

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DEL'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ 08 MAI 1945 GUELMA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire : Biologie moléculaire des procaryotes

Thème

Détermination de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

Présenté par : BERKANI Imène

HAMDI Hanene

RAZKALLAH Nadia

Devant le jury composé de :

Présidente : M^{me}. KHALLEF M

Examineurs : Mr. ROUABHIA K

Encadrant : Mlle. ZIDI S (Ma)

JUIN 2013

Remerciement

Louange à Dieu, Seigneur de l'univers, le tout puissant qui m'a inspiré et comblé de bienfaits. Je Vous rends grâce.

L'occasion m'est ici offerte d'adresser mes sincères remerciements aux nombreuses personnes qui m'ont prêté leurs précieux concours pour élaborer et parachever ce mémoire, tout particulièrement à:

- Mlle ZIDI sorour, Adjointe Chef de Département de science de la nature et de la vie et science de la terre et de l'univers de l'université de Guelma, de m'avoir encadré, pour sa présence, son dévouement, sa rigueur, ses précieux conseils et ses encouragements au cours de l'élaboration de ce mémoire.

- Je remercie également Mme KHELLAF.M qui a fait l'honneur d'avoir accepté la présidence du jury de thèse.

- Je remercie très sincèrement Mr. ROUABHIYA.K pour le temps qu'il me consacre en examinant ce mémoire.

- Mes remerciements vont aussi à Monsieur Zallagui Amar– maitre de conférence de l'Université d'Oum El Bouaghi –, qui m'a aidé pour ses précieux orientations et conseils.

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

BERKANI Imène

HAMDI Hanene

RAZKALLAH Nadia

Dédicaces

Je Dédie ce modeste travail à :

L'âme de mon père que dieu le bénisse.

*A ma perle rare, ma mère pour son endurance et ces
sacrifices sans limites*

*Mon frère et sa femme et mes sœurs et leurs maris, en
reconnaissance de leur affection toujours constante*

*A mes nièces et mes neveux : Wissal, Walla, Ritèje, Adem
tym, khaled, rymes et meyssem.*

Tous mes proches

Mes amis

Tous ce qui j'aime

Mes camarades de promotion

Tous mes enseignants

Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire

Imène

Dédicac

*C'est avec un très grand homeur que je dédie ce
modeste travail aux personnes les plus chères au
monde mes chers parents qui m'ont permis de
continuer mes études dans les meilleures conditions et
qui m'ont appris a jamais baissé les bras.*

- *A ma grand-mère qui m'a toujours aimé et comblé
par ses bénédictions.*
- *A mes très chers frères Mohamed et Khaled.*
 - *A ma très chère sœur Amel*
- *Mes chers oncles, tantes, cousins et cousines.*
- *Ainsi que pour tous mes amis et collègues.*

Hanene

Dédicace

*Je remercie Allah de m'avoir donné la force et le
courage pour
pouvoir réaliser ce modeste travail.*

*A mes parents, de toujours croire en moi et pour
ce que vous faites au quotidien pour moi.*

*A mes sœurs et mes frères et toutes mes cousines
et surtout Houria qui était toujours présente pour
moi.*

A mon neveu : Djasser

A mon cher mari : Hatem

A ma seconde famille : Negri

*A tous de m'apporter chacun à votre manière
quelque chose dans ma vie.*

*A tous ceux que je vais oublier, je m'en excuse et
je vous remercie aussi.*

Nadia

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Glossaire

Introduction

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : les bactéries et les antibiotiques

I- le monde microbien.....	01
I-1-Historique.....	01
I-2-Morphologie et structure de la cellule bactérienne.....	01
I-2-1-Dimensions.....	02
I-2-2-Forme.....	02
I-2-3- La paroi.....	02
I-2-4- La membrane plasmique.....	03
I-2-5- Le cytoplasme.....	04
I-3-Les bactéries a Gram négatif	04
I-3-1- <i>Escherichia coli</i>	04
I-3-2- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	06
I-4-Les bactéries Gram positif	07
I-4-1- <i>Staphylococcus aureus</i>	07
II- l'antibiotique.....	09
II-1-Les antibiotique.....	09
II-1-1-définition des antibiotiques.....	09
II-1-2-critère de classification des antibiotiques.....	09
II-1-3-la CMI.....	10
II-1-4-LaCMB.....	10
II-1-5-mode d'action des antibiotiques.....	12
II-1-6-synergie et l'antagonisme entre les ATB.....	13
II-1-7-la résistance bactérienne aux ATB.....	13
III-2-l'antibiogramme méthode de diffusion.....	13

Chapitre 02 : phytothérapie et les huiles essentielles

I-phytothérapie.....	16
I-1-historique phytothérapie.....	16
I-2-définition de phytothérapie.....	16
I-3-les plantes médicinales.....	17
I-3-1 la partie utilise en phytothérapie.....	17
I-3-2-la conservation de plante médicinales.....	18
II-les huiles essentielles.....	19
II-1-définition des HE.....	19
II-2-réparation et accumulation.....	19
II-3-Classification des HE.....	20
II-4-extraction des HE.....	20
II-4-1-L'hydrodistillation.....	20
II-4-2-L'entraînement à la vapeur d'eau.....	21
II-4-3-L'hydrodiffusion.....	22
II-4-4-L'expression à froid	23
II-5-les propriétés physico-chimiques.....	23
II-6-biochimie des HE.....	24
II-7-propriété biologique et pharmaceutiques d'HE.....	24
II-7-1-Les propriétés anti-infectieuses et de défense de l'organisme.....	24
II-7.2-Les propriétés anti-inflammatoires.....	25
II-7-3-Les propriétés cicatrisantes.....	25
II-7-4-Les propriétés à visée neurotrophe.....	26

Chapitre 03 : Généralité sur « *Rosmarinus officinalis* »

I - Généralité sur la plante « <i>Rosmarinus officinalis</i> ».....	27
I-1-Définition.....	27
I-2-historique.....	27
I-3- Habitat.....	28

I-4-classification.....	28
I-5-description.....	29
1-6-composition.....	29
I-7- Les propriétés pharmaceutiques et l'emploi	30
I-8-Indication usuelles.....	31
 La partie expérimentale	
I-Matériels.....	32
I.1-Matériel végétal.....	32
I.2- microorganismes utilisés.....	32
I.3- milieux de culture	32
II-Méthodes.....	33
II.1- les tests phytochimiques.....	33
II-1-1-les saponosides.....	33
II-1-2-les alcaloïdes.....	33
II-1-3-les tanins.....	33
I-1-4-Stérols et terpènes.....	33
II-1-5-les flavonoïdes.....	34
II-1-6-Mucilage.....	34
II-2-Protocole d'extraction	34
II-2-1-Calcul de rendement.....	35
II-2-2- Conservation de l'huile essentielle obtenue.....	35
II-3-Les tests de l'activité antibactérienne.....	36
II-3-1-Préparation de l'inoculum.....	36
II-3-2-L'antibiogramme.....	36
III-3-3-L'aromatogramme.....	37
 III-Résultats et discussion	
III-1-Résultats des tests phytochimiques.....	39

III-2-Rendement en huile essentielle.....	42
III-3- Résultats de l'antibiogramme.....	42
III-4- Résultats de L'aromatogramme.....	43
III-5-Discussion.....	45

Conclusion

Perspectives

Références bibliographiques

Annexe

Liste des Figures

Figure	Titre	page
01	Morphologie et structure de la cellule bactérienne	01
02	<i>Escherichia coli</i>	05
03	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	06
04	<i>Staphylococcus aureus</i>	07
05	la Détermination de la CMB	11
06	Mode d'action des antibiotiques	12
07	Les concentrations et les diamètres critiques des antibiotiques d'activité médicale (recommandations du CA-SFM)	14
08	Schéma du montage de l'hydrodistillation	21
09	la méthode d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau	22
10	schéma représentatif de la méthodes d'hydrodiffusion	22
11	<i>Rosmarinus officinalis</i>	28
12	montage de l'hydrodistillation	35
13	Illustration de la méthode d'aromatogramme	38
14	Test d'identification des saponosides	39
15	Test d'identification des alcaloïdes.	40
16	Test d'identification des tanins.	40
17	Test d'identification des stérols et terpènes	40
18	Test d'identification des flavonoïdes	41
19	Test d'identification des Mucilages	41

20	Le profil de résistance aux antibiotiques des différentes souches étudiées	43
21	L'effet antibactérien de l'huile essentielle du romarain.	46

Liste des tableaux

tableaux	Titre	page
01	Valeurs critiques des zones d'inhibition dues aux antibiotiques (CASFM, 2009)	37
02	Les principes actifs identifiés dans le romarin	39
03	Sensibilité et résistance des souches aux antibiotiques (La zone d'inhibition)	43
04	La sensibilité des souches étudiées à l'huile essentielle de romarin.	44

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ATB : Antibiotique

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CMB : concentration minimale bactéricide

CMI : concentration minimale inhibitrice

D : diamètres d'inhibition

E. coli : *Escherichia coli*

GN : Gélose Nutritive

HE : Huile Essentielle

J : Jour

kg : Kilogramme

MH : Muller Hinton

mg : Milligramme

ml : Millilitre

µl : Microlitre

mm : Millimètre

PH : Potentiel d'hydrogène

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

Glossaire

Agar : polymère de l'agarose qui rentre dans la composition du milieu de culture solide, inhibe la croissance de nombreuses moisissures.

