

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA  
TERRE ET DE L'UNIVERS  
DEPARTEMENT : ECOLOGIE ET GENIE 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 :

---

**Etude phytochimique et activité antibactérienne de deux plantes  
médicinales *Rosmarinus officinalis* et *Cinnamomum  
zeylanicum***

---

**Présenté par :**

Mosbah Moufida  
Fattoum Souheila

**Devant le jury composé de :**

|                       |                     |       |                      |
|-----------------------|---------------------|-------|----------------------|
| <b>Présidente :</b>   | Mme. Ibn Cherif H.  | M.C.B | Université de Guelma |
| <b>Examinatrice :</b> | Mme. Azzouz F.      | M.A.A | Université de Guelma |
| <b>Encadreur :</b>    | Mme. Boussadia M.I. | M.A.A | Université de Guelma |
| <b>Co-encadreur :</b> | Mme. Hamdiken M.    | M.A.A | Université de Guelma |

**Juin 2014**

# REMERCIEMENTS

*Avant tous nos plus sincères remerciements à notre Dieu « الله » qui nous a donné la force et le courage pour réaliser ce travail.*

*On tient à exprimer nos gratitudes à Mme Azzouz F. M.A.A. et Mme Iben Cherif. H. M.C.B à l'Université de 08 Mai 1945 de Guelma pour avoir accepté de juger ce travail.*

*On voudrait remercier notre directeur de mémoire Mme. BOUSSADIA M I. Maitre assistante à l'université de Guelma pour avoir acceptée de nous encadrer et pour la confiance, le suivie, l'aide, le soutien et les conseils qu'elle nous a accordé toute au long de notre projet de fin d'étude.*

*A M<sup>elle</sup> HAMDIKEN M. Pour avoir co-encadré et diriger ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, son aide et ses conseils pertinents afin de réaliser ce travail .*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements à Mme Khanaka K Maitre assistante à l'Université de Guelma et Mr. Ibn Tourki responsable du laboratoire de bactériologie à Hôpital Ibn Zohr de Guelma.*

*On tient à remercier également Mme. HIMER Ratiba technicienne du laboratoire de biochimie, Université de Guelma pour nous avoir soutenus durant notre période de travail sein de ce laboratoire, des sons oblier Ghania, Asma, Wafa et Hassiba qui nous ont facilité la tache .*

*Un grand merci à nos parents, pour tout l'amour et le soutien qu'ils nous ont apporté à tous les moments de notre vie. Ils sont toujours été une source de tendresse et un modèle de travail, de sagesse et d'humilité.*

*Nos sincères remerciements aussi :*

- A nos frères.*
- A nos amies et camarades.*

# *Table des Matières*



**Table des matières**

|  |    |
|--|----|
| <b>Liste des abréviations</b>  |    |
| <b>Liste des figures</b>   |    |
| <b>Liste des tableaux</b>  |    |
| <b>Introduction</b> .....  | 01 |
| <b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>                                      |    |
| I. L'antibiothérapie .....   | 03 |
| 1. Définition d'un antibiotique .....                                | 03 |
| 2. Modes d'action des antibiotiques.....                             | 03 |
| 3. Bactéries mult -résistantes.....                                  | 05 |
| 4. La résistance aux antibiotiques.....                              | 06 |
| 4.1. La résistance naturelle .....                                   | 06 |
| 4.2. La résistance acquise .....                                     | 07 |
| 5. Spectre D'activité / Sensibilité .....                            | 08 |
| II. L'aromathérapie.....   | 10 |
| 1. la phytothérapie.....   | 10 |
| 1.1. Définition de la phytothérapie .....                            | 10 |
| 1.2. Différents types de la Phytothérapie.....                       | 11 |
| 1.3. Les avantages de la phytothérapie.....                          | 11 |
| 2. Les plantes médicinales.....                                      | 12 |
| 2.1. L'importance de l'utilisation des plantes médicinales.....      | 12 |
| 2.2. Les principes éléments actifs des plantes médicinales .....     | 12 |
| 2.3. Domaines d'application des plantes médicinales.....             | 16 |
| 3. Les plantes médicinales sélectionnées.....                        | 17 |
| 3. 1. <i>Rosmarinus officinalis</i> .....                            | 17 |
| 3.1.1. Etymologie .....  | 17 |
| 3.1.2. Caractéristiques botaniques .....                             | 17 |
| 3.1.3. Classification du romarin .....                               | 18 |
| 3. 1.4. Composition biochimique du romarin.....                      | 18 |
| 3.1.5. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin..... | 19 |
| 3. 2. <i>Cinnamomumzeylanicum</i> .....                              | 19 |
| 3.2.1. Etymologie.....   | 20 |
| 3.2.2. Caractéristiques botaniques.....                              | 20 |
| 3.2.3. Classification de la Cannelle de Ceylan.....                  | 21 |
| 3.2.4. Habitat et culture .....                                      | 21 |
| 3.2.5. Composition chimique .....                                    | 22 |
| 3.2.6. Propriétés pharmacologiques et emplois.....                   | 22 |
| <b>MATERIEL ET METHODES</b>  |    |
| 1. Etude phytochimique.....  | 23 |
| 1.1 Récolte du matériel végétal.....                                 | 23 |

---

|  |    |
|--|----|
| 1.2. Tests préliminaire.....   | 23 |
| 1.3. Préparation des extraits.....   | 26 |
| 1.4. Analyse de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> et<br><i>Cinnamomum zeylanicum</i> ..... | 28 |
| 1.4.1. Séparation et identification par chromatographie sur couche mince<br>(C.C.M) .....                        | 28 |
| 1.4.2. Dosage des polyphénols.....   | 28 |
| 1.4.3. Dosage des flavonoïdes.....   | 29 |
| 2. Etude Bactériologique.....  | 30 |
| 2.1. Les espèces bactériennes sélectionnées.....   | 30 |
| 2.2. Milieux de culture utilisés.....  | 32 |
| 2.3. Essais antibactériens.....  | 33 |
| 2.3.1. Test du méthanol (MeOH) ou control négatif.....   | 33 |
| 2.3.2. Antibiogramme ou control positif .....  | 33 |
| 2.3.3. Tests de l'activité antibactérienne des extraits.....   | 34 |
| 2.3.3.1. Méthode de diffusion à partir d'un disque solide.....   | 35 |
| 2.3.3.2. Méthode de l'activité antibactérienne en milieu liquide.....  | 36 |

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

|  |    |
|--|----|
| 1. Résultats de l'étude phytochimique.....   | 39 |
| 1.1. Tests préliminaires de la composition chimique.....   | 39 |
| 1.2. Résultat de la préparation de l'extrait méthanolique du <i>Rosmarinus<br/>officinalis</i> et du <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ... .. | 41 |
| 1.3. Chromatographie sur couche mince.....   | 43 |
| 1.4. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes .....   | 44 |
| 2. Résultats de l'activité antibactérienne.....  | 46 |
| 2.1. Test du méthanol ou control négatif .....   | 46 |
| 2.2. Antibiogramme ou control positif .....  | 46 |
| 2.3. Résultat de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques.....  | 49 |
| 2.3.1. Réponse de la souche <i>Bacillus cereus</i> aux extraits testés.....  | 49 |
| 2.3.2. Réponse de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 aux extraits<br>testés.....  | 53 |
| 2.3.3. Réponse de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 aux extraits<br>testés.....  | 56 |
| 2.3.4. Réponse de la souche <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 aux extraits testés... ..   | 59 |
| 2.3.5. Réponse de la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 aux<br>extraits testés.....   | 62 |
| <b>CONCLUSION</b> .....  | 67 |

### **RESUME**

### **ABSTRACT**

### **ملخص**

### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

### **ANNEXES**



# *Liste des Abréviations*



## *Liste des abréviations*

**°C** : degré Celsius

**µg** : microgramme

**µl** : microlitre

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ATCC** : American type culture collection

**BMR** : Bactéries multi-résistantes

**C** : *Cinnamomum zeylanicum*

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**cm** : centimètre

**CMB** : Concentration minimale bactéricide

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**DO** : Densité optique

**EMC** : Extrait méthanolique du *Cinnamomum zeylanicum*

**EMR** : Extrait méthanolique du *Rosmarinus officinalis*

**g** : gramme

**h** : heure

**kg** : kilogramme

**M** : mètre

**mg EAG /g** : milligramme d'équivalent acide gallique par gramme

**mg EQ/g d'ext** : milligramme d'équivalent quercétrine par gramme d'extrait

**mg** : milligrammes

**ml** : millilitre

**mm** : millimètre

**mn** : minute

**N** : normalité

**nm** : nanomètre

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**P/V** : poids volume

**R** : *Rosmarinus officinalis*

**SFM** : Société Française de Microbiologie

**UFC** : Unité Formante Colonie

**UV** : Ultra violet

# *Liste des figures*



## *Liste des figures*

| <b>Figure N°</b> | <b>Les titres des figures</b>   | <b>N° page</b> |
|------------------|---|----------------|
| Figure 1         | Schéma représentant le mode d'action des antibiotiques  | 04             |
| Figure 2         | Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries   | 08             |
| Figure 3         | <i>Rosmarinus officinalis</i>   | 18             |
| Figure 4         | <i>Cinnamomum zeylanicum</i>  | 21             |
| Figure 5         | Cannelle de ceylan  | 21             |
| Figure 6         | Photographie d'un Rot à vapeur  | 26             |
| Figure 7         | Photographie d'un lyophilisateur  | 26             |
| Figure 8         | Schéma récapitulatif du protocole expérimental  | 27             |
| Figure 9         | Droite d'étalonnage de l'acide gallique   | 29             |
| Figure 10        | Droite d'étalonnage de la quercétine  | 30             |
| Figure 11        | Principe de la méthode de diffusion par disque  | 35             |
| Figure 12        | Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide  | 37             |
| Figure 13        | Détermination de la CMB en milieu solide  | 38             |
| Figure 14        | Test d'identification des flavonoïdes   | 39             |
| Figure 15        | Test d'identification des alcaloïdes  | 40             |
| Figure 16        | Test d'identification des tanins galliques  | 40             |
| Figure 17        | Test d'identification des tanins cathéchiques   | 40             |
| Figure 18        | Test d'identification des saponosides   | 40             |
| Figure 19        | Test d'identification des coumarines  | 41             |
| Figure 20        | Test d'identification des mucilages   | 41             |
| Figure 21        | Présentation graphique des rendements après lyophilisation pour les deux plantes étudiées   | 42             |
| Figure 22        | Chromatographie sur couche mince des deux extraits méthanoliques  | 43             |
| Figure 23        | Photographies du test négatif exercé sur les différentes souches  | 46             |
| Figure 24        | Antibiogramme des souches testées   | 48             |
| Figure 25        | Antibiogramme des souches : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 49             |
| Figure 26        | Réponse de la souche <i>Bacillus cereus</i> aux extraits testés   | 50             |
| Figure 27        | Aromatogramme du <i>Bacillus cereus</i>   | 51             |

## *Liste des figures*

| <b>Figure N°</b> | <b>Les titres des figures</b>   | <b>N° page</b> |
|------------------|---|----------------|
| Figure 28        | Activité antibactérienne en milieu liquide  | 51             |
| Figure 29        | La CMB de la souche <i>Bacillus cereus</i>  | 52             |
| Figure 30        | Pourcentage d'inhibition de la souche <i>Bacillus cereus</i>                        | 53             |
| Figure 31        | Réponse de la souche de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 aux extraits testés | 54             |
| Figure 32        | Aromatogramme de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923                  | 54             |
| Figure 33        | Activité antibactérienne en milieu liquide ( <i>S.aureus</i> ATCC 25923)            | 55             |
| Figure 34        | La CMB de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923                         | 55             |
| Figure 35        | Pourcentage d'inhibition de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923       | 56             |
| Figure 36        | Réponse de la souche de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 aux extraits testés | 57             |
| Figure 37        | Aromatogramme du <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300                            | 57             |
| Figure 38        | Activité antibactérienne en milieu liquide ( <i>S.aureus</i> ATCC 43300)            | 58             |
| Figure 39        | La CMB de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300                         | 58             |
| Figure 40        | Pourcentage d'inhibition de de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300    | 59             |
| Figure 41        | Réponse de la souche <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 aux extraits testés         | 60             |
| Figure 42        | Aromatogramme du <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922                                 | 61             |
| Figure 43        | Activité antibactérienne en milieu liquide ( <i>E.coli</i> )                        | 61             |
| Figure 44        | Pourcentage d'inhibition de la souche <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922            | 62             |
| Figure 45        | Réponse de la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 aux extraits testés   | 63             |
| Figure 46        | Aromatogramme du <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853                           | 63             |
| Figure 47        | Activité antibactérienne en milieu liquide ( <i>Ps.aeruginosa</i> )                 | 64             |
| Figure 48        | Pourcentage d'inhibition de la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853      | 65             |

# *Liste des Tableaux*

---

*Liste des tableaux*



## *Liste des tableaux*

| <b>Tableaux N°</b> | <b>Les titres des tableaux</b>   | <b>N° page</b> |
|--------------------|--|----------------|
| Tableau 1          | Principaux mécanismes d'action des antibiotiques                                 | 04             |
| Tableau 2          | les Diamètres critiques des antibiotiques utilisés                               | 34             |
| Tableau 3          | Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition                   | 36             |
| Tableau 4          | Screening phytochimique des deux plantes   | 39             |
| Tableau 5          | Rendement des deux plantes   | 42             |
| Tableau 6          | Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'EMR et l'EMC             | 45             |
| Tableau 7          | Diamètre d'inhibition du test positif exercé sur les différentes souches en (mm) | 47             |
| Tableau 8          | Mécanismes de résistance bactérienne   | 49             |
| Tableau 9          | Pourcentage d'inhibition du <i>Bacillus cereus</i>                               | 52             |
| Tableau 10         | Pourcentage d'inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923              | 56             |
| Tableau 11         | Pourcentage d'inhibition du <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300              | 59             |
| Tableau 12         | Pourcentage d'inhibition d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922                   | 62             |
| Tableau 13         | Pourcentage d'inhibition de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853             | 64             |

# *Introduction*



### **Introduction**

L'organisme humain, constamment exposé à une multitude de microbes (bactéries, virus, parasites, champignons), possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus (**Hart et al., 1969**). Cependant, dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave (**Patrick et al., 1988**).

Les maladies infectieuses causées par les bactéries et les champignons affectent des millions de personnes dans le monde entier, et causent de lourdes pertes au niveau économique. De nombreux programmes ont été conduits pour découvrir et développer de nombreux agents antimicrobiens d'origine biologique. Ainsi 27 antibiotiques et 12 antifongiques étaient en développement en 1998 contre les infections bactériennes et fongiques (**Persidis, 1999**), ce qui illustre l'effort sérieux exercé pour la lutte contre les maladies infectieuses.

Les antibiotiques figurent parmi les médicaments les plus puissants et les plus importants sur le marché, les médecins les prescrivent pour anéantir les bactéries et guérir les infections. Ils servent à traiter les différentes infections bactériennes, depuis les infections potentiellement mortelles comme la méningite, jusqu'aux problèmes les plus courants comme l'acné, mais les antibiotiques ne sont pas indistinctement actifs sur tous les agents pathogènes.

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse.

Aujourd'hui, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire. Des avantages économiques considérables dans le développement de la médecine traditionnelle et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés (**Muthu et al., 2006**), d'où la nécessité d'une valorisation de la médecine traditionnelle.

Notre travail a pour objectif principal d'étudier l'effet antibactérien de deux plantes médicinales *Rosmarinus officinalis* et *Cinnamomum zeylanicum* sur des souches connues par leur pathogénéicité après avoir déterminé au préalable leur composition chimique.

Trois parties sont consacrées pour cette étude l'une théorique représente la problématique d'antibiothérapie et la résistance bactérienne aux agents antibactérien ainsi que l'importance de l'aromathérapie afin de soulever ces problèmes, a été faite par des descriptions de plantes sélectionnées.

La deuxième partie rassemble les différentes techniques employées pour le screening phytochimique et les tests bactériologiques.

La troisième partie regroupe l'ensemble des résultats collectés ainsi que leurs discussions possibles, et enfin, nous terminerons par une conclusion et des perspectives concernant cette étude.

# *Données Bibliographiques*



## **I. L'antibiothérapie**

L'antibiothérapie ou thérapeutique-antibiotique, consiste en l'administration d'un principe actif à un organisme dont l'état sanitaire a été affecté, suite à une infection par un ou plusieurs agents bactériens, cette thérapie peut être préventive, pour éviter par exemple la surinfection des plaies des grands brûlés ou le développement d'infection post-opératoire après un acte chirurgical, ou curative pour éradiquer un agent pathogène responsable d'une infection déjà localisée.

L'étude expérimentale de l'activité antibactérienne des antibiotiques *in vitro* sur des cultures bactériennes, permet de définir certaines notions fondamentales en matière d'antibiothérapie ; mécanisme d'action, spectre d'activité et mode d'action antibactérienne (Fontaine et Cadoré, 1995).

### **1. Définition d'un antibiotique**

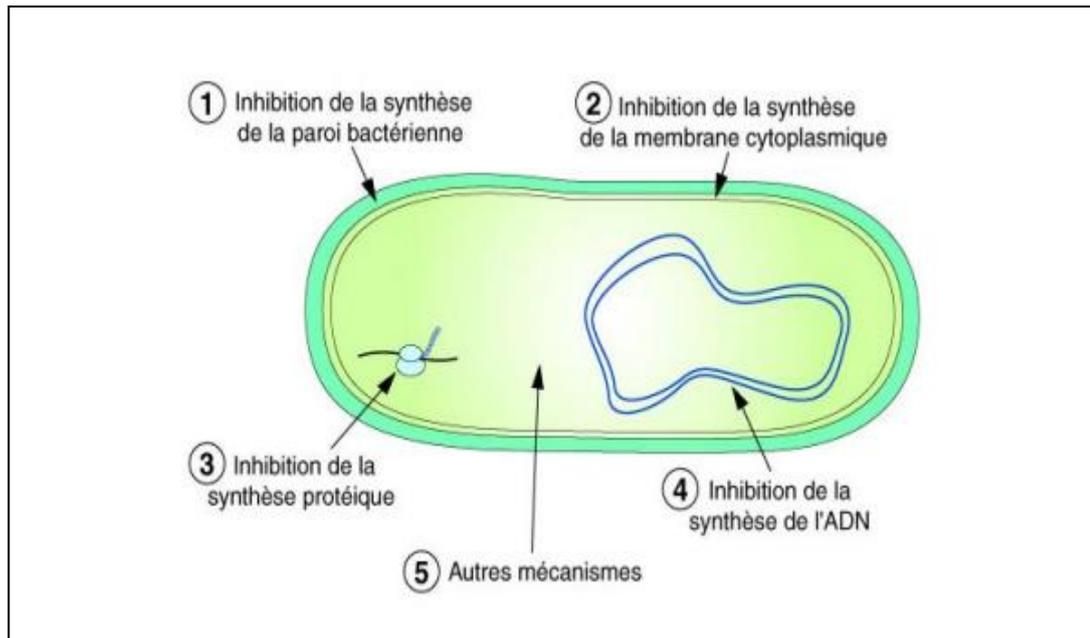
C'est une molécule antimicrobienne, actuellement définie comme un médicament, qui détruit (effet bactéricide) ou bloque (effet bactériostatique) la croissance des micro-organismes. Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à une dose plus élevée (Kohanski *et al.*, 2010). Dans tous les cas, les concentrations thérapeutiques d'antibiotiques sont définies de sorte à limiter la toxicité chez l'hôte (Cerf *et al.*, 2010).

### **2. Modes d'action des antibiotiques**

Les agents antimicrobiens détruisent les bactéries en s'attaquant directement à leurs structures essentielles (paroi cellulaire, ribosomes, membrane plasmique et ADN) (fig.1) et/ou en perturbant leurs métabolismes et par conséquent leurs fonctions (Tortora *et al.*, 2003).

Les modes d'action majeurs des antibiotiques incluent l'interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire ( $\beta$ -lactames), l'inhibition de la synthèse protéique (macrolides et aminoglycosides), l'interférence avec la synthèse de l'acide nucléique (fluoroquinolones) et l'inhibition d'une voie métabolique (Tenover, 2006).

L'action sur la membrane est aussi un mécanisme antibactérien très répandu. Les polymyxines induisent l'augmentation de la perméabilité membranaire causant la perte du contenu de la cellule bactérienne (tab.1) (Storm, 1997).



**Figure 1 :** Schéma représentant le mode d'action des antibiotiques (1).

**Tableau 1.** Principaux mécanismes d'action des antibiotiques (Prescott *et al.*, 2003).

| Antibiotique                                 | Mécanisme d'action  |
|--|---|
| <b>Inhibition de la synthèse de la paroi</b> |   |
| Pénicilline                                  | Active les enzymes lytiques de la paroi.  |
| Ampicilline                                  | Inhibe les enzymes de transpeptidation impliquées dans le pontage des chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane de la paroi bactérienne. |
| Vancomycine                                  | Se fixe directement sur la terminaison D-Ala- D-Ala et inhibe la transpeptidation.  |
| <b>Inhibition de la synthèse protéique</b>   |   |
| Chloramphénicol                              | Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et empêche la formation des liaisons peptidiques par l'inhibition de la peptidyl-transférase.       |
| Erythromycine                                | Se fixe à la sous unité 50S du ribosome et inhibe l'élongation de la chaîne peptidique.   |

**Suite tableau1** : principaux mécanismes d'action des antibiotiques  
(Prescott *et al.*,2003)

| <b>Inhibition de la synthèse des acides nucléiques</b> |  |
|--|--|
| Ciprofloxacine et autres quinolones                    | Inhibe l'ADN gyrase bactérienne et donc interfère avec la réplication de l'ADN, la transcription et autres activités impliquant l'ADN. |
| <b>Destruction de la membrane cellulaire</b>           |  |
| Polymyxine B   | Se fixe à la membrane cellulaire et perturbe sa structure et ses propriétés de perméabilité.   |
| <b>Antagonisme métabolique inhibe</b>                  |  |
| Sulfamide  | Inhibe la synthèse de l'acide folique par compétition avec l'acide paminobenzoïque   |

### 3. Bactéries multi résistantes

Les bactéries sont dites multi-résistantes aux antibiotiques (BMR) lorsque, du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutiques (2). Les principales bactéries multi-résistantes sont :

#### ❖ *Staphylocoque aureus* résistant à la méticilline

*Staphylocoque aureus* a développé des résistances quasiment à tous les antibiotiques mis sur le marché dont les classes d'anti staphylococciques majeurs (pénicilline, méthicilline). Les mécanismes impliqués comprennent la synthèse d'enzymes inactivatrices, la modification de la cible des antibiotiques, des systèmes d'efflux qui diminuent la concentration de l'antibiotique dans la bactérie (Leclercq, 2002).

#### ❖ Entérobactéries productrices de carbapénèmases

Les carbapénèmes sont une classe d'antibiotiques appartenant à la famille des  $\beta$ -lactamines et ayant le spectre d'activité antimicrobienne le plus large. Ils sont actifs

sur la plupart des bacilles à Gram négatif notamment les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries s'explique essentiellement par deux mécanismes :

- le premier résulte d'un défaut de perméabilité membranaire par altération qualitative ou quantitative des porines membranaires, voie de pénétration des carbapénèmes dans la bactérie.
- le second correspond à l'inactivation de l'antibiotique par la production de carbapénémases qui ont une activité hydrolytique vis à vis des carbapénèmes (**Nordmann et Carrer, 2010**).

