis par l'alcool 95°, rincer brièvement à l'eau.
 - Recolorer la lame avec la fuchsine, durant 30sec.
 - Rincer à l'eau courante et laisser sécher le frottis.
 - Lecture au microscope, objectif x100 à immersion

2.2.2. Etude bactériologique

✓ **Isolement, culture des bactéries du lait mammitieux**

6 milieux de culture (fig.10) ont étéensemencés à partir du lait mammitieux.

❖ **Gélose Chapman** : Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif.

Un critère de différenciation est la fermentation du mannitol révélé grâce au virage de l'indicateur coloré de pH : le virage au jaune du milieu à l'origine rouge ; indique que les colonies sont mannitol (+) car elles fermentent le mannitol dans leur métabolisme énergétique avec acidification du milieu.

❖ **Gélose Hektoen** : est un milieu d'isolement des Salmonelles et des *Shigelles*, bien que de nombreuses bactéries à Gram négatif puissent se développer sur ce milieu.

L'identification d'entérobactéries pathogènes repose sur le non utilisation des glucides présents dans le milieu.

En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène réduisent le citrate ferrique ammoniacal et se manifestent par un noircissement du à l'apparition de sulfure de fer au centre des colonies.

-l'aspect des microorganismes sur l'Hektoen est représenté dans le tableau 8.

Tableau 8: L'aspect macroscopique des bactéries sur le milieu Hektoen

Caractéristique	Microorganismes
Colonies saumon	<i>Escherichia, Levinea, Citrobacter diversus, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Yersinia</i>
Colonies saumon à centre noir	<i>Citrobacter freundii, Proteus vulgaris,</i>
Colonies bleu-vert à centre noir	Suspicion de <i>Salmonella</i> , à différencier de <i>Proteus mirabilis</i>
Colonies bleu-vert ou vertes	Suspicion de <i>Shigella</i> ou de <i>Salmonella</i>
Petites colonies bleues ou brunâtres	<i>Pseudomonas</i>

- ❖ **Gélose BCP** : C'est un milieu non sélectif qui est utilisé la détection et l'isolement des entérobacteriacées dans l'eau, les produits alimentaires, l'urine et les selles.
C'est un milieu contenant une base nutritive ordinaire permettant la poussée des bactéries non exigeantes, il contient un critère de différenciation : la fermentation du lactose est révélée par le virage en milieu acide de l'indicateur coloré de pH, le bromocrésol pourpre.
 - Colonies bleues : bactéries lactose –
 - Colonies jaunes : bactéries lactose +

- ❖ **Gélose au sang** : C'est un milieu d'isolement enrichi sur lequel les Streptocoques se développent bien. Il permet, la lecture du caractère hémolytique, c'est un milieu riche d'autant plus par la présence de sang.
 - Hémolyse β : zone claire d'hémolyse totale de diamètre 3-4 mm entourant les colonies.
 - Hémolyse α : zone floue et granuleuse, verdâtre de 1 à 2 mm de diamètre.

- ❖ **Milieu Cétrimide** : La gélose au cétrimide est un milieu sélectif, qui permet l'isolement des Pseudomonas et notamment de P.aeruginosa. Ce milieu gélosé est relativement pauvre, et contient un antiseptique: le cétrimide (bromure de N-cétyl-N, N, N-triméthylammonium). Ce milieu, proche du milieu King A, favorise aussi la production de pigments par P.aeruginosa.
 - Milieu bleu : pyocyanine,
 - Milieu jaune- vert : pyoverdine

- ❖ **La gélose Columbia** : est un milieu très nutritif permettant les cultures et isolement d'une grande variété de microorganismes et plus particulièrement des germes très exigeants (tels que streptocoques et pneumocoques), à partir de divers prélèvements d'origine animale.

Le protocole expérimental de notre travail est récapitulé dans le schéma suivant :

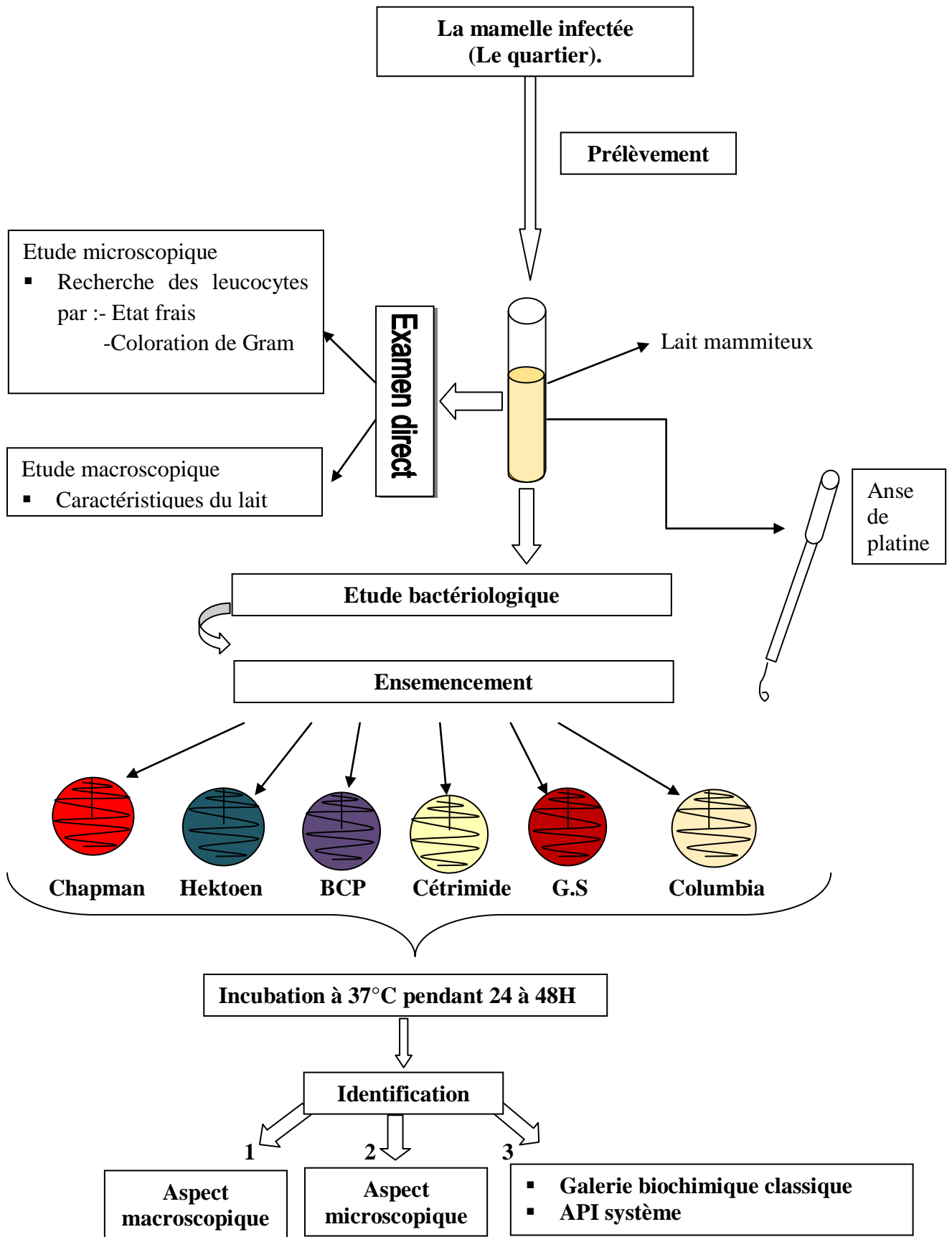


Figure 10 : protocole d'isolement et d'identification des bactéries du lait mammitéux.

✓ **Ensemencement**

Chaque prélèvement a été homogénéisé, puis un volume équivalent à une prise d'anse est déposé sur la gélose et ensemencé par la méthode de stries transversales.

- Les milieux ensemencés sont ensuite placés dans l'étuve à 37°C.

La première lecture est faite après 18 à 24 h, si elle est négative, on prolonge l'incubation à 48 h.

2.2.3. Identification

Aspect macroscopique

L'identification des germes est basée sur l'observation de l'aspect macroscopique des colonies obtenues à partir des différents milieux d'isolement, cette observation servira de moyen d'orientation pour une identification plus approfondie, qui permet de déterminer la couleur, la taille, la forme, le contour et le pouvoir hémolytique des bactéries.

Aspect microscopique

A partir des colonies obtenues sur les différents milieux gélosés, on réalise un examen direct (Etat frais, coloration de Gram) résumé dans le tableau suivant :

Tableau 9: Buts et les méthodes d'examen microscopiques.

	Examen direct a l'état frais	Examen direct après coloration
Le but d'examen	-Permet de connaitre la forme, la taille, la mobilité et l'abondance des bactéries ainsi que leur mode de groupement.	Coloration de Gram -Cette technique traditionnelle a pour but de déterminer l'aspect microscopique de la bactérie et la nature de sa paroi (Gram+ et Gram-), on peut observer la disposition des germes et leur morphologie (cocci, bacille, coccobacille)
La méthode	-Déposer aseptiquement sur une lame porte-objet (propre) une goutte d'eau physiologique. -Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile une colonie a partir du milieu gélosé, l'émulsionner dans la goutte ; puis recouvrir d'une lamelle en évitant la formation de bulles d'air. Lecture : faire l'observation microscopique (x40)	Préparation d'un frottis Avant tout coloration il faut réaliser un frottis -Déposer sur une lame propre une goutte d'eau stérile -Prélever à l'aide de l'anse de platine une colonie bactérienne. -Mélanger afin d'obtenir une suspension homogène. -Réaliser le frottis en partant du centre de la lame en décrivant avec l'anse des mouvements circulaire de façon a obtenir un étalement -Sécher et fixer le frottis au dessus de la flamme du bec bunsen. A partir de la culture à étudier préparer un frottis. -Réaliser une coloration simple au violet de Gentiane, laisser agir pendant 1minute, rincer à l'eau. -Ajouter le lugol et laisser agir pendant 1minute. -Laver à l'eau courante, puis à l'alcool à 95° ; rincer à l'eau -Recolorer avec fuchsine, laissé agir pendant 30 secondes -Rincera l'eau courante égoutté puis sécher au dessus de la flamme de bec bunsen. -Observer au microscope à l'immersion après avoir déposer une goutte de l'huile de cèdre au centre de la lame.

✚ Etudes des caractères biochimiques

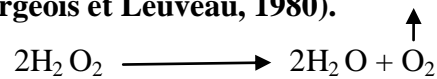
❖ Les entérobactéries

Sont des bacilles gram négatifs, le plus souvent court, immobiles ou mobiles de culture aéro-anaérobies facultatifs, fermentaire, oxydase négatif, catalase positif, nitrate réductase positif.

*Les enzymes respiratoires

➤ Test catalase

La catalase est une enzyme qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec Dégagement d'oxygène (**Bourgeois et Leveau, 1980**).



La technique consiste à déposer une colonie de la culture à tester sur une goutte d'eau oxygénée. Si les bactéries examinées possèdent une catalase, on observe un dégagement immédiat de bulles gazeuses (**Hariri et al., 2009**).

➤ Test oxydase

La technique consiste à utiliser des disques (OX) commercialisés par l'institut Pasteur, ces disques sont imprégnés de l'oxalate de diméthyle paraphénylène diamine, ce composé est oxydé par le système cytochrome C, des bactéries dites oxydase positive en un composé violet.

En pratique, le disque est imbibé avec une ou deux gouttes d'eau distillée stérile et une parcelle de culture prélevée à l'aide d'une anse de platine est alors étalée sur ce disque. La présence d'oxydase se manifeste alors par le développement d'une coloration violette.

Les bacilles fermentaires oxydase négatifs sont présumés Entérobactéries et les oxydases positifs sont considérés non Entérobactéries (NE). (**Mechai, 2009**)

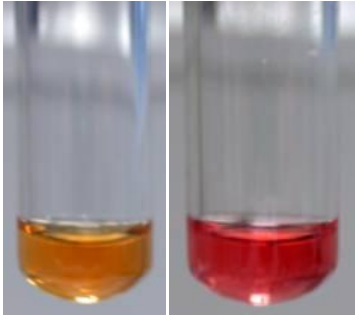

*la galerie biochimique classique

Nous avons utilisé la galerie biochimique présentée dans le tableau suivant :(tab.10)


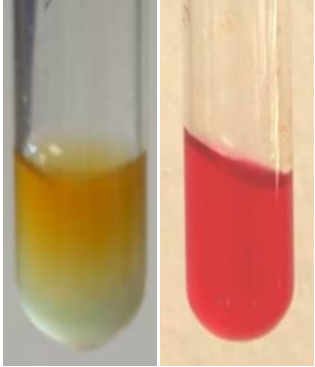
Tableau 10 : Caractères de la galerie biochimique

Milieu	L'ensemencement	Caractères recherchés	Résultat attendu
TSI	<p>-l'ensemencement abondamment la surface par des stries serrées, puis le culot par simple pique.</p> <p>Mettre à l'étuve 24h à 37°C</p>	<p>-Utilisation du glucose</p> <p>-Utilisation du lactose</p> <p>-Utilisation du saccharose</p> <p>-Production H₂S</p> <p>-Production du gaz</p>	<p>-Virage de la couleur vers le jaune : glucose, lactose et saccharose positif(+)</p> <p>-Formation de tache noire (H₂S+)</p> <p>-Bulles de gaz dans le culot, parfois même une surélévation de la gélose.</p> 
Mannitol Mobilité	<p>-Ensemencement par pique centrale à l'aide d'un fil droit.</p> <p>-Incuber pendant 24h à T° optimal.</p>	<p>-mannitol</p> <p>-mobilité</p>	<p>- Caractère mannitol :</p> <p>- milieu jaune : Mannitol +</p> <p>- milieu rouge : Mannitol –</p> <p>- La mobilité : Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle ; (formation d'un voile autour de la pique).</p> 

Suite de tableau 10 : caractères de la galerie biochimique

Milieu	L'ensemencement	Caractères recherchés	Résultat attendu
Citrate de Christensen	-l'ensemencement sur la surface par des stries serrées. - Mettre à l'étuve 24h a 37°C	-utilisation du citrate et La formation d'ions hydroxyle alcalinise le milieu.	virage de la couleur du jaune vers le rose : citrate + Si le milieu persiste jaune : Citrate -
Urée indole	-Ensemencement largement. -Incuber 24h à 37°C Test d'indole -Après incubation on ajoute à la culture le réactif à l'indole de kovacs	-l'uréase , enzyme hydrolysant l'urée, activité directement détectable par le suivi de l'alcalinisation. Formation d'indole : la tryptophanase, après addition du réactif de Kovacs. Le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase, et forme un composé coloré en rouge	La coloration rouge : traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée et formation de carbonate d'ammonium : uréase+ Si le milieu persiste orangé alors pas d'alcalinisation test uéase –  -Formation d'un anneau rouge : indole + - Absence de coloration rouge : indole – 

Suite de tableau 10 : caractères de la galerie biochimique

Milieu	L'ensemencement	Caractères recherchés	Résultat attendu
Clark et lubs	<p>Ensemencer largement.</p> <p>Incuber 24 h à t°C optimale.</p> <p>1. test VP :</p> <ul style="list-style-type: none"> - ajouter 10 gouttes d'alpha naphthol et le même volume de soude concentrée (ou de potasse). - incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation. - attendre quelques min à 1 heure. <p>2. test RM :</p> <ul style="list-style-type: none"> - ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle. - la lecture est immédiate. 	<p>-production de l'acétone</p> <p>-la réaction de voges proskauer (vp) consiste à mettre en évidence, par une réaction colorée, le butanediol et l'acétone</p> <p>-mise en évidence de la voie des fermentations acides mixtes par le test RM (au rouge de méthyle</p>	<p><u>Test VP :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - rouge : VP+ - jaune : VP  <p><u>Test RM</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - rouge : RM+ - jaune : RM- 


***Les tests complémentaires**

✓ **Recherche de la bêta-galactosidase (ONPG)**

La recherche de B- galactosidase ou test ONPG permet de détecter l'enzyme capable de scinder la molécule de lactose positif, des bactéries lactose négatives. Ce test est pratiqué uniquement pour toute bactéries lactose (-), en 24h sur milieu solide.

Le tableau suivant explique le test de l'ONPG (tab.11) :

Tableau 11 : Caractères de test Béta-galactosidase.


Technique	Caractères recherchés	résultats
-on utilise ONPG -A partir de milieu lactosé Exemple (BCP) *réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée. *ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque d'ONPG. *incuber 30 min à 37°C.	- une β -galactosidase	- Milieu jaune : ONPG + - Milieu sans couleur : ONPG – 

✓ Test TDA

La désaminase agit sur le L-tryptophane en donnant l'acide indole-pyruvique : l'acide indole pyruvique donne avec le perchlorure de fer une coloration brune rouge.

Le test est réalisé sur le milieu urée-indole selon le tableau suivant. (Tableau 12)


Tableau 12: les caractères de test TDA

Techniques	Caractères recherchés	Résultats
-Faire une suspension en milieu Urée-tryptophane. -étuver -ajoute 2 à 3 gouttes du réactif de TDA	Le tryptophane désaminase (TDA): après addition de chlorure de Fer III. Le Fer III forme un complexe avec le produit de l'activité de la TDA, l'acide indole-pyruvique, complexe décelable par la formation d'un précipité marron.	- Obtention d'un précipité brun foncé : TDA + - Absence de précipité : TDA - . 

✓ **Test de : décarboxylase ODC, LDC et des dihydrolase ADH bactériennes**

Le diagnostic différentiel des espèces appartenant aux familles des *Enterobactéries*, et *Pseudomonadaceae*, est souvent facilité par la recherche de la lysine décarboxylase (LDC), de l'ornithine décarboxylase (ODC) et de l'arginine dihydrolase (ADH).

Tableau 13 : recherche des lysines, ornithine décarboxylases.

Techniques	Caractères recherchés	Résultats
Ensemencer le milieu de Moeller avec une goutte de suspension. Agiter (si le tube n'est pas plein le recouvrir de vaseline stérile). -milieu moeller (Témoin) -moeller + lysine (LDC) - moeller + ornithine(ODC) Fermer le tube entièrement afin de créer une anaérobiose relative. Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.	Les décarboxylases LDC ODC 	- une bactérie non décarboxylante utilisera les peptones du milieu, et produira des acides organiques ainsi que des bases faibles comme l'ammoniac. Le milieu deviendra jaune . - une bactérie décarboxylante après avoir utilisé le glucose va produire du dioxyde de carbone et des amines. L'alcalinité des amines est importante, et le virage de l'indicateur de pH sera obtenu : le milieu restera violet .

***Etude des caractères biochimique par la galerie API 20E**

C'est une galerie miniaturisée (commercialisée), révélant de 10 à 20 caractères différents (fig.11) permettant une identification rapide des *Enterobacteriaceae* et autre bacilles Gram négatif non fastidieux.

➤ **Principe**

La galerie API 20E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide de tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.



Microtube contenant le milieu déshydraté

la cupule

Figure 11: Galerie API 20E

➤ **Mode opératoire**

L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :

- ✓ Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles de la boîte pour créer une atmosphère humide, puis déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- ✓ Remplir tubes et cupules des tests : ICIT1, IVPI, IGEL1, avec la suspension bactérienne
- ✓ Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) les autres tests.
- ✓ Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H2S en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine.
- ✓ Refermer la boîte d'incubation (fig.12), coder et placer à 37°C pendant 18-24 heures.



Figure 12: Galerie API 20E ensemencée.

➤ Lecture

Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées, ensuite réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : test VP, TDA, IND... (fig.13)

La lecture de ces tests est faite après 10 à 15 min.

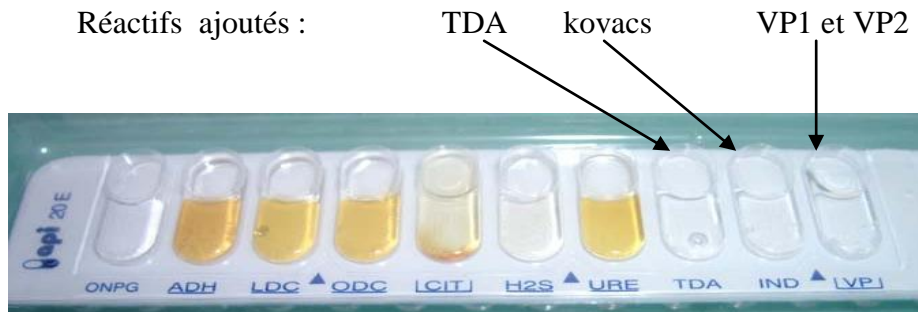


Figure 13: L'addition des additifs.

➤ L'identification

✓ Avec le catalogue analytique

Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1ou2ou4) est positive suivant l'ordre de l'emplacement de la cupule dans le groupe, ensuite on obtient un nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification avec un logiciel d'identification ou un tableau d'identification.