Alzheimer : la maladie d'Alzheimer est une démence neurodégénérative à prédominance corticale qui touche en premier lieu les fonctions cognitives et se répercute sur le comportement et l'adaptation sociale des patients.

Antibactérienne : substance utilisée pour lutter contre les bactéries.

Antifongique : se dit d'un médicament qui agit contre les infections provoqués par les champignons ou les levures parasites.

Anti-inflammatoire : qui fait dégonfler et diminuer l'irritation.

Antispasmodique : se dit d'un médicament qui calme les spasmes.

Antiseptique : se dit d'un médicament propre à prévenir les infections.

Antiviral : une molécule destinée à agir contre la multiplication d'un virus. Il est donc administré en cas d'infection virale.

Arbrisseau : plante ligneuse a tiges ramifiées dès la base est en générale d'un mètre maximum.

Cellule sécrétrice : se rencontre dans l'épiderme et dans les tissus plus profonds des végétaux. Elle diffère des autres cellules par leur petite taille et par l'absence fréquente de cutine dans leur paroi.

Immunodépression : insuffisance des moyens de défense naturels de l'organisme, spécifiques ou non spécifiques.

Phytosanitaire : Ensemble des produits chimiques utilisés pour la protection des cultures. Ils servent à lutter contre les insectes parasites, les champignons parasites et les herbes indésirables. Les pesticides est l'autre nom donné aux produits phytosanitaires.

Pétale : partie de fleur située entre les sépales et les organes reproducteur. Les pétales composent la corolle .Ils sont fixés au calice par un onglet.

Poche sécrétrice : des formations anatomiques végétales qui reçoivent et accumulent l'huile essentielle élaborée par les cellules sécrétrices qui les bordent.

Pathovar : Dans le domaine de la pathologie végétale, certaines espèces de bactéries phytopathogènes sont subdivisées en pathovars. Le pathovar correspond à un classement de commodité, uniquement basé sur le symptôme et les caractéristiques de pathogénicité. Ce classement permet de différencier - à un niveau intraspécifique (au sein d'une même espèce) - certaines souches d'autres souches de la même espèce ou d'une sous-espèce en fonction des symptômes observés chez une ou plusieurs plantes hôtes.

Introduction

Les remèdes populaires destinés à lutter contre les différentes maladies, tiennent une large place dans le monde. Il est impossible d'éliminer l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales, malgré le développement des médicaments de synthèse. [01]

Les raisons qui ont mené à l'usage de ces plantes sont nombreuses. Elles sont d'abord d'un coût inférieur aux médicaments, et pourraient constituer une solution face à la résistance bactérienne et aux effets secondaires liés à l'usage des antibiotiques.

Les plantes médicinales représentent une nouvelle source de composés actifs. Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles.

En effet, l'évaluation des propriétés thérapeutiques des plantes médicinales, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales folkloriques. [02]

Les huiles essentielles sont des substances aromatisantes utilisées en industrie alimentaire, en cosmétique et comme agents antimicrobiens, en médecine populaire [1]. Différentes études récentes ont confirmé, *in vitro*, l'activité antimicrobienne de certaines huiles.

La flore algérienne contient un nombre illimité de plantes présentant des vertus thérapeutiques. Le *Rosmarinus Officinalis* (romarin) est une plante utilisée en médecine traditionnelle et dans l'industrie des parfums et des aliments. Il possède des propriétés anti-inflammatoires, antispasmodiques et une action stimulante sur le système nerveux. Cette plante est réputée également pour activer et faciliter les fonctions digestives. [3].

Notre travail est subdivisé en deux parties :

- Une partie bibliographique sur les plantes médicinales, la plante utilisée, les antibiotiques et les bactéries étudiées.
- Une partie expérimentale dans laquelle nous avons étudié l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis* obtenue par hydrodistillation sur des souches bactériennes référencées telles que (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et *Escherichia coli* ATCC 25922).

I-Le monde microbien

1- Historique

En 1673, Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723), fut le premier à observer les bactéries. Il décrivit leur différentes formes et il les appela "animalcules". Ce fut également le premier à décrire un globule rouge et les spermatozoïdes. Ses découvertes ne dépassèrent pas le stade descriptif et ce n'est que deux siècles plus tard, grâce aux travaux de Pasteur (1822-1895) et de Koch que naquit la Microbiologie [04].

Le terme "microbe" a été inventé par un chirurgien : Sédillot en 1878 pour désigner tous les organismes microscopiques, et celui de bactérie fut utilisé antérieurement par Cohn en 1887 [57].

Une des raisons majeures de l'étude des bactéries, est la lutte contre la maladie. Les bactéries sont la cause de quelques maladies graves ainsi que de multiples affections bénignes. La prévention et le contrôle de ces maladies dépendent en grande partie de l'effort des bactériologistes tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire ou en agriculture [05].

2-Morphologie et structure de la cellule bactérienne

Les procaryotes sont essentiellement représentés par les bactéries. Leurs cellules sont constituées d'un compartiment unique entouré d'une membrane plasmique, ne possédant pas de noyau bien défini et ayant une organisation interne simple (Figure 01) [07].

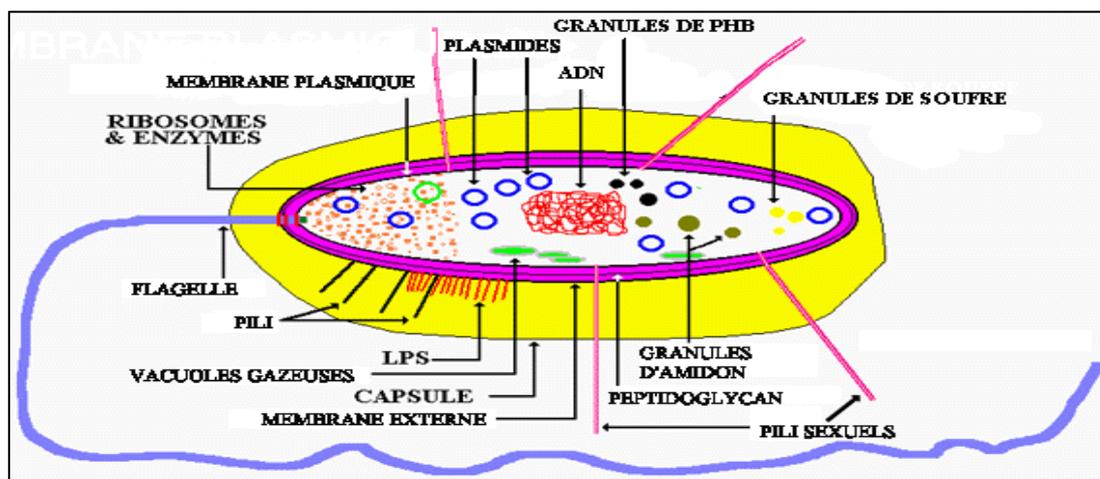


Figure 01 : Morphologie et structure de la cellule bactérienne[06].

2.1-Dimensions

Le microscope est nécessaire à l'étude des bactéries, puisque elles atteignent à peine une centaine de μm de longueur (entre 5 à 10 μm). Une goutte d'eau peut contenir plus d'un milliard de ces organismes. Les *Staphylocoques* et les *Streptocoques* qui sont des bactéries sphériques ont un diamètre variant entre 0,75 et 1,25 μm . Au plus fort grossissement du microscope optique (X 1000 à 1500), les Rickettsies et Chlamidies sont à peine visibles ce qui les classe parmi les plus petites bactéries [06].

2.2-Forme

Les cellules bactériennes individuelles sont sphériques, en forme de bâtonnet ou spiralées. Chacune de ces formes est importante pour décrire la morphologie d'une espèce.