#### 4. La résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un phénomène général observé pour toutes les espèces bactériennes rencontrées chez l'homme. C'est la capacité pour une souche bactérienne de croître en présence d'une concentration d'antibiotique supérieure à celle qui inhibe la croissance de la majorité des souches appartenant à la même espèce.

Plusieurs études ont établi que l'apparition de la résistance est associée d'une part, à la surconsommation d'antibiotiques et d'autre part, à des traitements trop courts ou trop longs et parfois mal dosés.

On distingue la résistance naturelle ou intrinsèque et la résistance acquise.

##### 4.1. La résistance naturelle

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle.

Les bactéries du genre *Mycoplasma sp* illustrent ce dernier exemple. Le composant principal de la paroi des bactéries est le peptidoglycane, un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques, constituées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Dépourvus de cet élément constitutif, les mycoplasmes

présentent une résistance intrinsèque aux  $\beta$ -lactames, dont le mode d'action consiste en une inhibition de la synthèse du peptidoglycane (**Normak et Normak, 2002**).

### **4.2. La résistance acquise**

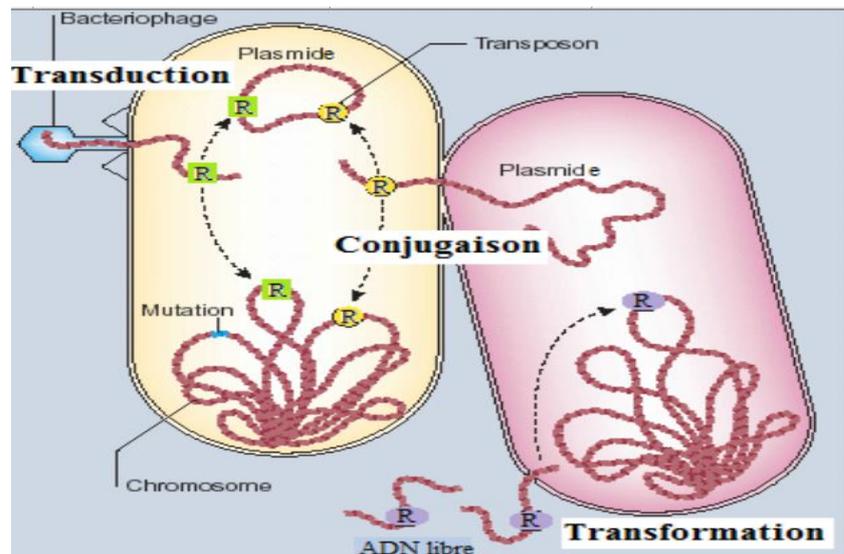
La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes.

La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation (fig.2).

La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement.

La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine (**Goossens *et al.*, 2006**). Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales, ou incorrectement dosées (**Yagupsky, 2006**).

La France, malgré une décroissance de sa consommation, peut-être liée aux campagnes publiques de sensibilisation, reste le second pays consommateur d'antibiotiques en Europe. L'utilisation d'antibiotiques, nécessitant de longues périodes de traitement ou à large spectre d'action, est aussi un facteur de risque pour la propagation des résistances (**Yagupsky, 2006**).



**Figure 2:** Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries (Levy et Marshall, 2004).

### 5. Spectre D'activité / Sensibilité

Le spectre d'activité, pour un antibiotique donné, est défini comme la liste des espèces microbiennes dont la majorité des souches s'avèrent sensibles *in vitro*. Selon que le nombre d'espèces bactériennes couvertes est important ou non, on dit que l'antibiotique possède un spectre large ou étroit. En dehors de n'importe quelle résistance acquise, toutes espèces non incluses dans ce spectre seraient naturellement résistantes (Duval et Soussy, 1990 ; Martel, 1996).

En termes cliniques, le spectre d'activité d'un antibiotique est la collection des micro-organismes dont les infections associées peuvent être traitées d'une manière efficace aux dosages habituels. Le spectre clinique prend en considération outre la CMI des bactéries, les propriétés pharmacocinétiques de l'antibiotique et les résultats cliniques habituellement obtenus (Mogenet et Fedida, 1998).

Classiquement, trois catégories de souches bactériennes sont distinguées et, délimitées chacune par deux valeurs : la concentration critique supérieure (C) et inférieure (c) qui sont spécifiques à chaque antibiotique :

- **Souches sensibles** ( $CMI < \text{ou} = c$ ) : Les concentrations produites sont sensiblement plus élevées que la CMI. La probabilité de la réussite d'une telle thérapeutique étant assez importante.

- **Souches intermédiaires** ( $c < \text{CMI} < \text{ou} = C$ ) : Les concentrations produites sont proches de la CMI. L'issue thérapeutique est imprévisible.
- **Souches résistantes** ( $\text{CMI} > C$ ) : Les concentrations produites ne peuvent pas atteindre la CMI, même aux doses élevées de l'antibiotique. Le risque d'échec est important (**Duval et Soussy, 1990 ; Martel, 1996 ; Mogenet et Fedida, 1998**).

Malgré l'importance des antibiotiques et leur utilité dans le traitement de diverses maladies infectieuses, plusieurs obstacles se sont manifestés: résistance, multi résistance, toxicité; ce qui a poussé un grand nombre de gens à fuir ces traitements pour se diriger vers la médecine douce ou médecine naturelle "moderne" avec ses différentes disciplines: phytothérapie, aromathérapie, nutrithérapie (diétothérapie), basée sur les connaissances antiques et leurs applications scientifiques rigoureuses, *in vitro* (au laboratoire) et même *in vivo* (essais cliniques); qui s'est montrée aussi efficace que les remèdes chimiques et moins nuisibles et pour la plupart des cas, sans danger.

## **II. L'aromathérapie**

Si l'on ne sait pas précisément ce que nos ancêtres mangeaient au début de l'humanité il y a 5 à 7 millions d'années, il est certain que les plantes faisaient partie de leur alimentation quotidienne. Ils découvraient très tôt dans leur évolution que ces plantes ne représentaient pas uniquement une source d'alimentation mais pouvaient également soulager voire guérir certaines maladies.

Aujourd'hui les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins (**Hans, 2007**). Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé (**Farnsworth *et al.*, 1986**).

En effet sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique ont des vertus médicinales (**Millogo *et al.*, 2005**).

### **1. la phytothérapie**

#### **1.1. Définition de la phytothérapie**

La phytothérapie consiste en l'usage des plantes pour la prévention ou le traitement des maladies, dans des cas aigus ou de façon à modifier une sensibilité individuelle à déclarer un type de maladie. Elle est, aujourd'hui encore, la médecine la plus employée à travers le monde (**Larousse, 2009**).

Le principe de base de la phytothérapie est de soigner un organisme dans sa globalité, en cherchant à résoudre également la cause, sans se contenter de traiter uniquement les symptômes, en s'appuyant d'une part sur l'analyse des principes actifs contenu dans les plantes ou une parties de celle-ci des plantes, et la compréhension de leur mode d'action, et d'autre part sur les résultats constatés par les malades (**Larousse, 2009**).

### **1.2. Différents types de la Phytothérapie**

- **L'aromathérapie** : est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou les huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau.
- **Gemmothérapie** : se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicules.
- **Herboristerie** : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée; de la plante entière, ou une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération.

Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale.

- **Homéopathie** : a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive; les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale.
- **Phytothérapie pharmaceutique** : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant.

Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats... (**Strang, 2006**).

### **1.3. Les avantages de la phytothérapie**

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou le paludisme.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus.

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite (**Iserin et al., 2001**).

### **2. Les plantes médicinales**

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine.

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies(**Schauenberg et Paris, 2006**).

#### **2.1. L'importance de l'utilisation des plantes médicinales**

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, depuis le XVIIIème siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent. On considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs.

La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels.

Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes (**Iserin et al., 2001**).

#### **2.2. Les principes éléments actifs des plantes médicinales**

Ce sont des molécules présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animal. Le principe actif est contenu dans une drogue végétale ou une préparation à base de drogue végétale.

Une drogue végétale en l'état ou sous forme de préparation est considérée comme un principe actif dans sa totalité, que ses composants ayant un effet thérapeutique soient connus ou non (**Pelt, 1980**).

La camomille par exemple, est utilisée depuis des milliers d'années contre les troubles digestifs. Or, ce n'est que récemment que les éléments actifs à l'origine des actions thérapeutiques des plantes ont été isolés et étudiés. Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme (**Iserin et al., 2007**), parmi ces composants on peut distinguer :

- **Les alcaloïdes**

Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine (**Guignard, 2000**).

Ce sont des substances organiques azotées, à propriétés basiques ou amères et ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques (**Dellile, 2007**). Les alcaloïdes sont utilisés comme molécules anti cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (**Iserin et al., 2007**).

- **Les phénols**

Petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être également estérifiées, étherifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides. Leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. Ayant tendance à s'isomériser et à se polymériser, ces phénols sont solubles dans les solvants polaires (**Garnero, 2000**). Les phénols sont des anti-inflammatoires et des antiseptiques. Les acides phénoliques (comme l'acide rosmarinique), sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales (**Eberhard et al., 2005**).

- **Les tanins**

Les tanins sont des composés phénoliques complexes, hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da (**Kamra et al., 2006**), ils peuvent former des complexes avec les protéines grâce à la présence de plusieurs groupements hydroxyles phénoliques. Ils sont présents dans plusieurs plantes fourragères avec des proportions différentes (**Amlan et Patra, 2010**), selon leur nature chimique ces composés sont divisés en

deux classes: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Cowan, 1999 ; Kamra , 2005).

Les tanins sont des inhibiteurs pour plusieurs micro-organismes du rumen et spécialement, les protozoaires ciliés, la flore fibrolytique et les archaebactéries méthanogènes (Kamra *et al.* , 2006) . Les tanins à faible poids moléculaire ont une activité inhibitrice plus importante car ils sont capables de former des liaisons plus fortes avec les enzymes et les protéines en général, comparativement aux tanins à un poids moléculaires élevé. L'inclusion des différents types de fourrages riches en tanins montre une réduction de la production de méthane *in vitro* et *in vivo*, cependant, la digestibilité est susceptible d'être fortement diminuée si la concentration de ces composés dépasse les 5% dans la ration (Amlan et Patra, 2010).

Les tanins représentent généralement la principale partie de l'extrait poly phénolique. Peu de choses sont connues concernant leur rôle biologique sur la plante mais leur présence confère à cette dernière des propriétés astringente, antiseptique, antioxydant et anti diarrhéique (Vivas, 2002).

- **Les flavonoïdes**

Ce sont des pigments naturelles de couleur jaune, généralement poly phénoliques. Ils sont le plus souvent sous forme d'hétérosides appelés flavonoïdes dont les génies sont des dérivés de la phénylchromone, la chromone étant la benzo-y-pyrone. Les flavonoïdes sont doués d'activités diurétiques et vitaminique P (in Mbodj, 2003). Ils interviennent probablement pour protéger les plantes des herbivores et contrôler le transports des auxines (Judd *et al.* , 2002).

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoire, anti-oxydante anti-enzymatique et hépatoprotectrice ; ils jouent un rôle important dans le système de défense (anti virales) (Iserin, 2001).

- **Les coumarines**

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels. La structure de la coumarine se trouve dans environ 150 espèces, appartenant à 30 familles de plantes

différentes. Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de la fève tonka, d'où fut isolée pour la première fois en 1820 la coumarine (**Bruneton, 1998**).

Les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, que l'on peut considérer en première approximation, comme étant des lactones des acides 2-hydroxy-7-cinnamiques. Les coumarines donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché (**Stacie et al., 2004**). Elles présentent un intérêt physiologique, inhibant la croissance des graines en germination.

Les coumarines en présence d'UV, se lient aux bases pyrimidiques de l'ADN. Elles sont donc phototoxiques pour un large panel d'organismes dont des bactéries, virus, champignons, invertébrés et vertébrés. Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines. Elles sont considérées comme des phytoalexines. Ces phytoalexines sont synthétisées au niveau des sites d'infection, leur activité antimicrobienne est démontrée *in vitro* (**Hofmann, 2003**).

- **Les saponines**

Les saponines sont des glycosides contenus dans les plantes qui doivent leur nom au fait qu'elles moussent lorsqu'on les mélange avec l'eau (**Hans, 2007**). Elles sont des constituants de nombreuses plantes médicinales ; elles existent sous deux formes : les stéroïdes et les triterpénoïdes.

La structure chimique des stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines (œstrogène, cortisone). Elles sont souvent expectorantes et facilitent l'absorption des aliments (**Eberhard et al., 2005**).

Les saponines possèdent une grande variété d'activités biologiques telles que : antipyrétique, antalgique, immunomodulatrice, anti-inflammatoire, anticoagulante. Ils ont des propriétés tensioactives et biologiques importantes et sont utilisés dans des domaines variés tels que l'industrie, la pharmacie et la cosmétologie (**Lautrette, 2004**).

- **Les Polysaccharides :**

Ce sont des unités complexes de molécules de sucre liées ensemble que l'on trouve dans toutes les plantes. Du point de vue de la phytothérapie, les polysaccharides les plus

importants sont les mucilages «visqueux » et les gommes, présents dans les racines, les feuilles et les graines (**Iserin, 2001**).

Le mucilage et la gomme absorbent de grandes quantités d'eau, produisant ainsi une masse gélatineuse qui peut être utilisée pour calmer et protéger les tissus enflammés (par exemple quand la peau est sèche et irritée ou la paroi des intestins est enflammée et douloureuse). La meilleure façon de préparer les herbes mucilagineuses comme l'orme rouge (*Ulmus rubra*) et le lin (*Linum usitatissimum*) est de les gorger d'eau froide et les faire macérer. (**Iserin et al., 2007**). Certains polysaccharides, comme les glucomannanes et les pectines, sont utilisés en cosmétologie (**Eberhard et al., 2005**).

### 2.3. Domaines d'application des plantes médicinales

Il y a 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 (**scientific correspondence, 2003**). Les plantes médicinales sont appliquées dans différents domaines :

#### Utilisation en médecines en tant que médicament pour l'homme exemple :

- En urologie, dermatologie gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs ,sommeil et désordres nerveux (**Svoboda et Hampson, 1999**) .
- Contre le diabète (*Azadirachta indica*) (**Amjad, 2005**) .

#### En agriculture

Exemple de : l'arbre *Azadirachta indica* qui se développe dans tous le subcontinent indien, est une des plantes médicinales les plus importantes au Bangladesh. Les huiles de cet arbre sont utilisés dans la lutte contre divers insectes et nématodes (vers parasites) (**Amjad, 2005**).

#### En alimentation

En assaisonnements, dans la fabrication des boissons, des colorants (**Svoboda et Hampson, 1999 ; Porter, 2001**) et des composés aromatiques (**Smallfield, 2001**). Ainsi que les épices.

#### En cosmétique

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

### 3. Les plantes médicinales sélectionnées

#### 3.1. *Rosmarinus officinalis*

Le romarin est une plante des coteaux arides, garrigues et lieux rocheux de la région méditerranéenne et même un peu plus au sud jusqu'aux confins sahariens (Boullard, 2001). Depuis l'antiquité, il est employé pour améliorer et stimuler la mémoire. Les anthropologues et les archéologues ont découvert que le romarin a été employé comme vertus médicinales, culinaires et cosmétiques en Egypte, Mesopotamia, Chine et en Inde antiques (Stefanovits-Banyai *et al.*, 2003). Le romarin est cultivé ou début du printemps, jusqu'à l'été (Poletti, 1988).

##### 3.1.1. Etymologie

Le nom latin *rosmarinus* est habituellement interprété, comme dérivé "ros" de la rosée et "marinus" d'appartenir à la mer, bien qu'elle se développe habituellement loin de la mer. On a affirmé que cette interprétation est un produit d'étymologie traditionnelle, mais probablement le nom original est dérivé du grec "rhops" arbuste et "myron" baume (Heinrich *et al.*, 2006).

##### 3.1.2. Caractéristiques botaniques

Cette plante appartient à la famille des Labiées. Elle se présente sous forme d'arbuste, sous arbrisseau ou herbacée (Atik bekkara *et al.*, 2007), mesurant environ de 0.8 à 2m de hauteur (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2007).

Les feuilles sont étroitement lancéolées linéaires, friables et coriaces, les fleurs d'un bleu pâle, maculées intérieurement de violet sont disposées en courtes grappes denses s'épanouissent presque tout au long de l'année (fig.3) (Atik bekkara *et al.*, 2007).

### 3.1.3. Classification du romarin (Quezel et Santa, 1963)

- Règne : **Plantes**
- Embranchement : **Spermaphytes**
- Classe : **Dicotyledones**
- Ordre : **Lamiales (Labiales)**
- Famille : **Lamiaceae**
- Genre : ***Rosmarinus***
- Espèce : ***Rosmarinus officinalis***



Figure 3 : *Rosmarinus officinalis* (3)

### 3.1.4. Composition biochimique du romarin

Le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence des flavonoïdes, des tannins et des saponines, et l'absence des alcaloïdes détecté dans l'extrait aqueux. Les flavonoïdes détectés par la chromatographie sur couche mince (CCM) sont la quercétine et le kaempférol (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2007).

Okamura *et al.*, (1994) ont pu isoler de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles du romarin trois flavonoïdes glycosylés (lutéoline 3'-O- $\beta$ -D-glucuronide, lutéoline 3'-O-(4''-O-acétyl)- $\beta$ -D-glucuronide, et lutéoline 3'-O-(3''-O-acétyl)- $\beta$ -D-glucuronide), ainsi que l'hespéridine.

La première application du système d'électrophorèse capillaire à détection électrochimique a permis la détection de : l'hespéretine, l'acacétine, la diosmétine, l'apigénine, la lutéoline, l'acide férulique, l'acide rosmarinique et l'acide caféique dans les extraits méthanoliques du romarin (Peng *et al.*, 2005).

La Chromatographie liquide à détection par spectrophotométrie de masse (LC-MS) a montrée la composition suivante en acides phénoliques de l'extrait éthanolique du romarin : 14916. 23 mg/kg ; Mg : 1634.55mg/kg ; Na : 2711.87 mg/kg ; P : 1474.60 mg/kg ; Cr : 97. 36 mg/kg ; Sr : 74 .65 mg/kg (Arslan et Musa Ozcan, 2007).

### 3.1.5. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin

Le *Rosmarinus officinalis* possède des propriétés aromatiques, antioxydantes, antimicrobiennes, anti-tumorale et antihépatotoxiques (Goetz, 2005).

L'activité antioxydante est liée aux composés phénoliques présents dans le romarin (acide carnosique et carnosol, diterpènesabietanes, acide rosmarinique, ester de l'acide hydroxycinnamique) (Inatani *et al.*, 1983).

Ces composés avec d'autres isoprenoïdes (stéroïls, isoprène, mono- et diterpènes, tocophérols ou caroténoïdes) jouent le rôle de protection ; ils sont considérés comme constituants bioactifs.

Le *Rosmarinus* est un excellent mellifère, condimentaire, cholagogue, désinfectant, stimulant, emménagogue, antidépresseur, soulage l'arthrose, aide à la digestion des graisses, antipelliculaire.

Il est utilisé aussi comme antiseptique, antifongique, stomatique, carminatif, cholérique, antitussif, antinévralgique, antibactérien, antimutagénique, tonique, vulnéraire, contre les problèmes circulatoires (en frictions), cicatrisant (sommités fleuries) (Rasooli et Fakoor, 2008).

Le romarin est souvent cultivé pour son huile aromatique et considérée utile pour contrôler l'érosion du sol. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2007).

L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, parfums, désodorisants, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires (Arnold *et al.*, 1997).

### 3. 2. *Cinnamomum zeylanicum* (La cannelle de Ceylan)

Le cannelier de Ceylan est originaire de l'Inde, introduit dans les îles de l'océan Indien et dans le sud-est asiatique, il est principalement cultivé au Sri Lanka (ancien Ceylan) (Bruneton, 1999), mais se rencontre également aux îles Seychelles, à Madagascar et au Ghana (Vernon et Richard, 1976).

### **3.2.1. Etymologie**

le nom générique du Cannelier de Ceylan vient du grec « kinnamômou » ou « kinnamomon » qui désigne cette Lauracée aromatique, « Kinein » signifiant enroulé, et « Zeylanicum » désignant son origine de Ceylan. Le nom de Cannelle, quant à lui, vient du latin « canna » qui signifie roseau, tuyau, en référence à la forme des bâtonnets que l'on utilise dans le commerce (4).

### **3.2.2. Caractéristiques botaniques**

Le cannelier de Ceylan est un arbre d'une dizaine de mètres de haut (**Vernon et Richard, 1976**) (peut atteindre 20m) (**Leung, 1980**).

Ses feuilles opposées et persistantes, de forme ovale, sont lisses et luisantes, d'un vert brillant sur le dessus, glauques (vert tirant sur le bleu) en dessous et ont un parfum caractéristique lorsqu'elles sont écrasées. Ses fleurs petites, blanches ou jaunes sont réunies en grappes terminales et dégagent une odeur désagréable (fig.4). Ses fruits, de couleur violette foncée, sont des drupes (à pulpe) charnues et ressemblent par leur forme, au gland du chêne (**Richard et Loo, 1992 ; Vernon et Richard, 1976**).

La première récolte est possible au bout de cinq ans, ensuite elle se fait tous les deux ans à la saison des pluies lorsque l'écorce est gorgée de sève (**Vernon et Richard, 1976**). L'écorce est détachée des jeunes pousses ou des branches, par incision, découpée en lanières de 30 cm de long, qui sont mis à sécher puis grattée pour en séparer le liège. Elle se présente sous forme de tuyaux emboîtés les uns dans les autres (**Richard et Loo, 1992**).

La cannelle peut se présenter en tuyaux entiers (épiderme/gratté de l'écorce interne), en tuyaux brisés, en morceaux (fig.5), en copeaux ou en poudre.

### 3.2.3. Classification de la Cannelle de Ceylan

- **Royaume :** Plante
- **Sous royaume :** Trachéophyte
- **Embranchement :** Spermatophytes
- **Sous embranchement :** Angiospermes
- **Classe :** Dicotyledonae
- **Sous classe :** Magnoliidae
- **Ordre :** Magnoliales
- **Famille :** Lauraceae
- **Genre :** *Cinnamomum*
- **Espèce :** *C. zeylanicum* Nees ou *C. verum* J. Presl
- **Nom commun :** Cannelle de Ceylan
- **Nom en anglais :** Ceyloncinnamon ou cinnam



**Figure 4 :** *Cinnamomum zeylanicum* (5).



**Figure 5 :** cannelle de ceylan (6)

### 3.2.4. Habitat et culture

Originnaire du Sri Lanka et du sud de l'Inde, la Cannelle de Ceylan (*Cinnamomum zeylanicum*) pousse dans les forêts tropicales de Ceylan, de l'Inde orientale, de Java, de Madagasca (**Readers Digest, 1985**). Elle est cultivée de manière intensive dans toutes les régions tropicales, notamment aux Philippines et aux Antilles. On la multiplie par bouturage et, tous les deux ans, à la saison des pluies, on

taille les arbrisseaux au ras du sol. L'écorce est récoltée sur les nombreux rejets et mise à fermenter pendant 24 heures. L'écorce interne peut alors être séparée de l'écorce externe (**Larousse, 2001**).

### 3.2.5. Composition chimique

L'écorce contient des tanins, résines, du mucilage, de gomme, sucres, oxalate de calcium, peu de coumarine (**Leung, 1980**), de l'amidon, des diterpènes polycycliques, des oligomères proanthocyanidoliques et des huiles volatiles. La teneur de ces dernières, est au minimum 12 ml/kg (un intervalle de 5 à 20 ml/kg) (**Bruneton, 1999**).