✓ Avec le tableau d'identification

Comparer les réactions notées sur la fiche des résultats avec celle du tableau décrit en (Annexe I).

✓ Avec un logiciel d'identification.

❖ Les staphylocoques

Sont des coques à Gram positifs, immobiles, en générale groupés en amas dans un plan irrégulier, mais on peut les rencontrer également sous forme de diplocoques, en tétrades, ou en courtes chainettes. (tab.14)

- Les souches de *Staphylococcus aureus* forment des colonies luxuriantes et élaborent leur propre pigment. Les colonies s’entourent en 24 à 48 heures d’une auréole jaune due à la fermentation du mannitol.

***Les enzymes respiratoires**

 **Test catalase**

Toutes les espèces du genre *Staphylocoque* sont catalase positives.

***La galerie biochimique classique**

 **Test de la Coagulase libre**

Après incubation, prendre aseptiquement une demi-colonie dans un tube stérile à hémolyse contenant 0,3 ml de plasma de lapin (ou de l'homme), et on laisse incuber à nouveau à 37°C pendant 12 h.

La coagulase induit une coagulation du plasma de lapin : on observe un caillot qui se forme en quelques minutes à quelques heures pour les bactéries à coagulase positive, alors que le milieu reste liquide pour les bactéries à coagulase négative. Ce test permet de faire la distinction entre les (SCN) et (SCP : *S. aureus*) (tab.14)

Tableau 14 : Tableau d’identification des staphylocoques

<i>Staphylocoque</i>	<i>aureus</i>	<i>intermedius</i>	<i>epidermidis</i>	<i>saprohiticus</i>
Catalase	+	+	+	+
Coagulase	+	-	-	-
Mannitol	+	-	+/-	+

***Etude des caractères biochimique par la galerie API Staph**

API Staph est un système standardisé pour l’identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria* comprenant des tests biochimiques miniaturisés.

- **Principe :** est le même que la galerie API 20E. (fig.14)



Figure 14: Galerie API Staph

➤ **Mode opératoire**

L'opération s'effectuée selon les étapes suivantes :

- ✓ Réunir le fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles de la boîte pour créer une atmosphère humide, puis déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- ✓ Préparation de l'inoculum :
 - A partir d'une culture jeune (18-24 heures) de la souche à identifier, ensemercer une ampoule d'API Staph Medium jusqu'à l'obtention d'une suspension bactérienne homogène, d'opacité égale à 0,5 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.
- ✓ A l'aide d'une pipette, remplir les tubes de la galerie avec l'API Staph Medium ensemercé. Ne remplir que les tubes et non les cupules.
- ✓ Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- ✓ Renfermer la boîte d'incubation (Fig.15)
- ✓ Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18-24 heures.

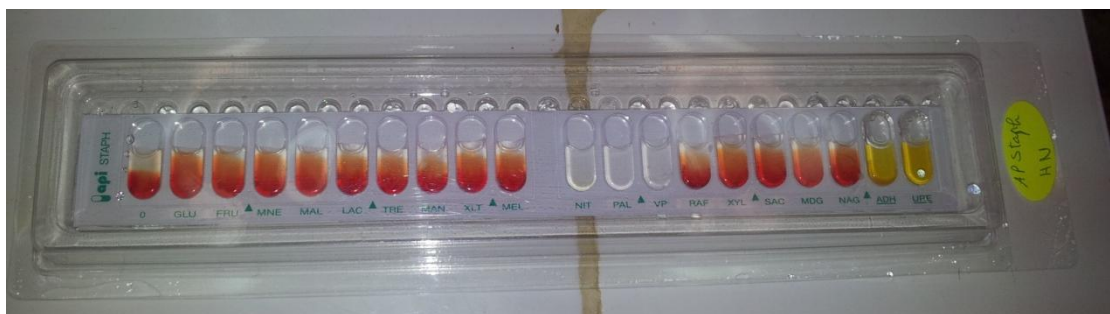


Figure 15 : Galerie API Staph ensemercée.

➤ **Lecture**

Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées, ensuite réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs :

✓ Test VP : VP1 et VP2

Attendre 10 minutes, une couleur rose franche ou violette indique une réaction positive.

✓ Test NIT : NIT1 et NIT2

Attendre 10 minutes, une coloration rouge indique une réaction positive.

✓ Test PAL : ZYM A et ZYM B

Attendre 10 minutes, une coloration violette indique une réaction positive.

➤ **L'identification**

✓ Avec le catalogue analytique.

✓ Avec le tableau d'identification.

✓ Avec un logiciel d'identification.

❖ **Les Streptocoques**

Sont des coques Gram positifs ronds ou ovoïdes, groupés en chainettes plus ou moins longues ou en diplocoque, anaérobies facultatifs, catalase-.

Puisque la gélose au sang permet l'isolement de différentes souches (Staphylocoques et Streptocoques), nous avons utilisé le test de catalase pour les différencier.

***les enzymes respiratoires**

Test catalase

A la différence des staphylocoques, les streptocoques sont caractérisés par l'absence de la catalase.

***Etude des caractères biochimique par la galerie API 20Strep**

API 20Strep est un système standardisé associant 20 tests biochimiques (fig.16), qui représentent un grand pouvoir discriminant. Il permet de faire un diagnostique de groupe ou

d'espèce pour la plupart des streptocoques, entérocoque et pour les germes apparentés les plus courants.

- **Principe** : est même que la galerie API 20E et API Staph



Figure 16: Galerie API 20Strep

- **Mode opératoire**

Après isolement et vérification de l'appartenance de la souche à identifier à la famille des Streptococcaceae (coloration de Gram, catalase)

L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :

- ✓ Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles de la boîte pour créer une atmosphère humide, puis déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- ✓ Préparation d'inoculum :
 - Ouvrir une ampoule d'API suspension Médium (2ml), à l'aide d'un écouvillon, prélever toute la culture préalablement préparée.
 - Réaliser une suspension très dense : opacité supérieure à 4 de McFrand.
- ✓ Dans la première moitié de la galerie (tests VP à ADH) répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles :
 - pour les tests VP à LAP : environ 100µl dans chaque cupule.
 - pour le test ADH : remplir uniquement le tube.
- ✓ Dans la deuxième moitié de la galerie (test RIB à GLYG)
 - ouvrir une ampoule d'API GP Medium, et y transférer le reste de la suspension, soit 0,5ml au minimum, bien homogénéiser.
 - répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement

- ✓ Créer une anaérobiose dans les tests ADH à GLYG en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- ✓ Renfermer la boîte d'incubation (fig. 17)
- ✓ Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en aérobie pendant 4h – 4H30 pour une première lecture et 24 heures si nécessaire pour une deuxième lecture.



Figure 17: Galerie API 20Strepensemencée.

➤ Lecture

- Ajouter les réactifs :

-Test VP : 1goutte de VP1 et VP2

-Test HIP : 2 gouttes de NIN

-Test PYRA, GAL, GUR, GAL, PAL, LAP : 1goutte de ZYM A et ZYM B.

➤ L'identification :

- ✓ Avec le catalogue analytique.
- ✓ Avec le tableau d'identification.
- ✓ Avec un logiciel d'identification.

3. Tests de l'activité antibactérienne

3.1. Préparation des extraits

Les extraits (lyophilisats) sont solubilisés dans le méthanol à 85%. Les solutions obtenues, sont maintenues au réfrigérateur à 4 °C dans des tubes à essais pendant 24 h pour une meilleure solubilisation.

3.2. Origine des souches testées

Les bactéries utilisées dans ce travail sont:

- Des souches de référence suivantes : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, et *Escherichia coli* ATCC 25922
- Des souches cliniques isolées des vaches atteintes de mammites : *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*.

Ces bactéries sont conservées et maintenues en vie par des repiquages continus, sur divers milieux de culture solides et liquides, selon les espèces.

Pour assurer la survie des bactéries, le milieu de culture utilisé est : Muller – Hinton

❖ Préparation de l'inoculum

La méthode de préparation des inoculum est celle préconisée par la SFM (communiqué de 2005) qui consiste à préparer, à partir d'une culture de 18 à 24h en milieu solide, 2 à 4 colonies bien isolées, sont prélevées et mises en suspension dans 10ml de solution stérile de NaCl 0,9%. La turbidité de cette suspension microbienne est ajustée à celle d'une suspension standard (densité 0,5 de l'échelle McFarland).

Cet inoculum contient environ 1 à 2 x 10⁸ UFC/ml. A un niveau proche, on a mesuré l'absorbance de la suspension bactérienne (absorbance doit être proche de 0,1 à 625nm) (standardisation de l'antibiogramme selon l'OMS, 1999). Comme suite :

- ✓ À partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement (ayant au maximum 24h), racler à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette pasteur scellée, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- ✓ Décharger l'anse ou la pipette pasteur dans 10 ml d'eau physiologique
- ✓ Bien homogénéiser la suspension bactérienne.

❖ Mode d'ensemencement

L'ensemencement doit se faire au moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

Le milieu de culture utilisé est Muller – Hinton (4mm d'épaisseur) qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

- ✓ On a trempé un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (il évite la contamination du manipulateur et de la paillasse) et on a étalé la surface entière de la gélose à trois reprises, faisant un frottement de haut en bas, en stries serrées, et en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum.
- ✓ Enfin, on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose.
- ✓ Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

3.3.Essais antibactériens

3.3.1 Test du méthanol (MeOH)

Après l'ensemencement de milieu de culture, des disques de papier Whatman n°3 (ou autre type de papier buvard), découpés en disques de 6 mm de diamètre et stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C, sont imprégnés des dilutions décroissantes de méthanol (méthanol pur, méthanol 85%, et 50%) à raison de 10µl par disque :

Ont été déposés stérilement à l'aide d'une pince sur la surface de la gélose, les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37°C.

La lecture de résultats est faite par la mesure des zones d'inhibition.

3.3.2 Tests de l'activité antibactérienne des extraits

Trois méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antimicrobien des différents extraits bruts de *Thymus ciliatus* et *Teucrium polium* : la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier (Essawi et Srour, 2000) qui permet la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des différents extraits, la méthode de puits et la méthode de l'activité antibactérienne en milieu liquide (Billerbecket *et al.*, 2002) qui ont pour objectif de déterminer des CMI (concentrations minimales inhibitrices) à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture.

3.3.2.1 Méthode de diffusion à partir d'un disque solide (antibioaromatogramme)

La méthode de diffusion à partir d'un disque solide a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des extraits bruts vis-à-vis des germes pathogènes.

Les deux extraits des deux plantes sont solubilisés dans le méthanol (MeOH), la gélose appropriée est coulée dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre et inoculée avec une suspension microbienne pure fraîchement préparée.

Des disques stériles sont imprégnés avec des concentrations décroissantes (200mg/ml, 100mg/ml, 50mg/ml, 25mg/ml et 10mg/ml) d'extraits à raison de 10µl par disque, ont été déposés stérilement à l'aide d'une pince sur la surface de la gélose, un espace de 15 mm est laissé entre le bord de la boîte et le disque pour éviter les effets de bord, et de 30 mm entre les centres des différents disques pour éviter l'interférence des zones d'inhibition. Les boîtes sont incubées à l'étuve à 37 °C pendant 24h.

La lecture de résultats est faite par la mesure des zones d'inhibition.

3.3.2.2 Méthode de l'activité antibactérienne en milieu liquide

La méthode de dilution consiste à préparer une série de tubes de bouillon nutritif (5ml) contenant des concentrations d'extrait correspond à « 200- 100- 50 – 25 - 12,5 -6,25 - 3,12 - 1,56 et 0,78 mg/ml » et on inocule avec une population de l'organisme à tester (à raison de 2 gouttes par tube).

Deux témoins sont effectués : (Bouillant nutritif additionné à 1ml de l'extrait, bouillant nutritifensemencé par l'inoculum).

Les séries sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

La CMI se définit comme la plus petite concentration d'extrait pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans extrait.

3.3.2.3 Méthode de puits

Après les 15minutes de préparation de l'inoculum, on a trempé un écouvillon dans la suspension et on a étalé la surface entière de la gélose (Gélose Mueller Hinton et gélose Mueller Hinton au sang) à trois reprises, en tournant, la boîte à environ 60° à chaque fois, puis on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose, par la suite à l'aide d'une pipette pasteur stérile ont effectué des puits de 6 mm de diamètre, qui recevront chacun 100µl de la solution à tester.

3.3.3 Tests de l'activité antibactérienne des extraits sur les souches cliniques

- Pour chaque souche bactérienne nous avons réalisé différents tests, en employant la méthode de puits
 - ✚ Les 2 extraits séparément ;
 - ✚ Une synergie (mélange des deux extraits) ;
 - ✚ Antibiogramme ;
 - ✚ Un mélange d'Antibiotique + Extrait.
- Puis les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h.

3.3.3.3 Les 2 extraits séparément

Nous avons remplis les puits par différentes concentrations de nos extraits à raison de 5 concentrations par boîtes (300, 200, 100, 50, 25 mg /ml de méthanol, méthanol 85%).



Figure 18 : Application de l'extrait de *Teucrium polium* et de *Thymus ciliatus*

3.3.3.4 La synergie

Si deux produits, agissent simultanément sur un organisme, produisent un effet qui est supérieur à la somme des effets de chacun d'eux, administré séparément, on dit que ces produits agissent en synergie.

Dans notre travail nous avons réalisé un mélange de deux extraits (Extrait de Thymus+ Extrait de Germandrée) ayant la même concentration (100mg d'extrait/ml) en raison de 50µl de chacun.

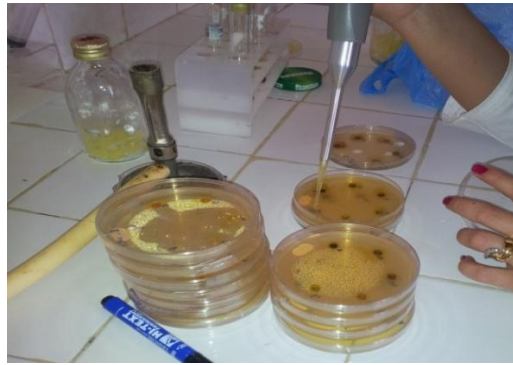


Figure 19 : Synergie de deux extraits de *Teucrium polium* et de *Thymus ciliatus*

3.3.3.5 Antibiogramme

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

Dans notre étude nous avons choisis 6 antibiotiques (tab.15) qui sont utilisés généralement en médecine vétérinaire pour le traitement des mammites.

Tableau 15: les antibiotiques utilisés

ATB	Pénicilline (P)	Tétracycline (TE)	Erythromycine (E)	Céfotaxime (CTX)	Ampicilline (AMP)	Chloramphénicol (C)
Charge de disques	10µg	30 µg	15 µg	30 µg	10 µg	30 µg

➤ Réalisation de l'antibiogramme

L'antibiogramme a été réalisé in vitro selon la méthode de diffusion en milieu gélosé (fi.20).

À l'aide d'une pince, des disques d'antibiotiques sont déposés (6 disques par boîte)

Après étuvage à 37 °C pendant 24 heures nous pouvons obtenir des diamètres (zone d'inhibition) autour des pastilles d'antibiotique.



Figure 20 : Réalisation de l'antibiogramme pour les différentes souches.

3.3.3.6 Combinaison d'antibiotique/ Extrait

Dans deux différentes boites de pétri, on a déposé les disques d'antibiotiques sur le milieu gélosé MH, puis 10µl de l'extrait de *Thymus* ont été ajoutés dans l'une des boites et le même volume de l'extrait de *Teucrium* pour l'autre boite.



Figure 21: Mélange d'ATB /extraits de *Teucrium polium* et de *Thymus ciliatus*

3.3.4 Lecture des résultats

En mesurant à l'aide d'une règle les diamètres des halos clairs (zones d'inhibition) tout autour des disques ou des puits.

Antibioaromatogramme

Les bactéries seront classées selon le diamètre d'inhibition dans l'une des catégories suivantes: résistante, sensibilité limité, sensibilité moyenne et très sensible comme le montre le tableau 16 :

Tableau 16: Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition.

Diamètre d'inhibition	≤ 8 mm	8 à 14 mm	14 à 20 mm	≥ 20 mm
Sensibilité du germe	Résistante	Sensibilité limitée	Sensibilité moyenne	Très sensible
Degré d'activité	(-)	(+)	(++)	(+++)

Antibiogramme

Les mesures obtenues seront comparées aux tableaux de lecture des ATB de la SFM (2005). (Annexe III).

1. Résultats de l'étude phytochimique

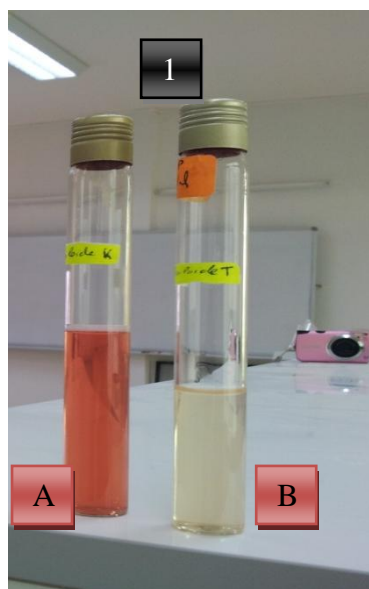
1.1. Tests préliminaires de la composition chimique

Le screening phytochimique de *Thymus ciliatus* et *Teucrium polium* a permis de mettre en évidence divers métabolites secondaires, les résultats sont exprimés dans le tableau suivant. (tab.17)

Tableau 17: Screening phytochimique des deux plantes.

Plante	Tests					
	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Tanins	Saponosides	Cardénolides cardiotoniques	Stérols et terpènes
<i>Thymus ciliatus</i>	-	+	+	+	-	+
<i>Teucrium polium</i>	+	+	+	+	+	+

(-) : absence ; (+) : présence



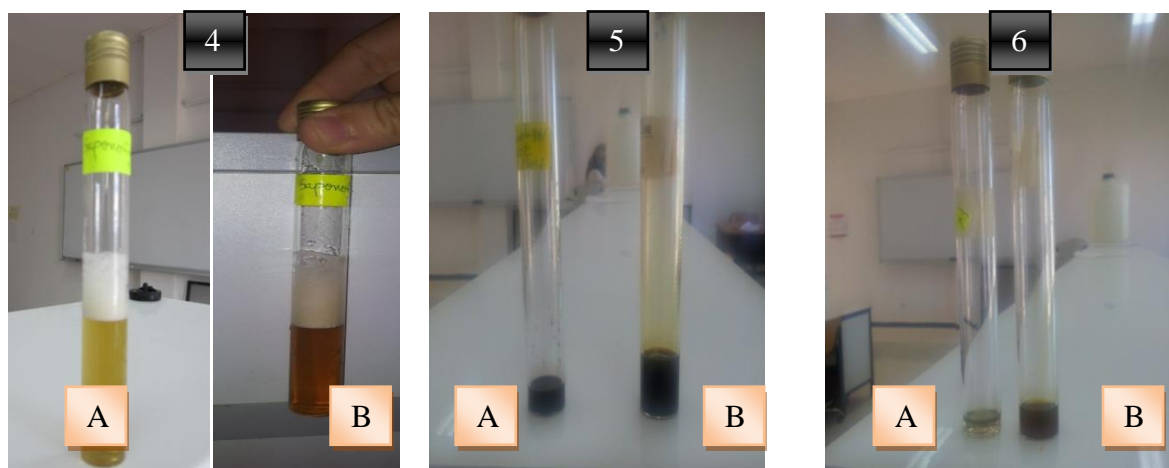


Figure 22 : Testes préliminaires des deux plantes (A : *Teucrium polium* B : *Thymus ciliatus*) (1 : Alcaloïdes, 2 : Tanins, 3 : Flavonoïdes, 4 : saponosides, 5 : Cardénolides cardiotoniques 6 : Stérols et terpènes)

Les tests de la composition chimique réalisés sur la poudre de *Teucrium polium* révèlent la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, stérols et triterpènes, saponosides, les tanins et les cardénolides cardiotoniques.

Nos résultats présentent des similarités à ceux de **Hasani et al., (2007)**, et de **Al-kufaishi et al., (2012)** lors de la révélation des compositions chimiques de la plante *Teucrium polium*.

Le screening phytochimique de *Thymus ciliatus* révèlent la présence des flavonoïdes, des stérols et triterpènes, saponosides, les tanins, Par contre les alcaloïdes, et les cardénolides cardiotoniques ont été absents dans l'échantillon analysé.

D'après ces résultats, on déduit que les deux plantes *Teucrium polium* et *Thymus ciliatus*, comme d'autres espèces de la famille des Lamiacée, sont riches en divers métabolites secondaires, ce qui explique l'intérêt et l'attention particulière portée par les chercheurs à travers les études scientifiques sur ces deux plantes. (**Naghibi et al., 2005**).