Les bactéries en forme de petites sphères sont appelées des coques ou cocci. Les formes cylindriques droites, sont des bacilles ou bâtonnets. Les formes recourbées en virgule sont des vibrions. Les formes hélicoïdales sont des spirilles. Ces formes sont les plus caractéristiques, mais dans la nature, on trouve des intermédiaires de ces formes typiques comme les Coccobacilles [07].

2.3- La paroi

La paroi constitue l'enveloppe externe des bactéries. A l'exception des mycoplasmes, elle est présente chez toutes les bactéries dont elle assure la forme et la rigidité. Elle est aussi responsable de la protection physique de la membrane cytoplasmique sous-jacente.

L'originalité de la paroi des eubactéries réside dans la composition et la structure chimique du complexe macromoléculaire, appelé **peptidoglycane**, **muréine** ou **mucopeptide** qui est son composant principal. En plus du peptidoglycane, leur paroi contient d'autres constituants qui varient selon les espèces. Parmi ces constituants on note, le lipopolysaccharide qui est aussi un composé exclusif des bactéries.

- ❖ **La coloration de Gram** a permis de distinguer deux principaux groupes de bactéries répondant différemment aux mêmes colorants. Cette différence est due à leurs parois qui sont de structure et de composition différentes (en particulier à l'organisation du peptidoglycane) [08].

La paroi des bactéries **Gram positif** a une épaisseur de 20 à 80 nm. Elle est essentiellement composée de peptidoglycane, disposé en une vingtaine de couches

superposées, et parfois plus, représentant 30 à 70% de son poids sec . Elle est pauvre en lipides mais riche en constituant secondaires: en particulier les acides teichoïques qui sont liés par covalence au peptidoglycane. Ces polymères de ribitol phosphate ou de glycérol phosphate peuvent exister sous la forme de un ou de plusieurs types chez une même bactérie.

La paroi des bactéries à **Gram négatif** est à la fois plus fine et plus complexe. Elle est composée de deux éléments: le peptidoglycane et une membrane externe. Le peptidoglycane est présent généralement en une seule couche de 1 à 5nm d'épaisseur (une à trois couches chez *E. coli*) représentant moins de 10% du poids sec de la paroi. La membrane externe surmonte le peptidoglycane et comporte deux feuilletts plus ou moins liés au peptidoglycane selon les espèces. Cette membrane présente des caractères particuliers et une composition complexe de protéines, phospholipides et de lipopolysaccharides [09].

2.4- La membrane plasmique

Est une structure très mince (5 à 10 nm d'épaisseur). Elle entoure le cytoplasme et fait la limite avec le milieu extérieur. Elle permet le maintien d'un milieu interne dans un état constant. Elle est composée de protéines et de lipides en proportion variable selon le modèle en mosaïque des fluides.

- Les lipides amphipatiques : phospholipides (extrémités polaires) et extrémités hydrophobes ont tendance à s'associer formant une bicouche dans la membrane.

Absence de cholestérol (différence avec une cellule eucaryote).

- On trouve 2 types de protéines :

Extrinsèques : 20% des protéines membranaires

Intrinsèques :80% . Elles sont amphipatiques (une couche hydrophobe et une partie hydrophile) [10].

2.5- Le cytoplasme

Le cytoplasme contient un grand nombre de composés solubles de poids moléculaire variable, de l'ARN, et environ 20 000 ribosomes par cellule. Les ribosomes bactériens sont constitués de protéines et d'ARN ribosomal. Ils sont formés à partir de sous-unités 30S et 50S en ribosome 70S. Les ribosomes sont les organelles de la synthèse protéique. Dans le cytoplasme, on retrouve, de plus, des composés de réserve (dépôts de glycogène, métaphosphates polymérisés, lipides). Le cytoplasme peut contenir également des granules de carboxysomes(des réserves d'enzymes pour la fixation du CO₂) et des vacuoles gazeuses

ce qui permet aux bactéries de flotter à différentes profondeurs pour capter le maximum de lumière, d'O₂ et de nourriture [11].

Nb : d'autres composants de la bactérie peuvent être présents comme la capsule, les flagelles (mobilité), les fimbriae (fixation sur d'autres cellules) et les pilis sexuels. Enfin, certaines bactéries peuvent contenir des éléments d'ADN circulaire extrachromosomique ou d'ADN mobile (les plasmides) qui portent des informations génétiques spécifiques (exemple résistance à certains antibiotiques)[10].

3-Les bactéries Gram négatif

- **Espèce *Escherichia coli***

1-Définition

Escherichia coli est la bactérie la plus connue. Elle a été découverte en 1855 par le savant allemand Thomas. Elle est présente dans le tube digestif de l'Homme et des Mammifères. Bien que ne représentant pas la flore dominante, ce n'est pas une espèce typiquement pathogène. Ce sont des bacilles à Gram négatif, mobiles au moyen de flagelles péritriches, ou non mobiles; aérobies facultatifs, ce qui veut dire qu'ils se développent mieux en présence qu'en absence d'oxygène. Ils produisent une ou des catalases mais donne une réponse négative au test oxydase. Ils peuvent utiliser les nitrates pour effectuer une respiration nitrate, mais sans convertir les nitrates ni en azote, ni en ammoniacque (Figure 02) [12].

Ils produisent des acides à partir de glucose, même en présence d'oxygène.

E. coli est thermophile avec une température de croissance, comprise entre 15°C et 45°C avec un optimum à 37°C. Sa culture admet une grande tolérance de variation de pH et le pH optimum est de 7,5. *E. coli* fermente le glucose, le mannitol et le lactose avec production importante de gaz.

La fermentation du glucose se fait selon deux modes : la fermentation des acides mixtes et la fermentation du butanediol. La plupart sont résistantes à la présence des sels biliaires qui sont présents dans leur habitat d'origine. Cette bactérie reste relativement sensible aux antibiotiques [13].



Figure 02: *Escherichia coli* [14].

2-Pouvoir pathogène

Infection urinaire : *E.coli* est la bactérie la plus incriminée dans les infections urinaires communautaires, qu'elles soient basses (cystite) ou hautes (pyélonéphrite).

Infection intestinale : elle peut être responsable de gastro-entérites ayant des traductions cliniques variables : diarrhée d'allure banale ou sanglante qui peut être suivie d'un syndrome hémolytique et urémique.

Infection néonatale : elle peut se traduire par une méningite ou une septicémie.

Infection diverses : *E. coli* est impliquée dans de nombreuses infections à point de départ digestif ou urinaire (suppurations localisées ou septicémie). Il peut s'agir d'infections communautaires ou nosocomiales [14].

3-Les différents pathovars d'*E. coli*

Les souches de *E. coli* forment un groupe très hétérogène au regard des mécanismes en cause dans leur pathogénicité. Un pathovar est un taxon d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce et caractérisé par son pouvoir pathogène. Certains sérotypes sont

pathogènes et peuvent être associés à un ou plusieurs pathovars qui sont classés en fonction des signes cliniques engendrés en:

- ✓ Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC).
- ✓ Les *Escherichia coli* entéroadhérents ou aggrégants (EAEC).
- ✓ Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC).
- ✓ Les *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC).
- ✓ Les *Escherichia coli* entéroinvasifs (EIEC)[15].

- Espèce *Pseudomonas aeruginosa*

1-Définition

Ce sont des bacilles droits ou incurvés mais pas vibrioïdes, longs de 1,5 à 4 μm , mobiles au moyen de flagelle polaire simple ou multiple. Leur métabolisme est exclusivement respiratoire, jamais fermentaire même si elles produisent un peu d'acide à partir des sucres en aérobiose. De nombreux *Pseudomonas* dont *aeruginosa* et certains *fluorescens* réalisent la respiration nitrate. Elles sont hétérotrophes, toujours catalase positive et le plus souvent oxydase positive. Elles ne possèdent pas de pigment photosynthétiques mais peuvent produire des pigments. Elles ne produisent pas d'indole à partir de tryptophane, n'acidifient pas le milieu au test rouge de méthyle et ne produisent pas d'acétoïne.

Le *Pseudomonas* est un germe opportuniste, vivant dans les eaux et les milieux humides (Figure 03)[16].

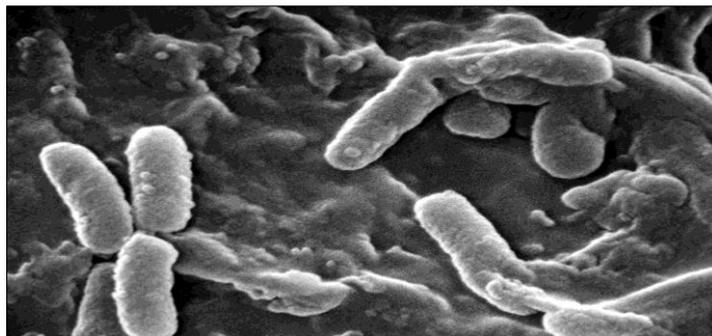


Figure 03 : *Pseudomonas* [16].