L'espèce *C.zeylanicum* possède la plus grande quantité d'eugénol parmi les variétés de l'huile d'écorce du genre *Cinnamomum* (**Leung, 1980**).

### 3.2.6. Propriétés pharmacologiques et emplois

En plus de son utilisation comme arôme, l'écorce de la cannelle et son huile essentielle ont été utilisés il y a des milliers d'années pour traiter la diarrhée chronique, le rhumatisme, le froid, l'hypertension, souffrances abdominales et du cœur, troubles rénaux, ... etc (**Leung, 1980**).

En France ainsi qu'en Allemagne, l'écorce ou l'huile essentielle, sont traditionnellement utilisées par voie orale: dans le traitement symptomatique de troubles digestifs tels que ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructation, flatulence; dans les asthénies fonctionnelles; et pour faciliter la prise de poids (**Bruneton, 1999**).

L'écorce possède plusieurs propriétés: carminative, astringente (**Leung, 1980**), sudorifique, antispasmodique, antiseptique, tonique, remède digestif chaud (**Ody, 1995**).

L'huile essentielle est aussi: carminative, de même qu'elle a une action antiseptique, antivirale, bactéricide et larvicide (**Cowan, 1999**). Ses activités antibactériennes et antifongiques ont été démontrées *in vitro*. Certains praticiens utilisent l'huile essentielle, per os, en cas d'infection urinaires, une activité bactériostatique urinaire ayant été démontrée (**Bruneton, 1999**).

# *Matériels & Méthodes*



## **1. Etude phytochimique**

### **1.1 Récolte du matériel végétal**

Les deux plantes ont été récolté au mois de janvier 2014, La récoltes est effectuée au niveau de la commune de Khesaras, wilaya de Guelma pour le romarin (*Rosmarinus officinalis*) tandis que la cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) elle est disponible dans le marché.

Après une identification botanique fait par Mr : ZAAFOUR (Pr. Université Badji Mokhtar Annaba), la partie aérienne du romarin (feuilles, fleurs et tiges) a été séchée à l'abri de la lumière du soleil pendant six semaines puis broyée en poudre pour qu'elle soit prête à l'utilisation. Le broyat du romarin et de la cannelle va constituer la matière sèche qui va servir à l'extraction des polyphénols.

### **1.2. Tests préliminaires**

#### **❖ Mise en évidence des flavonoïdes**

On met 3g de la poudre avec 75ml d'eau distillée dans une fiole. Le mélange est porté à ébullition pendant 15 minutes. On filtre et on laisse refroidir (**in Mbodj, 2003**).

#### **▪ Coloration en milieu alcalin**

En milieu alcalin, les flavonoïdes se dissolvent facilement en donnant des colorations allant du jaune au brun. A 2ml de l'extrait, on ajoute quelques millilitres de soude au 1/10 dans un tube a essai.

On a eu une coloration jaune orangé, donc le test est positif (**in Mbodj, 2003**).

#### **▪ Coloration par le perchlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>)**

Les flavonoïdes, du fait de la présence de fonctions phénoliques dans leur génies, donnent des colorations variées avec des diluées de FeCl<sub>3</sub>. A 2 ml de solution extractive on ajoute 2 à 3 gouttes d'une solution de FeCl<sub>3</sub> diluée à 2%.

L'apparition d'une coloration verdâtre, indique que le test est positif (**in Mbodj, 2003**).

▪ **Réaction de cyanidine**

En solution alcoolique, en présence d'hydrogène naissant, produit in situ par action de chlorhydrique sur des magnésium, les flavonoïdes donnent des colorations variées allant du rouge-oranger au violet. On introduit dans un tube 2ml de l'extrait. On ajoute 2ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 96° = 2 volume ; eau = 2 volume; HCl concentré = 1 volume).

Coloration orange, puis violette, donc la réaction est positive (**in Mbodj, 2003**).

**Mise en évidence des tanins**

Dans un Erlenmeyer, on met 5g de poudre dans 100 ml d'eau bouillante. Après infusion pendant 15 mn, on filtre et on complète le filtrat à 100 ml avec de l'eau distillée.

On introduit 5 ml d'infusé à 5 % dans un tube à essais, puis on ajoute 1 ml d'une solution aqueuse de FeCl<sub>3</sub> à 1 %. En présence de tanin, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noir (**Edeoga1 et al., 2005**).

▪ **Tanins catéchiques**

A 5ml de solution à 5% on ajoute 5 ml d'Hcl concentré. l'ensemble est porté à ébullition pendant 15mn puis on filtre sur papier filtre. En présence de tanins catéchiques, il se forme un précipité rouge (**Edeoga1 et al., 2005**).

▪ **Tanins galliques : réaction de stiasny**

A 30 ml de solution à 5% on ajoute 15 ml de réactif de stiasny (10ml de formol à 40% et 5ml de Hcl concentré), puis on chauffe au bain-marie à 90°C pendant 15mn environ. Après filtration le filtrat est saturé par 5g d'acétate de sodium. On ajoute alors 1ml goutte à goutte d'une solution de Fe cl<sub>3</sub> (à 1%) l'observation d'une teinte bleu noire montre la présence de tanins galliques non précipité par réactif de stiasny (**Edeoga1 et al., 2005**).

❖ **Mise en évidence des saponosides**

On porte à ébullition 100 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 250 ml puis on ajoute 1g de la poudre ensuite on maintient une ébullition pendant 15 mn. Après filtration, on ajuste le filtrat à 100 ml. On remplit 1ml du décocté à 1 % préparé dans un tube à essais et on ajuste le volume à 10 ml avec de l'eau distillée. Ensuite, on agite le tube. Pour confirmer la

présence des saponosides, il faut qu'une mousse apparaisse après avoir laissé au repos pendant 15 minutes le tube à essais (**Karumi et al., 2004**).

### ❖ Mise en évidence des mucilages

On introduit 1 ml du décocté à 10 % dans un tube à essais et on ajoute 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux dans le mélange, indique la présence de mucilages (**Karumi et al., 2004**).

### ❖ Mise en évidence des coumarines

On place 1g de l'échantillon de la poudre dans un tube à essais, on recouvre le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et on place dans un bain-marie pendant quelques minutes. On ajoute 0,5ml de NH<sub>4</sub>OH (10%), on met deux taches sur un papier filtre et on examine sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines (**Rizk, 1982**).

### ❖ Mise en évidence des alcaloïdes

#### ▪ Macération

On met 10g de la poudre végétale dans un erlenmeyer de 250 ml+ 50 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué au 1/10 (50ml). On laisse macérer pendant 24 heures à la température du laboratoire. On filtre sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat (**Dohou et al., 2003**).

#### ▪ Réactions de caractérisation

1 ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de MAYER (5 g de KI et 1,358 g de HgCl<sub>2</sub> solubilisés dans 100 ml d'eau distillée) s'il apparaît un précipité c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes (Précipité blanc-jaunâtre).

1 ml de filtrat + 5 gouttes de réactif de WAGNER (2 g de KI et 1,27g d'I<sub>2</sub> solubilisés dans 100 ml d'eau distillée) s'il apparaît un précipité brun c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes filtrat (**Dohou et al., 2003**).

#### ▪ Test de confirmation

Nous procédons à une extraction de la poudre végétale en milieu acide. Dans un ballon de 500 ml contenant 5 g de poudre végétale on verse 25 ml d'acide chlorhydrique 0,05N. le mélange est laissé en macération sous agitation magnétique à la température du laboratoire (environ 25° C) pendant 24 heures; puis filtré et lavé à l'eau distillée. La solution obtenue est

en suite ajustée à 20 ml avec de l'eau distillée, et après on réalise les tests de caractérisation précédents filtrat (Dohou *et al.*, 2003).

### 1.3. Préparation des extraits

#### ▪ Extraction des polyphénols

La poudre de deux plantes est macérée dans le méthanol à 85% à raison de 25% (P/V), et laissée macérer pendant 24h à la température du laboratoire (fig.8). Après la filtration, le sédiment est subi deux autre macérations successives dans le méthanol à raison de 50% (P/V).

Les trois filtrats sont mélangés et évaporés à basse température (40°C) avec un Rot à vapeur (R-215) (fig.6), le résidu est récupéré dans des flacons hermétiquement fermés, puis lyophilisés pendant 24h (fig.7) (in Mbodj, 2003).

Le lyophilisat est pesé pour calculer le rendement de l'extraction.



**Figure 6 :** Photographie d'un Rot à vapeur



**Figure 7 :** Photographie d'un lyophilisateur

#### ▪ Le calcul du rendement

Le rendement de l'extraction est le rapport entre le poids de l'extrait obtenu et le poids initial de la plante utilisée.

Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$R = 100 m / m_0$$

**R** : le rendement en %.

**m** : la masse de l'extrait.

**m<sub>0</sub>** : la masse initial de la plante.

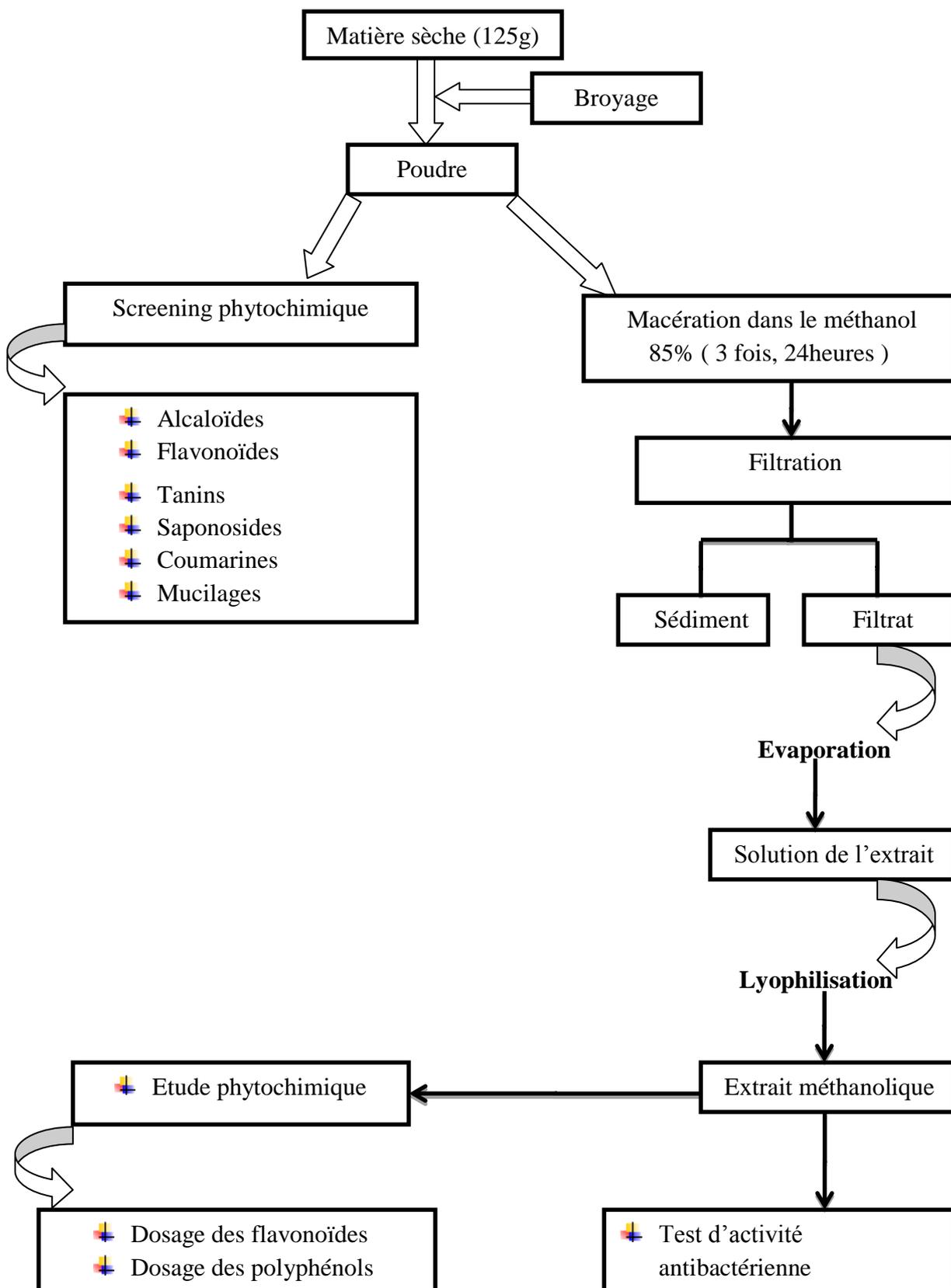


Figure 8 : Schéma récapitulatif du Protocol expérimental

#### **1.4. Analyse de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* et de *Cinnamomum zeylanicum*:**

##### **1.4.1. Séparation et identification par chromatographie sur couche mince (C.C.M)**

C'est une méthode rapide de contrôle la phase stationnaire est constituée d'une couche mince et uniforme, de 0,25mm d'épaisseur, de silice séchée, finement pulvérisée et appliqué sur un support approprié (feuille d'aluminium ou de verre).

La phase mobile ou éluant se propage à la surface de la plaque par capillarité.

##### **✓ Phase stationnaire**

Des plaques de silice Kieselgel 60F254 de 0,2mm d'épaisseur (Merck) ont été employées pour la chromatographie sur couche mince en phase normale.

##### **✓ Phase mobile**

##### **-Solvant**

Acétate d'éthyle - méthanol - eau distillée aux proportions de : (100V : 135V : 10V).

##### **- Dépôts de la solution à tester**

- Déposer 8µl de chaque extrait sur la plaque à l'aide d'un capillaire.
- Déposer 8 µl de quercétine, acide gallique et alanine (standards).

##### **- Migration**

Introduire la plaque dans la cuve à chromatographie contenant l'éluant approprié. La phase mobile parcourt alors la phase stationnaire provoquant ainsi une succession de partage des constituants entre les deux phases, ce qui permet une séparation des constituants entre les deux phases.

##### **- Révélation**

Pour révéler les taches de substances sur la plaque, on utilise soit la détection UV, soit la Ninhydrine ( **Oomah, 2003** ).

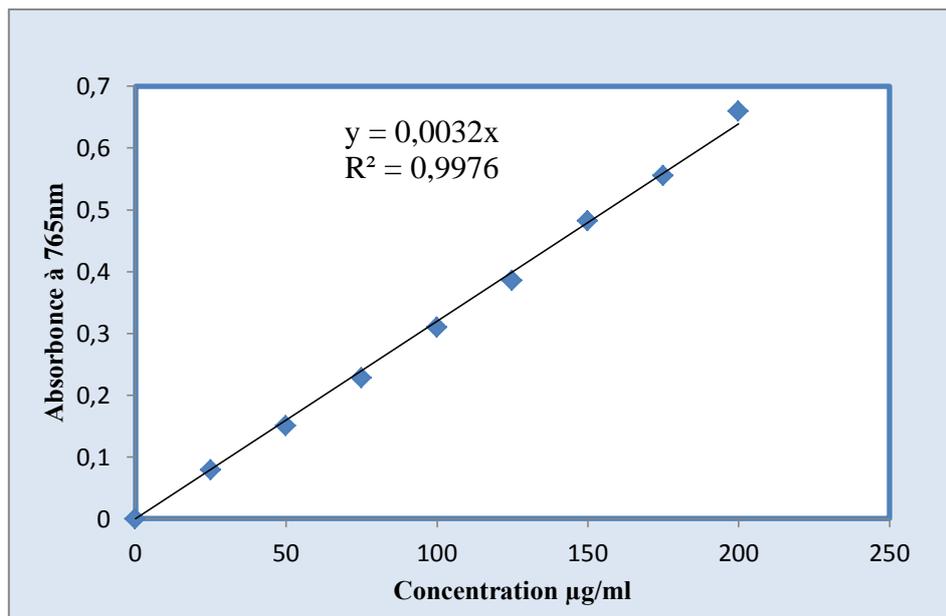
Après évaporation de l'éluant, la plaque est pulvérisée par la Ninhydrine.

##### **1.4.2. Dosage des polyphénols**

La teneur en composés phénoliques des deux extraits de *Rosmarinus officinalis* et *Cinnamomum zeylanicum* (EMR et EMC) a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon (**Li et al., 2007**) basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstic ( $WO_4^{-2}$ ) phosphomolybdic ( $MoO_4^{-2}$ ) duré actif de Folin par les groupement oxydables des composés polyphénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à

la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Georgé *et al.*, 2005). Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (dilué 10 fois) est ajouté à 200µl d'échantillon ou de standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800µl d'une solution de carbonate de sodium (0,75%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200 µg/ml) et est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (fig.9).



**Figure 9 :** Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

### 1.4.3. Dosage des flavonoïdes

L'évaluation quantitative des flavonoïdes dans les deux extraits selon la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996). Brièvement, les échantillons sont préparés par la dissolution de 1mg (extrait)/ml (méthanol). 1 ml de chaque échantillon est ajouté 1 ml de la solution d'AlCl<sub>3</sub> (2%, dans le méthanol). Dix minutes après le début de la réaction, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une gamme étalon est établie séparément avec la quercétine (0-40 µg/ml) (fig.10) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de lyophilisat.

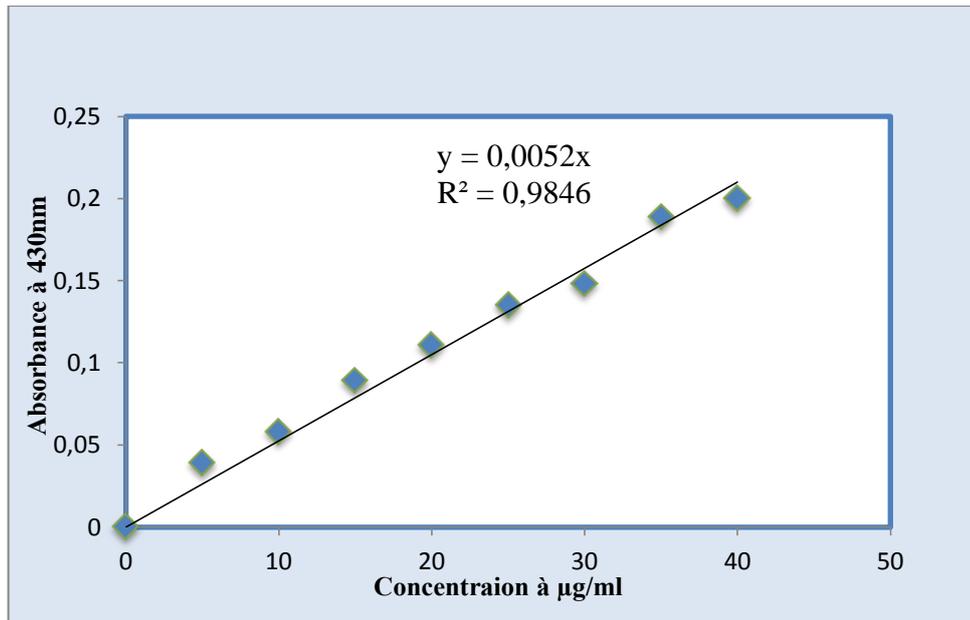


Figure 10 : Droite d'étalonnage de la quercétine.

## 2. Etude Bactériologique

### 2.1. Les espèces bactériennes sélectionnées

Nous avons sélectionné deux groupes de bactéries :

- Bactéries à Gram négatif :
  - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
  - *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Bactéries à Gram positif :
  - *Bacillus cereus*
  - *Staphylococcus aureus* ATCC 43300
  - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Les souches bactériennes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, sont des souches de référence été fournies par le responsable du laboratoire de microbiologie Hôpital IBN ZOHR-Guelma, les autres *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 proviennent du laboratoire de recherche de microbiologie Université Mentouri Constantine. Ces souches ont été procurées dans des tubes stériles contenant la gélose de conservation (GN).

▪ **Caractéristiques des souches cibles**

❖ *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (rhino-pharynx, intestin). On le trouve sur la muqueuse nasale d'un tiers environ des sujets normaux. Éliminé dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement.

L'espèce *S.aureus*, responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses (furoncle, impétigo, staphylococcie maligne de la face, staphylococcies bulleuses, etc.), mais aussi osseuses (ostéomyélite), digestives (entérocolites post-antibiotiques), septicémiques (**Simonet et al., 1995**).

❖ *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie Gram<sup>-</sup> aérobie ubiquiste considérée comme pathogène opportuniste. Sa résistance supérieure aux autres bactéries vis-à-vis de certains désinfectants peut conduire à sa présence lors d'infections en milieu hospitalier. Elle conduit à des surinfections graves. On la retrouve dans les infections de plaies, de l'utérus ou des poches gutturales, le plus souvent en association. *Pseudomonas aeruginosa* a également été identifiée à partir de prélèvements de synovie.

❖ *Escherichia coli*

Ce genre comprend 5 espèces, mais *E.coli* est la plus importante, c'est un hôte commun de l'intestin de l'homme, et des animaux; elle est recherchée à ce titre, comme germe témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments.

A l'intérieure de l'espèce il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastro-entérites et diarrhées), leur pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou la production d'entérotoxines. *E.coli entérotoxigène* (diarrhées infantiles), *E.coli entérotoxino-gène* (touriste), *E.coli entéroinvasif* (invasion des cellules intestinales), *E.coli entérohémorragique* (diarrhées sanglantes), *E. coli entéroadhérent* (diarrhée du voyageur).

D'autres responsables de méningites néonatales, provoquent aussi des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes (**Simonet et al., 1995**).

❖ *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* se présente se forme de bâtonnets à Gram positif généralement mobiles, elle sont habituellement considérés comme des germes de l'environnement et leur rôle en pathologie humaine est souvent négligé.

Cette espèce représente près de 5% de l'ensemble des toxi-infections alimentaires dans certains statistiques anglo-saxonnes.

Les spores du *Bacillus cereus* peuvent contaminer de nombreux produits : viandes, légumes. En cas de cuisson insuffisantes les spores restent viable et donnent naissance aux forme végétatives de la bactérie (**Gaillard, 1989**).

## **2.2. Milieux de culture utilisés**

Selon les techniques employées, les milieux de culture utilisés sont les suivants :

- Gélose nutritive (GN) : un milieu d'isolement non sélectif, utilisé dans le but de repiquer la bactérie ou de la purifier si elle est contaminée.
  - Le milieu Mueller Hinton (MH) : reconnu par tous les experts comme étant le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques et toutes autres substances qui possèdent une activité antimicrobienne comme les extraits.
  - Le bouillon nutritif : constitue un milieu d'utilisation générale pour un grand nombre de micro-organismes ne présentant pas d'exigences particulières.
- **Préparation de l'inoculum**

La méthode de préparation des l'inocula est celle préconisée par la SFM (**SFM, 2005**) qui consiste à prélever à partir d'une culture de 18 à 24h, 2 à 3 colonies à l'aide d'une anse stérile, et les mètres dans 5ml d'eau physiologique stérile, bien homogénéiser. La turbidité de cette suspension bactérienne est ajustée à celle d'une suspension standard (0,5 de Mc Farland), l'absorbance doit être comprise entre (0,08 à 0,1 ) à 625 nm. Cet inoculum contient environ 1 à 2 x 10<sup>8</sup> UFC/ml (**standardisation de l'antibiogramme selon l'OMS, 1999**).