1.2. Extraction des polyphénols

Les deux plantes ont été soumises à l'extraction des composés phénoliques, avec une gamme de solvants. Et le Tableau 18 donne l'aspect, la couleur, le volume et la masse de chaque extrait phénolique obtenus :

Tableau 18: Différents caractères des deux plantes

Plantes (poudre)	Extrait avant lyophilisation		Extrait après lyophilisation		Rendement
	Aspect et couleur	Volume (ml)	Aspect et la couleur	Masse de l'extrait lyophilisé (g)	
<i>Thymus ciliatus</i> (100g)	marron-foncée	61	Pate collante marron	5,2	5,2%
<i>Teucrium polium</i> (50g)	vert-foncée	26	Pate vert	4,12	8,24%

Dans ce présent travail, à partir de 100 g de *T. ciliatus* et 50g de *T. polium*.

Une pate brune foncée collante de *T. ciliatus* et une poudre vert foncée de *T. polium* sont récupérées.

L'extraction méthanolique a donné un rendement de 5,2% pour *T. ciliatus* et 8.24 % pour *T. polium*.

Cette différence semble être liée aux caractères chimiotypiques ; de plus, aux propriétés génétiques des plantes, aux conditions et à la durée de stockage et de la récolte.

En outre, le solvant d'extraction emporte des substances non phénoliques comme les sucres et les Protéines. (Djeridane et al., 2006)

1.3. Analyse phytochimique des extraits méthanolique

✚ Chromatographie sur couche mince (CCM)

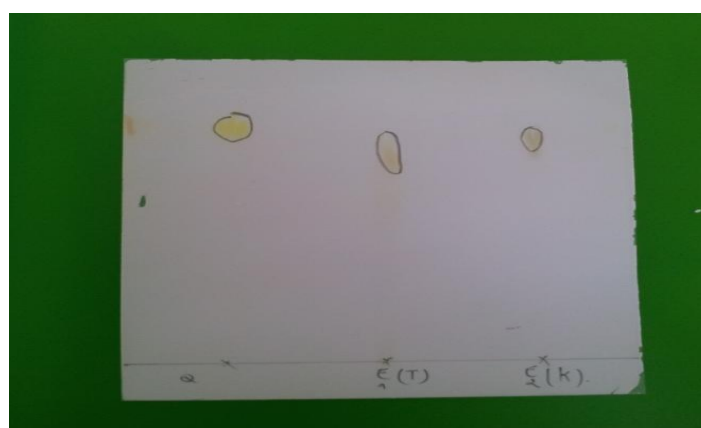


Figure 23 : CCM des deux extraits

(Q : Quercétine, E₁ : *Thymus ciliatus*, E₂ : *Teucrium polium*)

Après révélation de la plaque CCM par le biais d'une solution Ninhydrinique, le chromatogramme montre pour la solution du référence (Quercétine) ; une tache jaune-verte alors que la solution à examiner est caractérisée par une tache verte-clair pour l'extrait (E₂) et une tache marron-clair pour l'extrait (E₁).

La plaque obtenue présente une bonne migration par conséquent une bonne séparation qui permet l'analyse qualitative des composés flavonoïques.

la chromatographie sur couche mince que nous avons effectuée sur les deux extraits, nous a permis de confirmer la présence des taches similaires à la quercétine ; qui est caractérisant par leurs propriétés pharmacologiques.

✚ Dosage des polyphénols

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de Folin-Ciocalteu en utilisant comme standard l'acide gallique (fig.24), les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg EQ/g d'extrait.

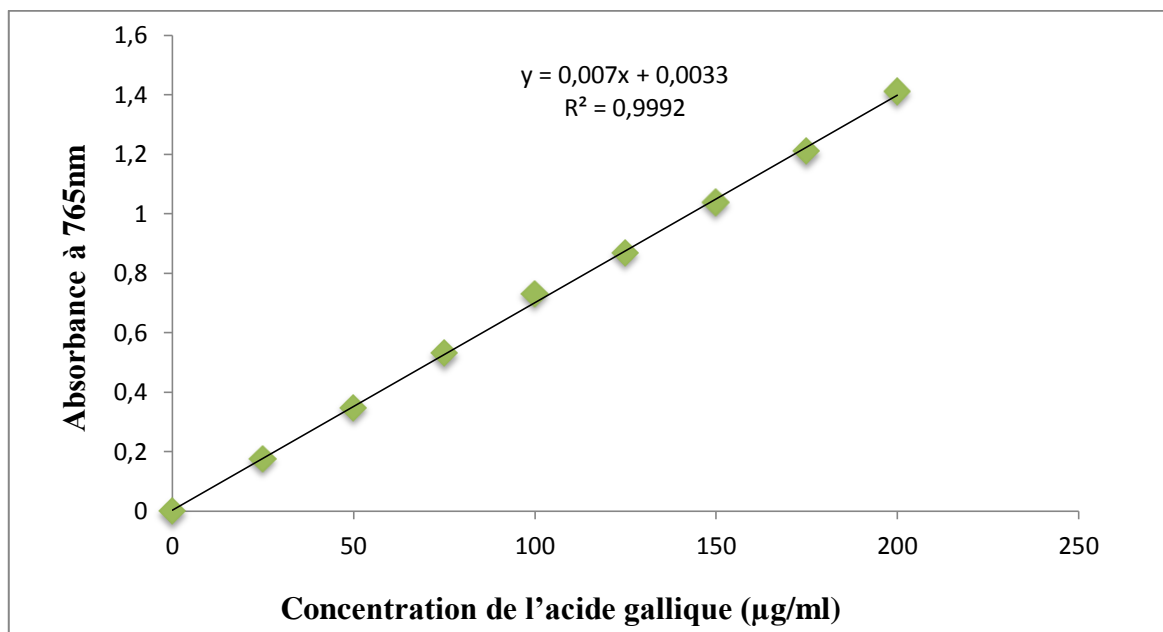


Figure 24 : Droite d'étalonnage des polyphénols.

Les polyphénols obtenus en équivalent d'acide gallique en mg par g d'extrait, montre que : l'extrait de *Thymus ciliatus* représente la teneur la plus élevée en polyphénols avec 36mgEqAG/g d'extrait, ce résultat confirme la grande richesse de cette plante en substances polyphénoliques.

L'extrait de *Teucrium polium* représente une concentration de polyphénols avec 29,33mg Eq AG/g d'extrait.

Djeridane *et al.*, (2006) et Proestos *et al.*, (2006), rapportent que la plante *Teucrium polium* est riche en composés phénoliques.

La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols.

En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (Falleh *et al.*, 2008).

✚ Dosage des flavonoïdes

La raison principale pour la quelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante.

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d' AlCl_3 en utilisant comme standard la quercétine, les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg EqQ/g d'extrait.

L'évaluation quantitative des flavonoïdes montre (fig.25) une corrélation positive entre la variation de ce flavonoïde (0 à 40 $\mu\text{g/ml}$) et l'absorbance avec un coefficient de corrélation $R = 0,99$.

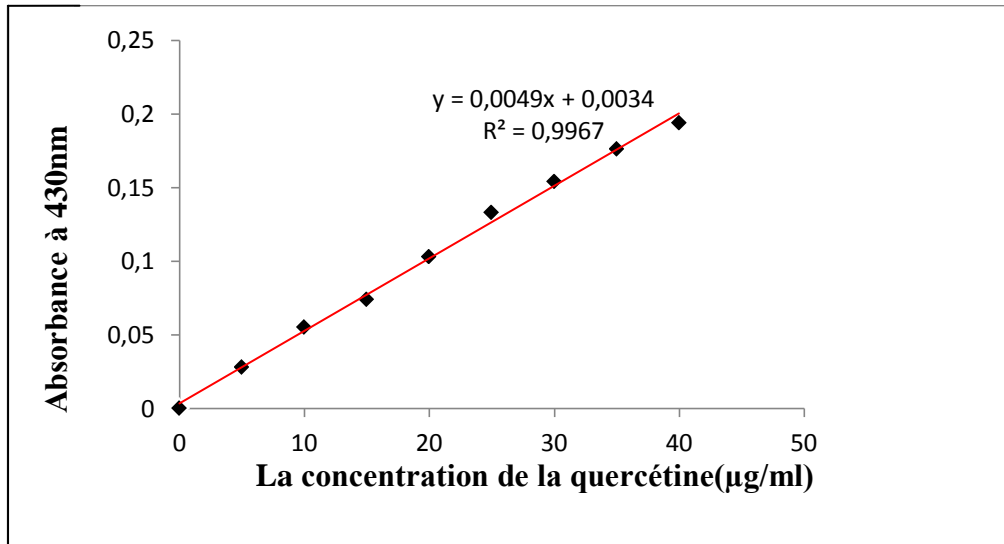


Figure 25 : Droite d'étalonnage des flavonoïdes

Les résultats indiquent que le *Thymus ciliatus* présente la teneur la plus élevée en flavonoïdes qui est de 29,51 mg EqQ/g d'extrait en le comparant avec *Teucrium polium* dont son extrait contient 22,36mg EqQ/g d'extrait.

Les teneurs élevées en composés phénoliques par comparaison aux flavonoïdes sont logiques étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols. Ceci

peut être aussi expliqué par une augmentation du métabolisme phénolique de ces deux plantes, en plus, l'existence d'une liaison avec les conditions de culture et climatiques dures telles que les températures élevées, la durée d'exposition solaire, la nature du sol, la saison de croissance (Djeridane *et al.*, 2007).

✚ Evaluation du pouvoir oxydant

L'évaluation de l'activité antioxydante (fig.26) des extraits bruts de deux plantes : *Thymus ciliatus* et *Teucrium polium* a été fait en comparaison avec l'antioxydant : l'acide ascorbique

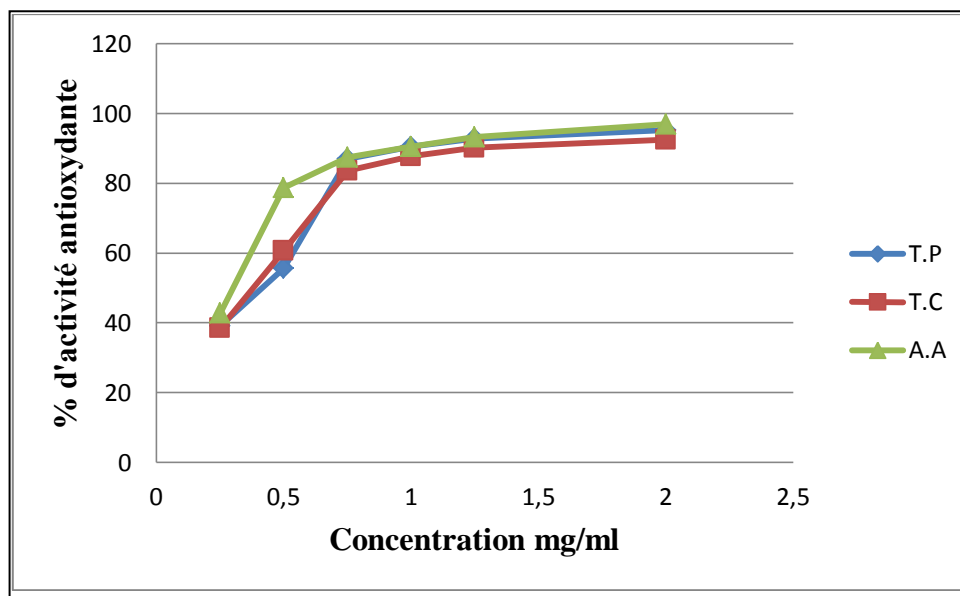


Figure 26 : Activité antioxydante des 2 extraits/ standard.
(**T.P** : *Teucrium polium* ; **T.C** : *Thymus ciliatus* ; **A.A** : Acide ascorbique)

Les résultats obtenus, montre que le pouvoir oxydant des extraits méthanolique vis à vis du DPPH°est marqué.

Le pouvoir le plus élevé (95, 23 %) est observé pour *Thymus ciliatus*; équivalent à celui qu'exerce la vitamine C (96 ,87%), et de (92,48) pour *Teucrium polium*.

Des résultats similaires ont été déterminés sur l'activité antioxydante de *Thymus ciliatus* par (Kabouche *et al.*, 2004).

2. Résultats de l'étude biologique

2.1. Examen clinique des vaches mammitesuses

Les vaches atteintes de mammites présentent (fig.27), des signes cliniques au niveau de la mamelle tels que les œdèmes, en plus des signes fonctionnels tels que le changement de la couleur du lait et la diminution de la sécrétion lactée.



Figure 27: Photographie d'une mammite clinique.

(1 : Gonflement de la mamelle, 2 : Inflammation et asymétrie des quartiers.)

(Photo personnelle, 2013)

2.2. Examen direct du lait prélevé

🚦 Aspect macroscopique du lait

L'observation macroscopique des laits prélevés à partir des quartiers malades montre un changement de la couleur du lait par rapport au lait d'une mamelle saine (fig.28)

L'ensemble de modifications constatées est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 19: Aspect macroscopique du lait.

Prélèvements	Etude macroscopique
1 ^{er} prélèvement	Présence de grumeaux, lait de couleur brunâtre.
2 ^{ème} prélèvement	Lait muqueux; sanguinolent
3 ^{ème} prélèvement	Présence de grumeaux, lait de couleur jaunâtre
4 ^{ème} prélèvement	Présence des grumeaux, lait de couleur jaunâtre et d'une odeur désagréable
5 ^{ème} prélèvement	Lait écrémé de couleur jaunâtre

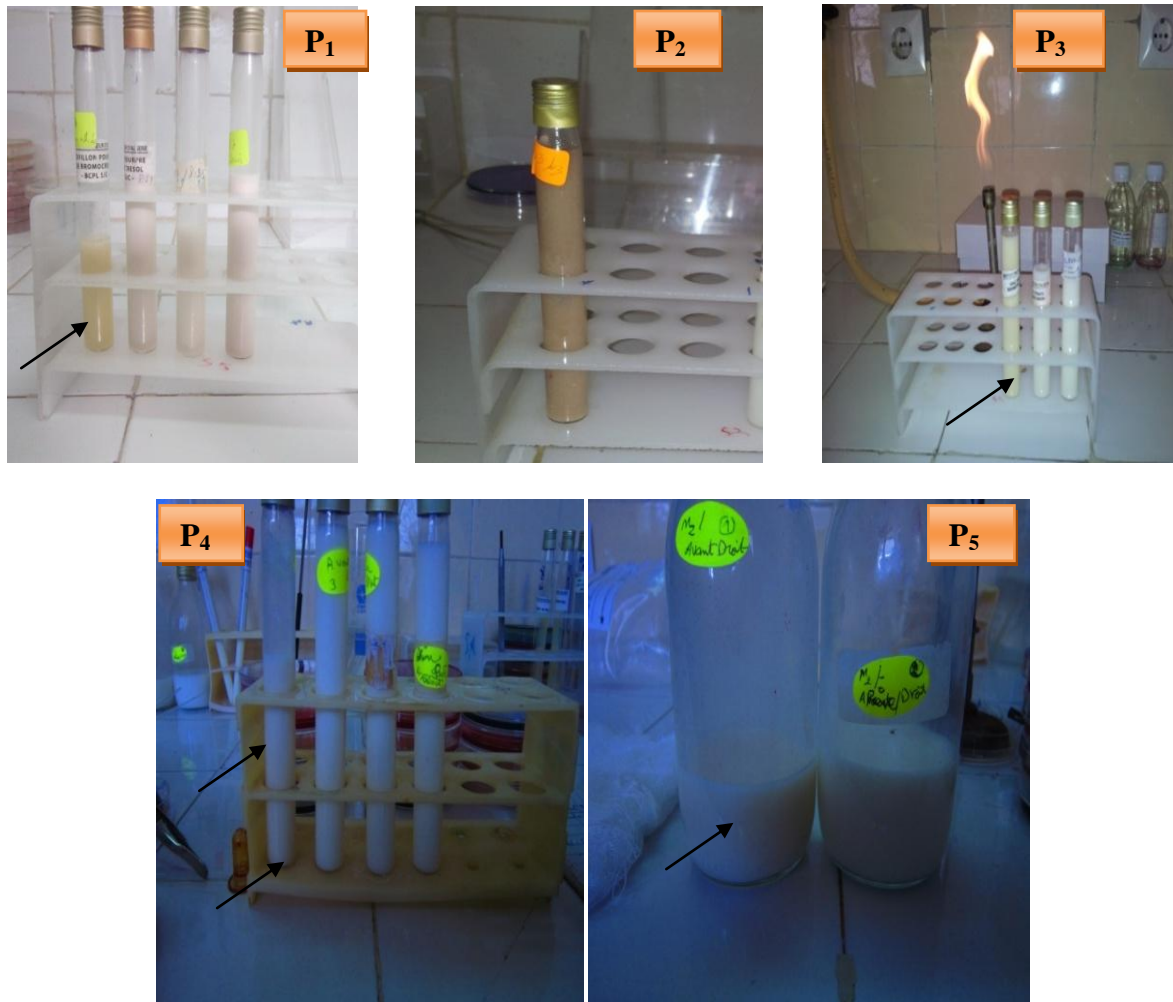


Figure 28 : Aspect macroscopique des laits mammitieux
(P : Prélèvement)

✚ Aspect microscopique du lait

L'analyse microscopique des laits prélevés à partir des différents quartiers malades après coloration montre une augmentation des leucocytes en comparaison avec leur nombre dans le cas du quartier sain.

Signe relatif d'une défense immunitaire en présence d'une éventuelle infection. (fig.29)

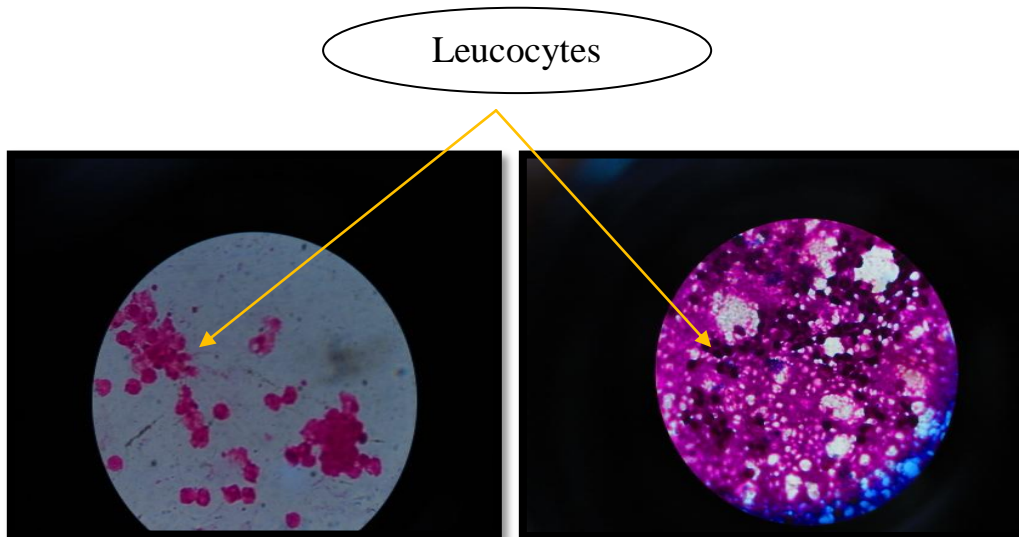


Figure 29: Présence des leucocytes dans le quartier malade

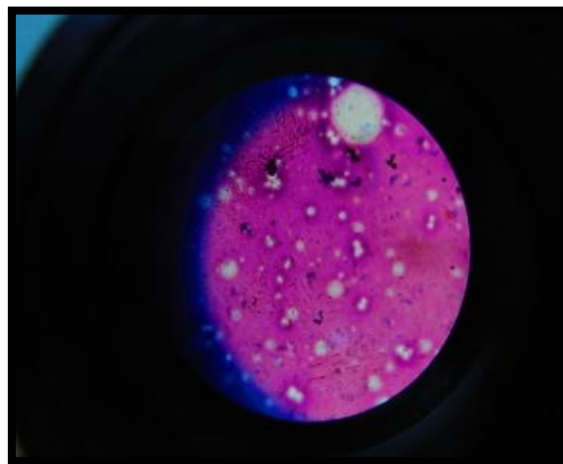



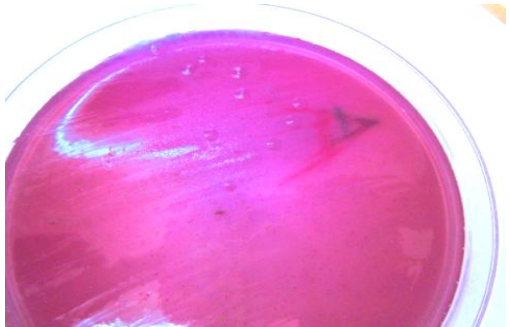
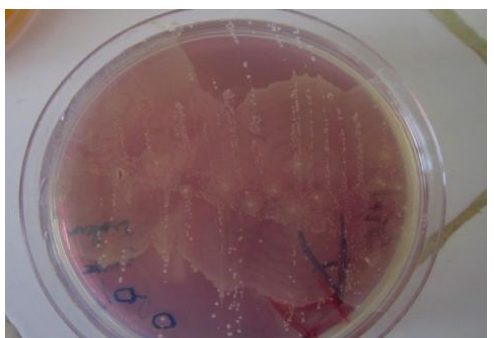
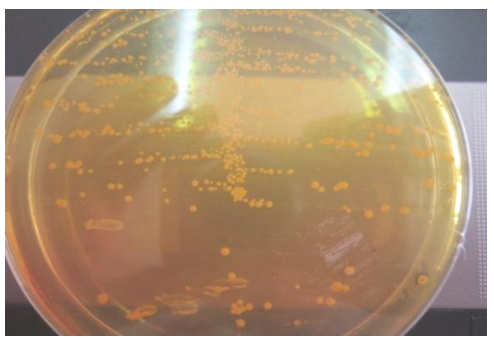
Figure 30: Absence des leucocytes dans le quartier sain

2.3. Résultats de l'étude bactériologique

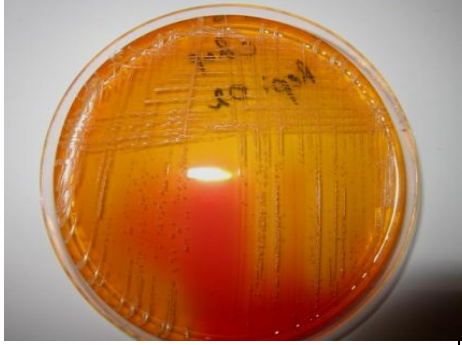
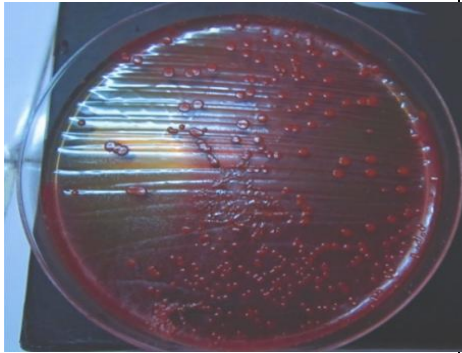
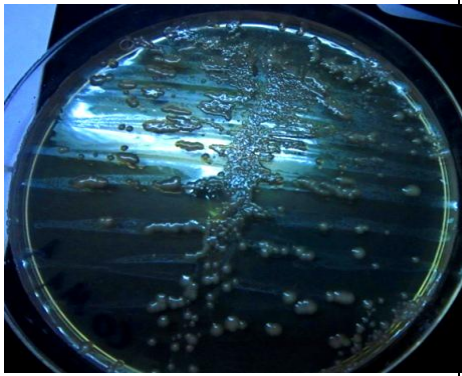
Dans l'ensemble des échantillons du lait mammitéux examinés cultivés sur des milieux d'isolement, 5 prélèvements ont montré la présence de germes.