2-Pouvoir pathogène

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste à large spectre d'hôtes, responsable de nombreuses infections nosocomiales chez l'homme et en particulier chez les patients immunodéprimés ou atteints de mucoviscidose. Les infections générées par *P. aeruginosa* peuvent être divisées en deux grands types : les infections aiguës, caractérisées par la sécrétion de nombreuses toxines et les infections chroniques caractérisées par la formation d'une communauté bactérienne persistante organisée en biofilm au niveau du site d'infection [17].

Les bactéries Gram positif

- Espèce *Staphylococcus aureus*

1-Définition

Les staphylocoques observés par Pasteur en 1879 dans un pus de furoncle, sont des coques immobiles, anaérobies facultatifs, capables de réduire les nitrates en nitrites, à test oxydase négatif, qui produisent des acides à partir de glucose : un peu d'acétate et de CO₂ en aérobiose et de l'acide lactique en anaérobiose. La plupart des souches tolèrent 10% de NaCl et se développent entre 18 et 40°C (Figure 04).

Ils vivent en général sur la peau des animaux à sang chaud et dans les glandes de la peau, ainsi que sur les muqueuses. Sa transmission interhumaine s'opère généralement par contact direct, et peut produire de nombreuses toxines. Parmi les 27 espèces du genre actuellement répertoriées, les principales sont *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis* et *S.saprophyticus*. L'espèce *S.aureus* sera prise comme un exemple à décrire [18].



Figure 04: Staphylococcus aureus [18]

2-Pouvoir pathogène

Lésions suppurées : les plus fréquentes sont cutanées et sous cutanées : folliculite, furoncle, anthrax, impétigo bulleux panaris. *S.aureus* est aussi responsable de mastites chez les femmes qui allaitent. Il tient également une place dominante dans les infections osseuses primitives.

Septicémies et endocardites: les lésions suppuratives peuvent se compliquer de septicémie. Une forme particulière est la staphylococcie maligne de la face. Elle a pour origine un furoncle de la lèvre ou de la narine qui se complique d'une thrombophlébite suppurée. Elles représentent une proportion importante des septicémies d'origine nosocomiale. La porte d'entrée est souvent un cathéter intravasculaire. Toutefois certaines septicémies surviennent sans porte d'entrée apparente.

Les septicémies à *S.aureus* se compliquent volontiers de métastases septiques notamment au niveau du poumon et de l'appareil ostéo-articulaire plus rarement au niveau de l'appareil urinaire ou du système nerveux central.

S.aureus est responsable d'intoxication alimentaire à incubation courte. Ces intoxications sont dues à l'ingestion d'aliments contaminés et conservés trop longtemps à température ambiante.

L'infection : L'infection à *S.aureus* est parfois à l'origine d'un syndrome dit de choc toxique staphylococcique .Ce syndrome associe une fièvre élevée .Il entraîne une certaine mortalité .

L'infection cutanée à *S. aureus* peut se traduire chez le nouveau-né par une dermite exfoliatrice (maladie de Ritter) et chez le nourrisson, par un syndrome sévère dû à un décollement étendu de la couche superficielle de l'épiderme (aspect de peau ébouillantée) [14].

I-Les antibiotiques

1-définition des antibiotiques

Un antibiotique est une substance antimicrobienne d'origine biologique. Elle est produite par un micro-organisme (champignon microscopique et bactérie) ou synthétisée chimiquement. Elle est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres micro-organismes.

Exemple : La Pénicilline est produite par un champignon *Penicillium notatum*

La Chloramphénicol est un antibiotique de synthèse chimique

Il existe deux catégories d'antibiotiques :

- Les antibiotiques à effet bactériostatique qui inhibent la croissance bactérienne en ralentissant puis arrêtant la multiplication.
- Les antibiotiques bactéricides qui lysent les bactéries.

Remarque : un antibiotique bactériostatique peut avoir un effet bactéricide à des doses augmentées.

Qu'ils soient d'origine biologique ou de synthèse chimique, ces médicaments antimicrobiens doivent posséder les propriétés à savoir :

- Avoir une activité antibactérienne
- Être de toxicité sélective (contre les cellules bactériennes et non contre les cellules de l'hôte).

2-critère de classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

L'origine : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)

Le spectre d'activité : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)

La nature chimique : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse.

La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles (β lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.) [21].

3-La CMI (concentration minimale inhibitrice)

Est la plus faible concentration d'antibiotiques qui inhibe toute croissance visible d'un microorganisme après 24h d'incubation dans un milieu de croissance spécifique.

C'est l'approche la plus utilisée pour évaluer *in vitro* l'activité bactériostatique d'un antibiotique [58].

4- La CMB concentration minimale bactéricide

La CMB est la plus petite concentration d'antibiotique qui ne laisse que 0.01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18h d'incubation à une température de 37°C. Elle caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique.

Détermination du rapport CMB/CMI

Ce rapport est utilisé pour distinguer les antibiotiques bactéricides ($CMB/CMI < 2$) des antibiotiques bactériostatiques (CMB très éloignée de la CMI).

Il permet de définir également la tolérance d'une souche bactérienne à un antibiotique bactéricide ($CMB/CMI > 32$)(Figure 05).

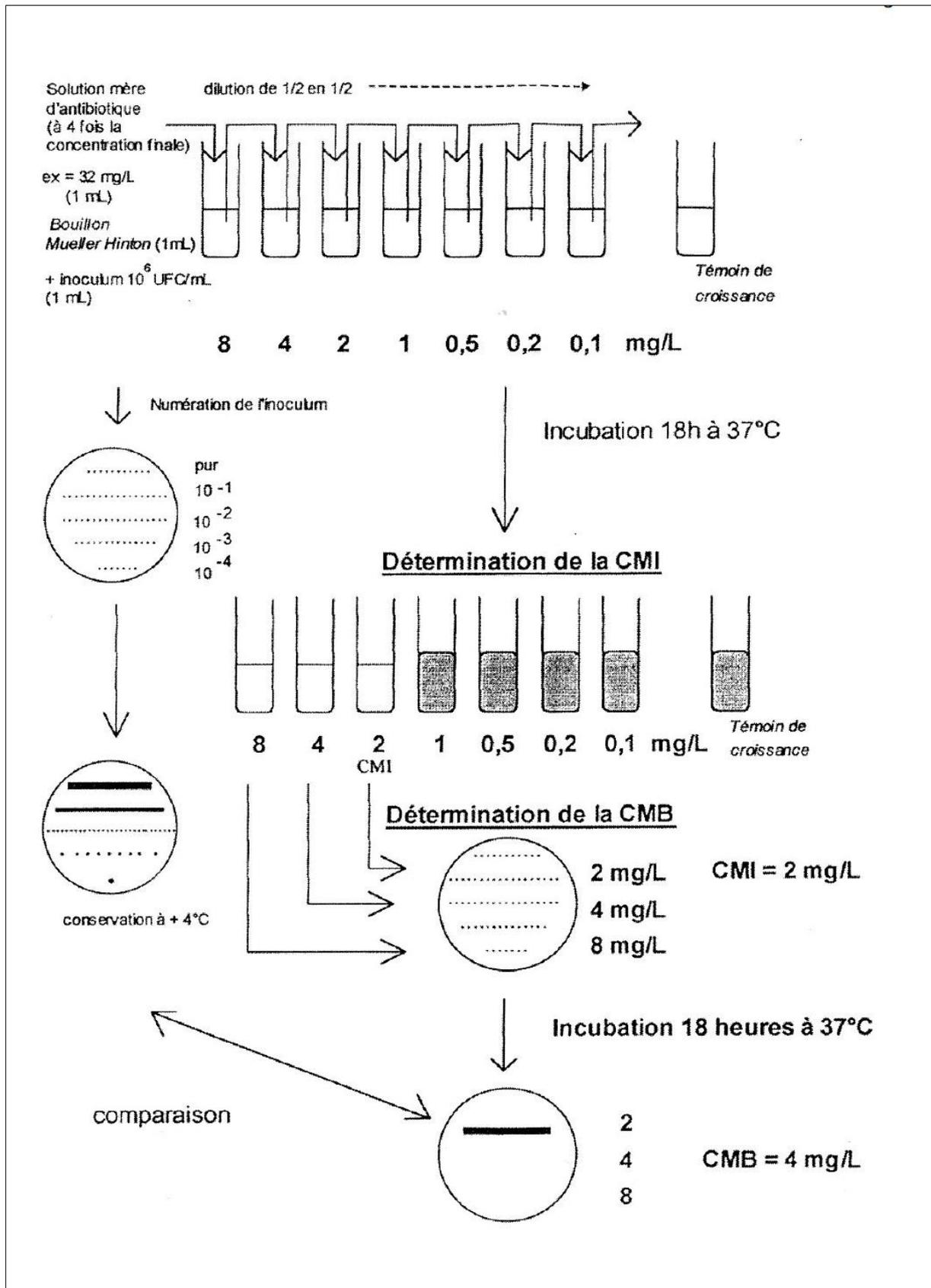


Figure 05 : la Détermination de la CMB [59].