▪ **Mode d'ensemencement**

L'ensemencement doit se faire au moins 15min après la préparation de l'inoculum, et se fait comme suite :

- d'abord couler les boites de Pétri avec MH solide (4mm d'épaisseur), laisser refroidir.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, puis étaler la surface entière de la gélose à trois reprises, faisant un frottement de haut en bas, en stries serrées, et en tournant la boite à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum.
- Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boites de Pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

**2.3. Essais antibactériens**

**2.3.1. Test du méthanol (MeOH) ou control négatif**

Après ensemencement du MH solide, des disques de papier Whatman n°1, de 6mm stériles imprégnés du méthanol à 85% à raison de 10µl par disque sont déposés stérilement à l'aide d'une pince sur la surface de la gélose (4 disques par boite) ensuite les boites sont incubées pendant 24 heures à 37°C.

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

**NB** : 2 répétitions sont effectuées pour chaque souche.

**2.3.2. Antibiogramme ou control positif**

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 4 antibiotiques (tab.2).

**Tableau 2 : les Diamètres critiques des antibiotiques utilisés  
(SFM, 2013)**

| Antibiotiques            | Charge de disques | Diamètre critique |            |
|--------------------------|-------------------|-------------------|------------|
|                          |                   | Sensibles         | Résistants |
| Pénicilline<br>( P )     | 10µg              | ≥29               | <18        |
| Rifampicine<br>( RIF )   | 5µg               | ≥19               | <14        |
| Erythromycine<br>( E )   | 15µg              | ≥22               | <17        |
| Chloramphénicol<br>( C ) | 30µg              | ≥ 23              | <19        |

➤ **Réalisation de l'antibiogramme**

L'antibiogramme a été réalisé *in vitro* selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. A l'aide d'une pince, des disques d'antibiotiques sont déposés (4 disques par boîte) Après étuvage à 37°C pendant 24 heures nous pouvons obtenir des diamètres (zones d'inhibition) autour des pastilles d'antibiotique.

➤ **Lecture des résultats**

Réalisée par la mesure à l'aide d'une règle les diamètres des halos claires (zones d'inhibition), tout autour du disque (disque inclus).

**2. 3.3. Tests de l'activité antibactérienne des extraits**

Les méthodes employées pour l'évaluation de l'effet antimicrobien des différents extraits méthanoliques du *Rosmarinus officinalis* et du *Cinnamomum zeylanicum* sont : 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 extrait, la méthode de l'activité antibactérienne en milieu liquide (**Billerbecket et al., 2002**) qui a pour objectif de déterminer la CMI (concentration minimales inhibitrices) à partir d'une gamme de concentration de produit dans le milieu de culture, ainsi que la CMB.

### 2.3.3.1. Méthode de diffusion à partir d'un disque solide (aromatogramme)

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

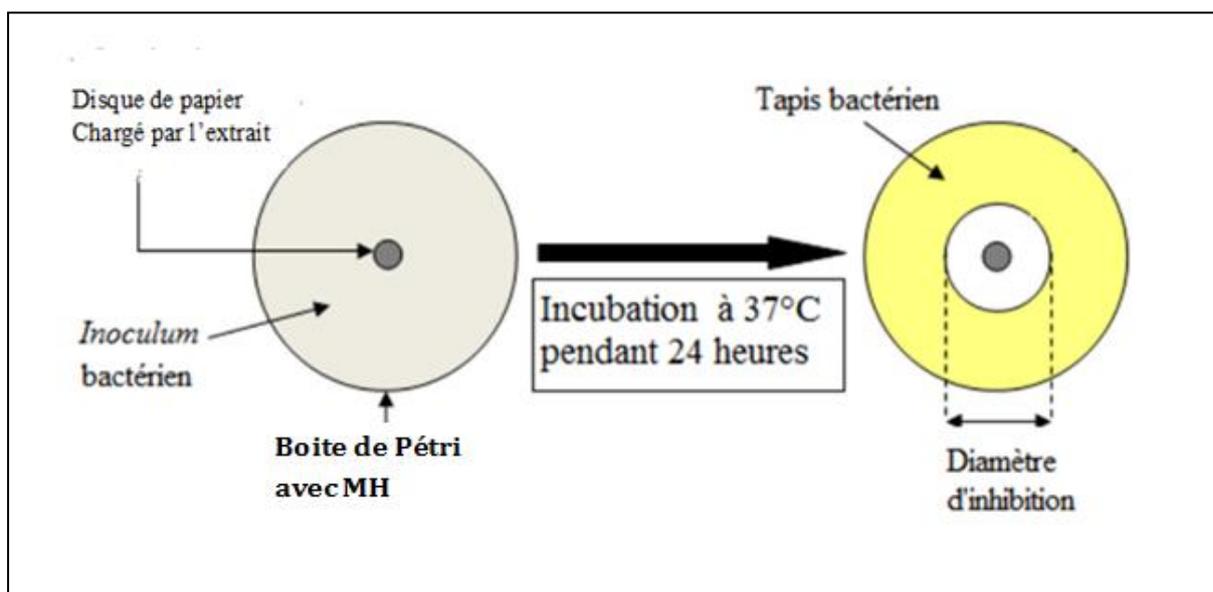
#### ❖ Préparation des extraits :

Les extraits des deux plantes sont solubilisés dans du méthanol (MeOH 85%), la gélose appropriée est coulée dans des boites de Pétri de 90 mm de diamètre et inoculée avec une suspension microbienne fraîchement préparée.

#### ❖ Application des disques :

Les disques stériles sont imprégnés avec des concentrations décroissantes (250mg/ml, 200mg/ml, 150mg/ml, 100mg/ml, 50mg/ml, 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 15mm est laissé entre le bore de la boîte et le disque pour éviter l'interférence des zones d'inhibition. Chaque test est réalisé trois fois au cours de trois expériences successives. Par la suite, les boites sont mises 2h au réfrigérateur à 4°C puis incubées à 37°C pendant 24h.

La lecture de résultats est faite par la mesure des zones d'inhibition (fig.11).



**Figure 11** : Principe de la méthode de diffusion par disque

Les bactéries seront classées selon le diamètre d'inhibition dans l'une des catégories suivantes : Non sensible, sensible, très sensible et extrêmement sensible selon le tableau 3 :

**Tableau 3:** Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition (**Moreira et al., 2005**).

| Diamètre d'inhibition | ≤ 8 mm       | 8 à14 mm | 15 à 19 mm    | ≥ 20 mm              |
|-----------------------|--------------|----------|---------------|----------------------|
| Sensibilité du germe  | Non sensible | Sensible | très sensible | Extrêmement sensible |
| Degré d'activité      | ( - )        | ( + )    | ( ++ )        | ( +++ )              |

### 2.3.3.2. Activité antibactérienne en milieu liquide

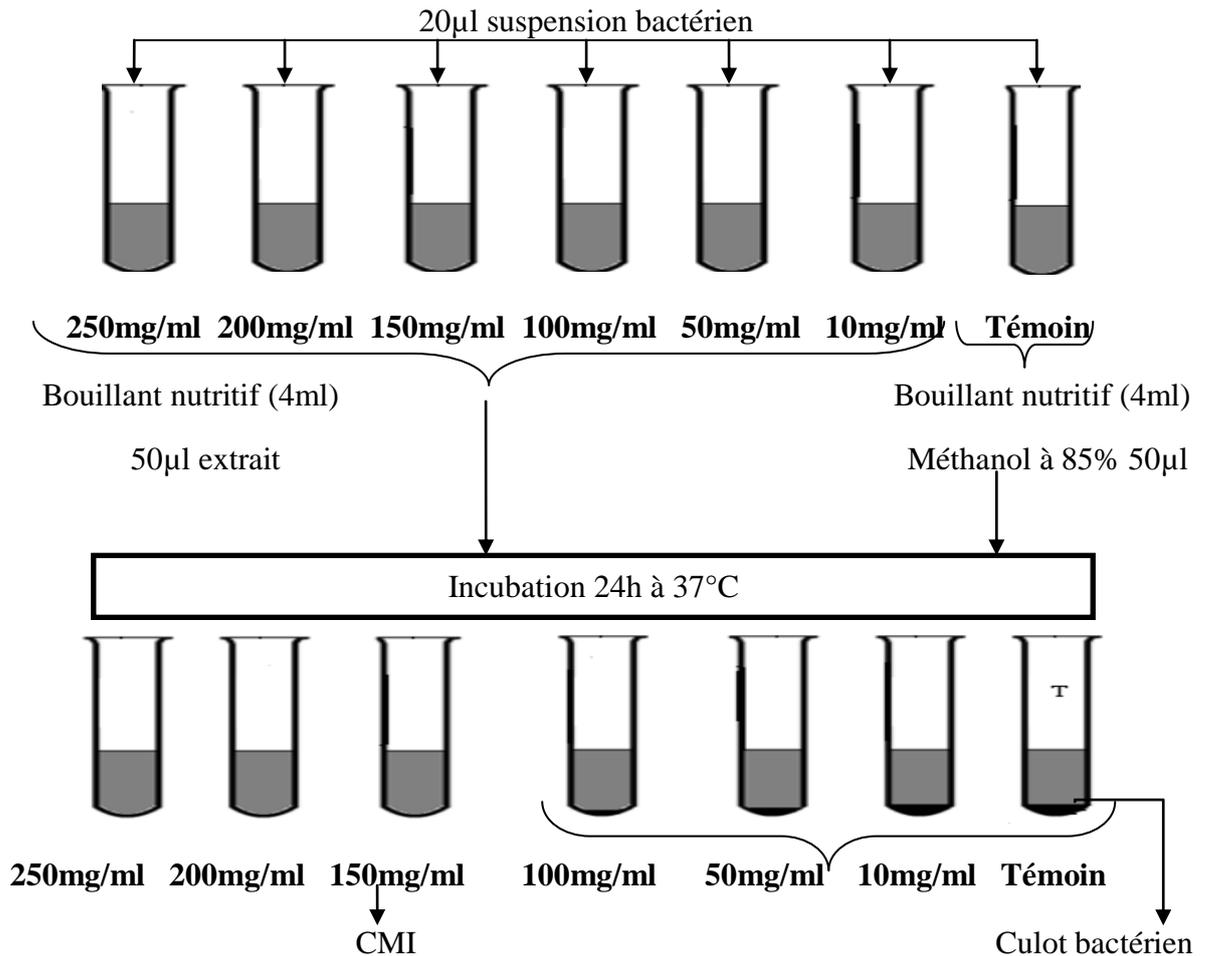
Cette méthode vise à déterminer la CMI d'un agent antibactérien

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique entraînant une inhibition de toute croissance bactérienne visible durant 24 heures (**Lambert et Pearson, 2000 ; SFM, 2003**).

La méthode de dilution consiste à préparer une série de tube contenant du bouillon nutritif stérile (4ml) additionnée de 50µl d'une gamme de concentration d'extrait « 250mg, 200mg, 150mg, 100mg, 50mg, 10mg/ml de méthanol», l'ensemble ensuite, est inoculé par 20µl de la suspension bactérienne (fig.12).

Un témoin est composé de : bouillant nutritif (4ml), méthanol (50µl), et 20µl de la suspension bactérienne.

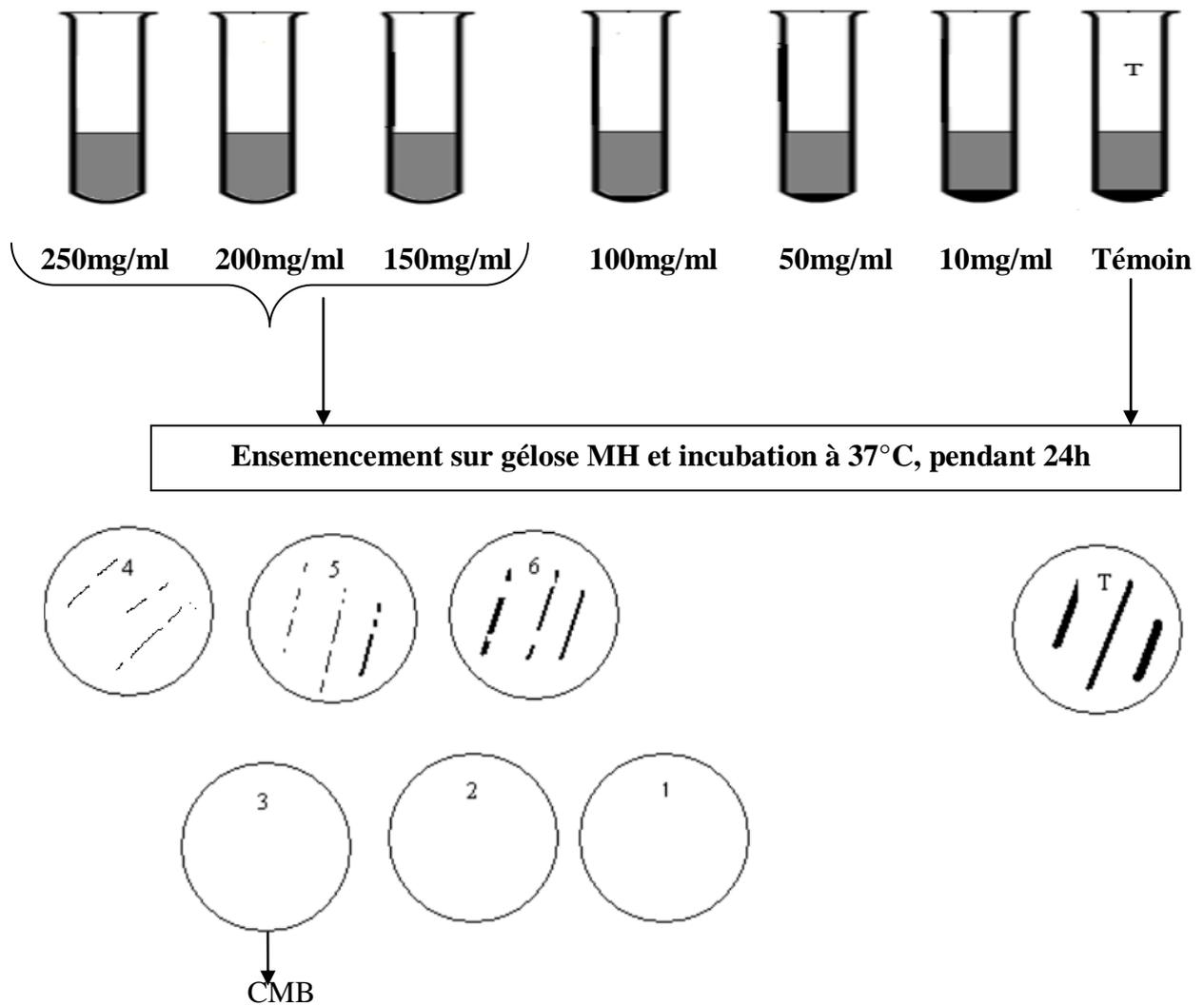
Les séries sont incubées à 37°C pendant 24 heures.



**Figure 12 :** Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide

❖ **Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en extrait capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'un extrait. La même gamme de concentration « 250mg/ml, 200mg/ml, 150mg/ml, 100mg/ml, 50mg/ml, 10mg/ml » est utilisée pour déterminer la CMI et la CMB de l'extrait à tester (fig.13). Des prélèvements sont effectués à partir du tube témoin et de chacun des tubes dépourvus de culot bactérien puisensemencés par stries sur gélose MH. Les boîtesensemencées sont incubées 24 heures à 37°C.



**Figure 13 :** Détermination de la CMB en milieu solide

❖ **Le calcul du pourcentage d'inhibition**

Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suite :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left( \frac{D_{\text{test}}}{D_{\text{boite de Pétri}}} \right) \times 100$$

-**Dtest** : diamètre d'inhibition

-**Dboite de Pétrie** : diamètre de la boite de Pétri

# *Résultats & discussion*

---

*Résultats & discussion*



### 1. Résultats de l'étude phytochimique

#### 1.1. Tests préliminaires de la composition chimique

Le Screening phytochimique du *Rosmarinus officinalis* et *Cinnamomum zeylanicum* montre la présence de plusieurs principes actifs qui sont indiqués dans les figures (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) et répertoriés dans le tableau 4.

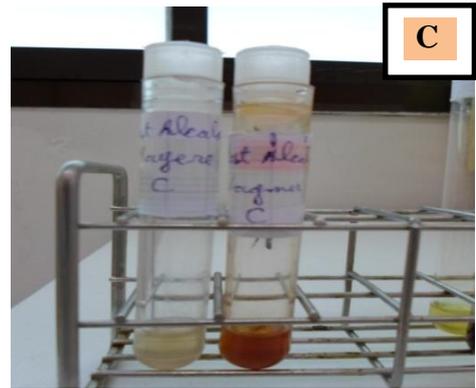
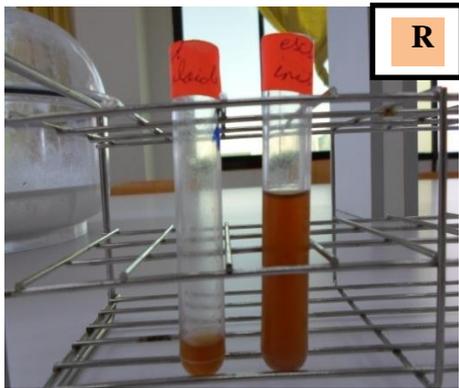
**Tableau 4 :** Screening phytochimique des deux plantes.

| Composés    | <i>Rosmarinus officinalis</i> | <i>Cinnamomum zeylanicum</i> |
|-------------|-------------------------------|------------------------------|
| Alcaloïdes  | -                             | +                            |
| Tanins      | +                             | +                            |
| Flavonoïdes | +                             | +                            |
| Saponosides | +                             | +                            |
| Coumarines  | -                             | -                            |
| Mucilages   | +                             | +                            |

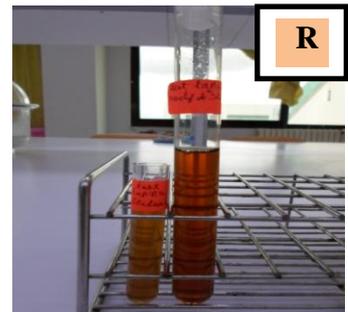
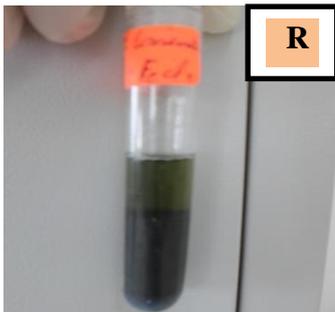
(+) : présence ; (-) : absence



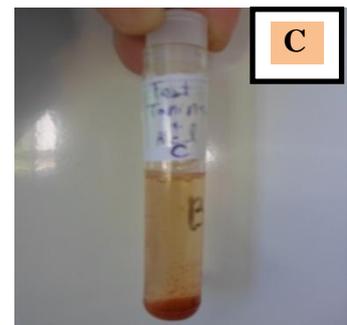
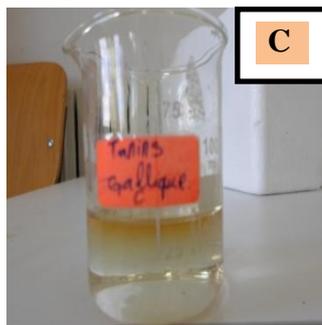
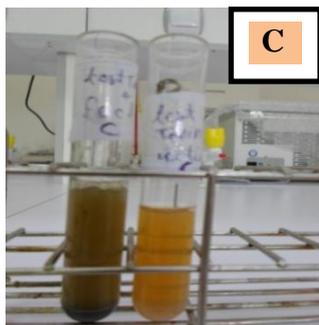
**Figure 14 :** Test d'identification des flavonoïdes



**Figure 15 :** Test d'identification des alcaloïdes



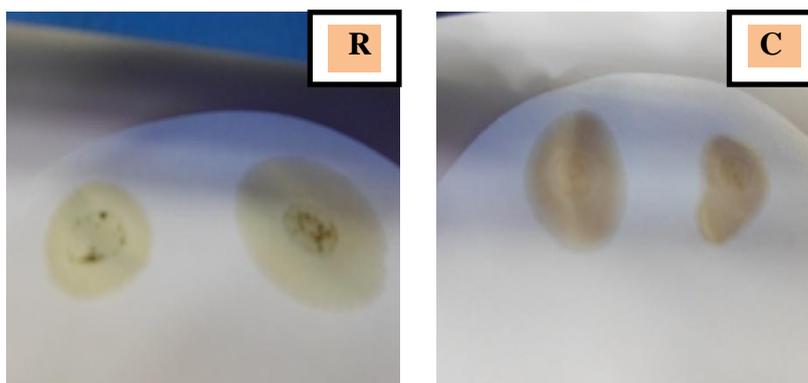
**Figure 16 :** Test d'identification des tanins galliques



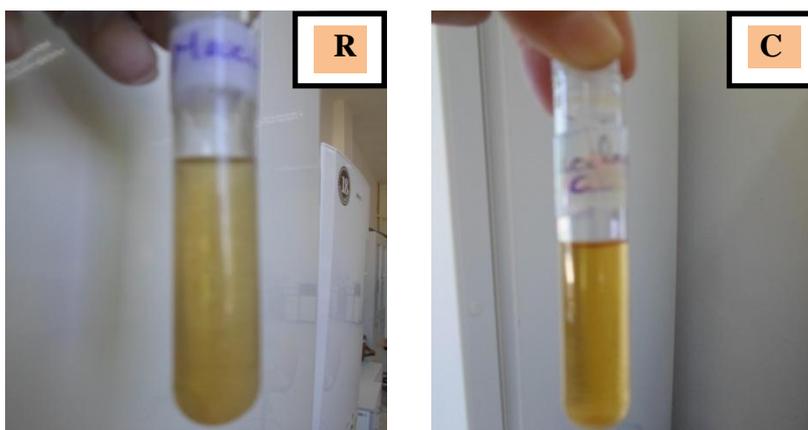
**Figure 17:** Test d'identification des tanins cathéiques



**Figure 18 :** Test d'identification des saponosides



**Figure 19 :** Test d'identification des coumarines



**Figure 20 :** Test d'identification des mucilages

Les tests de la composition chimique réalisés sur la poudre du *Rosmarinus officinalis* et de la *Cinnamomum zeylanicum* révèlent la présence des flavonoïdes, saponosides, tanins et des mucilages, on note aussi la présence des alcaloïdes uniquement chez *Cinnamomum zeylanicum*, concernant les coumarines sont absents chez les deux plantes.