Le résultat des caractères culturaux et microscopiques est présenté dans les tableaux (20 et 21) respectivement.

Tableau 20 : caractères cultureux

Prélèvement	Le milieu de culture	Aspect macroscopique	Les milieux de cultures
1 ^{er} prélèvement	Gélose au sang	Petites colonies arrondies, lisses à contour régulier de couleur blanche crème	
2 ^{ème} prélèvement	Bcp	Colonies moyennes, enlevées, transparente, de contour régulier. Lactose-	
	Columbia	Colonies moyennes, plates, il consiste en un envahissement progressif de toute la surface du milieu	
	Chapman	Colonies moyennes bombées, arrondies, contour régulier, de couleur blanche crème.	

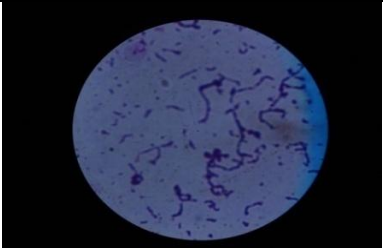
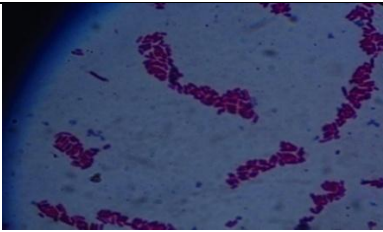
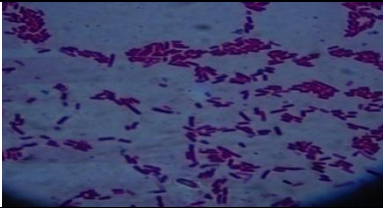
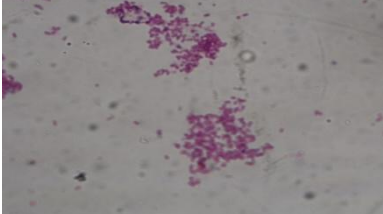
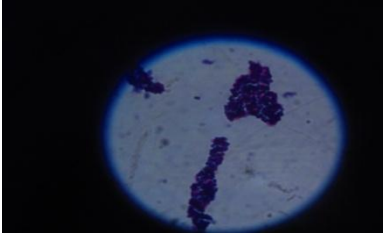
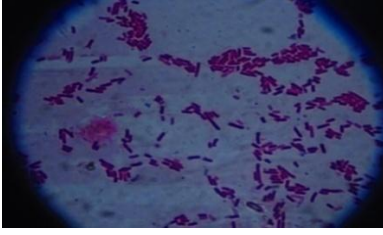
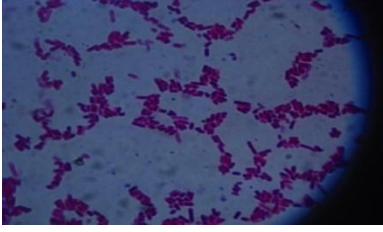
Suite du tableau 20 : caractères cultureux

Prélèvement	Le milieu de culture	Aspect macroscopique	Les milieux de cultures
3 ^{ème} prélèvement	Chapman	Colonies assez grandes d'environ 1 mm de diamètre, rondes, régulières, bombées, lisses et brillantes, aussi crémeuses ou pigmentées en jaune (entourées d'un auréole jaune)	
4 ^{ème} prélèvement	Hektoen	Colonies moyennes, plates, contour régulier, de couleur rouge, avec une odeur désagréable.	
5 ^{ème} prélèvement	Columbia	Colonies moyennes, bombées, contour régulier, muqueuse, opaque, de couleur blanche crème.	

L'examen microscopique après coloration de Gram nous a permis de différencier l'aspect morphologique des bactéries isolées ainsi que leurs arrangements.

Cette observation a révélé la présence de cocci colorés en violet, ils sont donc Gram positifs disposés en diplocoques, isolés en amas ou en grappe, d'autres sont colorés en rose indiquant la négation de l'affinité tinctoriale (Gram négatifs) présentés sous forme de coccobacilles et de bacilles (tab.21).

Tableau 21: caractères microscopiques

Prélèvement	Les milieux de cultures	L'aspect microscopique	Coloration de Gram
1 ^{er} prélèvement	Gélose au sang	Cocci, Gram+, isolé en chaînette plus ou moins longues, et en diplocoque.	
2 ^{ème} prélèvement	BCP	Bacille, Gram- regroupé en paires, en amas et des monobacilles.	
	Columbia	Bacille à Gram-.	
	Chapman	Cocci à Gram+, regroupé en diplocoque et en amas.	
3 ^{ème} prélèvement	Chapman	Cocci à Gram +, regrouper en amas, ou en grappes de raisin.	
4 ^{ème} prélèvement	Hektoen	Cocobacille à Gram-	
5 ^{ème} prélèvement	Columbia	Bacille à Gram-.	

2.4. Résultats de l'identification biochimique

❖ Pour les *Entérobactéries*

- Bacille Gram –.
- Catalase-
- Dépourvus de Cytochrome oxydase (oxydase-).

🚦 Résultats de la galerie biochimique classique

Les résultats de la galerie biochimique classique pour les *Entérobactéries* sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 22: Les caractères biochimiques des souches identifiées à partir des prélèvements du lait.

Test Germe identifié	TSI					Citrate De Christensen	Mannitol Mobilité		Urée indole			Clark et lubs		Acide aminé			ONPG
	Glu	La c	sac	H ₂ S	Gaz		Man	Mob	URE	IND	TDA	VP	RM	LDC	ODC	ADH	
P ₂	+	-	-	+	+	/	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
P ₅	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+

(-) : Réaction négative.

(+): Réaction positive.

(/) : Test n'est pas réaliser.

P : Prélèvement

Suivant le tableau (22) sur les 2 souches à identifier, on a pu déterminer approximativement leur appartenance aux espèces suivantes :

✓ La souche isolée du prélèvement (2) est bacille Gram- : se caractérise par un caractère culturaux très important qui est l'envahissement sur la gélose de Columbia sous forme d'une nappe, ceci est due à la mobilité de l'espèce, en plus des caractères biochimiques importants tel que : Glu+, H₂S+, TDA+.

- Ces caractéristiques nous orientent vers l'espèce *Proteus mirabilis* (Institut Pasteur, 1978).

Chez l'animal, les *Proteus* sp sont responsables de mammites, de surinfections des plaies, d'endométrites, et sont largement répandues dans la nature et elles sont isolées du sol, de l'eau, de l'intestin de l'homme et de l'intestin de nombreuses espèces animales.

- ✓ La souche isolée du prélèvement (5) est caractérisée par des colonies de taille moyenne avec une consistance muqueuse, immobile, Glu+, sac+ et lac+, urée/indole+, et ONPG+.
- Ces caractéristiques nous orientent vers l'espèce *Klebsiella oxytoca* (Institut Pasteur, 1978).
- Les bactéries du genre *Klebsiella*, sont fréquemment rencontrées dans les mammites. Elles sont ubiquistes, on les trouve également dans la nature (sol et eau), dans le tube digestif et dans la flore respiratoire des mammifères.

✚ Résultats de la galerie API 20E

Le résultat de la galerie API 20E de la souche isolée du prélèvement (4) est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 23 : Résultat de la galerie API 20E. (fig.30)

prélèvement	Code	espèce
P (4)	1144552	<i>Escherichia coli 1</i>



Figure 31: API 20E du prélèvement(4).

- *Escherichia coli* peut provoquer des mammites de gravité variables L'infection peut également provenir d'une contamination fécale de l'eau et de divers aliments
 - Cette bactérie vivant couramment dans les intestins de l'homme et des animaux.

La présence du *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca* et *Escherichia coli*, dans le lait cause des infections diverses tels que : les infections urinaires, les infections de plaies, les infections du tractus respiratoire, une diarrhée aqueuse pouvant devenir sanglante (colite hémorragique), plus rarement de septicémies et de méningites particulièrement graves chez les nourrissons.

❖ **Pour les *Staphylocoques***

- Cocci coloré en violet, c'est-à-dire ; des bactéries Gram(+)
- Catalase (+)
- Oxydase (-).

🚦 **Résultats de la galerie biochimique classique**

Tableau 24 : Les caractères biochimiques des souches identifiées

Test prélèvement \	Cat	Oxydase	GLU	Sac	Man	Urée	VP	coagulase
P(2)	+	-	+	+	+	-	-	-
P(3)	+	-	+	+	+	+	+	+

Suivant le tableau 24, on peut déterminer approximativement l'espèce suivante :

- ✓ La souche isolée du prélèvement (2) est une cocci Gram+, catalase +, mannitol+, et dépourvus de coagulase. Ces caractères orientent vers *Staphylococcus saprophyticus*.
- Cette espèce est fréquemment rencontrée lors de mammites. Lorsqu'elle appartient au groupe de *Staphylocoques* à coagulase négative, sa source pouvait aussi bien être la mamelle, la peau des vaches ou du trayeur ou même l'environnement (SMITH, 2008).

🚦 **Résultats de la galerie API Staph**

Le résultat de la galerie API Staph de la souche isolée du prélèvement (3) est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 25: Le résultat de la galerie API Staph. (fig. 31)

Prélèvement	Code	Espèce
P (3)	6734153	<i>Staphylococcus aureus</i>



Figure 32: API 20 Staph du prélèvement (3).

✚ *Staphylococcus aureus* : responsables principalement de mammites subcliniques, mais aussi de mammites cliniques (Smith, 2008).

Ils sont présents sur la peau, les muqueuses, l'air et le matériel de traite, mais leur réservoir principal est la mamelle des vaches infectées. (Roberson, 1994).

❖ Pour les *Streptocoques*

- Cocci Gram(+).
- Catalase (-).
- Oxydase (+).

✚ Résultats de la galerie API 20Strep

Le résultat de la galerie API 20Strep de la souche isolée du prélèvement (1) est présenté dans le tableau suivant :

Tableau 26: Résultat de la galerie API 20Strep. (fig.32)

Prélèvement	Code	Espèce
P (1)	3063011	<i>Streptococcus agalactiae</i>



Figure 33: API 20Strep du prélèvement (1).

✓ *Streptococcus agalactiae* : est un parasite obligatoire de diverses espèces animales (notamment les bovins) et de l'homme, et considéré comme l'une des causes majeures de mammites subcliniques ou chroniques (Matthews *et al.*, 1992).

- Cet organisme se trouve dans la matière organique utilisé comme litière (la paille et la sciure de bois, par exemple) et dans le sol et l'eau contaminés par des matières fécales. Il peut aussi se trouver sur la peau de la vache (les mamelles et l'abdomen) et dans le système reproducteur.

❖ D'après les résultats obtenus (Aspects macroscopique, microscopique et les galeries biochimique), les espèces isolées ainsi que leur emplacement sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 27 : Espèces bactériennes identifiées à partir de différent prélèvement.

Prélèvement	Espèce bactérienne
P ₁	<i>Streptococcus agalactiae</i>
P ₂	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
P ₃	<i>Staphylococcus aureus</i>
P ₄	<i>Escherichia coli 1</i>
P ₅	<i>Klebsiella oxytoca</i>

P : prélèvement

3. Résultats de l'activité antibactérienne

3.3.1 Test du méthanol

Le test de l'activité antibactérienne ou non du méthanol (solvant utilisé pour la préparation des extraits) à différentes concentration (pur, 85°, 50°), sur les souches de référence *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* montre que ce solvant n'a aucun effet sur ces micro-organismes. (fig. 34).

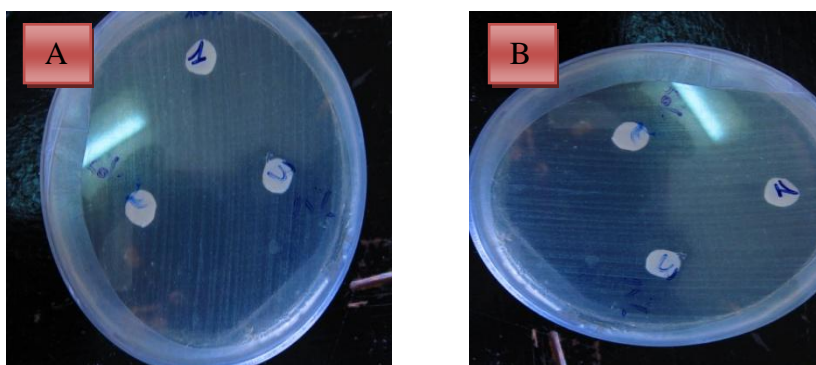


Figure 34: Activité du méthanol sur les deux souches de références.
(A : *S. aureus* ATCC, B : *E. coli* ATCC)

3.1.2 Tests de l'activité des extraits

3.1.2.1 Méthode de diffusion à partir d'un disque solide (antibioaromatogramme)

Tableau 28 : Effet des extraits sur les souches de références

Extractions Bactérie	<i>Thymus</i>				<i>Teucrium</i>			
	200mg	100mg	50mg	25mg	200mg	100mg	50mg	25mg
<i>E. coli</i> ATCC	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC	22	19	15	12	-	-	-	-

Ce test réalisé par la méthode de diffusion en gélose permet de déterminer les diamètres des zones d'inhibition des extraits sur les souches de référence.

On note l'absence des zones d'inhibition à différentes concentration des 2 extraits de plantes ciblées dans le cas de la souche *E. coli*. (fig.35)

En ce qui concerne *S. aureus*, on remarque une sensibilité vis-à-vis de l'extrait de *Thymus ciliatus* même avec de faibles concentrations, tandis que l'extrait du *Teucrium polium* n'a aucun effet (fig.36)

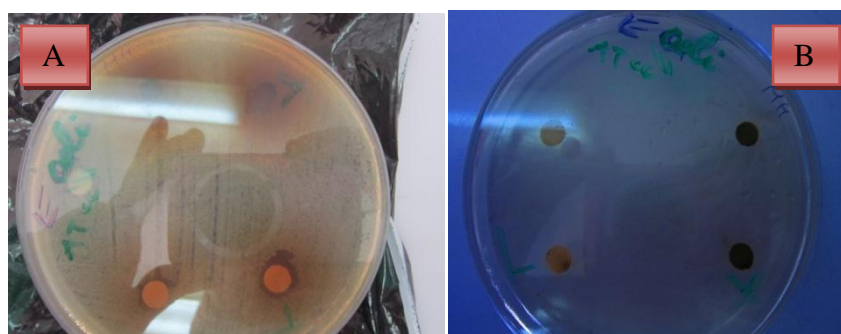


Figure 35: Antibioaromatogramme d'*E. coli* ATCC
(1: 200 mg/ml; 2: 100 mg/ml; 3: 50 mg/ml; 4: 25 mg/ml)
(A: *Thymus ciliatus*, B: *Teucrium polium*)

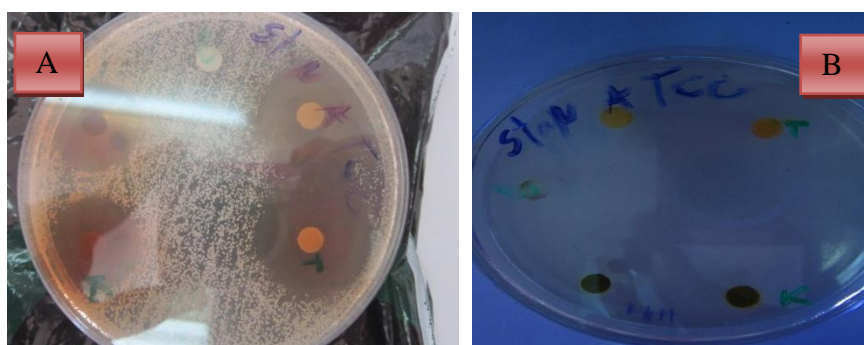


Figure 36 : Antibioaromatogramme de *S. aureus* ATCC.
(1: 200 mg/ml; 2: 100 mg/ml; 3: 50 mg/ml; 4: 25 mg/ml)
(A: *Thymus ciliatus*, B: *Teucrium polium*)

3.1.2.2 Test de l'activité antibactérienne en milieu liquide

Les concentrations des extraits allant de 200mg/ml jusqu'à 0,078mg/ml testées sur les 2 souches *E. coli* et *S. aureus*, ne présentent aucune activité inhibitrice. (fig.37)



Figure 37 : Résultat de méthode de l'activité antibactérienne en milieu liquide
(A: *S. aureus* ; B: *E. coli*)

3.1.2.3 Méthode de puits

Les résultats de ce test sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 29: Diamètre des zones d’inhibition de la croissance microbienne en réponse aux extraits bruts étudiés (en mm)

Souches Concentrations	<i>Thymus ciliatus</i>		<i>Teucrium polium</i>	
	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>E. coli</i> ATCC	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>E. coli</i> ATCC
200mg/ml	19	16	22	20
150 mg/ml	15	21	18	19
100 mg/ml	13	18	15	16
50 mg/ml	10	11	11	8
10 mg/ml	8	8	9	-
5 mg/ml	-	-	-	-
Témoin (méthanol)	-	-	-	-

D’après ces résultats on remarque que les 2 extraits ont réagis positivement sur les souches utilisées à des concentrations allons de (200, 150, et 100mg/ml).

En ce qui concerne les concentrations inférieures de 100mg/ml, des petits diamètres ont été mesuré (fig.38et 39), d’après la littérature, un extrait ne peut avoir une action bactériostatique si le diamètre d’inhibition est inférieur à 12mm. (Sagdaç, 2003).



Figure 38 : Antibioaromatogramme de *S. aureus* ATCC.
 (1 : 200 mg/ml ; 2 : 150 mg/ml ; 3 : 100 mg/ml ; 4 : 50 mg/ml ; 5: 10 mg/ml ; 6 : 5mg/ml;
 7:Témoin)
 (A: *Thymus ciliatus*, B: *Teucrium polium*)



Figure 39 : Antibioaromatogramme d'*E. coli* ATCC.