5-Mode d'action

Les antibiotiques agissent à l'échelle moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie.

Ils agissent par :

- **Toxicité sélective au niveau de la :**

- Synthèse de la paroi bactérienne
- Membrane cytoplasmique
- Synthèse des protéines
- Acides nucléiques (Figure 06)

- **Inhibition compétitive :** dans ce cas l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle de la bactérie.

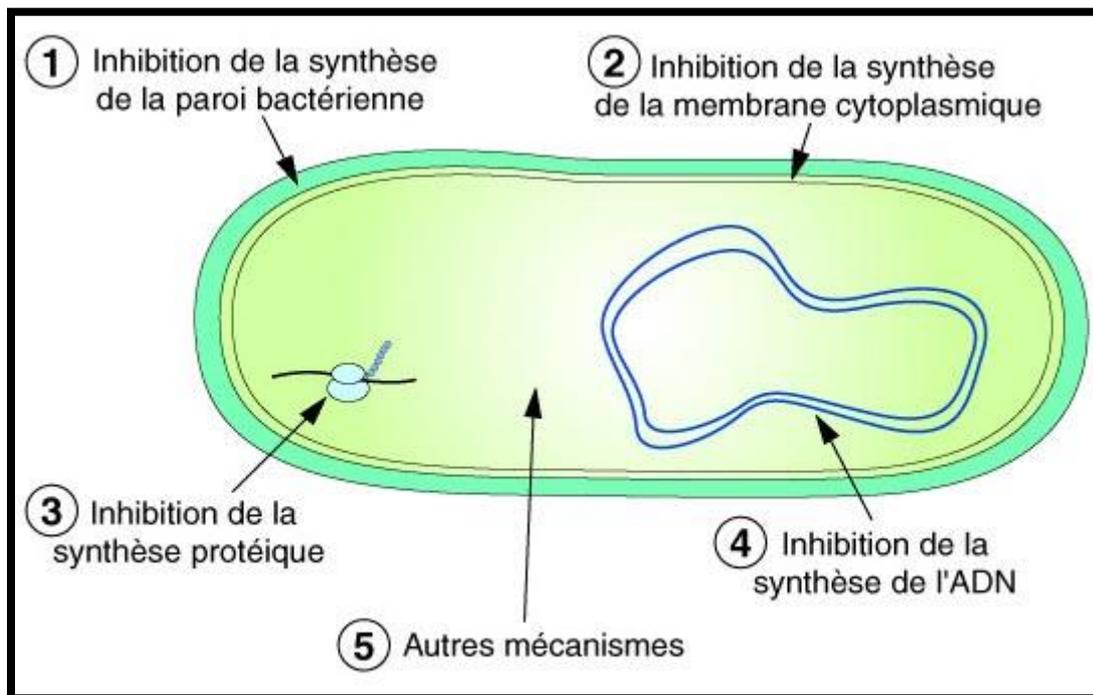


Figure 06 : Mode d'action des antibiotiques[19]

6- Synergie et antagonisme entre ATB

Deux antibiotiques ou plus, peuvent être occasionnellement employés contre le même organisme pathogène. Il est possible de catégoriser en laboratoire la relation entre deux antibiotiques, ou plus ; contre une bactérie comme synergique, antagoniste ou indifférente, cela dépend de l'effet l'association des médicaments sur la croissance bactérienne.

- Si l'association des médicaments augmente nettement l'effet antibactérien au-delà de celui du médicament le plus actif l'association est synergique.
- Si l'association aboutit à une inhibition de la croissance bactérienne inférieure à celle due au médicament le plus actif, l'association est antagoniste.
- Si l'association n'est ni synergique, ni antagonisme, elle est indifférente [19].

7- La résistance bactérienne aux ATB

Les antibiotiques peuvent être naturellement inefficaces contre certaines bactéries (résistance naturelle). Cette résistance définit le spectre d'action de l'antibiotique. Elle est connue et se manifeste chez tous les individus de la population bactérienne considérée. Le spectre peut être étroit, moyen, large ou très large.[20]

Ou devenir inefficace contre les bactéries au préalable sensibles à l'antibiotique (résistance acquise). Cette résistance est propre à certaines souches d'une même espèce considérée et correspond à la résistance par des modifications génétiques au niveau chromosomique ou extra-chromosomique. Elle est évolutive , varie en fonction du temps , de l'utilisation des antibiotiques, et s'appelle aussi phénotype résistant [21].

II-1 'antibiogramme

1- Définition

L'antibiogramme est un test qui permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne *in vitro*. Il renseigne, par conséquent, sur la sensibilité des germes vis-à-vis des agents anti-infectieux. Les résultats de l'antibiogramme engagent pleinement la responsabilité du biologiste. En effet, sa décision suppose que la souche isolée est responsable du processus infectieux et incite le clinicien à la mise en route d'une antibiothérapie donnée. Cette mise au point sera axée sur le choix de la méthode adéquate pour la réalisation de l'antibiogramme, la lecture interprétative des résultats et les limites de l'antibiogramme[22].

Tous les antibiotiques ne sont pas efficaces contre toutes les bactéries. L'antibiogramme permet en effet de déterminer l'antibiotique le plus efficace en cas d'infection bactérienne. Il permet donc de jauger l'efficacité d'un antibiotique[23].

2- La méthode de diffusion « méthodes des disques »

❖ Principe

Ce test consiste en l'application de disques imprégnés d'antibiotiques sur une gélose préalablementensemencée par des bactéries. L'antibiotique va diffuser dans la gélose avec une concentration décroissante vers la périphérie.

Cette technique utilise des disques de papier buvard imprégnés d'une concentration donnée d'antibiotique déposé à la surface d'une gélose spécifique (Muller Hinton) coulée en boîte de pétri uniformémentensemencée d'une suspension de la bactérie étudiée[23].

Dans la zone où la concentration est inhibitrice, on n'observera pas de pousse bactérienne.

❖ Lecture

a) Mesure du diamètre de la zone d'inhibition

La Lecture se fait avec la mesure du diamètre de la zone d'inhibition et grâce à des abaques, on pourra classer la bactérie en sensible(S), intermédiaire(I) ou résistante(R).

Pour classer les bactéries, on compare la CMI avec des valeurs critiques (valeur critique Inférieure, valeur critique supérieure)(Figure 07).

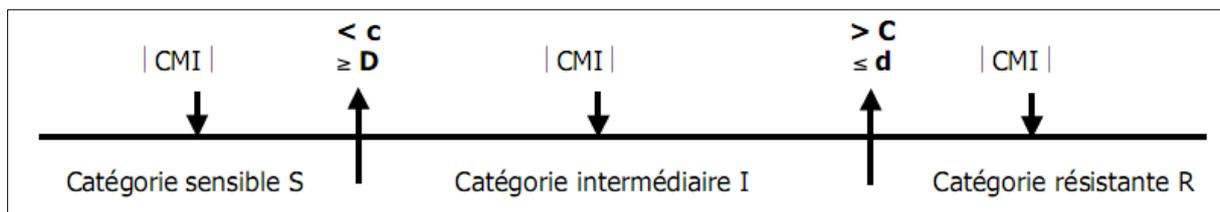


Figure 07: Les concentrations et les diamètres critiques des antibiotiques d'activité médicale (recommandations du CA-SFM)

Concentrations critiques hautes (C) définit la résistance

Concentrations critiques basses (c) définit la sensibilité

Concentrations critiques basses < CMI < Concentrations critiques hautes.

b) Etablissement de la courbe de corrélation

Pour un grand nombre de souches (au moins 300), on met en relation le diamètre d'inhibition avec la CMI obtenue par une des méthodes de dilution : on obtient un nuage de points dans un graphique représentant le diamètre en fonction du \log_2 de la CMI.

On peut calculer alors une courbe de régression, appelée courbe de concordance, qui met en relation la CMI avec le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne[24].

I-La phytothérapie

1-Historique de la phytothérapie

Le premier texte connu sur la médecine par les plantes est gravé sur une tablette d'argile, rédigé par les Sumériens en caractères cunéiformes 3000 ans av. J.-C. Ils utilisaient des plantes telles que: le myrte, le chanvre, le thym, le saule en décoctions filtrées.