De façon général, les familles chimiques détectées dans notre étude viennent confirmer les travaux de **Iserin (2001)**, **Gonzalez-Trujano et al., (2007)**, **Roux et al., (2007)** et **El-Sakka et al., (2010)** sur *Rosmarinus officinalis* et de **Leung Albert (1980)**, **Bruneton (1999)** pour la *Cinnamomum zeylanicum*

### **1.2. Résultat de la préparation de l'extrait méthanolique du *Rosmarinus officinalis* et du *Cinnamomum zeylanicum***

L'extraction de 125 g du matériel végétal avec du méthanol et lyophilisation a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait méthanolique, les résultats du rendement sont mentionnés dans le tableau 5 et la figure 21 :

Tableau 5 : Rendement des deux plantes.

| La quantité d'extrait à partir de 125 g | <i>Rosmarinus officinalis</i> | <i>Cinnamomum zeylanicum</i> |
|---|-------------------------------|------------------------------|
| Rendement (g)                           | 7,59                          | 15,43                        |
| Rendement %                             | 6,072                         | 12,344                       |

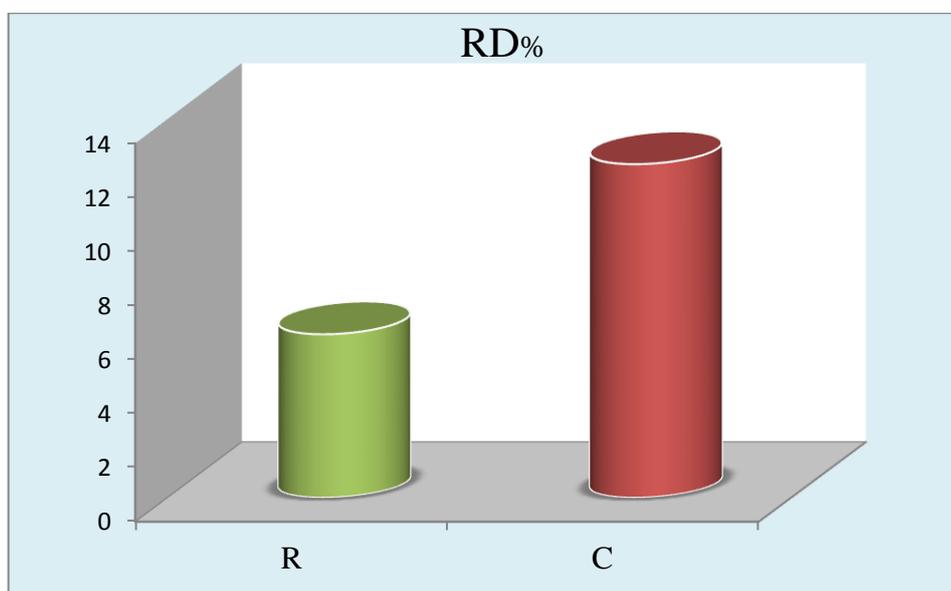


Figure 21 : Présentation graphique des rendements après lyophilisation pour les deux plantes étudiées. ( **R** : *Rosmarinus officinalis* ; **C** : *Cinnamomum zeylanicum* )

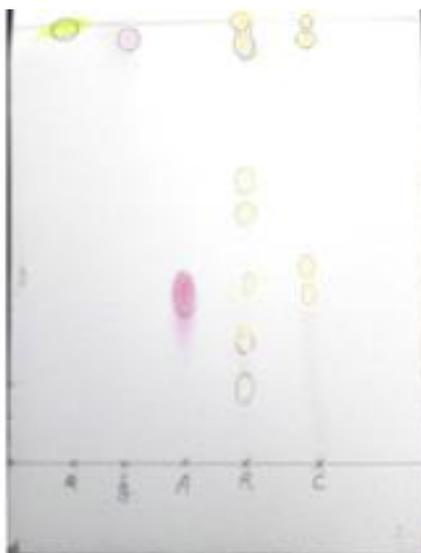
**RD %** : rendement %

Dans ce présent travail, à partir de 125g de chaque plante ( *Rosmarinus officinalis* et *Cinnamomum zeylanicum*), une poudre verte clair de *Rosmarinus officinalis* et une poudre marron de *Cinnamomum zeylanicum* sont récupérées.

L'extraction méthanolique a donné un rendement de 6,072% pour *Rosmarinus officinalis* et 12,344% pour *Cinnamomum zeylanicum* (fig. 21).

On constate que le rendement est variable et aussi important pour la cannelle que le romarin malgré que la technique d'extraction soit la même. Cette variabilité est due probablement à la variation des facteurs suivants : le stade de croissance, les conditions climatiques, la période du récolte, le temps du récolte, le séchage et l'espèce de la plante.

### 1.3.Chromatographie sur couche mince (CCM)



**Figure 22 :** Chromatographie sur couche mince des deux extraits méthanoliques  
(prise personnelle)

L'analyse du chromatogramme révèle la présence de sept taches pour l'extrait méthanolique du romarin et quatre taches pour l'extrait méthanolique de la cannelle.

Les rapports frontaux sont calculés selon l'équation suivante :

$$Rf = \frac{\text{distance parcourue par l'échantillon}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$

- **Front du solvant = 10cm**

Les distances parcourues par :

-la quercétine = 9,9cm

$$Rf_Q = 0,99.$$

-Alanine = 3,8cm

$$Rf_A = 0,38$$

-Acide gallique = 9,7cm

$$Rf_G = 0,97$$

- Les distances parcourues par les taches de *Rosmarinus officinalis*:

$$D_1 = 1,7\text{cm} \quad Rf_1 = 0,17$$

$$D_2 = 2,7\text{cm} \quad Rf_2 = 0,27$$

$$D_3 = 4\text{cm} \quad Rf_3 = 0,4$$

$$D_4 = 5,6\text{cm} \quad Rf_4 = 0,56$$

$$D_5 = 6,3\text{cm} \quad Rf_5 = 0,63$$

$$D_6 = 9,7\text{cm} \quad Rf_6 = 0,97$$

$$D_7 = 9,9\text{cm} \quad Rf_7 = 0,99$$

- Les distances parcourues par les taches de *Cinnamomum zeylanicum* :

$$D_1 = 4\text{cm} \quad Rf_1 = 0,4$$

$$D_2 = 4,4\text{cm} \quad Rf_2 = 0,44$$

$$D_3 = 9,7\text{cm} \quad Rf_3 = 0,97$$

$$D_4 = 9,9\text{cm} \quad Rf_4 = 0,99$$

La révélation par la Ninhydrine a permis d'avoir une bonne séparation et une visibilité acceptable des taches qui confirme la présence de l'acide gallique et la quercétine dans les deux extraits.

### 1.4. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Dans le but de caractériser les deux extraits préparés, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués.

La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, dans les plantes médicinales et les nourritures (Abdel-Hameed, 2009). L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu (Maisuthisakul *et al.*, 2008).

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996) en utilisant comme standard la quercétine, et est exprimée en milligramme d'équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'ext). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6 :

**Tableau 6 :** Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'EMR et l'EMC.

|                               | Teneur en polyphénols<br>(mg EAG /g) | Teneur en flavonoïdes<br>(mg EQ/g d'ext) |
|-------------------------------|--------------------------------------|--|
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | 124,66                               | 91,2                                     |
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i>  | 111 ,33                              | 66,4                                     |

Nos résultats montrent que l'extrait méthanolique de *Cinnamomum zeylanicum* contient 111,33 mg EAG/g et l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* contient 124,66 mg EAG/g d'extrait qui est le plus riche en polyphénols.

Généralement, toutes les plantes de la famille des Lamiacée sont connues pour leurs composés phénoliques (**Gortzi et al., 2007, Fecka et al., 2008**).

La teneur d'extrait méthanolique du *Rosmarinus officinalis* est si proche à celle de **Erkan et al., (2008)** : (162 mg EAG/g) et **Ho et al., (2008)** : ( $127 \pm 3$  mg EAG/g), mais assez loin à celle de **Tsai et al., (2007)** : ( $58.1 \pm 0.9$  mg EAG/g) et **Tawaha et al., (2007)** : ( $39.1 \pm 3.6$  mg EAG/g).

Cette différence importante peut être due à la méthode de dosage de Folin-Ciocalteu qui n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique élevé (**Tawaha et al., 2007**).

D'autre part 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 (**Falleh et al., 2008**).

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) (**Podsdek, 2007; Falleh et al., 2008**).

Le test préliminaire a indiqué la présence des flavonoïdes dans les extraits des deux plantes, mais le résultat de dosage quantitatif des flavonoïdes révèle que l'extrait méthanolique de *Cinnamomum zeylanicum* contient (66,4mg EQ/g) d'extrait, par contre de *Rosmarinus officinalis* qui contient (91,2 mg EQ/g) est plus riche en flavonoïdes.

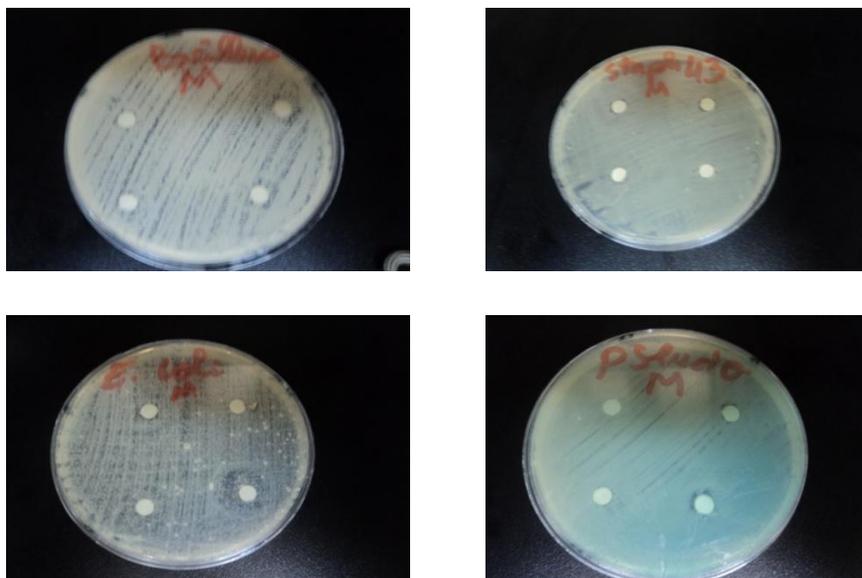
Ces résultats sont en accord avec les résultats de **Tsai *et al.*, (2007)** qui ont également trouvé que l'extrait méthanolique du *Rosmarinus officinalis* contient (60.7 mg EQ/g).

**Maisuthisakul *et al.*, en (2008)** ont constaté que la teneur totale des flavonoïdes des extraits méthanoliques de 28 plantes, est liée à la teneur des composés phénoliques totaux. De même nous avons trouvé que la teneur des flavonoïdes des extraits est corrélée significativement avec la teneur des polyphénols.

### 2. Résultats de l'activité antibactérienne

#### 2.1. Test du méthanol ou control négatif

Le test d'effet antibactérien ou pas du méthanol dilué à 85% sur les souches : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 montre que ce solvant n'a aucun effet sur ces micro-organismes (fig.23).



**Figure 23 :** Photographies du test négatif exercé sur les différentes souches

#### 2.2. Antibiogramme ou control positif

Les résultats de l'évaluation de l'action antimicrobienne des antibiotiques testés sur les souches cibles sont présentés par le tableau 7 et les figures 24 et 25.

On remarque que tout les antibiotiques testés sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont un effet positif.

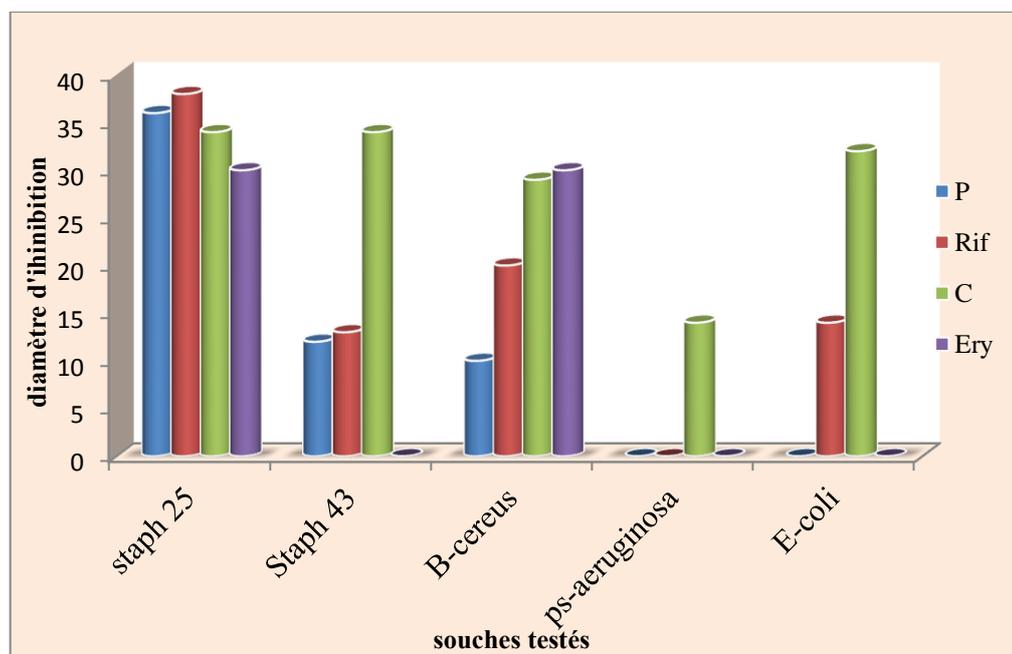
Pour la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, elle se manifeste résistante vis-à-vis des antibiotiques testés à l'exception du chloramphénicol qui réagit positivement.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* se montre résistante vis-à-vis de tout les antibiotiques de même, *Escherichia coli* à l'exception du chloramphénicol, a son égard la bactérie est sensible.

En ce qui concerne *Bacillus cereus*, cette espèce se montre sensible vis-à-vis du chloramphénicol, du rifampicine et de l'érythromycine, et résistante à l'égard des bêta-lactamines.

**Tableau 7 :** Diamètre d'inhibition du test positif exercé sur les différentes souches en (mm)

| ATB<br>souches                          | Pénicilline | Rifampicine | Chloramphénicol | Erythromycine |
|---|-------------|-------------|-----------------|---------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 36          | 38          | 34              | 30            |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300 | 12          | 13          | 34              | 0             |
| <i>Bacillus cereus</i>                  | 10          | 20          | 29              | 30            |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>           | 0           | 0           | 14              | 0             |
| <i>Escherichia coli</i>                 | 0           | 14          | 32              | 0             |



**Figure 24 :** Antibiogramme des souches testées ( *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 )

**P** : Pénicilline, **Rif** : Rifampicine, **Ery** : Erythromycine, **C** : Chloramphénicol

Ces mécanismes de réponse différentiels entre les souches cibles vis-à-vis des antibiotiques dépend principalement de l'état cellulaire de la bactérie.

Pour la Pénicilline c'est un bactéricide qui agit principalement sur les coques Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> ainsi que sur les bacilles Gram<sup>+</sup>, la résistance à l'égard de cette antibiotique est due probablement à une diminution de l'affinité de la liaison d'antibiotique (PBP : Penicillin Binding Proteins) suite à une mutation de celle-ci ou à une diminution du nombre de PBP, la réduction de l'affinité est documentée chez les Gram<sup>-</sup>, par ailleurs, les deux mécanismes sont rencontrés chez les Gram<sup>+</sup>.

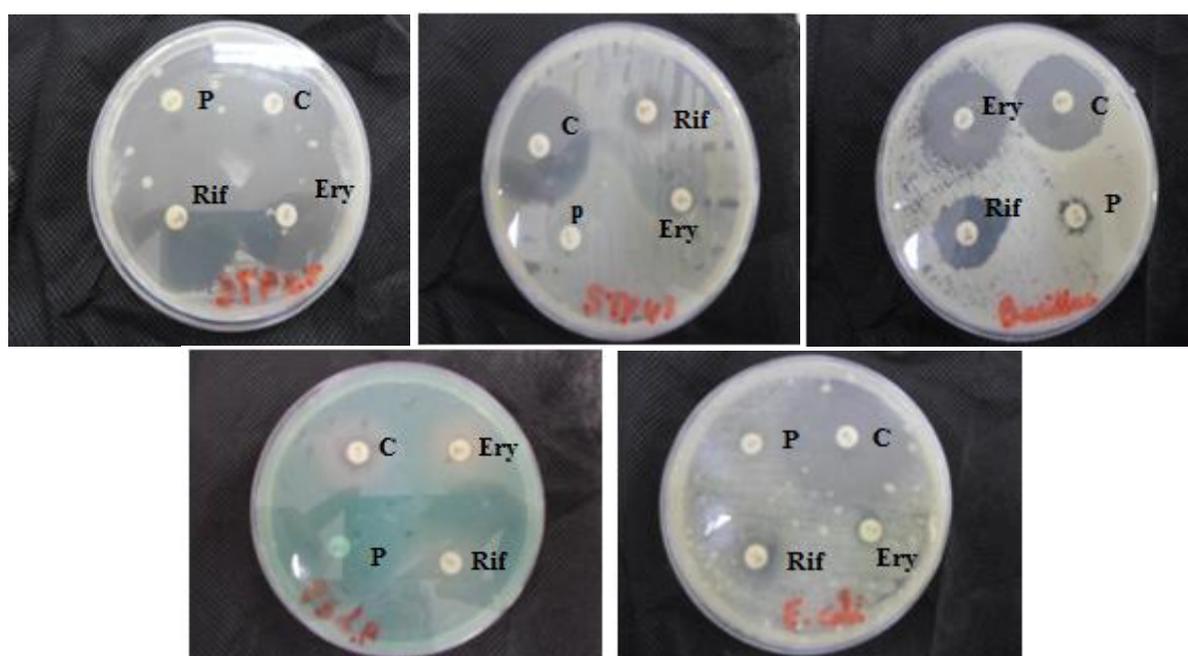
Pour l'érythromycine c'est un bactériostatique des coques Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup>, et des bacilles Gram<sup>+</sup> mais inactif sur les Entérobactéries et *Pseudomonas*.

En ce qui concerne la multi-résistance du genre *Pseudomonas*, elle peut être due à la présence de pompes capables de reconnaître et donc expulser plusieurs classes d'antibiotiques, les mécanismes de résistance probables sont résumés dans le tableau 8.

**Tableau 8 :** Mécanismes de résistance bactérienne ( Van Bmbeke et Tulkenns, 2008)

| Type d'Antibiotique | modification enzymatique de l'ATB | Altération membranaire | Altération de la paroi | Efflux | Altération des ribosomes |
|---------------------|-----------------------------------|------------------------|------------------------|--------|--------------------------|
| B-lactamine         | P /C                              | C                      | -                      | C      | -                        |
| Macrolide           | P                                 | -                      | -                      | P /C   | P                        |
| Phénicolé           | P                                 | P                      | -                      | C      | C                        |
| rifampicine         | -                                 | -                      | -                      | C      | -                        |

**P** : résistance plasmidique, **C** : résistance chromosomique, - : mode de résistance non décrit.



**Figure 25 :** Antibiogramme des souches : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

### 2.3. Résultat de l'activité antibactérienne des extraits méthanolique

#### 2.3.1. Réponse de la souche *Bacillus cereus* aux extraits testés

##### ✚ Méthode de diffusion sur disques (aromatogramme)

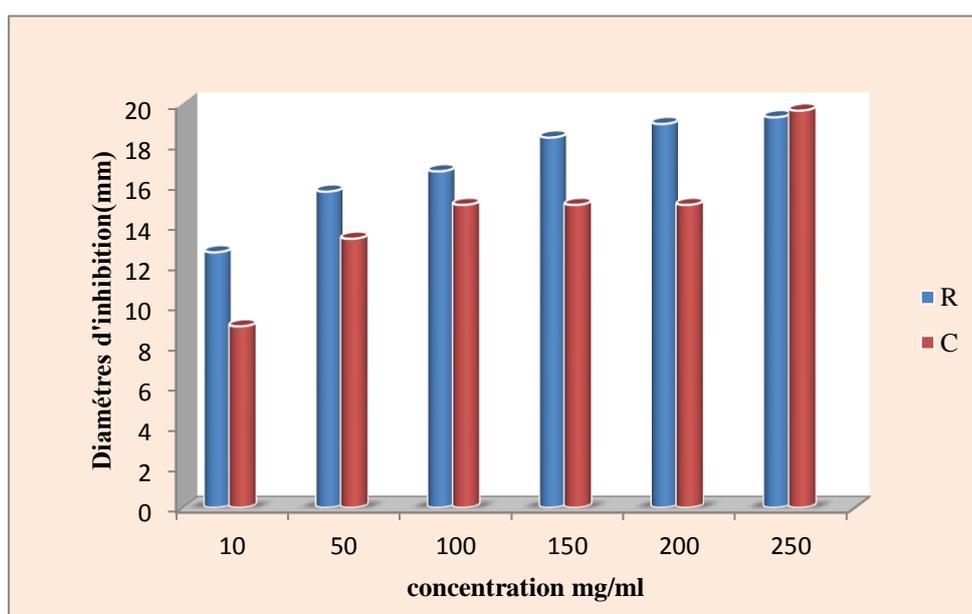
Nos résultats présentés par les figures 26 et 27 montrent que l'extrait méthanolique des deux plantes testées sur l'espèce *Bacillus cereus* ont un effet positif à partir de la faible concentration (10mg/ml) de la gamme choisie.

De plus, on peut dire que les deux extraits ont le même effet sur la souche.

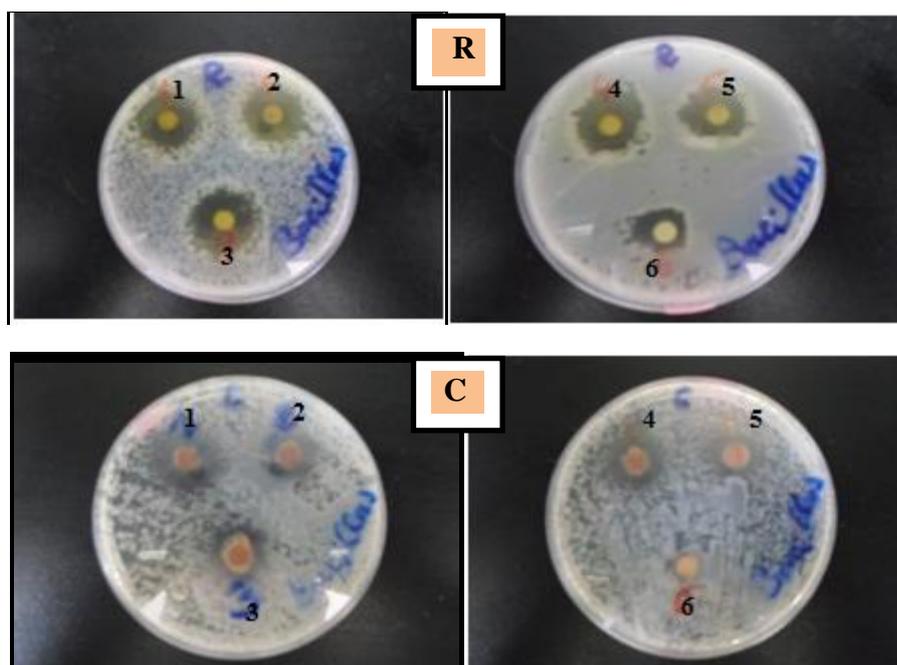
Les zones d'inhibition mesurées permettent de classer la bactérie dans les catégories sensible (diamètre >8) et très sensible (diamètre < 20).

Nos résultats sont aussi significatif par rapport à ceux indiqués par **Celiktas et al (2005)** qui ont testé l'extrait du romarin sur la souche correspondante, ces derniers ont eu un diamètre d'inhibition égale à 16,5mm avec une concentration de 500mg/ml du méthanol, soit le double de la notre (diamètre proche de 20mm).

On peut céder cette divergence aux facteurs influençant la composition des plantes (lieux et périodes de récolte).