(1 : 200 mg/ml ; 2 : 150 mg/ml ; 3 : 100 mg/ml ; 4 : 50 mg/ml; 5: 10 mg/ml ; 6 : 5mg/ml;
7:Témoin)

(**A:** *Thymus ciliatus*; **B:** *Teucrium polium*)

A partir de ces résultats on a pu déterminer que la concentration minimale inhibitrice (CMI) de nos extraits est de 100mg/ml.

On peut dire aussi que la méthode de puits a donné des résultats plus significatifs de l'activité antibactérienne des 2 extraits par rapport aux méthodes précédentes à raison de faible volume imprégné dans les disques (10 μ l) et dilué dans le bouillon (1ml d'extrait/ 5ml bouillon nutritifs).

3.1. Test de l'activité antibactérienne sur les souches clinique

✚ Effet des extraits /ATB sur *Streptococcus agalactiae*

Tableau 30: Les diamètres d'inhibition de l'Antibioaromatogramme de *Str. agalactiae*

	Concentration mg/ml méthanol					
	300mg/ml	200mg/ml	100mg/ml	50mg/ml	25mg/ml	Témoin
Extrait K	22	17	13	1	0	0
Extrait T	Large diffuse				11	0
Extrait K+T	30	26	22	16	0	0

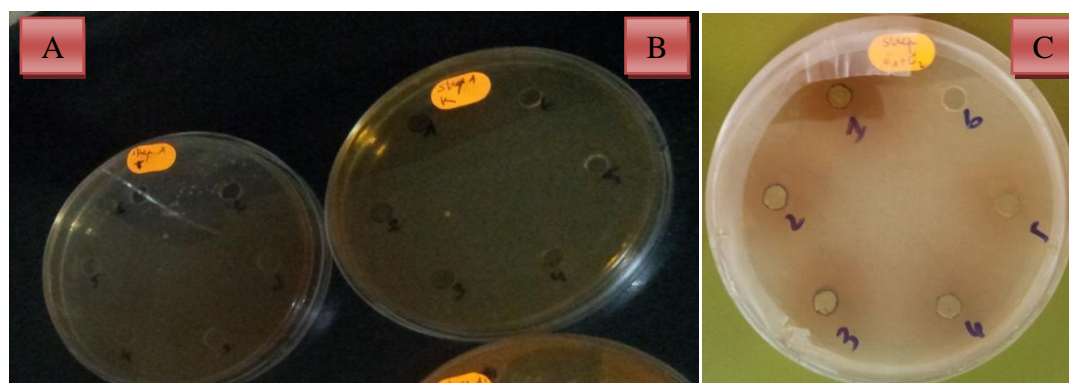


Figure 40: l'antibioaromatogramme de *Str. agalactiae*
 (1 : 300 mg/ml ; 2 : 200 mg/ml ; 3 : 100 mg/ml ; 4 : 50 mg/ml ; 5 : 25 mg/ml ; 6 : Témoin)
 (A : *Teucrium polium*; B : *Thymus ciliatus*; C : mélange des deux extraits)

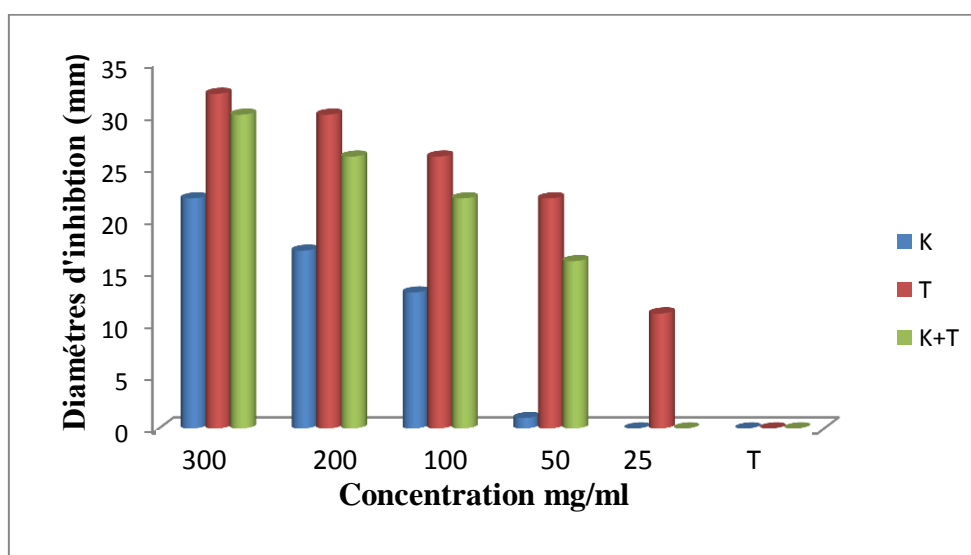


Figure 41: Présentation graphique de l'Antibioaromatogramme de *Streptococcus agalactiae*
 . (K : *Teucrium polium*; T : *Thymus ciliatus*)

D'après nos observations, les 2 extraits testés séparément ou mélangés sont avérés actifs contre l'espèce *Streptococcus agalactiae* à différentes concentrations, en revanche le *Thymus* montre un effet plus important que le *Teucrium* même à de faibles concentrations.

En ce qui concerne les ATB, le groupe testé a un effet antibactérien contre *Str. agalactiae* avec des diamètres qui varient entre 18 et 32mm, à l'exception de l'Ampicilline qui ne représente aucun effet. (tab.31, fig.42 et fig.43)

De même la synergie des ATB + extraits donne un effet inhibiteur meilleur avec la totalité des ATB y compris l'Ampicilline associée avec le *Thymus*.

Tableau 31 : Résultat de l'effet ATB/Extrait sur *Streptococcus agalactiae*

	Antibiotiques					
	Pénicilline	Tétracycline	Erythromycine	Chloramphénicol	Céfotaxime	Ampicilline
ATB	22 « I »	21 « I »	20 « I »	32 « S »	18 « I »	9 « R »
ATB+ K	26 « S »	20 « S »	22 « I »	32 « S »	18 « I »	0 « R »
ATB+ T	30 « S »	22 « S »	25 « S »	34 « S »	20 « S »	8 « R »

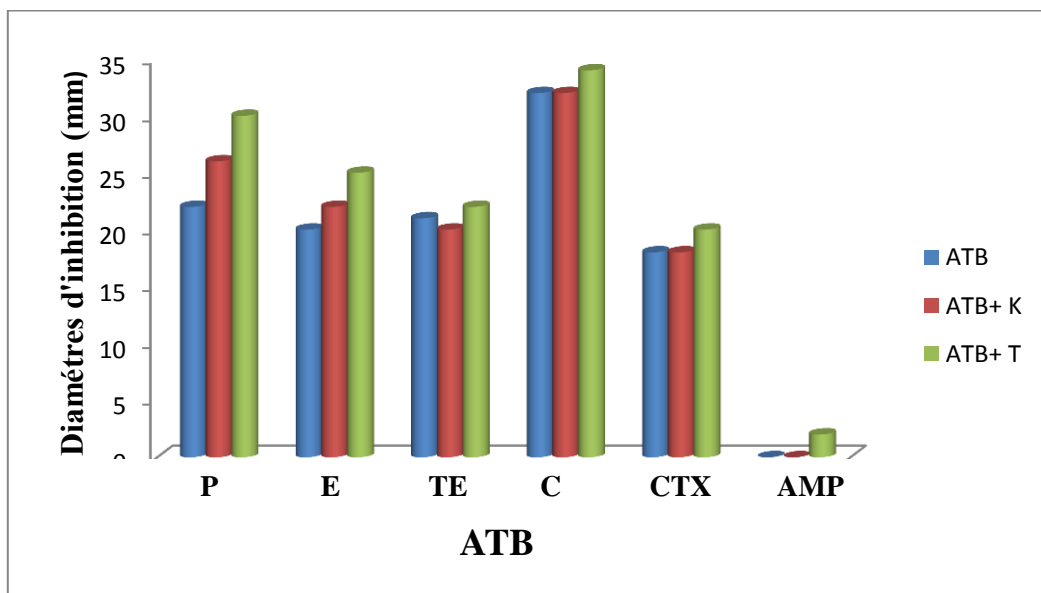


Figure 42: Présentation graphique de l'effet ATB/Extraits sur *Streptococcus agalactiae*.
(K : *Teucrium polium*; T : *Thymus ciliatus*)

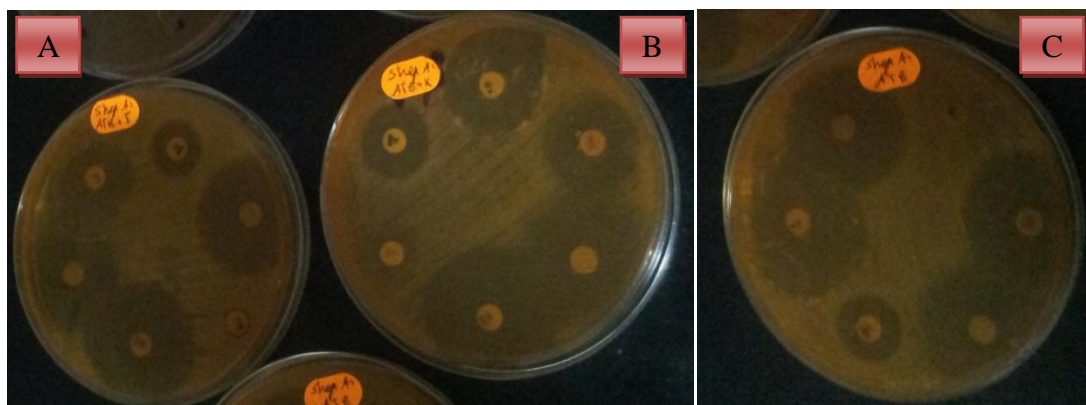


Figure 43: Résultat de l'effet ATB/Extraits sur *Str. agalactiae*.

(A : *Teucrium polium*+ ATB; B : *Thymus ciliatus*+ATB; C: ATB seul)

Les travaux de **Singleton, (1988)** ; **Escarpa et Gonzalez, (2001)** signalent que les montants polyphénoliques ont montré une sensibilité variée vis-à-vis des bactéries pathogènes dont les *Streptococcus*.

Ces résultats étaient similaires à ceux de **Hamrouni et al., (2002)** qui ont signalé qu'il existe un effet positif de l'huile essentielle infusée de *Teucrium polium* contre plusieurs souches y compris *Streptococcus*.

Nos résultats présentent des similarités à ceux de **Gonzalez et al., (2011)** lors de l'isolement des phénols à partir de *T. ciliatus* et d'autres espèces de *Thymus*, qui pourrait être responsable de l'activité antibactérienne élevée observée contre les *Streptococcus*.

Les travaux de **Ghorab et al., (2013)** démontrent également la sensibilité du *Streptococcus sp.* vis-à-vis des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* avec un diamètre d'inhibition de 19mm.

✚ Effet des extraits /ATB sur *Proteus mirabilis*

Les essais sur *Proteus mirabilis* montrent que les extraits présentent des diamètres d'inhibition supérieurs ou égales à 8mm, ce diamètre augmente de plus en plus avec le mélange des 2 extraits (tab.32 fig.44 et fig.45).

Tableau 32 : les diamètres d'inhibition de l'Antibioaromatogramme contre *Proteus mirabilis*

	Concentration mg/ml méthanol					
	300mg/ml	200mg/ml	100mg/ml	50mg/ml	25mg/ml	Témoin
Extrait K	21	18	13	11	8	0
Extrait T	19	15	12	10	8	0
Extrait K+T	30	24	20	18	14	0

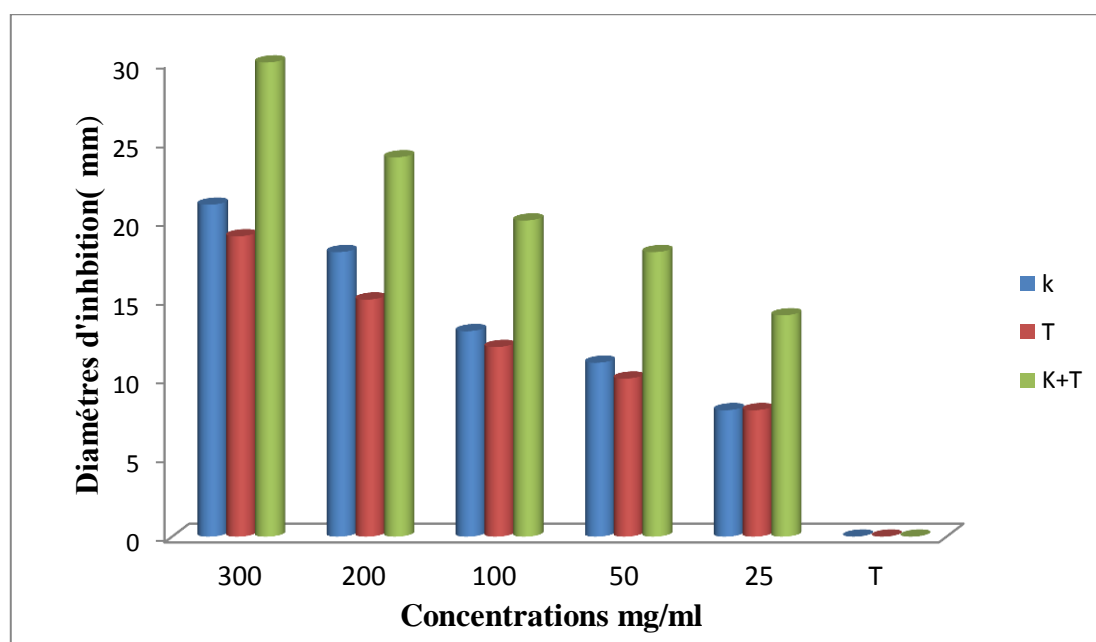


Figure 44: Présentation graphique de l'Antibioaromatogramme de *Proteus mirabilis* (K : *Teucrium polium*; T : *Thymus ciliatus*)

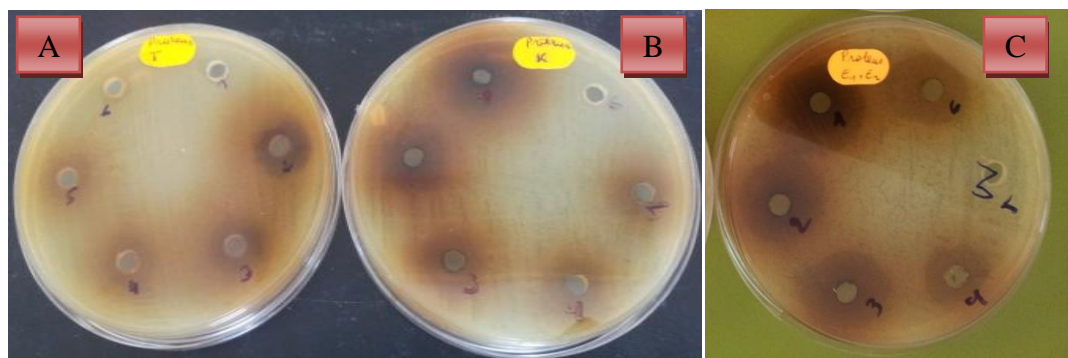


Figure 45 : l'effet antibactérien des plantes sur *P. mirabilis*
 (1 : 300 mg/ml ; 2 : 200 mg/ml ; 3 : 100 mg/ml ; 4 : 50 mg/ml ; 5 : 25 mg/ml ; 6 : Témoin)
 (A : *Teucrium polium*; B : *Thymus ciliatus*; C: mélange des deux extraits)

Les résultats de l'antibiogramme montrent que la majorité des ATB testés sur l'espèce *P. mirabilis*, ont un effet positif traduit par les différents diamètres d'inhibition sauf exception de l'érythromycine et la céphalosporine qui ont un effet négatif, ce qui est remarquable que cet effet a changé avec la combinaison des 2 extraits (Erythromycine, *Thymus et Chloramphénicol, Teucrium*) (tab.33, fig.46 et fig.47).

Tableau 33 : les diamètres d'inhibition des ATB/Extraits sur de *Proteus mirabilis*

	Antibiotiques					
	Pénicilline	Tétracycline	Erythromycine	Chloramphénicol	Céfotaxime	Ampicilline
ATB	12 « R »	29 « S »	0 « R »	0 « R »	40 « S »	20 « R »
ATB+ K	17 « R »	29 « S »	0 « R »	12 « R »	45 « S »	23 « I »
ATB+ T	20 « I »	30 « S »	14 « R »	0 « R »	45 « S »	26 « S »

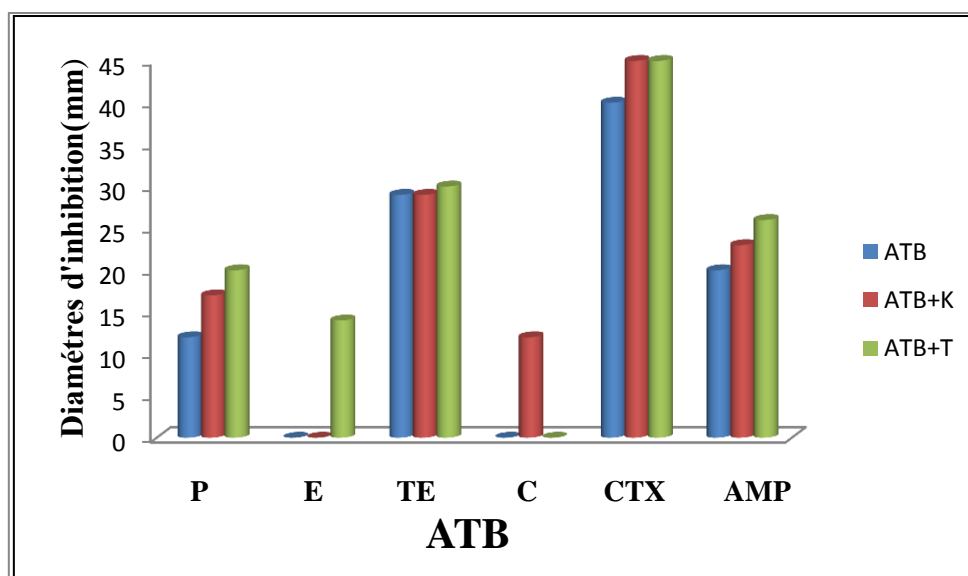


Figure 46: Présentation graphique de l'effet ATB/Extraits de *Proteus mirabilis* (K : *Teucrium polium*; T : *Thymus ciliatus*)

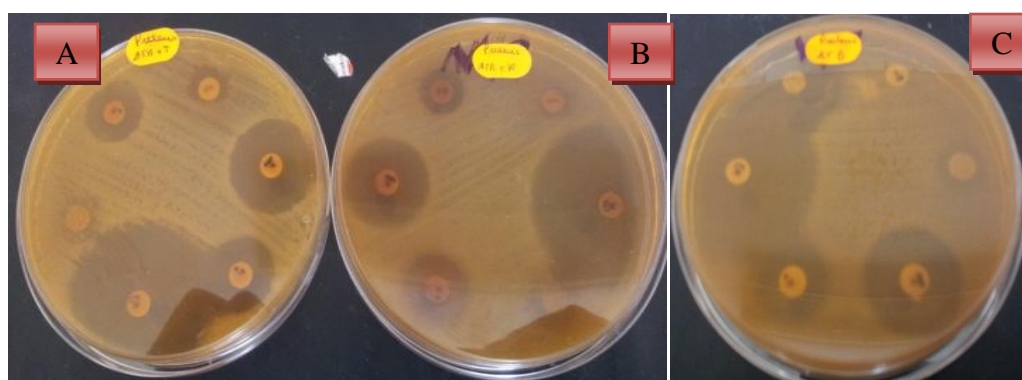


Figure 47 : Résultat de l'effet ATB/Extraits sur *P. mirabilis* (A : *Teucrium polium*+ ATB; B : *Thymus ciliatus*+ATB; C: ATB seul)

L'extrait méthanolique de *Teucrium polium* inhibe la croissance des souches de *Proteus mirabilis* en milieu gélosé. Une étude similaire faite par **Oganesyan et al., (1992)** montre l'effet antimicrobien de cet extrait sur la souche.

Les travaux de **Ghorab et al., (2013)** ont démontré la sensibilité de *Proteus mirabilis* vis-à-vis de l'extrait de *Thymus ciliatus* avec une CMI de 80mg/ml.