Le Papyrus Ebers, du XVI^e siècle av. J.-C. est le premier recueil connu consacré aux plantes médicinales. De loin le plus volumineux connu de l'Égypte ancienne avec « 110 pages ». Il fait référence à de plus anciens documents citant des dizaines de plantes accompagnés d'un mode d'utilisation.

Les Grecs et les Romains utilisaient également de nombreuses plantes. On en retrouve des références, entre autres, dans l'œuvre de Dioscoride (médecin grec du I^{er} siècle).

En Europe, les plantes représentent l'essentiel de la pharmacopée jusqu'à la fin du XIX^e siècle et l'avènement de la chimie moderne. Encore largement utilisées après la Seconde Guerre mondiale, elles furent ensuite supplantées par les médicaments de synthèse plus simple d'emploi.

En France, le diplôme d'herboriste a été supprimé en septembre 1941 par le gouvernement de Vichy. De 4 500 herboristes en 1941, ils sont désormais une dizaine tandis qu'en Allemagne ou en Italie, on compte plusieurs milliers d'herboristes.

Alors que depuis l'Antiquité les spécialistes des plantes étaient clairement identifiés, du médecin à l'herboriste, et que cette séparation est encore en vigueur dans d'autres sociétés de par le monde : certaines plantes sont sacrées, préparées uniquement par la personne qui remplit la fonction de guérisseur[25].

2-Définition de la phytothérapie

Le mot phytothérapie provient de deux mots grecs qui signifient essentiellement « soigner avec les plantes ». Il s'agit d'une pratique millénaire basée sur un savoir empirique qui s'est transmis et enrichi au fil d'innombrables générations.

La phytothérapie, étymologiquement le traitement par les plantes, est une méthode thérapeutique qui utilise l'action des plantes médicinales.

On peut distinguer deux types de phytothérapie :

- Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement.
- Une pratique basée sur les avancées scientifiques qui recherche des extraits actifs des plantes.

La phytothérapie est basée sur le pouvoir des plantes à agir sur certains maux grâce aux principes actifs qu'elles contiennent. Les produits chimiques de synthèse –engrais et traitements phytosanitaires, altèrent certains principes actifs naturels et s'accumulent dans les plantes, les rendant impropres à une utilisation phytothérapeutique. L'utilisation des plantes 'bio' est donc indiquée[26].

II-Les plantes médicinales

1- Définition

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses.

Environ 35000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains.

Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne [27].

2- La partie utilisée en phytothérapie

L'utilisation d'une plante médicinale s'envisage sous deux aspects :

- Soit l'utilisation de la plante comme médicament ou phytothérapie.
- Soit l'utilisation de substances actives extraites de végétaux [30].

Les essences dans les plantes peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (Citronnelle, Eucalyptus), écorces (cannelier) , bois (bois de rose , santal) , racines (vétiver) , rhizome (acore , gingembre) , sève (myrte) , bourgeons (pin) , fruit (badiane) ou graines (carvi) , bulbe (ail) plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une espèce , voire dans un même organe .[28].

3- La conservation des plantes médicinales

De nombreuses plantes médicinales ne sont bien entendu pas destinées à être utilisées immédiatement. On souhaite au contraire les conserver jusqu'à ce qu'une maladie survienne. Le stockage n'est dans certains cas uniquement possible que lorsque l'on effectue au préalable certaines procédures sur les plantes cueillies. L'une des procédures les plus fréquentes est le séchage des plantes. Les plus destinées à être séchées doivent être traitées le plus rapidement possible après la récolte. Choisissez une pièce chaude, ombragée et bien aérée.

On suspende les plantes entières en bouquets la tête en bas sur une poutre (pas de dix plantes par bouquet) et on étale les feuilles. Les tiges coupées et les tronçons de racine sur de la gaze ou du papier absorbant. Au mieux on place la gaze ou le papier sur une grille pour que l'air puisse également circuler par le dessous. Le temps de séchage dépend de la température en eau et de l'épaisseur des différentes parties de la plantes.

En conséquence, on contrôle régulièrement les plantes étalées et enlever immédiatement les parties pourries. Il est aussi conseillé de retourner de temps en temps les plus grands tronçons. On peut également faire sécher les plantes au four à environ 50C ou au four à micro-ondes mais les arômes et les propriétés thérapeutiques ne resteront alors pas toujours totalement intactes.

On peut commencer à stocker les plantes séchées lorsqu'elles sont devenues très légèrement cassantes. Pour conserver vos plantes utilisez des récipients en verre ou en porcelaines ou bien des sachets en papier ou des pochons en tissu. Dans de très nombreux cas, il est également possible de congeler les plantes, les substances actives et nutritives ainsi que les arômes seront alors conservé pour la grande majorité des espèces[29].

III-les huiles essentielles

1- Definition des HE

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverses parties des végétaux. Elles sont très concentrées, volatiles, non huileuses et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur [30].

Les huiles essentielles extraites des plantes par distillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes. Elles sont largement employées en parfumerie. Les huiles essentielles contenues dans les plantes sont des composés oxygénés, parfois d'origine terpénoïde et possédant un noyau aromatique. Les huiles essentielles ont de multiples propriétés [31].

Les terpènes (principalement les monoterpènes) représentent la majeure partie (environ 90%) de ces composants [32].

2-Réparation et accumulation

Les HE n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Environ 1% des espèces élaborent des essences. Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles regroupent et en particulier les labiés (Thym, Menthe, Lavande, Origan, Sauge, etc.), les Ombellifères (Anis, Fenouil, Angélique, Cumin, Coriandre, Persil, etc.), les Myrtacées (Myrthe, Eucalyptus), les Lauracées (Camphrier, Laurier-sauce, Cannelle) [33].

Les HE sont synthétisées et accumulées dans des structures histologiquement spécialisées.

On retrouve ces structures sur ou à proximité de la surface de la plante et dans tous les organes végétaux. On peut distinguer :

- tissus à sécrétion externe (situés à l'extérieur de la plante)
- tissus à sécrétion interne (situés à l'intérieur de la plante)
- cellules à sécrétion intracellulaire.

Cette distinction entre les différentes parties de la plante est fondamentale. Ainsi, l'Huile Essentielle peut avoir des propriétés différentes suivant la partie de la plante dont elle est extraite [34].

3- Classification des huiles essentielles

Selon le pouvoir spécifique sur les germes microbiens, et grâce à l'indice aromatique obtenu par des aromatogramme, les huiles essentielles sont classées en groupe :

- Les huiles majeures
- Les huiles médiums
- Les huiles terrains [30].

4-Extraction des HE

Les quantités d'essences secrétées par les plantes sont extrêmement variables et les procédés techniques utilisés pour l'obtention de ces essences sont aussi très variables. Les modes d'extraction les plus fréquemment employés sont :

4.1- L'hydrodistillation

On peut alors donner une signification du terme hydrodistillation: c'est l'entraînement par la vapeur d'eau de l'huile essentielle contenue dans un végétal lorsque celui-ci est chauffé en présence d'eau.

Le principe de l'hydrodistillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur.

Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux. Cependant, à cause de l'eau, de l'acidité, de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, de racémisation, d'oxydation, d'isomérisation, etc. qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation.

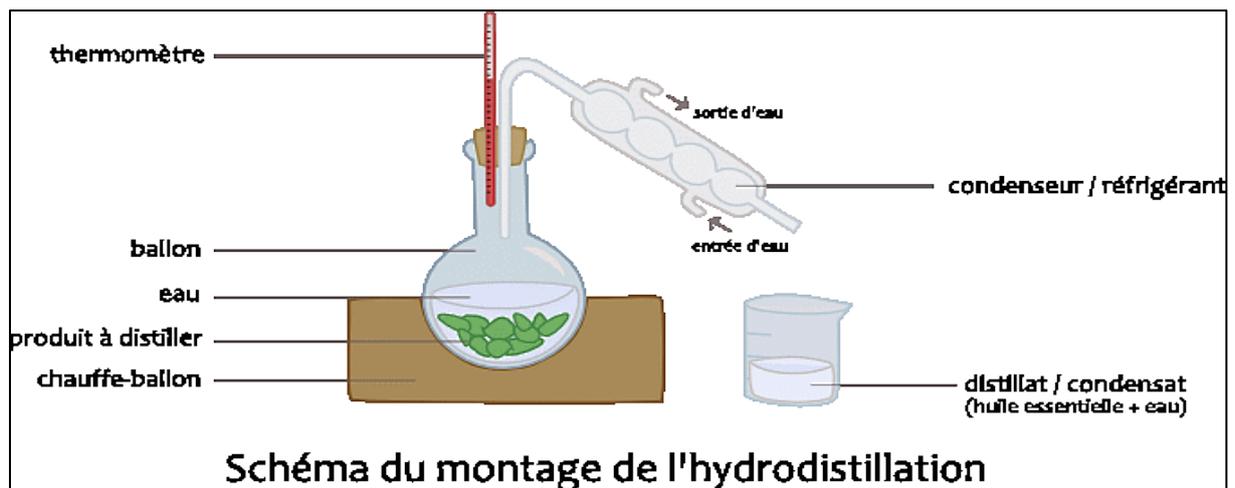


Figure 08 : montage de l'hydrodistillation

4.2-L'entraînement à la vapeur d'eau

Les méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont basées sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'essence se libère du tissu végétal et entraînée par la vapeur d'eau. Le mélange de vapeurs est condensé sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation .