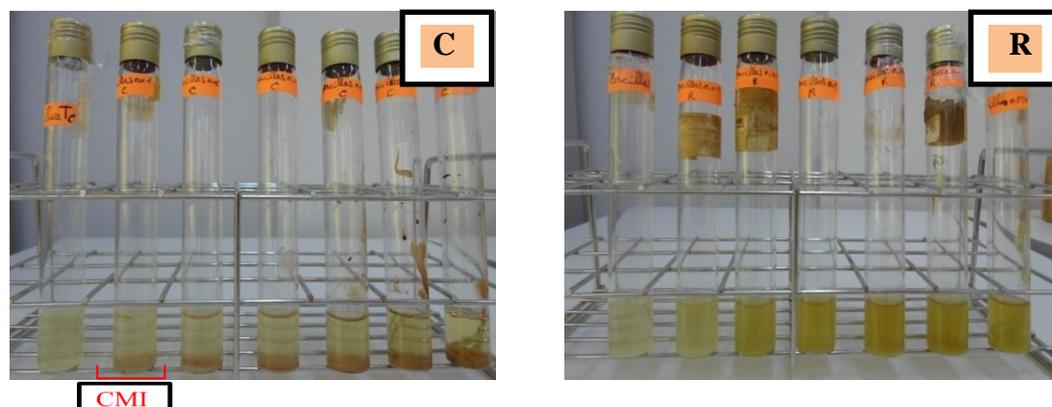
**Figure 26 :** Réponse de la souche *Bacillus cereus* aux extraits testés ( R : *Rosmarinus officinalis* ; C : *Cinnamomum zeylanicum* )



**Figure 27 :** Aromatogramme du *Bacillus cereus*  
(1 : 250mg /ml, 2 : 200mg /ml, 3 : 150mg /ml, 4: 100mg /ml, 5: 50mg /ml, 6 :10mg /ml)  
( R : *Rosmarinus officinalis* ; C : *Cinnamomum zeylanicum* )

#### ✚ Activité antibactérienne en milieu liquide

Les concentrations des extraits testées sur la souche présentent une activité inhibitrice à partir de 10mg/ml pour l'extrait de la plante *Cinnamomum zeylanicum*. En revanche aucune activité inhibitrice de la gamme de concentration de l'extrait du *Rosmarinus officinalis* n'a pu être observée (fig. 28).

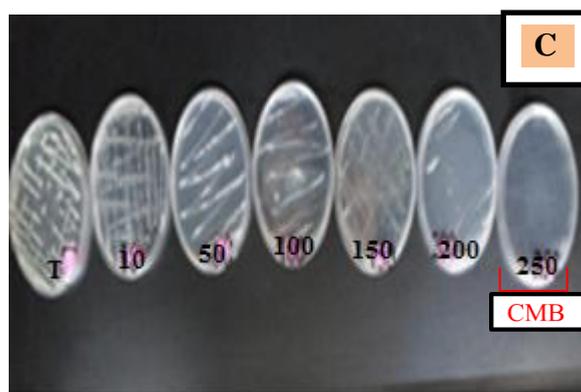


**Figure 28 :** Activité antibactérienne en milieu liquide  
( R : *Rosmarinus officinalis* ; C : *Cinnamomum zeylanicum* )

### ✚ Résultat de la CMB

La série des dilutions précédentes représentant la CMI et les concentrations supérieures relatifs à l'extrait de la cannelle a permis après ensemencement sur GN et incubation à 37°C pendant 18 à 24h, la détermination visuelle d'une CMB qui égale à 250mg/ml du méthanol (fig. 29).

Ce résultat permet de dire que la cannelle est un agent bactériostatique tant que la CMB > CMI.



**Figure 29 :** La CMB de la souche *Bacillus cereus*

### ✚ Pourcentage d'inhibition du *Bacillus cereus*

Les pourcentages d'inhibitions de la souche issus avec l'extrait de *Rosmarinus officinalis* varient entre 16,66 et 21,47%, tandis que ceux de l'extrait de *Cinnamomum zeylanicum* varient entre 10 et 21,84% (tab. 9).

**Tableau 9:** Pourcentage d'inhibition du *Bacillus cereus*

| Plantes                       | Concentrations mg/ml |       |       |       |       |       |
|-------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                               | 10                   | 50    | 100   | 150   | 200   | 250   |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | 16,66                | 16,66 | 17,77 | 20,33 | 21,11 | 21,47 |
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i>  | 10                   | 14,81 | 16,66 | 16,66 | 16,66 | 21,84 |

De manière générale, la souche *Bacillus cereus* s'est montré sensible vis-à-vis des deux extraits même à de faibles concentrations et que le pourcentage du romarin semble relativement élevée par rapport à celui de la cannelle (fig.30).

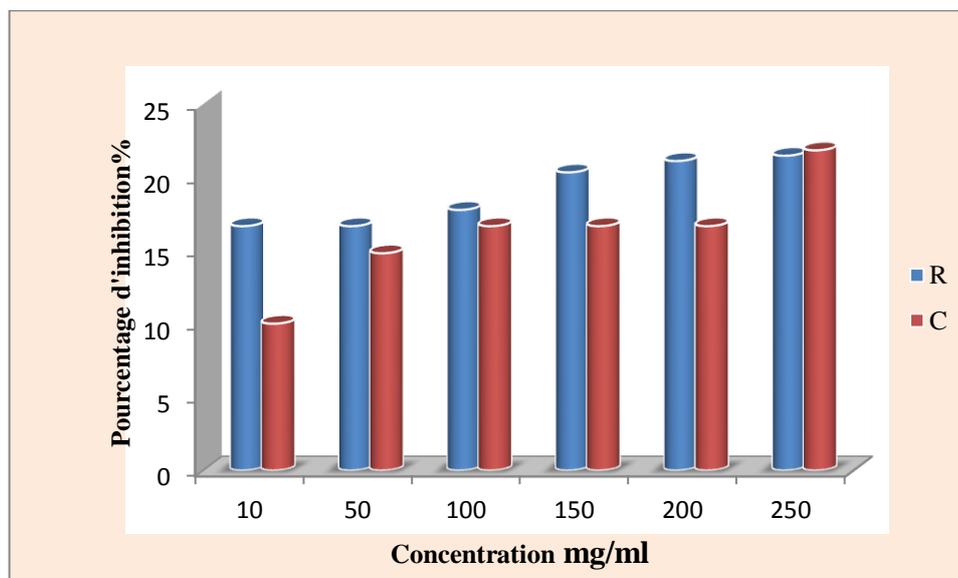


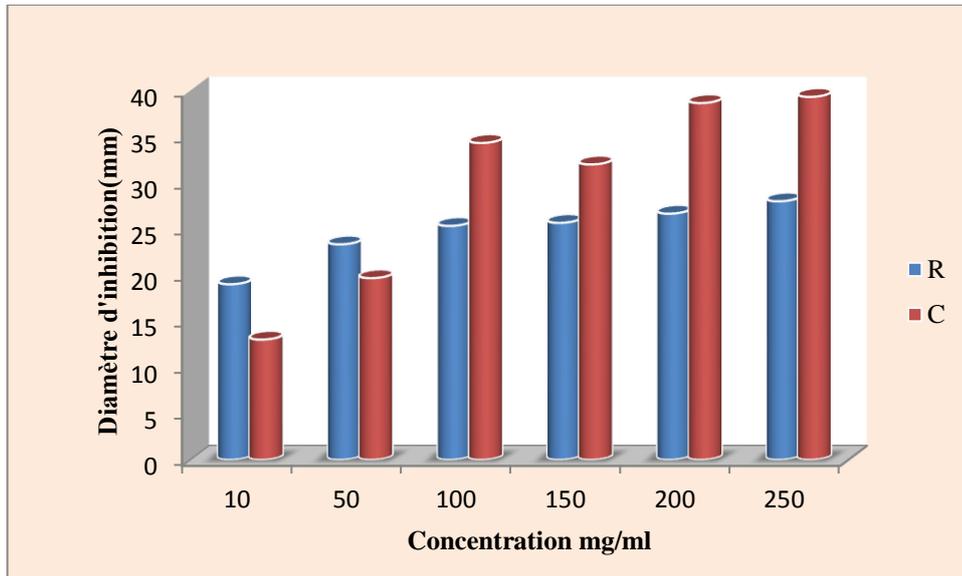
Figure 30 : Pourcentage d'inhibition de la souche *Bacillus cereus*

### 2.3.2. Réponse de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aux extraits testés

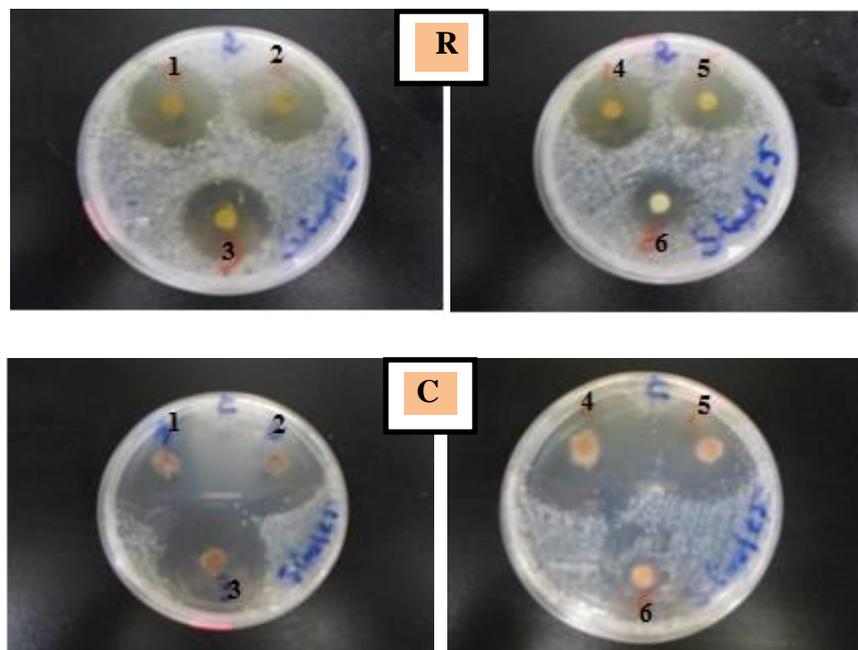
#### ✚ Méthode de diffusion sur disques (aromatogramme)

Nos données relatifs à cette méthode, montrent que les extraits méthanoliques des deux plantes ont un effet puissant sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En effet à des concentrations égales à 10 et 50mg/ml, le romarin donne un effet important par rapport à l'autre extrait, mais à partir de la concentration 100mg d'extrait/ml c'est la cannelle qui exerce une action plus efficace contre la poussée de la souche traduite par des diamètres > à 30mm rendant la bactérie extrêmement sensible (fig.31, 32).

Nos résultats sont aussi importants à ceux indiqués par **Dordevic et ses collaborateurs (2007)** qui ont rencontré une zone d'inhibition de 20.5mm à une concentration de 200mg/ml de l'extrait méthanolique du *Rosmarinus officinalis*, soit une zone proche de la nôtre à 10mg/ml d'extrait.



**Figure 31 :** Réponse de la souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aux extraits testés ( R : *Rosmarinus officinalis* ; C : *Cinnamomum zeylanicum* )

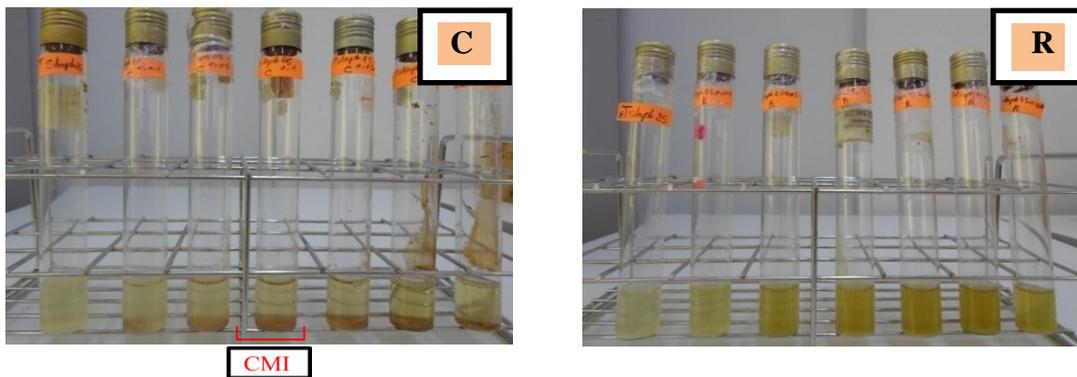


**Figure 32 :** Aromatogramme de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (1 : 250mg /ml, 2 : 200mg /ml, 3 : 150mg /ml, 4: 100mg /ml, 5: 50mg /ml, 6 :10mg /ml) ( R : *Rosmarinus officinalis* ; C : *Cinnamomum zeylanicum* )

**✚ Activité antibactérienne en milieu liquide**

L'observation de la série de dilution en milieu liquide du *Rosmarinus officinalis* indique une troublesse dans toute la gamme de concentration testée. Tandis que les tubes de

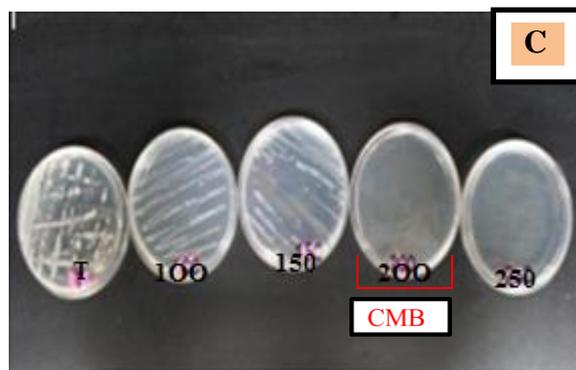
l'extrait du *Cinnamomum zeylanicum* apparaissent claires à partir de la concentration 100mg/ml, traduisant ainsi la CMI de cette série (fig.33).



**Figure 33 :** Activité antibactérienne en milieu liquide (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ( R : *Rosmarinus officinalis* ; C : *Cinnamomum zeylanicum* )

### + Résultat de la CMB

L'ensemencement fait à partir de la série de dilution en milieu liquide précédente montre que l'extrait du *Cinnamomum zeylanicum* a un effet bactéricide vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 à une concentration équivalente à 200mg /ml (fig.34).



**Figure 34 :** La CMB de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

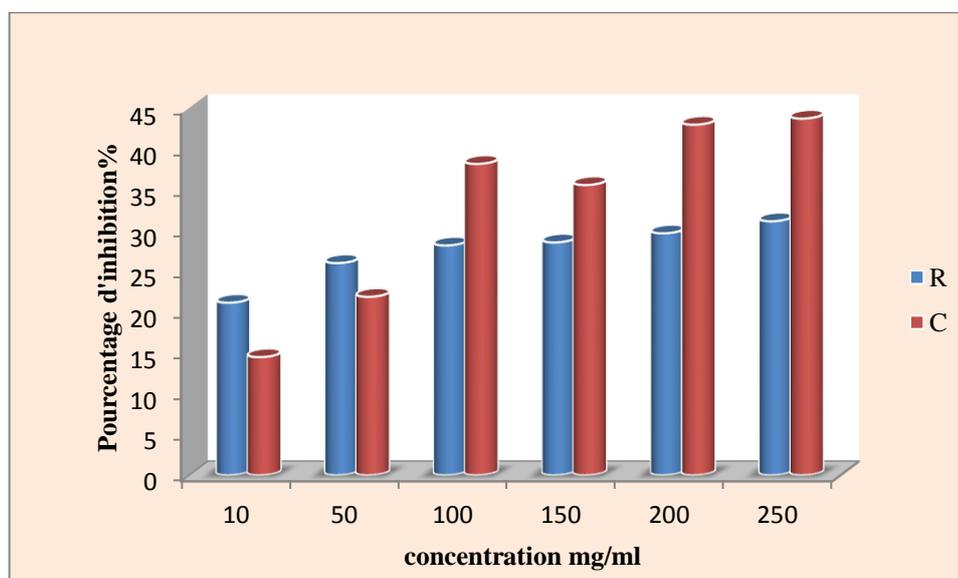
### + Pourcentage d'inhibition du *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

les pourcentages d'inhibition provoqués par l'extrait du romarin varient entre 21,11 et 31,11%, en comparaison avec *Cinnamomum zeylanicum* le pourcentage d'inhibition est plus important variant entre de 14,44% et 43,7% (tab.10).

**Tableau 10 :** Pourcentage d'inhibition du *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

| Plantes                       | Concentrations mg/ml |       |       |       |       |       |
|-------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                               | 10                   | 50    | 100   | 150   | 200   | 250   |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | 21,11                | 25,98 | 28,14 | 28,51 | 29,62 | 31,11 |
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i>  | 14,44                | 21,84 | 38,14 | 35,55 | 42,95 | 43,7  |

D'après nos résultats les deux extraits exercent un effet positif sur la souche, bien que l'extrait de la cannelle avec la majorité des concentrations testées donne une action plus importante (fig.35).



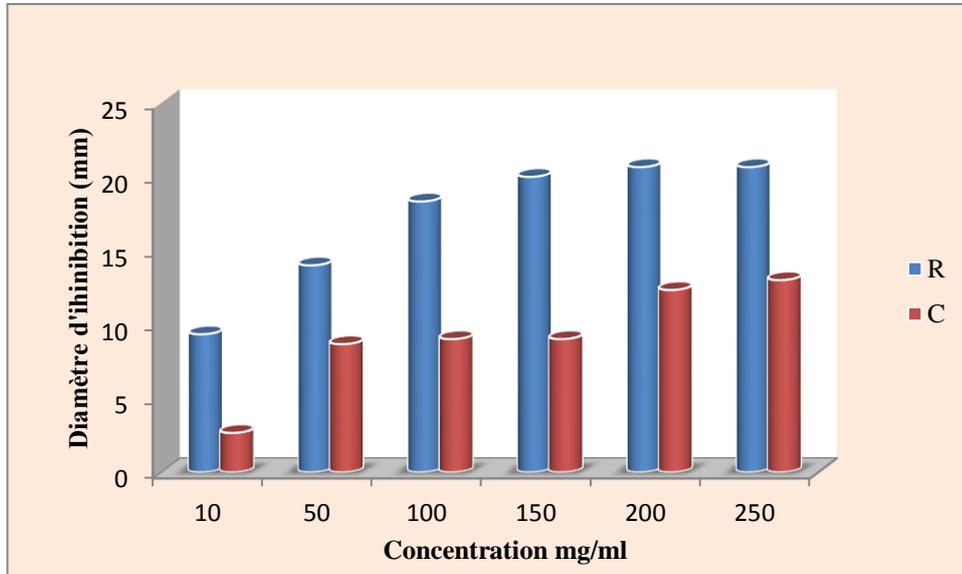
**Figure 35 :** Pourcentage d'inhibition de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

### 2.3.3. Réponse de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 aux extraits testés

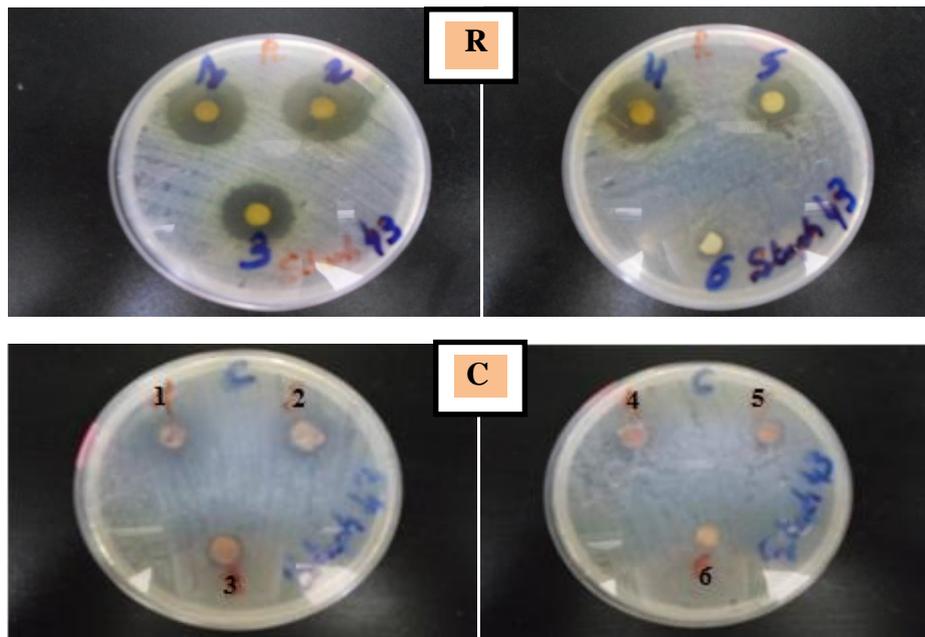
#### ✚ Méthode de diffusion sur disques (aromatogramme)

Les résultats obtenus présentés par les figures 36 et 37 montrent que l'extrait du romarin est actif sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 même à de faibles concentrations et permet de classer la bactérie dans la catégorie sensible à extrêmement sensible (diamètre dépassant 20mm avec la concentration 250mg/ml) tandis que l'extrait de la cannelle révèle

inactif à une concentration de 10mg/ml, et ce n'est qu'à partir de 200 et 250 mg/ml que la bactérie se manifeste très sensible.



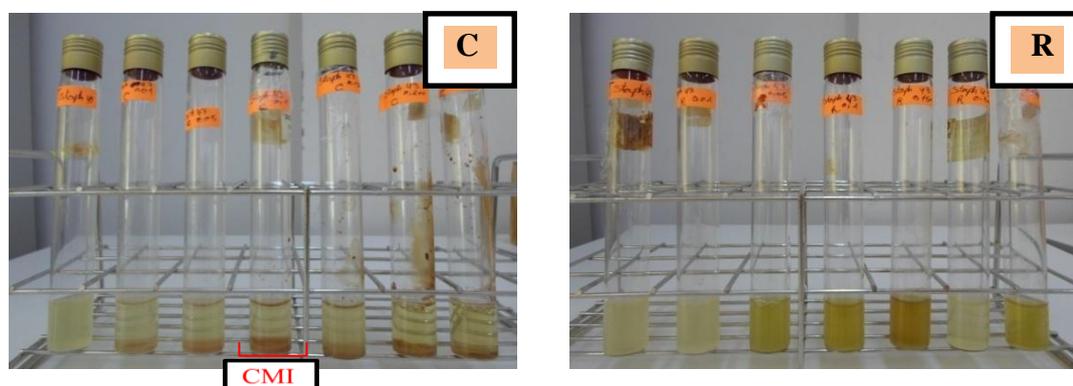
**Figure 36 :** Réponse de la souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 aux extraits testés ( R : *Rosmarinus officinalis* ; C : *Cinnamomum zeylanicum* )



**Figure 37 :** Aromatogramme du *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (1 : 250mg /ml, 2 : 200mg /ml, 3 : 150mg /ml, 4: 100mg /ml, 5: 50mg /ml, 6 :10mg /ml) ( R : *Rosmarinus officinalis* ; C : *Cinnamomum zeylanicum* )

### ✚ Activité antibactérienne en milieu liquide

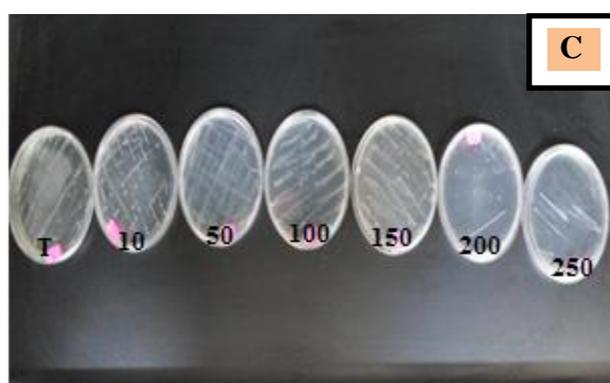
Les concentrations des extraits testées sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 présentent une activité inhibitrice à partir de 100mg/ml pour l'extrait de la plante *Cinnamomum zeylanicum*. Par contre aucune activité inhibitrice n'a été signalé pour l'extrait de la plante *Rosmarinus officinalis* (fig.38).



**Figure 38 :** Activité antibactérienne en milieu liquide( *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 )  
( **R** : *Rosmarinus officinalis* ; **C** : *Cinnamomum zeylanicum* )

### ✚ Résultat de la CMB

A partir de la série des dilutions réalisée avec l'extrait du *Cinnamomum zeylanicum*, aucune boîte n'a montré l'effet bactéricide de cette dernière (fig.39). Donc pour avoir une CMB, il se pourrait que l'augmentation des concentrations d'extrait sera utile.