✚ Effet des extraits /ATB sur les espèces du genre *Staphylococcus*

Les résultats obtenus témoignent une sensibilité importante des espèces du genre *Staphylococcus* vis-à-vis des extraits de plantes séparément testés ou mélangés à différentes concentrations d'une part (tab.34, fig.48 et fig.49),(tab.36, fig.52 et fig.53) ainsi qu'à l'égard des ATB testés seuls ou associés aux 2 extraits d'une autre part (tab.35, fig.50 et fig.51), (tab.37, fig.54 et fig.55) à l'exception de la céfotaxime qui a un effet négatif contre *S. aureus* en comparaison avec l'effet des extraits

- *Staphylococcus aureus*

Tableau 34: les diamètres d'inhibition de l'Antibioaromatogramme de *S. aureus*

	Concentration mg/ml méthanol					
	300mg/ml	200mg/ml	100mg/ml	50mg/ml	25mg/ml	Témoin
Extrait K	21	16	13	0	0	0
Extrait T	Large diffuse				15	0
Extrait K+T					32	0

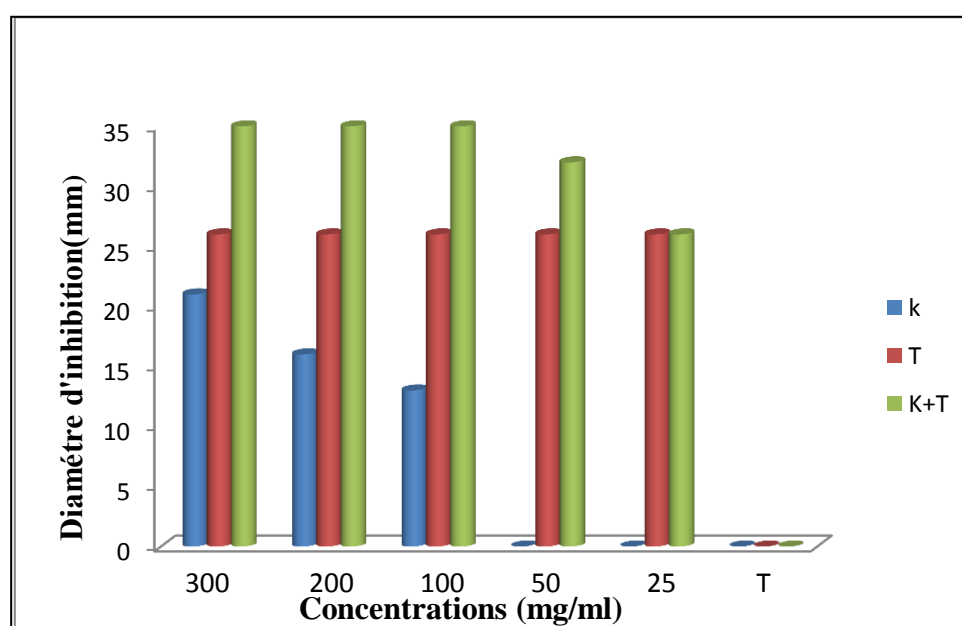


Figure 48: Présentation graphique des l'Antibioaromatogramme de *S. aureus* (K : *Teucrium polium*; T : *Thymus ciliatus*)

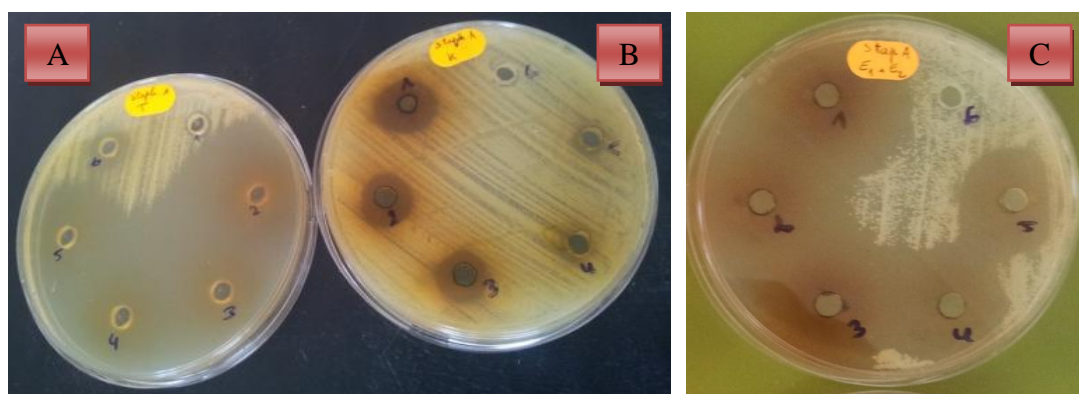


Figure 49: l'effet antibactérien des extraits sur *S. aureus*
 (1 : 300 mg/ml ; 2 : 200 mg/ml ; 3 : 100 mg/ml ; 4 : 50 mg/ml ; 5 : 25 mg/ml ; 6 : Témoin)
 (A : *Teucrium polium*; B : *Thymus ciliatus*; C : mélange des deux extraits)

Tableau 35: les diamètres d'inhibition des ATB/Extraits sur *S. aureus*

	Antibiotiques					
	Pénicilline	Tétracycline	Erythromycine	Chloramphénicol	Céfotaxime	Ampicilline
ATB	20 « I »	46 « S »	30 « S »	38 « S »	0 « R »	19 « R »
ATB+ K	Large diffuse	20 « S »	Large diffuse			
ATB+ T	30 « S »	Large diffuse				34 « S »

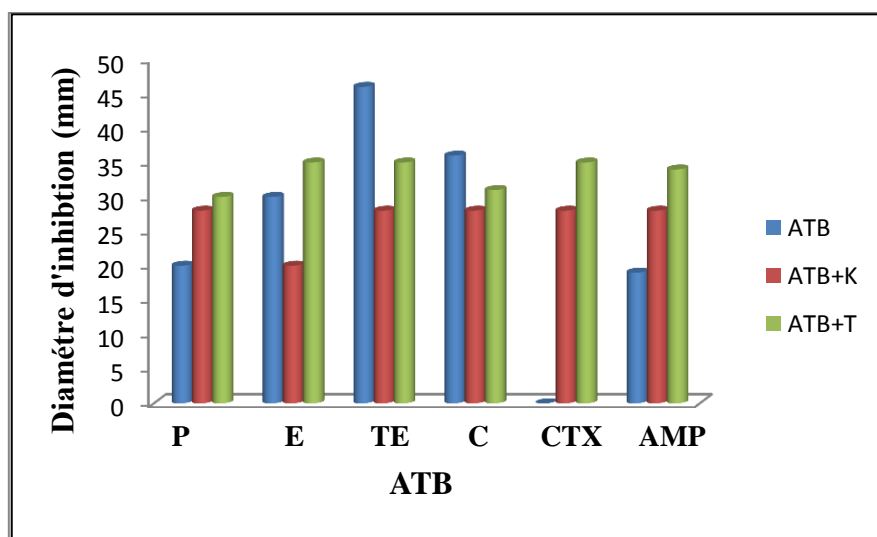


Figure 50 : Présentation graphique de l'effet ATB/Extraits sur *S. aureus*
 (K : *Teucrium polium*; T : *Thymus ciliatus*)

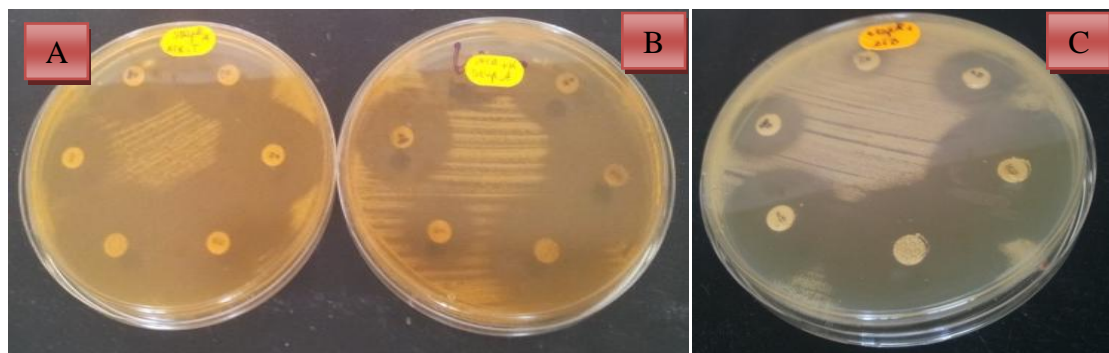


Figure 51 : Aspect culturaux de l'effet ATB/Extraits sur *S. aureus*
(**A** : *Teucrium polium*+ ATB; **B** : *Thymus ciliatus*+ATB; **C**: ATB seul)

- *Staphylococcus saprophyticus*

Tableau 36: les diamètres d'inhibition de l'Antibioaromatogramme de *S. saprophyticus*

	Concentration mg/ml méthanol					
	300mg/ml	200mg/ml	100mg/ml	50mg/ml	25mg/ml	Témoin
Extrait K	20	18	15	10	8	0
Extrait T	Large diffuse				12	0
Extrait K+T	Large diffuse			23	20	0

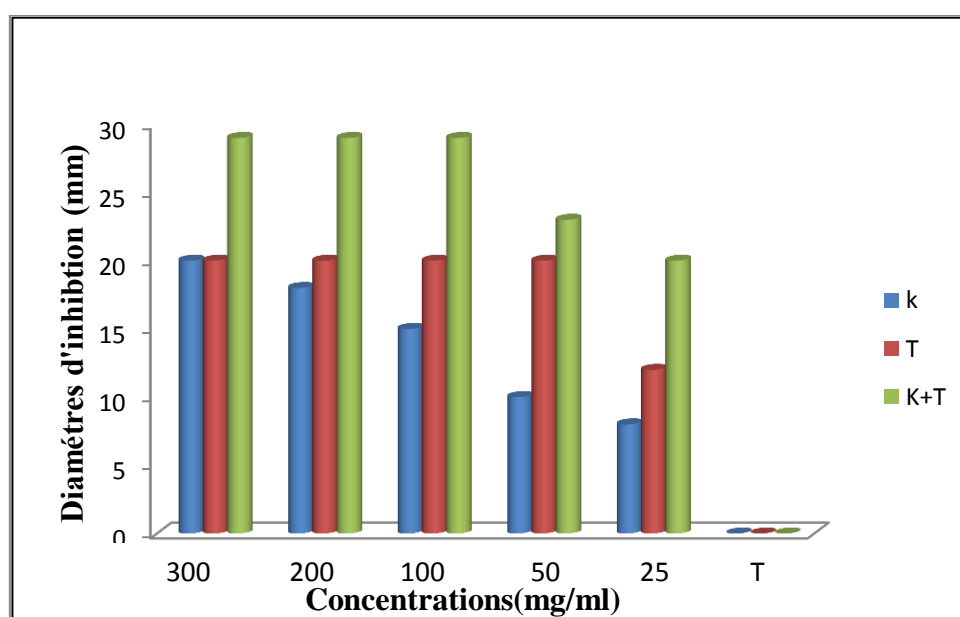


Figure 52: Présentation graphique de l'Antibioaromatogramme de *S. saprophyticus*
(**K** : *Teucrium polium*; **T** : *Thymus ciliatus*)

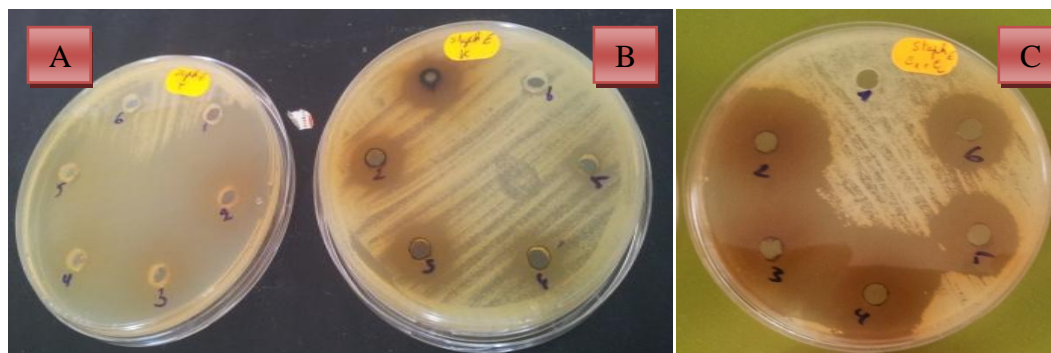


Figure 53: l'Antibioaromatogramme de *S. saprophyticus*
 (1 : 300 mg/ml ; 2 : 200 mg/ml ; 3 : 100 mg/ml ; 4 : 50 mg/ml ; 5: 25 mg/ml ; 6 : Témoin)
 (A : *Teucrium polium*; B : *Thymus ciliatus*; C: mélange des deux extraits)

Tableau 37: les diamètres d'inhibition de l'effet ATB/Extraits de *S. saprophyticus*

	Antibiotiques					
	Pénicilline	Tétracycline	Erythromycine	Chloramphénicol	Céfotaxime	Ampicilline
ATB	30 « S »	24 « R »	30 « S »	30 « S »	30 « S »	28 « I »
ATB+ K	Large diffuse		26 « S »	Large diffuse		
ATB+ T	Large diffuse					

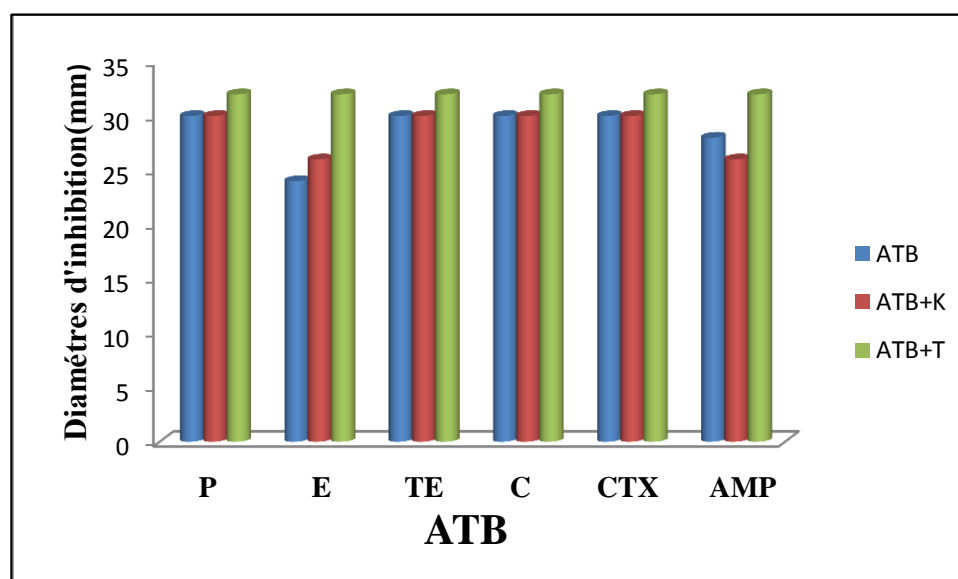


Figure 54: Présentation graphique de l'ATB/Extraits sur *S. Saprophyticus*.
 (K : *Teucrium polium*; T : *Thymus ciliatus*)

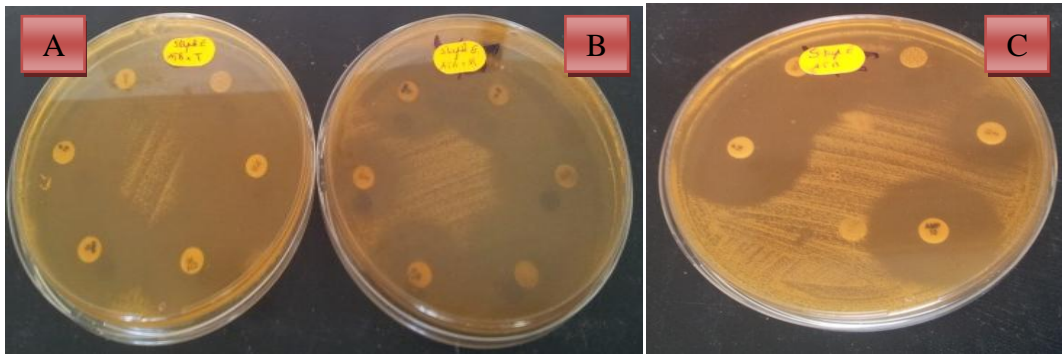


Figure 55: Aspect culturaux de l'effet ATB/Extraits sur *S. saprophyticus*
(A : *Teucrium polium*+ ATB; B : *Thymus ciliatus*+ATB; C: ATB seul)

Les travaux de **Ghorab et al., (2013)** démontrent une sensibilité assez importante de *S. aureus*, avec les huiles essentielles du *Thymus ciliatus*.

De même **Amarati et al., (2009)** prouvent que *S. aureus* été plus sensible aux extraits du *Thymus* même à de faibles concentration.

Hammoudi et al., (2012) ont démontré l'effet antibactérien de la plante *Teucrium polium* sur différentes souches bactériennes Gram positif telle que *S. aureus*.

Ce résultat est étayé par l'étude de **Shahba et al., (2013)** dont l'espèce s'est manifesté très sensible envers l'extrait du *Teucrium*.

✚ Effet des extraits /ATB sur *E. coli*

Les résultats de ces effets sont représentés par le tab.38 et fig.56 et fig.57

Tableau 38 : les diamètres d'inhibition de l'Antibioaromatogramme d'*E. coli*

	Concentration mg/ml méthanol					Témoin
	300mg/ml	200mg/ml	100mg/ml	50mg/ml	25mg/ml	
Extrait K	18	16	12	11	8	0
Extrait T	16	15	12	10	0	0
Extrait K+T	20	18	15	12	10	0

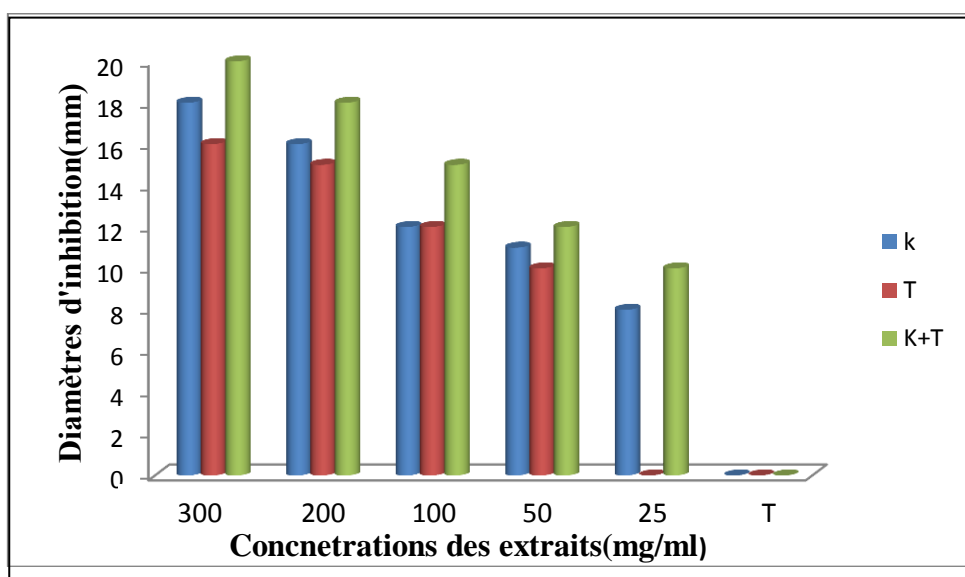


Figure 56: Présentation graphique de l'Antibioaromatogramme d'*E. coli*

(**K** : *Teucrium polium*; **T** : *Thymus ciliatus*)

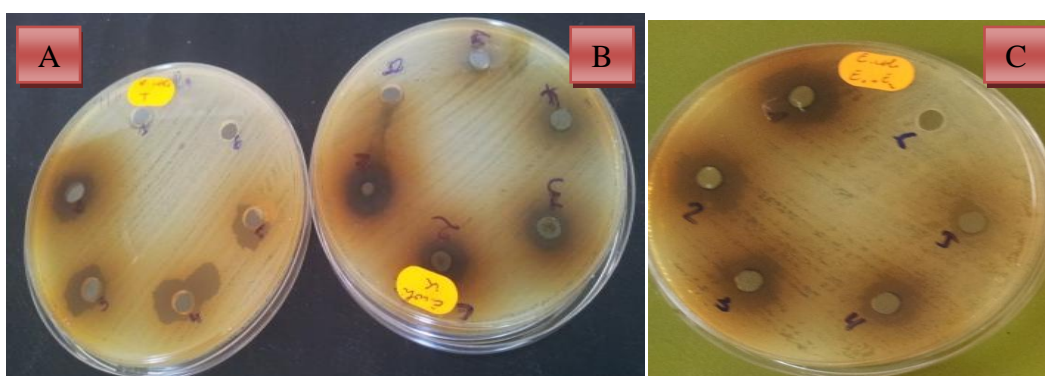


Figure 57 : l'Antibioaromatogramme d'*E. coli*

(**1** : 300 mg/ml ; **2** : 200 mg/ml ; **3** : 100 mg/ml ; **4** : 50 mg/ml ; **5** : 25 mg/ml ; **6** : Témoin)
(**A** : *Teucrium polium*; **B** : *Thymus ciliatus*; **C** : mélange des deux extraits)

Les résultats montrent clairement que la bactérie *E. coli* présente une sensibilité à l'égard des 2 extraits testés séparément, on note aussi que la synergie des 2 extraits montre un effet plus important même à des faibles concentrations.