En fonction de sa densité, elle peut être recueillie à deux niveaux:

- au niveau supérieur du distillat, si elle est plus légère que l'eau, ce qui est fréquent .
- au niveau inférieur, si elle est plus dense que l'eau.

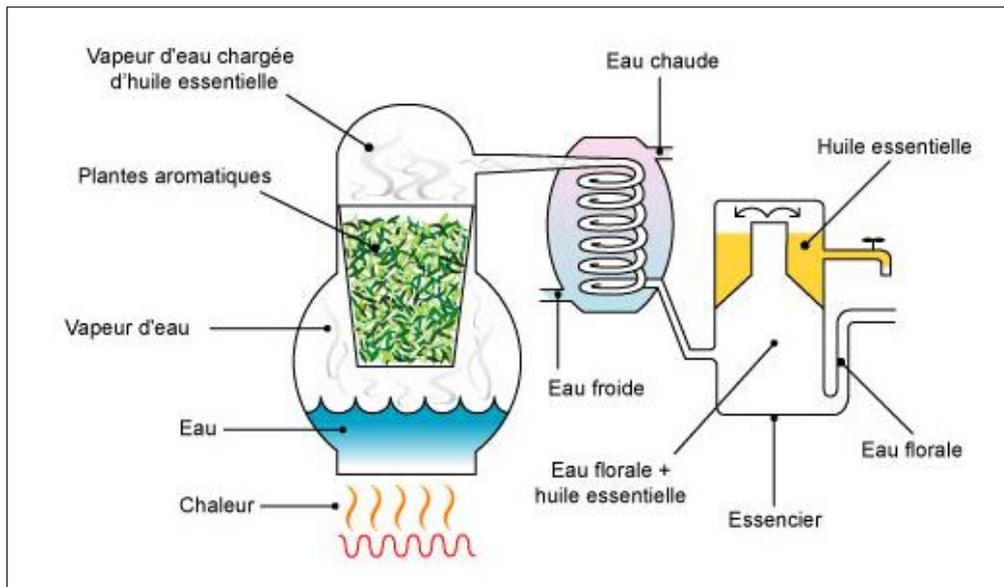


Figure 09: la méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau

4.3- L'hydrodiffusion

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant. cette technique est permet l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie.

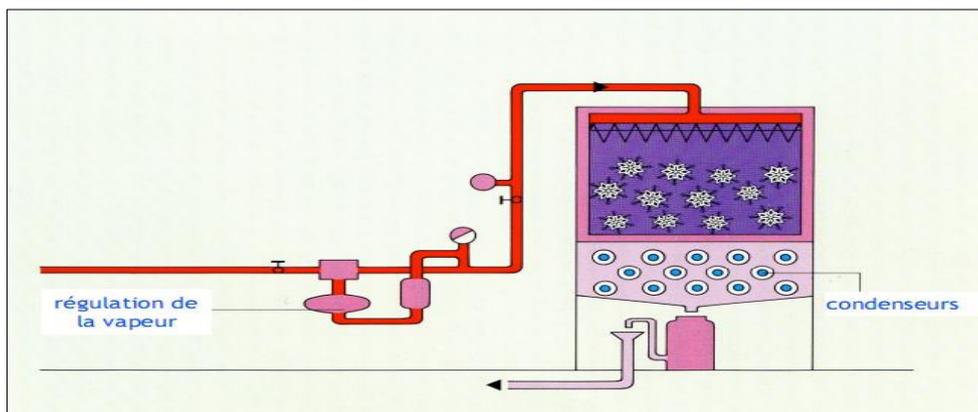


Figure 10: la méthodes d'hydrodiffusion

4.4- L'expression à froid

L'extraction par expression est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes comme le citron, l'orange, la mandarine, etc. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau [32].

5-Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les HE sont :

- liquides à température ambiante. A basse température, certaines HE se solidifient comme celle d'anis par exemple.
- consistance huileuse mais non grasse.
- volatiles (contrairement aux huiles fixes et odorantes). Leur volatilité augmente avec la chaleur.
- densité inférieure à celle de l'eau sauf celles de la cannelle et le girofle
- rarement colorées
- solubles dans les alcools jusqu'à concentration de 5%, les solvants organiques apolaires et les corps gras.
- insolubles dans l'eau .

La composition d'une HE, peut varier fortement en fonction de:

- l'origine de la plante.
- l'ensoleillement.
- la nature du sol.
- la source botanique.
- période de récolte.
- la technique d'extraction des H.E [35].

6-Biochimie des HE

Les huiles essentielles contiennent un nombre considérable de familles biochimiques (chénotypes). On voit qu'elles ne sont pas constituées d'acides gras, ni d'aucun autre corps gras. Elles sont constituées de :

- Les mono terpènes.
- Les sesquiterpènes.
- Composés aromatiques.
- Composés d'origines diverses [35].

7-Propriété biologique et pharmaceutiques des HE

Les HE contenues dans les herbes aromatiques sont responsables des différents senteurs que dégagent les plantes. Elles sont très utilisées dans de multiples propriétés :

7.1-Les propriétés anti-infectieuses et de défense de l'organisme

a. Antibactérienne

À la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effets des H.E. sur les microorganismes: une activité létale (bactéricide et fongicide) et une inhibition de la croissance (bactériostatique) [33] .

Les phénols possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé. Ils sont responsables des altérations irréversibles au niveau de la membrane bactérienne , suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol), aldéhydes (néral, géranial), etc.

b. Antivirale

De nombreuses familles de molécules chimiques rencontrées dans les extraits végétaux ont montré "*in vivo*" une activité antivirale et, parmi elles, les monoterpénols et les monoterpénols. Selon les travaux d'INOUYE et ABE, (2007), il existe des H.E. de plantes exotiques très puissantes qui ont un fort pouvoir antiviral et qui sont connues pour leur efficacité.

Les H.E. sont sélectivement absorbées et perturbent les fonctions des membranes biologiques de la cellule, sur la mitochondrie et autres organites vitales pour tous les organismes hormis les virus

les H.E. ne sont actives que sur les virus à enveloppe comme celui de la grippe et du VIH (virus de l'immunodéficience humaine).

c. Antifongique

les huiles présentant un fort pouvoir antifongique, telles que celles de thym et de cannelle, pourraient constituer une solution alternative intéressante dans les thérapies antimycosiques.

Le carvacrol et le thymol, deux composés rencontrés dans la majorité des espèces botaniques possèdent une activité antifongique contre les mycètes phytopathogène [35].

d. Antiparasitaire

Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites.

e. Antiseptique

Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes [33].

7.2-Les propriétés anti-inflammatoires

Les aldéhydes sont doués de propriétés actives contre les états inflammatoires.

Ainsi, les huiles essentielles qui en sont riches, sont très utilisées par voie interne ou locale, dans les troubles articulaires inflammatoires.

Les Huiles Essentielles d'eucalyptus citronné, de géranium, de gingembre, de giroflier ont un bon pouvoir anti-inflammatoire.

7.3-Les propriétés cicatrisantes

Les huiles essentielles employées contre les affections de la peau ont des propriétés cicatrisantes dues à leur activité physico-chimique, et à leur action vasomotrice. Ce sont les Huiles Essentielles de lavande aspic, palmarosa, niaouli, ravensare, et de romarin.

7.4-Les propriétés à visée neurotrophe

Les Huiles Essentielles agissent sur le système nerveux central. Ce sont des huiles à action sédative ou à action stimulante. L'action se fait par stimulation ou inhibition du système sympathique ou parasympathique. Elles sont régulatrices du système nerveux périphérique.

Les Huiles Essentielles sont utilisées pour leur pouvoir analgésique. De nombreuses

Huiles Essentielles ont une action antispasmodique qui leur permet d'avoir une action contre certaines douleurs : gastriques, menstruelles, musculaires, céphalées, rhumatismes. Ce sont les Huiles Essentielles d'eucalyptus citronné, de gingembre, de lavande vraie, et de clous de girofle entre autres [36].