**Figure 39 :** La CMB de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

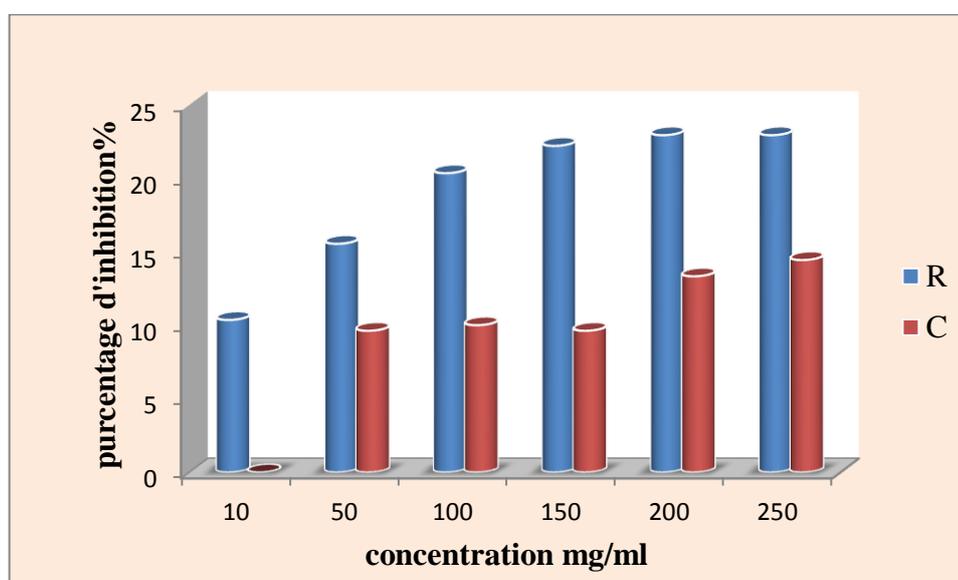
### ✚ Pourcentage d'inhibition de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Les pourcentages d'inhibitions provoquées par l'extrait de la *Cinnamomum zeylanicum* varient entre 9,62 et 14,44%, Comparativement à l'effet du *Rosmarinus officinalis* a un pourcentage d'inhibition plus important variant 10,36% à 22,95% (tab.11), à cet effet on peut

dire que la souche cible est affectée plus par l'action du romarin même à de faibles concentrations (fig.40).

**Tableau 11** : Pourcentage d'inhibition du *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

| plantes                       | Concentrations mg/ml |       |       |       |       |       |
|-------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                               | 10                   | 50    | 100   | 150   | 200   | 250   |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | 10,36                | 15,55 | 20,36 | 22,22 | 22,95 | 22,95 |
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i>  | 0                    | 9,62  | 10    | 9,62  | 13,33 | 14,44 |

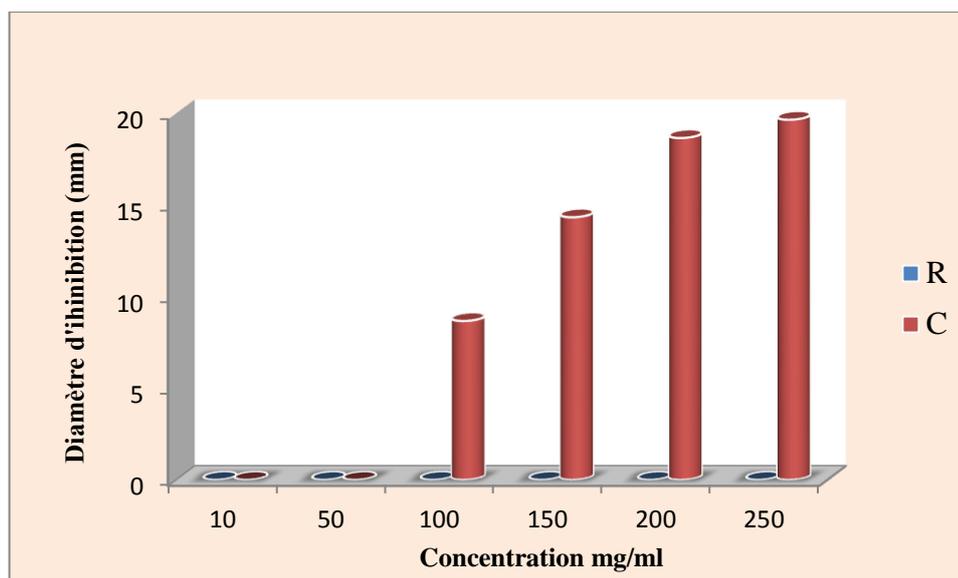


**Figure 40** : Pourcentage d'inhibition de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

#### 2.3.4. Réponse de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 aux extrait testés

##### ✚ Méthode de diffusion sur disques (aromatogramme)

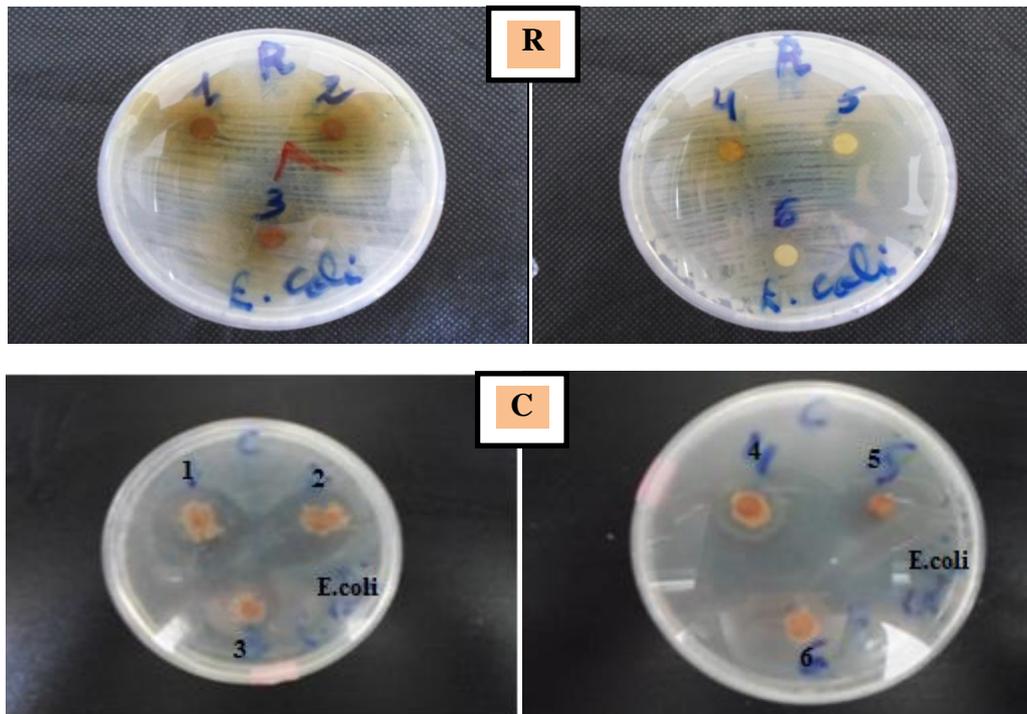
Les données associées à cette méthode indiquent que seulement l'extrait de la cannelle est actif sur l'espèce *Escherichia coli*, et cela n'est effectué qu'à partir de la concentration 100mg/ml (fig.41).



**Figure 41 :** Réponse de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 aux extraits testés ( R : *Rosmarinus officinalis* ; C : *Cinnamomum zeylanicum* )

Nos résultats sont très loin à ceux indiqués par **Makhloufi (2010)** qui a trouvé que l'extrait méthanolique du romarin exerce une grande activité sur la souche testée qui est traduit par un diamètre de 34 mm avec une concentration de 500mg/ml.

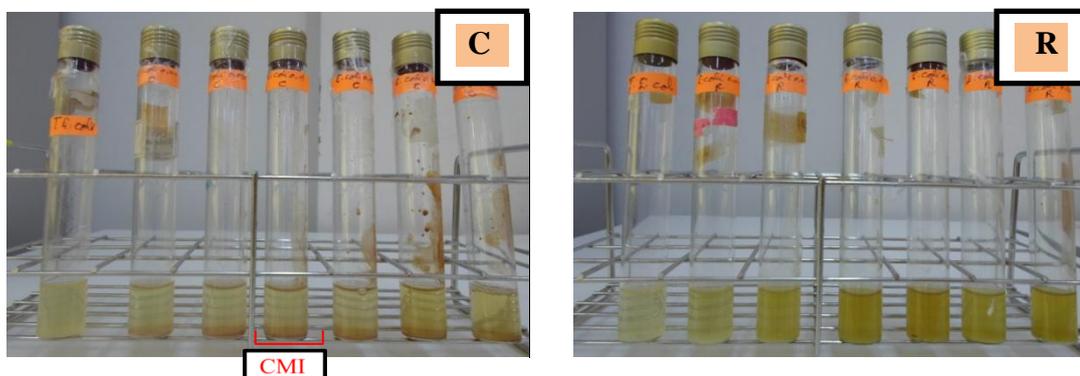
On peut céder cette divergence aux facteurs influençant la composition des plantes (lieux et périodes de récolte) et à la concentration de l'extrait.



**Figure 42 :** Aromatogramme d'*Escherichia coli* ATCC 25922 (1 : 250mg /ml, 2 : 200mg /ml, 3 : 150mg /ml, 4: 100mg /ml, 5: 50mg /ml, 6 :10mg /ml)  
( R : *Rosmarinus officinalis* ; C : *Cinnamomum zeylanicum* )

#### ✚ Activité antibactérienne en milieu liquide

La méthode de dilution des extraits testés à différentes concentrations sur la souche *Escherichia coli* montre une activité inhibitrice à partir de 100mg/ml pour l'extrait de la cannelle. En revanche aucune action positive n'est signalée pour l'autre extrait (fig.43).



**Figure 43 :** Activité antibactérienne en milieu liquide (*Escherichia coli* ATCC 25922)  
( R : *Rosmarinus officinalis* ; C : *Cinnamomum zeylanicum* )

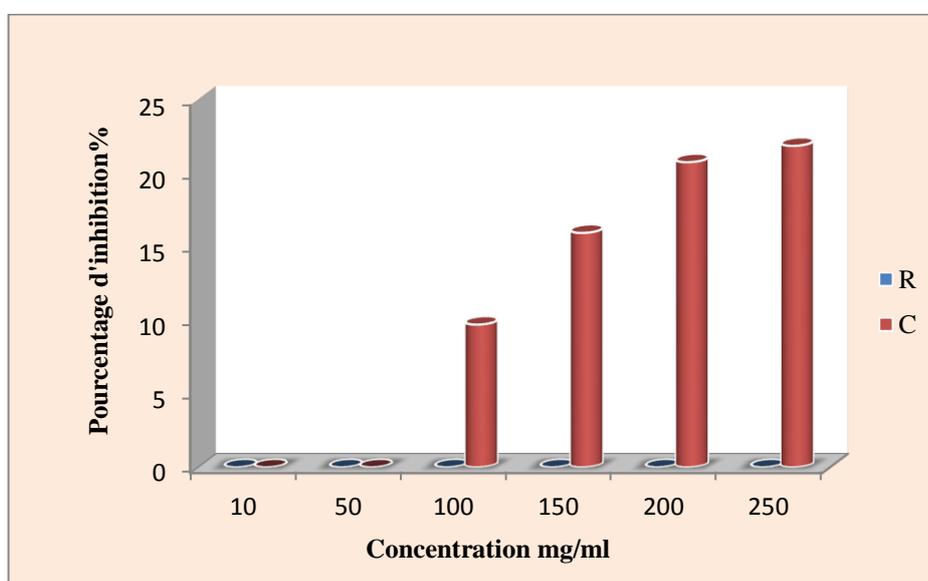
Toutes les boîtesensemencées par la série précédente relatif à l'extrait de la cannelle ont poussées après 24h.

### ✚ Pourcentage d'inhibition d'*Escherichia coli* ATCC 25922

D'après le tableau 12 et l'histogramme ci-dessous, la cannelle présente un pourcentage aussi important par rapport au romarin, qui se montre l'est totalement inactif contre la poussée de la souche.

**Tableau 12 :** Pourcentage d'inhibition d'*Escherichia coli* ATCC 25922

| Plantes                       | Concentrations mg/ml |    |      |       |       |       |
|-------------------------------|----------------------|----|------|-------|-------|-------|
|                               | 10                   | 50 | 100  | 150   | 200   | 250   |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | 0                    | 0  | 0    | 0     | 0     | 0     |
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i>  | 0                    | 0  | 9,68 | 15,92 | 20,73 | 21,84 |



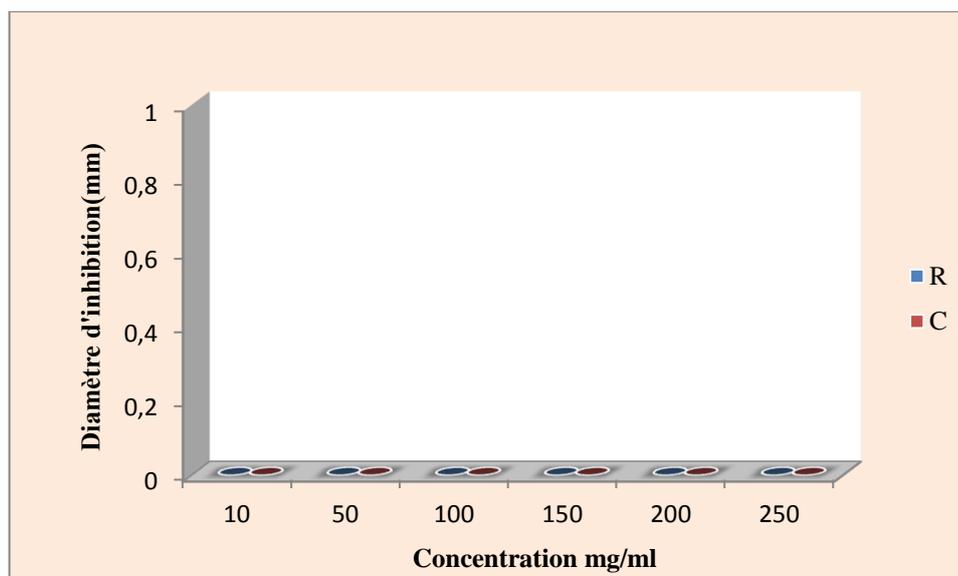
**Figure 44 :** Pourcentage d'inhibition de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922

### 2.3.5. Réponse de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 aux extraits testés

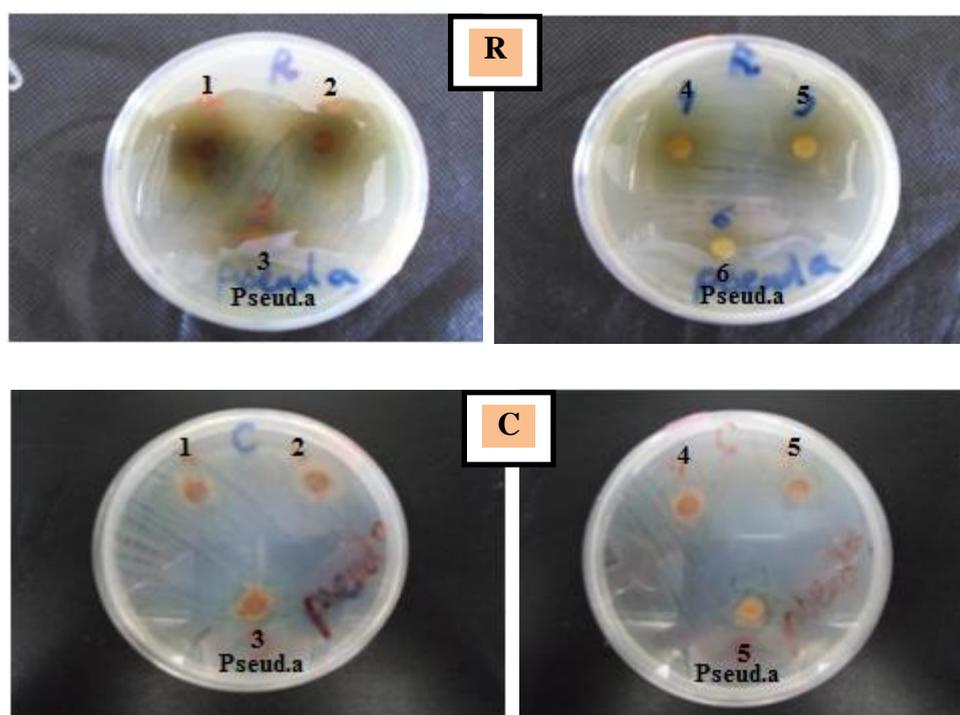
#### ✚ Méthode de diffusion sur disques (aromatogramme)

Les résultats de cette étude montrent la résistance nette du *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, vis-à-vis des extraits des deux plantes *Rosmarinus officinalis* et *Cinnamomum zeylanicum* testées (fig.45, 46).

Nos résultats corroborent avec ceux de Celiktas *et al* (2005) qui signalent la faible activité de l'extrait du romarin sur la souche.



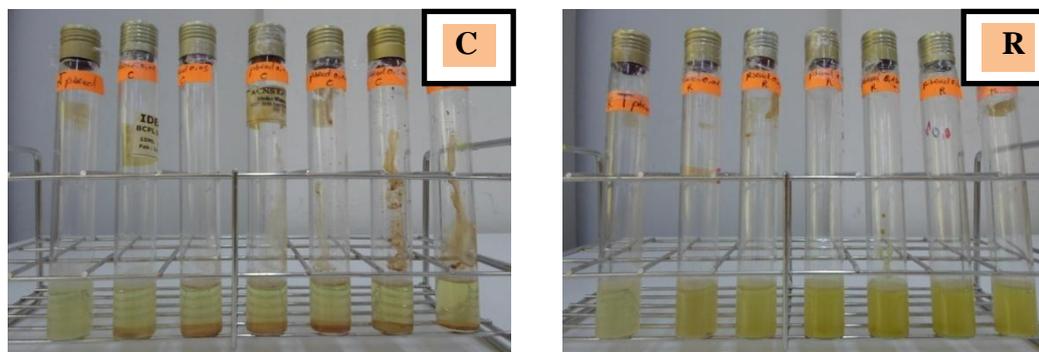
**Figure 45 :** Réponse de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 aux extraits testés ( R : *Rosmarinus officinalis* ; C : *Cinnamomum zeylanicum* )



**Figure 46 :** Aromatogramme du *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (1 : 250mg /ml, 2 : 200mg /ml, 3 : 150mg /ml, 4: 100mg /ml, 5: 50mg /ml, 6 :10mg /ml) ( R : *Rosmarinus officinalis* ; C : *Cinnamomum zeylanicum* )

### ✚ Activité antibactérienne en milieu liquide

La totalité des tubes composant la série de dilution en milieu liquide sont trouble dans les deux cas du *Rosmarinus officinalis* et *Cinnamomum zeylanicum* (fig.47).



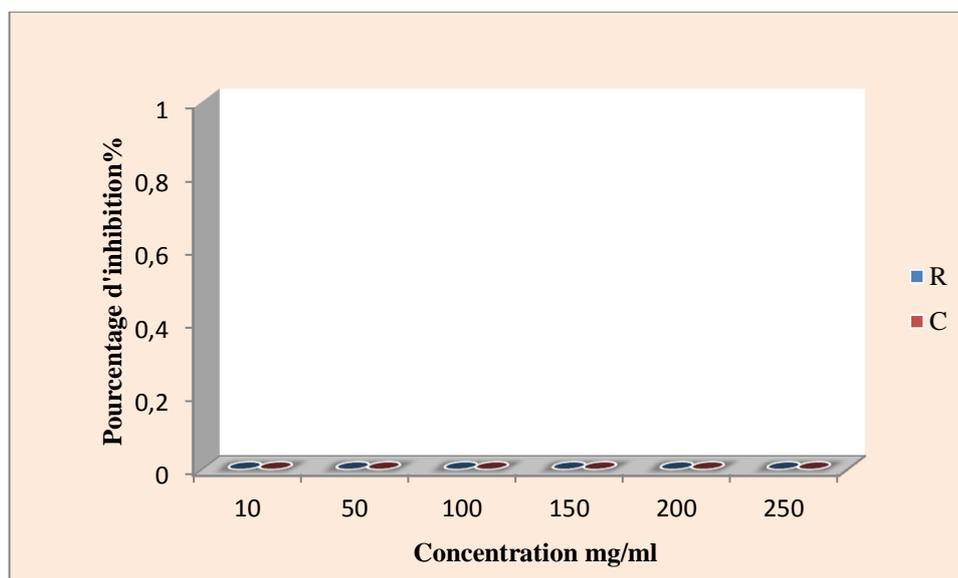
**Figure 47 :** Activité antibactérienne en milieu liquide (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ( **R** : *Rosmarinus officinalis* ; **C** : *Cinnamomum zeylanicum* )

### ✚ Pourcentage d'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Le calcul des pourcentages d'inhibition de la souche vis-à-vis des deux extraits a donné des valeurs nulles reflétant la résistance de l'espèce.

**Tableau 13:** Pourcentage d'inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

| plantes                       | Concentration mg/ml |    |     |     |     |     |
|-------------------------------|---------------------|----|-----|-----|-----|-----|
|                               | 10                  | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> | 0                   | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   |
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i>  | 0                   | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   |



**Figure 48 :** Pourcentage d'inhibition de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Les résultats révèlent des réponses variables en fonction des souches, de l'extrait et selon sa concentration.

La différence existait entre l'effet antibactérien des deux plantes est reliée probablement à leurs compositions phytochimiques variables, signalant toute fois la présence des alcaloïdes désignés comme élément toxiques chez *Cinnamomum zeylanicum* en comparaison avec le romarin en plus de l'instabilité des constituants actif de l'extrait, et l'insuffisance des doses choisis.

La majorité des travaux réalisés sur la *Cinnamomum zeylanicum* portent sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites par hydrodistillation.

Les travaux de **Benzeggouta Naïrouz (2005)** sur les huiles essentielles de la cannelle montrent que ces composant ont un effet contre l'espèce d'*Escherichia coli* avec par un diamètre d'inhibition de 16,5mm et un diamètre de 30,66mm pour l'espèce *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Tandis que, *Pseudomonas aeruginosa* représente la plus faible zone d'inhibition (12,83mm).

Par ailleurs, plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) (**Koné et al., 2004; Hayouni et al., 2007 ; Turkmen et al., 2007 ; Shan et al., 2007 ; Falleh et al., 2008**), ceci peut être attribuer à la différence dans

les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle (la membrane externe), qui se compose de phospholipide, de protéine et de lipopolysaccharide, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Néanmoins, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da.

Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram (-) a été rapportée, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent déranger l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane, telle que les basses valeurs du pH et les concentrations accrues en NaCl (**Georgantelis *et al.*, 2007**).

# *Conclusion*

---

*Conclusion*



### Conclusion et perspectives

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

L'étude phytochimique réalisée montre que les deux plantes sélectionnées sont riches en flavonoïdes, saponosides, tanins et mucilages, notons en effet la présence des alcaloïdes uniquement chez la cannelle.

Les rendements des deux plantes après extraction méthanolique et lyophilisation sont variables, cependant le rendement le plus important est signalé dans la *Cinnamomum zeylanicum* (12,344%) par rapport au romarin (6,072%).

L'analyse de la chromatographie sur couche mince révèle la présence de l'acide gallique et la quercétine dans les deux plantes.