Tableau 39: les diamètres d'inhibition de des ATB/Extraits sur *E. coli*

	Antibiotiques					
	Pénicilline	Tétracycline	Erythromycine	Chloramphénicol	Céfotaxime	Ampicilline
ATB	0 « R »	0 « R »	0 « R »	31 « S »	36 « S »	0 « R »
ATB+ K	0 « R »	0 « R »	0 « R »	39 « S »	37 « S »	0 « R »
ATB+ T	12 « R »	11 « R »	11 « R »	35 « S »	39 « S »	10 « R »

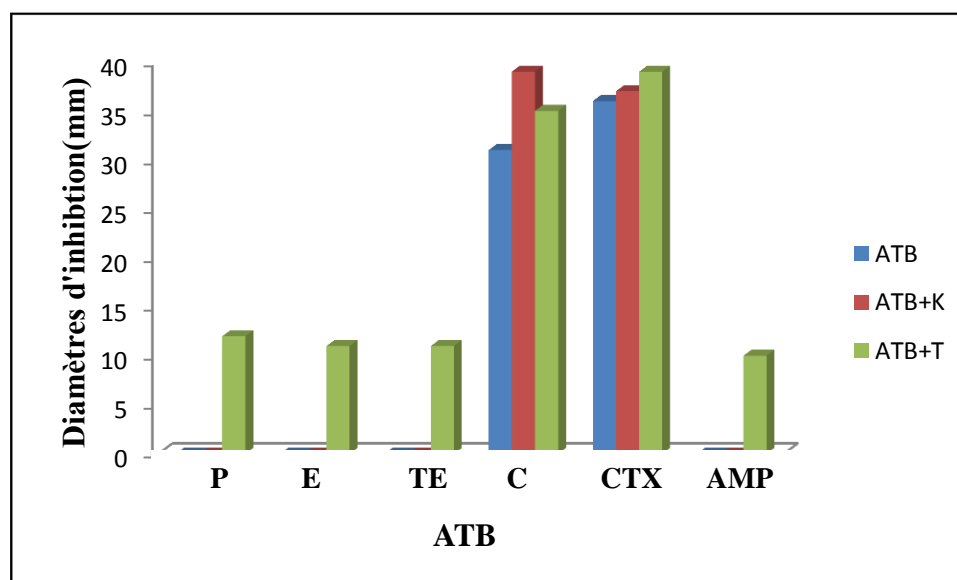


Figure 58: Présentation graphique de l'effet ATB/Extraits sur *E. coli* (**K** : *Teucrium polium*; **T** : *Thymus ciliatus*)

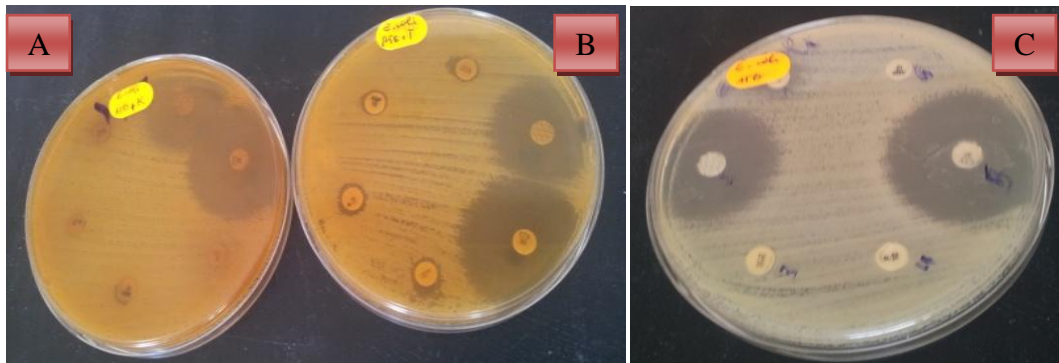


Figure 59 : l'effet antibactérien d'ATB/Extraits d'*E. coli*

(**A** : *Teucrium polium*+ ATB; **B** : *Thymus ciliatus*+ATB; **C**: ATB seul)

Sur la totalité des ATB testés, seulement la chloramphénicol, et la céfotaxime inhibent la croissance d'*E. coli* avec des diamètres d'inhibition variant de 31 mm à 36mm, ces diamètres augmentent avec le complexe ATB+*Thymus* et ATB +*Teucrium*.

Par conséquent, on remarque que la synergie du *Thymus*+ATB donne plus d'effet sur la bactérie qui été résistante vis-à-vis de l'ATB seul.

D'après nos résultats on peut tirer que tous les extraits ont réagi positivement sur *E. coli*, bien que la plante *Thymus* est douée de propriété antibactérienne très appréciée, la plante *Teucrium* montre une certaine activité inhibitrice de la croissance bactérienne mais moins intéressante.

Des résultats corroborent avec ceux de **Baydar et al., (2004)** ; **Amarati et al., (2009)** qui démontrent l'effet antibactérien du *Thymus ciliatus* sur plusieurs bactéries y compris *E. coli*.

L'étude d'**Oganesyan et al., (1992)** note aussi l'effet antimicrobien de l'extrait méthanolique de *Teucrium polium* sur *E. coli*.

✚ Effet des extraits /ATB sur *Klebsiella oxytoca*

Les représentations ci-dessous (tab.40 et fig.60 et fig.61) indiquent les résultats des tests d'activité antibactérienne des extraits issus des plantes *Thymus* et *Teucrium* sur l'espèce *K. oxytoca*

Tableau 40: les diamètres d'inhibition de l'Antibioaromatogramme de *Klebsiella oxytoca*

	Concentration mg/ml méthanol					
	300mg/ml	200mg/ml	100mg/ml	50mg/ml	25mg/ml	Témoin
Extrait K	0	0	0	0	0	0
Extrait T	21	17	15	10	0	0
Extrait K+T	24	17	15	13	10	0

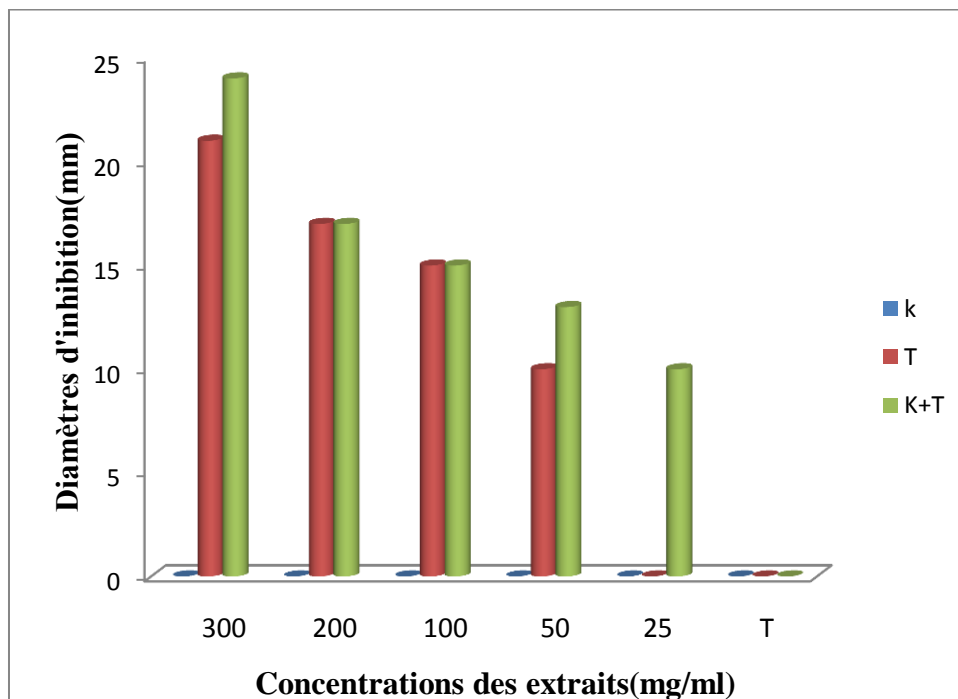


Figure 60: Présentation graphique de l'Antibioaromatogramme de *Klebsiella oxytoca*

(**K** : *Teucrium polium*; **T** : *Thymus ciliatus*)

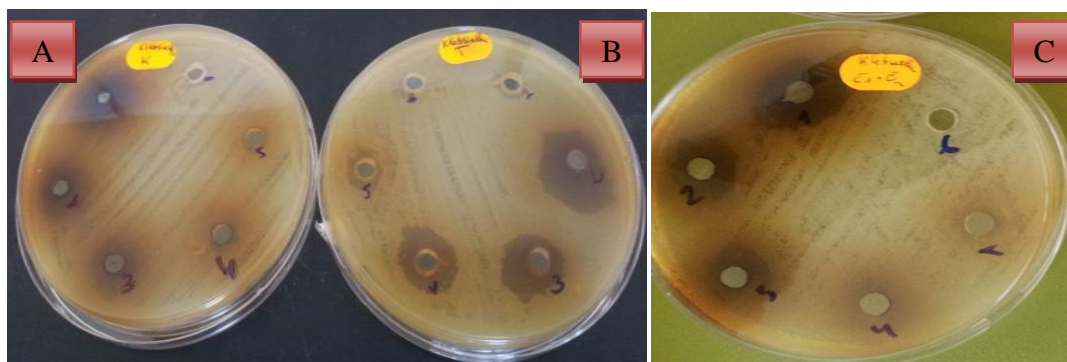


Figure 61: Aspect cultureux de l'Antibioaromatogramme de *K. oxytoca*.

(1 : 300 mg/ml ; 2 : 200 mg/ml ; 3 : 100 mg/ml ; 4 : 50 mg/ml ; 5: 25 mg/ml ; 6 : Témoin)

(A : *Teucrium polium*; B : *Thymus ciliatus*; C: mélange des deux extraits)

Il apparait un effet antibactérien de la plante *Thymus ciliatus* marqué par rapport à l'effet de *Teucrium polium* sur l'espèce *Klebsiella oxytoca* démontré par les diamètres d'inhibition variant de 10à 21mm.

Par contre l'action combinée des 2 extraits est notable et l'espèce s'est manifestée sensible.

Concernant l'action des ATB sur cette espèce, la totalité a donné un effet inhibiteur avec des diamètres qui varient entre (19-36mm) à l'exception de la pénicilline et l'érythromycine contre qui la bactérie est résistante.

L'activité du complexe extrait/ATB a augmenté à l'égard de la bactérie (tab.41 et fig.62 et fig.63)

Tableau 41: les diamètres d'inhibition des ATB/Extraits sur *Klebsiella oxytoca*

	Antibiotiques					
	Pénicilline	Tétracycline	Erythromycine	Chloramphénicol	Céfotaxime	Ampicilline
ATB	0 « R »	21 « I »	0 « R »	28 « I »	35 « S »	19 « I »
ATB+ K	0 « R »	30 « S »	0 « R »	30 « S »	34 « S »	17 « I »
ATB+ T	0 « R »	32 « S »	0 « R »	0 « R »	36 « S »	12 « R »

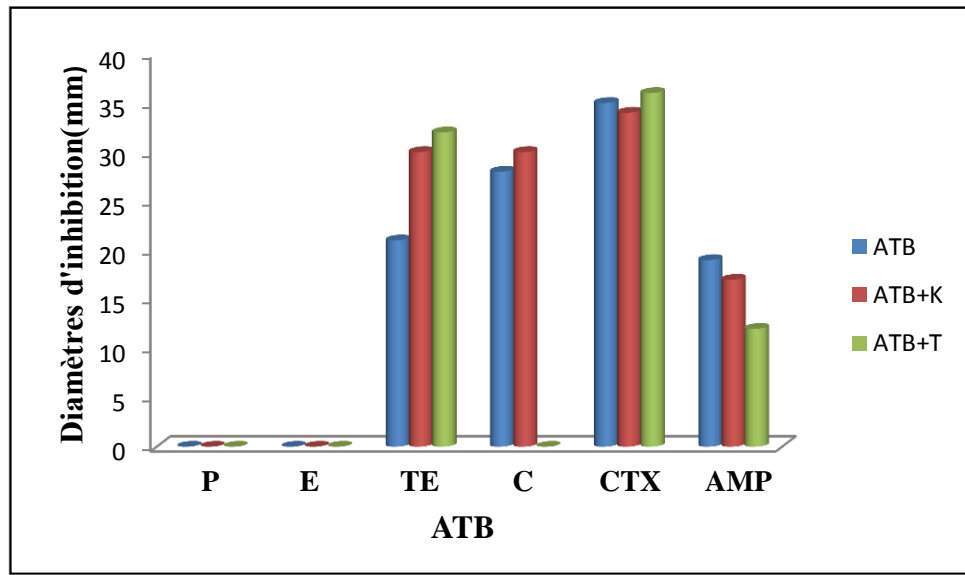


Figure 62: Présentation graphique de l'effet ATB/Extraits de *Klebsiella oxytoca*
(**K** : *Teucrium polium*; **T** : *Thymus ciliatus*)

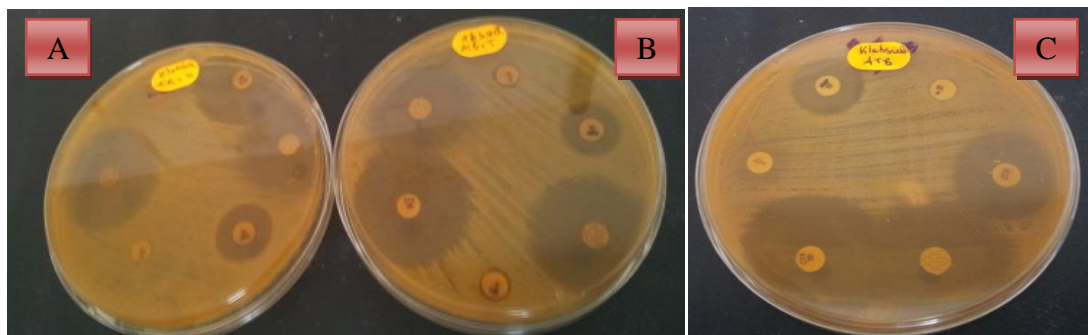


Figure 63: l'effet antibactérien de l'ATB/Extraits sur *K. oxytoca*.
(**A** : *Teucrium polium*+ ATB; **B** : *Thymus ciliatus*+ATB; **C**: ATB seul)

Les travaux de **Shahba et al., (2013)** montrent la résistance de *Klebsiella oxytoca*, vis-à-vis de l'extrait du *Teucrium polium*.

Une étude similaire faite par **Oganesyan et al., (1992)** montre l'effet antimicrobien des principes actifs de *Teucrium polium*, sur plusieurs bactéries y compris *Klebsilla sp.*

En ce qui concerne l'activité antibactérienne du *Thymus*, **Ghorab et al., (2013)** ont démontré la sensibilité de la souche *Klebsiella sp.* vis-à-vis de cette plante avec une concentration inférieure à 100mg/ml. (40mg/ml)

CONCLUSION

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

En vue de minimiser l'utilisation des antibiotiques et apporter plus d'information sur l'importance des plantes médicinales et précisément sur le *Thymus* et le *Teucrium*, à raison de leur richesse en polyphénols.

On peut conclure que :

- Le screening phytochimique de plantes basé sur des tests spécifiques avait mis en évidence divers métabolites secondaires : des flavonoïdes, des tanins, des saponosides, et des terpènes et stérols.
- L'étude bactériologique du lait de vaches malades à différentes fermes de wilaya de Guelma a révélé, après identification, la présence de différentes souches dont *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* et *streptococcus agalactiae*.
- Les tests biologiques effectués montrent d'une part que l'effet antibactérien des plantes *Teucrium polium* et *Thymus ciliatus* a été expérimenté avec succès et agissent différemment sur les souches bactériennes isolées. En revanche le *Thymus ciliatus* montre un effet plus important que *Teucrium polium*, on note aussi que la synergie de deux extraits donne plus d'efficacité par rapport aux extraits seuls. Cet effet est dû à la présence des flavonoïdes et des polyphénols qui sont des métabolites secondaires réputés pour leurs effets antibactériens.

CONCLUSION

- D'autre part l'effet antioxydant de deux extraits du *Thymus ciliatus* et *Teucrium polium* présente des activités anti-radicalaires très importantes.

On peut dire aussi que en médecine traditionnelle, les deux plantes sont utilisées pour soigner les infections, les syndromes dysentériques et pour désinfecter les plaies. Par conséquent, l'inhibition de la croissance de *E. coli*, *S. aureus*, et *Proteus* bactéries responsables de ces pathologies, permet de justifier au moins partiellement les usages ethno-pharmacologiques de ces plantes.

Dans ce contexte on propose les perspectives suivantes :

- Isoler les substances actives de 2 plantes afin de cerner mieux leur activité biologique.
- Tester ces 2 plantes sur d'autres souches cliniques de haute pathogénicité
- Traiter in vitro les mamelles de vaches atteintes de mammite par ces extraits.
- Développer des remèdes à base de ces plantes.

Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Strep

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 mn	
			Incolore	Rose-rouge
HIP	Acide hippurique	Hydrolyse	NIN / jusqu'à 10 mn	
			Incolore/ Bleu pâle	Bleu foncé/violet
ESC	Esculine Citrate de fer	Hydrolyse β - glucosidase	Incolore/jaune	pâle Noir/gris
PYRA	Acide pyroglutamique- β - naphtylamide	PYRrolidonyl Arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 mn	
			Incolore/ orange pâle	Orange
α GAL	6-bromo-2-naphtyl- α D-galactopyranoside	α -GALactosidase	Incolore	Violet
β GUR	Acide naphthol- ASB β glucuronique	β -GIUcuRonidase	Incolore	Bleu
β GAL	2-naphtyl- β Dgalactopyranoside	β -GALactosidase	Incolore ou violet pâle	Violet
PAL	2-naphtyl phosphate	Phosphatase Alcaline	Incolore ou violet pâle	Violet
LAP	L-leucine- β - naphtylamide	Leucine AminoPeptidase	Incolore	Orange
ADH	L-arginine	Arginine DIHydrolase	Jaune	Rouge
RIB	D-ribose	Acidification	Orange/rouge	Jaune
ARA	L-arabinose			
MAN	D-mannitol			
SOR	D-sorbitol			
LAC	D-lactose			
TRE	D-tréhalose			
INU	Inuline			
RAF	d-raffinose			
AMD	Amidon			
GLYG	glycogène			

Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api Staph

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
0	Aucun Témoin	négatif	Rouge	-
GLU	D-glucose	Témoin positif	Rouge	Jaune
FRU	D-fructose	Acidification à partir du carbohydate		
MNE	D-mannose			
MAL	Maltose			
LAC	Lactose			
TRE	D-tréhalose			
MAN	D-mannitol			
XLT	Xylitol			
MEL	D-melibiose			
NIT	Nitrate de potassium			
			Incolore/rose	Rouge
PAL	β -naphtyl ac.phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 mn	
			Jaune	Violet
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbonyl	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
			Incolore/ rose	Violet/rose
RAF	Raffinose	Acidification à partir du carbohydate	Rouge	Jaune
XYL	Xylose			
SAC	Saccharose			
MDG	α -méthyl- Dglucosamine			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/violet

Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20E

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	Ortho-nitro-phenylgalactoside	Beta-galactosidase	incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert-pâle/jaune	Bleu-vert/vert
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/ fin liseré
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA / Immédiat	
			jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND / 2 mn, maxi	
			jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
			incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
Ox	Sur papier filtre	Cytochrome-oxydase	Ox / 5-10 mn	
			incolore	Anneau violet
NO3-NO2	Tube GLU	Production de NO2 Réduction au stade N2	NIT 1 + NIT 2 / 2-3 mn	
			Jaune	Rouge
			Zn	
			Rouge	Jaune
MOB	Microscope	Mobilité	Immobile	Mobile
MAC	Milieu de MacConkey	Culture sur	Absence	Présence
OF	Glucose	Fermentation : sous huile Oxydation : à l'air	Vert	Vert
			Jaune	Jaune
CAT		Possession d'une catalase	H2O2 / 1-2 mn	
			Pas de bulles	Bulles

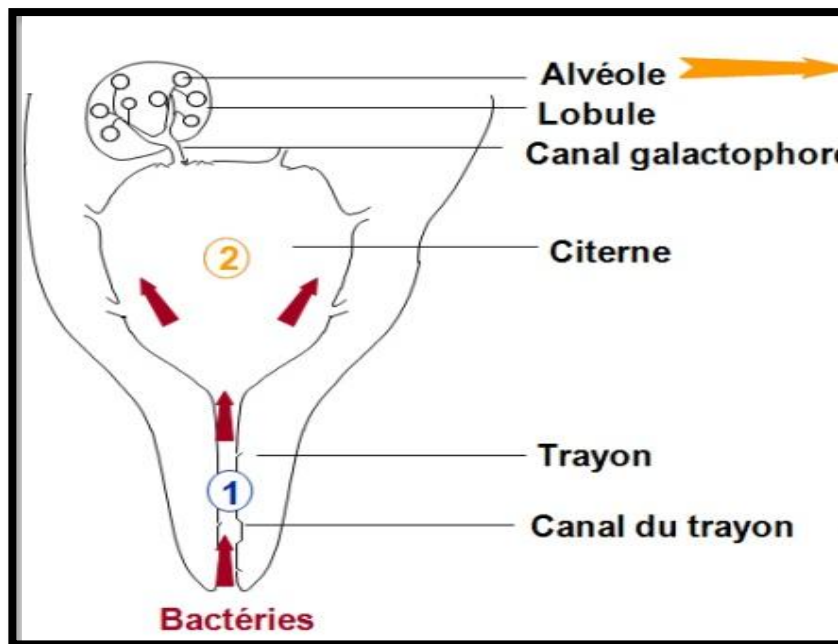


Figure représentant l'anatomie de la mamelle.

Solutions préparées :

1- Solution du 0,5 MacFarland

Cette solution représente le mélange d'une solution de BaCl_2 à 1% et de l'acide sulfurique à 1%.

➤ **Solution de BaCl_2 à 1%**

1g de BaCl_2 → 100ml d'eau distillée

➤ **Préparer une solution d' H_2SO_4 dilué à 1%**

Prélever 1ml d'acide sulfurique et compléter le volume jusqu'au 100ml par l'eau distillée.

➤ Prélever 0,5 ml de la solution de BaCl_2 et le déposer dans une fiole ou une éprouvette, compléter le volume jusqu'à 100ml avec la solution de l'acide sulfurique.

- Mesurer l'absorbance de mélange, elle doit être comprise entre 0,08 et 0,1 (longueur d'onde = 625nm).

✚ Conserver cette solution dans un flacon ombré à T° ordinaire.

2- L'eau physiologique

-L'eau physiologique est une solution à 9%.

- ✓ 9g de NaCl par 1 litre de l'eau distillée.
- ✓ Après préparation, stériliser cette solution et la conserver à 4° jusqu'à leur utilisation.

Tableau : Concentrations et diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques
(Se reporter aux recommandations pour certaines espèces ou certains groupes bactériens.
Pour les antibiotiques indiqués en italique, les données sont provisoires).

Antibiotique		Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
			S	R	S	R
PENICILLINES	Pénicilline G	6 µg (10 UI)	< 0,25	> 2	> 29	< 18
	Ampicilline	10 µg	< 2	> 8	> 21	< 16
	Ampicilline/sulbactam	10/10 µg	< 2 /8	> 8/8	> 21	< 16
	Amoxicilline	25 µg	< 2	> 8	> 23	< 16
	Amoxicilline/ac. clavulanique	20/10 µg	< 2/2	> 8/2	> 23	< 16
	Ticarcilline	75 µg	< 8	> 16	> 24	< 22
	Ticarcilline/ac. clavulanique	75/10 µg	< 8/2	> 16/2	> 24	< 22
	Pipéracilline	75 µg	< 4	> 16	> 22	< 18
	Pipéracilline/tazobactam	75/10 µg	< 4	> 16	> 22	< 18
	Sulbactam		< 8	-		
TETRACYCLINES	Tétracycline	30 UI	< 4	> 8	> 19	< 17
	Oxytétracycline	30 UI	< 4	> 8	> 19	< 17
	Doxycycline	30 UI	< 4	> 8	> 19	< 17
	Minocycline	30 UI	< 4	> 8	> 19	< 17
	<i>Tigécycline</i>	<i>15 µg</i>	< <i>0,25</i>	> <i>0,5</i>	> <i>22</i>	< <i>22</i>
PHENICOLES	Chloramphénicol	30 µg	< 8	> 16	> 23	< 19
MACROLIDES	Erythromycine	15 UI	< 1	> 4	> 22	< 17
	Dirithromycine	15 µg	< 0,12	> 4	> 28	< 16
	Azithromycine	15 µg	< 0,5	> 4	> 22	< 17
	Spiramycine	100 µg	< 1	> 4	> 24	< 19
CEPHALOSPORINES (Voie parentérale)	Céfotaxime	30 µg	< 1	> 2	> 26	< 23
	Ceftriaxone	30 µg	< 1	> 2	> 26	< 23
	Ceftazidime	30 µg	< 4	> 8	> 21	< 19
	Céfépime	30 µg	< 4	> 8	> 21	< 19
	Cefpirome	30 µg	< 4	> 8	> 21	< 19
	Latamoxef	30 µg	< 4	> 32	> 23	< 17

En **Gras** : les antibiotique utilisés

BIBLIOGRAPHIES

- **Abdollahi A., Karimpour H., Monsef-Esfehani H., (2003).** Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test. *Pharmacol. Res.* 48:31-35.
- **Alais C., (1961).** Science du lait, éd. Sep, paris 2^{ème} édition : 242.
- **Al-kufaishi A., AL-mashhedy L., (2012).** Qualitative and quantitative analysis of *Teucrium polium*. And the relation with antibacterial activity. 01: 21-26.
- **Amarati F, Satrani B, Ghanmi M., (2009).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* et *Thymus ciliatus* du Maroc. *Biotechnol Agron Soc Environ*; 14(1): 141-148.
- **Amjad Hossain M. (2005).** Neem Seed oil: Bangladesh, Examples of the Development of pharmaceutical Products from Medicinal Plants. Bangladesh Council of Scientific and Industrial Research (BCSIR); 10:59-63.
- **Baba Aissa F., (1991).** Les plantes médicinales en Algérie. Bouchéne et Ad.Diwan.
- **Bahorun T., (1997).** Substance Naturelles Actives : La flore Mauricienne, Une Source D'approvisionnement Potentielle. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius.
- **Baydar N.G., Özkan G., Sagdiç O., (2004).** Total phenolic contents and antibacterial activities of Thym extracts. *Food Control* 15, 335–33.
- **Beerens K., Liquet L., (2010).** Maîtrise du taux cellulaire du lait. *Rec.Méd.Vét.*, 170, 419-427.
- **Benhamza L., (2008).** Effets biologiques de la petite *centauree Erythraea centaurium*, *Pers.* Anatomie pathologique /pharmacologique. Mémoire de doctorat. Université mentouri-Constantine. Algérie.130p.
- **Ben moussa A., barberis A., (2007).** Etude bibliographique de la mammite de vache laitière- Enseignements pour l'Algérie. Mémoire pour l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire, Université de Batna. 2-4.
- **Billerbeck V.G., Roques C., Vanière P., Marquier P. (2002).** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes.* 3 (10) : 248-251.
- **Boullard B., (2003).** Plantes médicinales du monde : réalités et croyances. Paris. pp. 1092-1107.
- **Bourgeois C.M., Leuveau J.Y., (1980).** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, volume 3, Lavoisier, 331p.

- **Braun Blanquet J., (1975).** La flore du bassin méditerranéen. Essai de systématique. C.N.R.S. Paris.
- **Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 3^{ème} Ed. Editions médicales internationales, 3^{ème} Edition. Edition Tec& Doc Lavoisier. Paris. P.1120.
- **Celiktas O., Bedir E., Vardar Sukan F., (2007b).** In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. Food Chem. 101: 1457-1464
- **Dastidar S.G., (2004).** Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. International Journal of Antimicrobial Agents. 23:99-102.
- **Descoteaux T., Roy O., (2008).** Ecologie des germes et prévention des infections mammaires inhabituelles, recueil du congrès de la SNGTV, Nantes, p 885-891.
- **Djeridane A., Yousfi M., Vidal N., Lesgards J. F., Stocker P., (2007).** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. Food Chemistry, vol. 97: 654-660.
- **Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., (2003).** Screening phytochimique d'une endémique ibéro-Marocaine, *Thymelaea lythroides*. Bull Soc Pharm. Bordeaux; 142:61-78.
- **Escarpa A., Gonzalez M.C., (2001).** Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. Anal. Chim. Acta 427, 119-127.
- **Essawi T. et Srour M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity, Ethnopharm. 70: 343-349.
- **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008)** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .C. R. Biologies. 331: 372-379.
- **FAO., (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, Food et agriculture Org, 271p
- **Faroult J., (1998).** Staphylocoques et mammites bovines: importance des espèces différentes de Staphylococcus aureus, problèmes des échecs thérapeutiques G T V., 2B-420, 7-12.
- **GABLI A., (2005).** Etude cinétique des cellules somatiques dans le lait des vaches atteintes de mammites et de vaches saines- Enseignements pour l'Algérie, Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire, Université de Constantine.

Références bibliographique

- **Ghorab H., Kabouche A., Semra Z., Ghannadi A., Sajjadi EB., Touzani R., and Kabouche Z. (2013)** : Biological activities and compositions of the essential oil of *Thymus ciliatus* from Algeria. 05: 28-32.
- **González A.G., Alvarenga N.L., Ravelo A.G., Jimenez I.A., Bazzocchi I.L., Canela N.J., Moujir L.M., (2011)**. Antibiotic phenol from *Thymus ciliates*. Phytochemistry .43, 129–132.
- **Grosmond G., (2001)**. La phytothérapie. Elevage et agriculture biologique. Bulletin des GTV et HS. 143-145.
- **Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R., Bernigault R. (2005)**. Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole. Pp : 554-558
- **Hammoudi R., Hadj Mahammed M., Ramdane F., et Khodir A.A., (2012)** : Activite antibacterienne des extraits phenoliques de la plante *teucrium polium geyrii.*, Mémoire En vue de l'obtention du Diplôme de MAGISTER en Biochimie, éd. Université Kasdi Merbah, Ouargla, département de biologie : 49-54.
- **Hamrouni M., Rosmy Syamsir D., Azah Mohamad Ali N. (2002)**: chemical constituents and antimicrobial activity of the germander (*Teucrium polium L*) and (*Teucrium arduini L*), 08:56-67.
- **Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Djilali B. (2009)**: Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube, rev. Microbiol. Ind. San et Environ. p : 37-55.
- **Hasani, P., Yasa N., Vosough-ghanbari S., Mohammadirad, A., Dehghan, G. et Abdollahi M., (2007)**. In vivo antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to a-tocopherol. Acta Pharm. 57 : 123–129.
- **Hivin B., (2008)**. Phytothérapie et aromathérapie en élevage biologique bovin enquête auprès de 271 éleveurs de France. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Université Claude-bernard - lyon I (Médecine - Pharmacie).
- **Institut pasteur., (1978)**. milieux et réactifs de laboratoire pasteur. Ed, Publifab, Impremrie-Reliure maison Mame, Tours. Pg 573 ; 79.
- **Kabouche Z., Ghorab H., Kabouche A., Semra Z., Ghannadi A., Sajjadi EB., Touzani R., (2004)**. Biological activities and compositions of the essential oil of *Thymus ciliates* from Algeria. The royal Society of Chemistry Analyst. 128, 156-164.
- **Kabouche A., Ghannadi A., (2009)**. *Thymus ciliatus*-the highest thymol containing essential oil of the genus. Nat Prod Commun 4 (9): 1251-1254.

- **Kammerer M., Pinault L., (2001).** Thérapeutique en élevage biologique. Bulletin des Groupements techniques vétérinaires, Hors série Agriculture biologique. 121-126.
- **Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogugbuaja V.O., (2004):** Identification of active principles of *M. balsamina* (balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci*; 4(3):179-182.
- **Leyler G., vierling E., (2001) :** microbiologie et toxicologie des aliments, éd. Doin et CNDP, 3eme édition : 172-174.
- **Marouf A., (2002).** Analyse instrumentale à l'usage des biologistes. 2eme édition Dar el Gharb. Oran. P, 17 – 24.
- **Mau J.L., Huang P.N., Huang S.J., Chen C.C., (2004).** Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antridia camphorate my-celia*. *Food Chem*; 86: 25-31.
- **Martin S., Andriantsitohaina R., (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéologie*. 51: 304-315.
- **Matthews et al.,** Bovine mammary epithelial cell invasion by *Streptococcus uberis*, *Infection and immunity*, 1994, **62** (12): p 5641-5646.
- **Max Wichd., Bbert., (2003).** Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- **Mau J.L., Huang P.N., Huang S.J., Chen C.C., (2004).** Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antridia camphorate my-celia*. *Food Chem*; 86: 25-31.
- **Medefouni., Bendib., (2006).** Bactériologie sur lait en clientèle, *Le point vétérinaire*, 2005, n° 255 : p 52-53.
- **Mechai A. (2009).** Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones : études physiologiques et biochimiques, Thèse de doctorat de l'université Badji- Mokhtar, Annaba, 160p.
- **Naghbi F., Mosaddegh M., Mohammadi M.S et Ghorbani A., (2005).** Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology Iranian .*Journal of Pharmaceutical Research*, Vol 2: 63-79.
- **Narayana K.R. (2000).** Bioflavonoids: Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. *Indian Journal of pharmacology*. 33:2-13.
- **Okmu D.E., (2005).** Phytochemicals, vitamins and mineral contents of two Nigerian medicinal plants. *Int J Mol Adv Sci*; 1(14):375-381.

- **Oganesyan g. B., Galstyan a. M., Mnatsakanyan v. A., Shashkov A. S., et Gababyan P. V., (1992).** Phenylpropanoid glycosides of *Teucrium polium*. UDC, Erevan 581: 556-558.
- **Parsaee H., Shafiee-Nick R., (2006).** Anti-Spasmodic and anti-Nociceptive effects of *Teucrium polium* aqueous extract. Iranian biomedical journal. 10(3): 145-149.
- **Porter N., (2001).** Essential oils and their production. Crop & Food Research; 39p.
- **Poutrel B., (2002).** Actualités sur les méthodes de diagnostic des mammites. Journées nationales GTV INRA, Tours : 157-162.
- **Proestos C., Sereli D., Komaitis M., (2004).** Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. Food Chemistry. 95: 44-52.
- **Proestos C., Sereli D., Komaitis M., (2006).** Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction technics. Journal of Food Quality. Vol. 29: 567–582.
- **Quezel P., et Santa S. (1963) :** Nouvelle flore de l'Algérie. Ed, C.N. R.S., Paris. Tome 1. et 2, 1170 p.
- **Roberson et al. (1994).** Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms, J.Dairy Sci., 77: 3354-3364.
- **Shahba S., Bokaeian M., Mozafari-Sabet N.A., Saeidpour-Parizi A., Bameri Z., Nikbin M., (2013).** Comparison between antibacterial effect of *Teucrium polium* plant and common antibiotics on the bacteria causing urinary tract infections. Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS); 15: 10-15.
- **Sagdaç O. (2003)** Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish *thyme* and *oregano* hydrosols. Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 36: 467-473.
- **Singleton V.L., (1988).** Wine phenols. In: planta, H.F. (Ed.), Modern Methods of Plant Analysis, vol. 6. Springer-Verlag, Berlin.
- **Smallfield B., (2001).** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crop & Food Research; 45-49.
- **Smith B.P., (2008).** Mammary gland health and disorders. Large animal internal medicine, fourth edition: 1112-1119.
- **Svoboda K.P et Hampson J.B., (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr.Scotland.

- **Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M., (2005).** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*. 90: 333-340.
- **Treki A., (2002).** Effets biologiques de polyphénols extraits de plantes médicinales: *Ranunculus repens* et *Thymus hirtus* sur l'activité de microorganismes responsables de certaines pathologies. Thèse de magistère de l'université de Constantine.
- **Vaquero H., Dong J., Lu J., Chen J., Shan L., Lin Y., Fan W., (2007).** Effect of extraction solvent mixtures on antibacterial activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in *Thym*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54, 7277–7286.
- **Weisen J. P., (1974)** La stratégie de la lutte anti-mammite. La prophylaxie des mammites. Ed. Vigot Frère, Paris, 43-79.
- **Wink M., (1999).** "Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology". CRC Press.
- **Wong C., Li H.B., Cheng, K.W., Chen F., (2006).** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* 97: 705-711.
- **Yamni K., Dohou N., Tahrouch S., (2003).** Screening phytochimique d'une endémique ibéro-Marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull Soc Phrm. Bordeaux*; 142:61-78.
- **Yi Z.-B., Yu Y., Liang Y.-Z., Zeng B. (2007)** -In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids, *LWT-Food Science and Technology*. 4: 1000-1016.

WEBOGRAPHIE

(1)-<http://eap.mcgill.ca/agrobio/ab370-11.htm>. Consulter le (22.02.2013)

(2)- http://www.agrireseau.qc.ca/agriculturebiologique/documents/YChorfi_rapport-final-mammite-bio-VERSION%20FINALE.pdf. Consulter le (08.04.2013)

(3)- <http://veggiegastronomie.wordpress.com/2012/11/16/la-verite-sur-le-lait/>. Consulter le (17.01.2013)

(4)- <http://www.aromaticulture.com/plante-aromatique-LAMIACEAE-Vivace-Thymus,ciliatus-296.html>. Consulter le (02.05.2013)

Notre travail est porté sur l'étude de l'activité Antibactérienne de 2 plantes médicinales *Thymus ciliatus* et *Teucrium polium* sur des souches isolées à partir de laits de vaches atteintes de mammites dans diverses exploitations laitières de la Wilaya de Guelma.

L'étude phytochimique des plantes sélectionnées montre la richesse de ces dernières en métabolites secondaire « les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les stérols et les terpènes. ».

L'étude bactériologique nous à permis d'identifier 6 souches bactériennes appartient aux espèces « *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*. » ; dont leur présences est le plus souvent signalées dans les infections mammaire.

L'étude de l'activité Antibactérienne des extraits méthanolique des deux plantes à déférentes concentrations montre un effet inhibiteur important par rapport à celui des antibiotique testés, notant toute fois, que le *Thymus ciliatus* présente une activité positive aussi significative par rapport à la *Teucrium polium*.

De plus de l'effet antibactérien marqué des extraits, ils sont dotés d'une activité antioxydante.

Mots clés : *Teucrium polium*, *Thymus ciliatus*, *Polyphénols*, Mammites, Activité antibactérienne, Antioxydant.

This research focuses on the study of the antibacterial activity of two medicinal plants *Thymus ciliatus* and *Teucrium polium* on strains isolated from milk of cows suffering from mastitis in various dairy farms in the Wilaya of Guelma.

The phytochemical study of selected plants shows the richness of the latter with secondary metabolites "flavonoids, tannins, saponins, sterols and terpenes."

Bacteriological study allowed us to identify six bacterial strains belonging to the species "*Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*"; the presence of which is most often reported in the mammary infections.

The study of the antibacterial activity of the methanolic extracts of the two plants at different concentrations by employing the method of wells showed a significant inhibitory effect compared to that of the tested antibiotics. It is also noticed that the *Thymus ciliatus* presents a significant positive activity compared to the *Teucrium polium*.

More than the definite antibacterial effect of the extracts, they are endowed with an antioxidant activity, measured by the technique of reduction of free radical DPPH.

Keywords: *Teucrium polium*, *Thymus ciliatus*, Polyphenols, Mastitis, Antibacterial Activity, Antioxidant.

ملخص

ارتكز هذا العمل على الكشف عن النشاط المضاد للبكتريا, لنبتتين طبيبتين خياطة الجراح (*Teucrium polium*) و الزعيترة (*Thymus ciliatus*) على سلالات معزولة من حليب أبقار تعاني من التهاب الضرع, في عدة مزارع للألبان في ولاية قالمة.

الفحص الكيميائي النباتي, للنباتات المختارة, يدل على ثراء هذه الأخيرة بالمركبات الثانوية: " الفلافونويدات, العفصيات, الصبونيات, الستيرويدات, و التربينات."

سمحت لنا الدراسة البكتيرية بالتعرف على 6 سلالات من البكتيريا: بروتيوس ميرابليس, كلبسيلا أوكسيتوكا, الايشيريشيا كولي. المكورات العنقودية الذهبية, المكورات العنقودية المترممة, العقديية القاطعة للدر. والذي يدل وجودهم في معظم الأحيان إلى العدوى الشديدة.

دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات الميثانول بتراكيز مختلفة. دلت على نشاط هام و معتبر مقارنة بالمضادات الحيوية المستعملة. عموما فان النشاط المتعلق بالزعيترة, اظهر نشاط قويا مقارنة بخياطة الجراح.

زيادة عن النشاط المضاد للبكتريا الملحوظ, تم التأكد من النشاط المضاد للأكسدة الهام.

الكلمات المفتاحية:

-خياطة الجراح - الزعيترة -البوليفينول - التهاب الضرع - النشاط المضاد للبكتريا - من النشاط المضاد للأكسدة.