Le dosage quantitatif des polyphénols et des flavonoïdes montre que l'extrait méthanolique du romarin est plus riche en ces composés que l'extrait de la cannelle.

L'antibiogramme effectué avec les antibiotiques choisis révèle une sensibilité et/ou une résistance variable en fonction des souches, signalant toutefois la résistance marquée de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Attribuée à différents mécanismes chromosomiques et/ou plasmidiques.

L'effet des extraits testés sur les 5 souches bactériennes sélectionnées : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

employant différentes méthodes semble actif vis-à-vis de ces bactéries à différentes concentrations, notons que le romarin exerce une action importante sur les bactéries Gram<sup>+</sup> par rapport à la cannelle, cette dernière semble avoir un effet puissant sur la souche *E.coli*.

Par ailleurs, les deux extraits restent inactifs vis-à-vis de la bactérie multi-résistance de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.

Les résultats de l'activité antibactérienne en milieu liquide montrent que l'extrait méthanolique du *Cinnamomum zeylanicum* a une action inhibitrice des souches *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 4330, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 à des concentrations respectives équivalentes à 10, 100, 100, 100mg/ml. Une CMB a pu être déterminée à des concentrations  $\geq 200$ mg/ml pour les espèces *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

D'après la bibliographie ces deux valeurs de CMB sont supérieures aux valeurs de la CMI correspondantes, donc le rapport CMB/CMI est supérieur à 20 à cet effet on peut pas prononcer une action bactéricide mais réellement c'est une action bactériostatique.

Notre travail reste préliminaire et les deux extraits constituent un réservoir très intéressent pour des recherches ultérieures et il serait utile de :

- Tester les huiles essentielles de ces deux plantes sur la flore microbienne (champignons, virus et parasite).
- Développer des lotions à base de ces plantes.
- Isolement et caractérisation des composés actifs dans les deux extraits par des méthodes plus spécifiques.
- Faire des collectes à partir des différents endroits du territoire Algérien.
- Faire des comparaisons sur la composition chimique et l'effet antimicrobien des espèces de la même famille et de la même région.

# *Résumé*



## Résumé

Ce travail porte sur l'étude de la composition chimique et l'effet antibactérien des extraits de deux plantes médicinales.

Le screening phytochimique montre la présence des flavonoïdes, des saponosides, des tanins et des mucilages chez les deux plantes sélectionnées. En revanche les alcaloïdes ont été rencontrés uniquement chez la *Cinnamomum zeylanicum*.

Les deux plantes *Rosmarinus officinalis* et *Cinnamomum zeylanicum* après extraction alcoolique et lyophilisation présentent des rendements respectifs de 6,072% et 12,344%.

L'analyse de la chromatographie sur couche mince révèle la présence de l'acide gallique et de la quercétine dans les deux extraits.

Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes révèle que l'extrait méthanolique du *Rosmarinus officinalis* est plus riche en ces composants que l'extrait de la *Cinnamomum zeylanicum*.

Les tests de l'activité antibactérienne des extraits végétaux sur les 5 souches de référence montrent un effet positif des deux extraits sur les espèces *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Pour *E.coli* uniquement la cannelle se montre puissante à des concentrations supérieures à 100mg/ml.

Concernant l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, une multi-résistance est relevée avec les extraits naturels et les molécules de synthèse.

Et enfin une CMI est rencontrée chez *Bacillus cereus* (10mg/ml) et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (100mg/ml) suivi d'une CMB à des concentrations plus élevées dans le cas de la cannelle.

**Mots clés** : screening phytochimique; activité antibactérienne; *Cinnamomum zeylanicum* ; *Rosmarinus officinalis*; CMI; CMB.

---

## **Abstract**

This work focuses on the study of the chemical composition and the antibacterial effect of the extracts of two medicinal plants.

The phytochemical screening showed the presence of flavonoids, saponins, tannins and mucilage in both plants selected. In revenge alkaloids were encountered only in the *Cinnamomum zeylanicum*.

Both plants *Cinnamomum zeylanicum* and *Rosmarinus officinalis* after alcoholic extraction and lyophilization have respective yields of 6.072% and 12.344%.

Analysis of thin layer chromatography reveals the presence of gallic acid and quercetin in both extracts.

The dose of polyphenols and flavonoids reveals that the methanol extract of *Rosmarinus officinalis* is richer in these components that extract the *Cinnamomum zeylanicum*.

The tests of antibacterial activity of plant extracts on 5 strains of reference show a positive effect of the two plants on *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 species . For *E.coli* only Cinnamon shows effect at higher concentrations (100mg/ml).

Concerning *Pseudomonas aeruginosa*, multidrug resistance is raised with natural extracts and synthetic molecules.

And finally a CMI is encountered in *Bacillus cereus* (10mg/ml) and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (100mg/ml) followed by CMB at higher concentration in the case of the Cinnamon.

Keywords: Phytochemical screening; antibacterial activity; *Cinnamomum zeylanicum*; *Rosmarinus officinalis* ; MIC; MBC.

---

## ملخص

يرتكز هذا العمل على دراسة التركيب الكيميائي لمستخلص نبتتين طبيبتين إكليل الجبل والقرفة وتأثيرهما المضاد للبكتيريا .

أظهر الفحص الكيميائي النباتي وجود مركبات الفلافونويد، الصابونين ، العفص والصمغ في كل من النبتتين ، أما الفلويديات فقط في القرفة وبعد إستخلاص للمركبات الكحولية لكل من القرفة وإكليل الجبل وتجفيفهما سجل مردود 12.334% و6.072% على التوالي .

أبان التحليل الكروماتوغرافي على طبقة رقيقة عن وجود كل من حمض الغال و الكيرسيتين في كل من المستخلصات .

كشفت تقدير كمية البوليفينول و الفلافونويد على ثراء مستخلص إكليل الجبل المخزنية بالبوليفينول و الفلافونويد مقارنة بمستخلص القرفة .

كشفت إختبارات النشاط المضاد للبكتيريا بواسطة المستخلصات النباتية على خمسة سلالات مرجعية عن الأثر الإيجابي على الأنواع *Bacillus cereus* , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 و *Escherichia coli* بالنسبة للقرفة فقط بدءا من التركيز 100 ملغ/مل .

أما بشأن أنواع *Pseudomonas aeruginosa* فهي مقاومة للأدوية المتعددة مع المستخلصات الطبيعية من الجزيئات الإصطناعية .

وأخيرا أدنى تركيز مثبت وجد عند *Bacillus cereus* (10ملغ/مل ) وفي *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (100ملغ/مل) يليه أدنى تركيز مبيد للجراثيم في أعلى تركيز في حالة القرفة.

**الكلمات المفتاحية :** الفحص الكيميائي النباتي ، النشاط المضاد للبكتيريا ، قرفة ، إكليل الجبل المخزنية، أدنى تركيز مثبت، أدنى تركيز مبيد للجراثيم .

# *Références Bibliographiques*

---

*Références Bibliographiques*



---

*Références Bibliographiques*



- **Abdel-Hameed E.S., (2009).** Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chem.* 114:1271-1277.
  - **Al-Habori M et Raman A., (1998).** antidiabetic and hypocholesterolaemic effect of Fenugreek. *Phytotherapy Research.* 12: 233-242.
  - **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.
  - **Amlan K., Patra J.S., (2010).** A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry.* 71 : 1198–1222.
  - **Arnold N., Valentini G., Bellomaria B., Laouer H., (1997).** Comparative study of the essential oils from Rosmarinus eriocalyx Jordan & Fourr. from Algeria and R. officinalis L. *from other countries. J.essent.Oil Res.* 9: 167-175.
  - **Arslan D, Musa ozcan M., (2007).** Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and colour characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management.* (in press).
  - **Atik bekkara F., Bousmaha L., Taleb bendiab S.A., Boti J.B., Casanova J., (2007).** Composition chimique de l'huile essentielle de Rosmarinus officinalis L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé.* 7: 6-11.
  - **Bahorun T., (1996).** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural resarch council, Réduit , Mauritius : pp 83-94.
  - **Benzeggouta Naïrouz., (2005).** Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments, Thèse pour l'Obtention du Diplôme de Magister en Pharmacochimie, Université Mentouri de Constantine : pp110.
  - **Billerbeck V.G., roques C., Vanière P., (2002).** Activité antibactérienne et antifongique de produit à base d'huiles essentielles. *Hygiènes.* 3(10) : 248-251.
  - **Booth N.L., N. Dejan., B. Richard., E. Stacie., (2004).** *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 76: 511-516.
-

- **Boullard B., (2001).** Plantes médicinales du monde réalités et croyances. ESTEM (Ed) Paris : pp 660.
  - **Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentations Lavoisier.
  - **Bruneton J., (1998).** Pharmacognosie (Phytochimie, Plantes médicinales), 3eme Edition, Paris, France.
  - **Cerf O., Carpentier B. and Sanders P., (2010).** Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: "resistance" has different meanings. *Int J Food Microbiol.* 136: 247-254.
  - **Clermont-Beaugiraud S., (1968) :** Chromatographie sur couche mince des oses et oligosaccharides. *Chemistry and Materials Science.* 16, N1 (4) : 92-101.
  - **Cowan MM., (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12: 564-582.
  - **Delille L., (2007).** les plantes médicinales d'Algérie. Édition BERTI. Alger : pp122.
  - **DOHOU N et al., (2003).** Screening Phytochimique d' une Endémique IBÉRO-MAROCAINE : Thymelaea lythroides; Bull. Soc. *Pharm. Bordeaux.* 142 : 61 -78.
  - **Duval J., Soussy C.J., (1990).** Antibiothérapie. Masson, 4ème édition.
  - **Eberhard T, Robert A, Annelise L.,(2005).** Plantes aromatiques, épice aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc. Lavoisier. Paris France.
  - **Edeoga1 H.O., Okwu D. E. et Mbaebie B.O., (2005).** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology .* 4 (7) : 685-68.
  - **Encyclopédie des Plantes Médicinales., (2001).** 2<sup>ème</sup> édition Larousse / VUEF : pp 84.
  - **Erkan N., Ayranci G., Ayranci E., (2008).** Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* 110: 76-82.
  - **Essawi T. et srou M., (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity, *Ethnooharm.* 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.
  - **Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z., (1986).** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*. 64 (2) : 159-164.
  - **Fecka I., Turek S., (2008).** Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chem*. 108: 1039-1053.
  - **Fontaine M., Cadoré J.L., (1995).** Vade-mecum du vétérinaire. Vigot, 16ème édition.
  - **Garnero J., (1991).** les huiles essentielles, leurs obtention, leurs composition, leur analyse et leur normalisation. Editions techniques-encyclopidie des médecines naturelles.(paris, France), Phytothérapie, Aromathérapie, C-2 : pp 2-20.
  - **Georgé S., Brat P., Alter P et Amiot J.M., (2005).** Rapid determination of polyphénols and Vitamin C in plant-derived products. *J. Agr. Food Chem*. 53 : 1370-1373.
  - **Goetz P., (2005).** Phytothérapie. 6 : 260-264.
  - **Gonzalez-Trujano M.E., Pena E.I., Martinez A.L., Moreno J., Guevara-Fefer P., Deciga Campos M., Lopez-Munoz F.J., (2007).** Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol*. 111: 476-482.
  - **Goossens H., Guillemot D., Ferech M., Schlemmer B., Costers M., van Breda M., Baker L.J., Cars O Davey P.G., (2006).** National campaigns to improve antibiotic use. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. 62: 373-379.
  - **Gortzi O., Lalas S., Chinou I., Tsaknis J., (2007).** Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Origanum dictamnus* Extracts before and after Encapsulation in Liposomes. *Molecules*. 12: 932-945.
  - **Guignard J L., (1994).** Abrégé botanique, 9<sup>ème</sup> édition. Édition Masson, Paris : pp 204.
  - **Hans W. K., (2007).** 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition : pp 6-7.
-

- **Hart P.E ; Russel E.Jr & Remington J.S., (1969).** The compromised host and infection II, Deep fungal infection *J. Infect.Dis.* 120 : 169-176.
  - **Heinrich M., Kufer J Leonti M Pardo-de-Santayana M., (2006).** Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol.* 107: 157-160.
  - **Hill R.B.Jr., Rowlands D.J Jr & Rifkind D., (1964).** Infectious pulmonary disease in patient receiving immunosuppressive therapy for organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* 271 : 1021-1028.
  - **Ho S.C., Tsai T.H., Tsai P.J., Lin C.C., (2008).** Protective capacities of certain spices against peroxynitrite-mediated biomolecular damage. *Food and Chemical Toxicology.* 46: 920-928.
  - **Hofmann L., (2003).** Thèse de doctorat : Etude de métabolisme des phénylpropanoïdes, Strasbourg, France.
  - **Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deelesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A., ( 2001).** Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse : pp10-12.
  - **Iserin., (2001).** Larousse Encyclopédie des plantes médicinales. Ed Larousse : pp 10-335.
  - **Iserin P., Masson M et Restellini J P., (2007).** Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins .Ed Larousse : pp14.
  - **Judd Walter S., Campbell Christopher S., Kellogg Elizabeth A., Stevens Peter., (2002).** Botanique Systématique, une perspective phylogénétique. Edition De Boeck Université : pp 84-87 , pp 396-399.
  - **Kamra D.N., (2005).** Rumen microbial ecosystem. *Current Science.* 89 (1) : 124–135.
  - **Kamra D.N., Agarwal N., Chaudhary L.C., ( 2006).** Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series.* 1293 : 156 163.
  - **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.
-

- **Kohanski M.A., Dwyer D.J. and Collins J.J., (2010).** How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 8: 423-435.
  - **Koné W.M., Kamanzi Atindehou K., Terreaux C., Hostettmann K., Traoré D., Dosso M., (2004).** Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 93: 43-49.
  - **Leclerc H., Gaillard J-L., Simonet M., (1995).** Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs, Paris.
  - **Leclercq R., (2002).** Résistance des Staphylocoques aux antibiotiques. *Ann Fr Anesth Reanim.* 21: 375-383.
  - **Leung Albert Y., (1980).** Encyclopedia of common natural ingredients used in food drugs and cosmetics. Wiley-Interscience Publication New York.
  - **Levy SB., Marshall B., (2004).** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10: 122-129.
  - **Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F et Jiang Y., (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Foodchem.* 102 : 771-776.
  - **Maisuthisakul P., Pasuk S., Ritthiruangdej P., (2008).** Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J Food Composition and Analysis.* 21 :229-240.
  - **Martel J.L., (1996).** Critères de choix d'un antibiotique. Epidémiologie et surveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes chez l'animal. - *EPIDEM. SANTE. ANIM.* 29 : 107-120.
  - **Mbodj N., (2003).** Etude de l'Activité antidiabétique des extraits acetoniques, méthanolique et hexaniques de *vernonia colorata* (willd/drake) composées chez des rats wistar, Thèse de docteur en pharmacie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar : pp 53.
  - **Millogo H., Guisson I. P., Nacoulma O. et Traore A. S., (2005).** Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire –Lyon.
  - **Mogenet L., Fedida D., (1998).** Rational antibiotherapy in poultry farming. - Edition : CEVA.
-

- **Moreira M.R., Ponce A.G., Del Valle C.E., Roura S.I., (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*. 38: 565-570.
  - **Nordmann P., Carrer A., (2010).** Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Arch Pediatr*. 17: S154-62.
  - **Normak H.B., Normak S., (2002).** Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med*. 252: 91-106.
  - **Ody Penelope., (1995).** Les Plantes Médicinales, Encyclopédie pratique. Sélection Reader's Digest.
  - **Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto K., Yagi A., (1994).** Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*. 37: 1463-1466.
  - **Patrick B; Jean-Louis G. & Michel S., (1988).** Les bactéries des infections humaines. Bactériologie. Med. Sciences. Flammarion. 1<sup>ère</sup> édition.
  - **Pelt J.-M.,(1980).** Les drogues. Leur histoire, leurs effets, Ed. Doin.
  - **Peng Y., Yuan J., Liu F., Ye J., (2005).** Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39: 431-437.
  - **Persidis A., (1999).** Antibacterial and antifungal drug discovery. *Nature Biotechnol*. 17 : 1141-1142.
  - **Podsedek A., (2007).** Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT*. 40:1-11.
  - **Poletti A., (1988).** Fleurs et plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> Edition. Delachaux & Niestlé (Ed). Paris : pp 222.
  - **Porter N., (2001).** Essential oils and their production. *Crop & Food Research*: pp 39.
  - **Prescott L M., Harley J P and Klein D A ., (2003).** La chimiothérapie antimicrobienne. In: *Microbiologie*, 2<sup>ème</sup> édition (Bruxelles) : pp 806-811.
  - **Quezel P., Santa S., (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. C.N.R.S. (Ed). Paris : pp 565.
-

- **R. Inatani N. Nakatani H. Fuwa., (1983).** *Agric.Biol. Chem.* 47 :521-528.
  - **Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A., Rezaei M.B., (2008).** Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International J of Food Microbiology.*122:135-139.
  - **Richard H., Loo A., (1992).** Composition des extraits d'épices et herbes aromatiques. In Richard H (coordonnateur) *Epice et Aromates. Tec et Doc – Lavoisier, apria.*
  - **Rizk A.M., (1982).** Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterrapia.* 52 (2): 35-42.
  - **ROUX D., CATIER O.,(2007).** Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3<sup>ème</sup> édition, Wolters Kluwer : pp 141.
  - **Scientific correspondence., (2003).** Broad spectrum antimycrotic drug for the treatment of ringworm infection in human beings. 85 (1): 30-34.
  - **Secrets et Vertus des Plantes Médicinales., 1985** 2<sup>ème</sup> édition Sélection du Reader's Digest : pp 352.
  - **SFM., (2013).** Comite de l'antibiogramme de la societe francaise de microbiologie. Recommandations : pp 60
  - **Sekou Dembele. M., (2010).** Evaluation de la prescription d'antibiotique dans le service de chirurgie Orthopedique et traumatologique de l'hôpital Gabriel Toure, Thèse pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie, Université de Bamako : pp 71.
  - **Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D., Corke H., (2007).** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J Food Microbiology.* 117: 112-119.
  - **Smallfield B., (2001).** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research.* Number : pp 45, 4.
  - **Stefanovits-Banyai, E., Tulok, M.H., Hegedus, A., Renner, C., Szollosi Varga, I., (2003).** Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones+. *Acta Biologica Szegediensis.* 47:111-113.
-

- **Storm D R., Rosenthal KS and Swanson P E., (1977).** Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annual Review of Biochemistry*. 46: 723-763.
  - **Strang C., (2006).** Larousse médical. Ed Larousse.
  - **Svoboda K.P. et Hampson J.B., (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Plants Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.
  - **Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El-Elimat T., (2007).** *Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chem.* (in press).
  - **Tenover F C., (2006).** Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*. 119 (6): 3-10.
  - **Tortora G J., Funke B R and Case C L., (2003).** Introduction à la Microbiologie. Editions du Renouveau Pédagogique. France.
  - **Tsai P., Tsai T., Ho S., (2007).** In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chem.* (in press).
  - **Turkmen N., Velioglu Y. S., Sari F., Polat G., (2007).** Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. 12: 484-496.
  - **Van Bambeke F., Tulkens P. (2008).** Pharmacologie et Pharmacothérapie – Anti-infectieuse, Syllabus national belge de pharmacologie : pp 212.
  - **Vernon F., Richard H., (1976).** Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles : 2. In Série synthèses bibliographiques N° 10 – Centre de documentation internationale des industries utilisatrices de produits agricoles. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
  - **Yagupsky P., (2006).** Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25: 974-976.
-

## **WEBOGRAPHIE**

- (1)-[www.bacteriologie.net](http://www.bacteriologie.net) . Mode d'action des antibiotiques. **Consulter le (15.03.2014)**
- (2)- Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (raisin).  
Surveillance des bactéries multi résistantes dans les établissements de santé en France  
Réseau BMR-Raisin Résultats 2007.2009 Disponible sur: <http://www.invs.sante.fr/raisin/>
- (3)- <http://www.studyblue.com/notes/note/n/field-day-2/deck/6273371>. **Consulter le (02.03.2014)**
- (4)- <http://nature.jardin.free.fr>. Description du Cannelier de Ceylan, *Cinnamomum zeylanicum* , date de consultation : décembre 2005.
- (5)-[http://fr.wikipedia.org/wiki/Migrations\\_juives\\_%C3%A0\\_Madagascar](http://fr.wikipedia.org/wiki/Migrations_juives_%C3%A0_Madagascar). **Consulter le (02.03.2014)**
- (6)-[http://ez2plant.com/product/\\_\\_template=iphone/lid=31929269](http://ez2plant.com/product/__template=iphone/lid=31929269). **Consulter le (02.03.2014)**
-

# ANNEX

---

*Annexes*



## **Annexe 1**

### **1. Matériel screening phytochimique**

#### **Les produits Chimique et les réactifs :**

- Méthanol, acétone, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, HCl, NH<sub>4</sub>OH, Reactif de Fehling, Ethanol.
- Réactif de Folin, Carbonate de sodium, acide gallique, AlCl<sub>3</sub>, quercétine, acide ascorbique,
- Acétate d'éthyle, eau distillée, ninhydrine.

#### **Les équipements:**

- Rotavapor R-215 (Büchi).
- Lyophilisateur
- Spectrophotomètre (JENWAY 6305)
- Cuve de chromatographie.
- Balance (BB310) et (Sartorius)
- balance de précision (Explorer<sup>®</sup> Pro)
- Verrerie.
- Eppendorf
- Tubes capillaires
- Agitateur Vortex (snijders 34524)

### **Matériel bactériologique**

#### **Produit utilisés**

- Méthanol, L'eau physiologique, BaCl<sub>2</sub>,
- Gélose Nutritive, Gélose de Mueller Hinton, Bouillant nutritif

#### **Les équipements:**

- Autoclave
  - Four Pasteur
  - Etuve
  - Verrerie
  - Réfrigérateur
-

## **Annexe 2**

### **1. Solutions préparées**

#### **1.1 Préparation de la solution 0.5 Mac Farland**

Cette solution représente le mélange d'une solution de  $\text{BaCl}_2$  à 1% et de l'acide sulfurique à 1%.

##### **Solution de $\text{BaCl}_2$ à 1%**

1g de  $\text{BaCl}_2$   $\longrightarrow$  100ml d'eau distillée

##### **Solution d' $\text{H}_2\text{SO}_4$ à 1%**

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

Prélever 0,5ml de la solution de  $\text{BaCl}_2$  et le déposer dans une fiole ou une éprouvette, Compléter à 100 ml avec du  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 1%. Il doit avoir une DO de 0,08 à 0,1 lue à 625nm.

Conserver cette solution dans un flacon ombré à température ordinaire.

#### **1.2. L'eau physiologique**

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

9g de NaCl pour 1litre d'eau distillée.

Après préparation, stériliser cette solution et la conserver à 4°C jusqu'à son utilisation.

### **2. Préparation des milieux de cultures**

#### **2.1 Gélose Nutritive**

Dissoudre 39g dans un litre d'eau distillée, autoclaver 15 à 121°C. Ensuite conserver dans un endroit frais en absence d'humidité.

#### **1.2. Gélose de Muller Hinton**

Gélose Muller Hinton (38 g) plus 1L d'eau distillée. porté à ébullition avec agitations jusqu'à la dissolution complète de la poudre. La solution a ensuite été stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 30 min.

---

### **1.3. Bouillon nutritif**

Mettre 20g du milieu nutritif déshydraté dans 1litre d'eau distillée ou déminéralisée. Agiter lentement jusqu'à dissolution complète. Répartir en tube ou en flacons, stériliser à l'autoclave.

Conserver au réfrigérateur pour une usage ultérieur.

---