Généralité sur la plante «*Rosmarinus officinalis* »

1-Définition

Plante très connue, Le romarin est un arbrisseau vivace qui appartient à la famille de lamiacées, Scientifiquement, on le connaît sous le nom de *Rosmarinus*, mais il est plus communément appelé encensier, romarin des troubadours, herbe aux couronnes, ou encore rose marine, rose des marins, rose de la mer. Il se caractérise par des fleurs qui prennent différents tons, compris entre le bleu pâle et le violet. Le romarin est originaire du bassin méditerranéen [37].

Depuis l'Antiquité, il est employé pour améliorer et stimuler la mémoire. Encore aujourd'hui, en Grèce, les étudiants en font brûler dans leurs chambres en période d'examens. Le romarin est en effet considéré comme une plante tonique, revigorante, stimulante : autant de vertus que reflète sa saveur aromatique bien particulière [31].

2- Historique

Le romarin est un arbuste d'origine méditerranéenne, que l'on faisait autrefois brûler pour purifier l'air des malades. Il fut rendu célèbre au XVI^e siècle par la légende selon laquelle la reine Isabelle de Hongrie, malade et âgée, retrouva santé et jeunesse grâce aux vertus d'un mélange de solution alcoolique contenant du romarin.

Le romarin fait l'objet de très nombreuses mentions historiques et légendaires. Les anciens lui vouaient une grande vénération. Si la merveilleuse cure de Donna Izabella a «lancé» le romarin, celui-ci n'était pourtant pas un inconnu. Pour les Romains, il était une herbe sacrée qui portait bonheur aux vivants et assurait aux morts un séjour paisible dans l'au-delà. Ils en tressaient donc des couronnes qu'ils coiffaient pour certaines fêtes, qu'il s'agisse de cérémonies nuptiales, funéraires ou de célébrations profanes. Les mariées portaient des couronnes de romarin, symboles de fidélité, tandis que les invités recevaient des branches enjolivées de rubans de soie multicolores.

Les Égyptiens plaçaient des rameaux de romarin dans la tombe des pharaons afin de fortifier leur âme. Le romarin est un symbole du souvenir et de l'amitié. Les étudiants grecs s'en confectionnaient des couronnes, qu'ils portaient durant les examens pour stimuler leur mémoire.

Durant les épidémies de peste, le romarin était très populaire : on en faisait brûler des rameaux pour purifier l'air et on portait des sachets sur soi, que l'on respirait lorsqu'on passait dans les endroits touchés par cette terrible maladie. L'histoire veut aussi que la reine de

Hongrie, qui souffrait de rhumatismes chroniques, ait été délivrée de ses problèmes grâce à un remède à base de romarin lorsqu'elle était âgée de 72 ans.

Dans certaines régions rurales, on fait tremper du romarin dans du vin rouge pour obtenir une boisson fortifiante. On utilise aussi le romarin sous forme d'extrait à base d'alcool pour les plaies et sous forme d'onguent ou de baume pour soulager les rhumatismes et les névralgies, tant chez les humains que chez les animaux [60].

3 - Habitat

Le romarin pousse spontanément dans le sud de l'Europe. On le cultive dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps. Il apprécie les climats chauds, modérément secs.

En Algérie on trouve le romarin dans toute les communes, Garrigues , forêts claires , et avec une floraison annuelle [38].

4- Classification

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Sous-classe : Gamopétales

Ordre: Tubi florales

Sous-ordre : Lamiales

Famille : lamiacées

Genre : Rosmarinus

Espèce : officinalis



Figure 11 : *Rosmarinus officinalis*[39]

5- Description

C'est un arbuste à feuilles persistantes pouvant atteindre 2 m de haut, à nombreux Rameaux dressés ou quelquefois prostrés(variété *prostratus*).

Les feuilles sessiles et opposées , sont étroites et coriaces, à bords enroulés en dessous, vertes à la face supérieure, velues et blanchâtres à la face inférieure. Les fleurs varie du bleu pâle au violet (variété *Albi Florus*) sont disposées en courtes grappes à l'aisselle des feuilles, sur la partie supérieure des rameaux. Sous climat méditerranéen, la floraison a lieu presque toute l 'année [40].

Le calice, d'aspect pulvérulent, présente un tube campanulé à 3 divisions dont la plus large est la lèvre supérieure.

La corolle : son tube, plus long que le calice, s'élargit sur 2 lèvres inégales

- la lèvre supérieure à 2 lobes
- la lèvre inférieure à 3 lobes dont le médian est plus développé et concave.

L'androcée comporte 4 étamines dont 2 sont stériles et réduites à des crochets. Les 2 autres, saillantes, sont insérées sur la gorge par leur filet muni d'une petite dent. Ces 2 étamine ont des anthères allongées uniloculaires et déhiscentes par une seule fente.

Le gynécée se compose d'un style se terminant par un stigmate qui se développe Souvent après les étamines. L 'ovaire a 2 carpelles divisée en 2 parties.

Le fruit est un tétrakène brun dont chaque partie renferme un seul embryon sans albumen [39].

7- Composition

Le romarin est riche en principes actifs. Il contient des flavonoïdes, des acides phénols, notamment l'acide rosmarinique (2 à 3 %) [41].

Les feuilles de romarin contiennent de la résine, de tanin, une substance amère et environ 1.50 % d'une essence spéciale à odeur aromatique, saveur chaude et camphrée, de cinéole et de camphre ordinaire. Perrot a découvert la présence de poils sécréteurs de deux sortes dans le limbe de la feuille de Romarin. Les sécrétions sont les produits du métabolisme végétal qui comprennent les huiles essentielles, les gommes et les mucilages, les tanins, les alcaloïdes, les nectars, etc. D'autre part, Spiro et Chen rapportent que l'huile essentielle de Romarin est

contenue dans des glandes épidermiques appelées trichomes, divisées essentiellement en deux types principaux (peltate et capitate glands). Le premier type serait le site de stockage le plus important de l'huile essentielle de romarin. Il faut rappeler que la libération de l'huile n'est possible que si un facteur externe intervient [42].

Les principaux constituants de l'huile essentielle de Romarin sont :

- **Huile essentielle** : 1,8 cinéole, α -pinène, camphre
- **Acides phénols** : acides caféique, rosmarinique et chlorogénique
- **Diterpènes phénoliques**: acide carnosolique et carnosol
- **Tanins**
- **Triterpènes et stéroïdes** : acides oléanoliques et ursoliques
- **Flavonoïdes glucosides de flavones simples** [43]

N.B : A forte dose, le romarin peut-être toxique [38]

8- Les propriétés pharmaceutiques et l'emploi

Le romarin est composé de puissantes huiles essentielles qui lui confèrent des propriétés: digestive, stimulante, détoxiquante, diurétique, expectorante, anti-inflammatoire, antispasmodique, antinévralgique, tonique. Le romarin est recommandé aux convalescents, aux surmenés, aux dépressifs, de même qu'aux personnes sujettes aux palpitations, aux migraines, aux angoisses et aux insomnies [44].

Il est également bienfaisant dans les cas de digestion difficile due à l'atonie des organes digestifs, qu'il tonifie tout en augmentant la sécrétion de la bile et en favorisant son évacuation.

On l'utilise également en fumigation, dans les cas d'asthme. En usage externe, on utilisera une préparation de romarin cuite dans du vin et appliquée en cataplasme sur les gonflements douloureux des entorses, sur les contusions ou les rhumatismes articulaires.

On soignera les aphtes et l'amygdalite avec des bains de bouche d'une décoction de feuilles.

Pour soulager les rhumatismes, on prendra un bain auquel on ajoutera une décoction de feuilles de romarin [45].

Le romarin a été utilisé il y a des milliers d'années pour conserver les viandes. Cette plante contient des substances chimiques très antioxydantes, tel que l'acide carnosique (1,5 et 2,5%) et de carnosol (0,3-0,4%).

L'acide carnosique est également utilisée par la glande thyroïde pour produire les hormones thyroïdiennes.

Le romarin contient des composés qui préviennent la baisse de l'acétylcholine qui survient lors de la maladie d'Alzheimer. Il améliore également la circulation sanguine dans le cerveau [46].

Il aurait également une action contre le cancer. Lors d'étude de laboratoire, le romarin a démontré la capacité d'inhiber, chez l'humain, l'aflatoxine, un cancérigène que l'on retrouve sur de nombreux produits alimentaires destinés à l'homme ou aux animaux. Les huiles essentielles du romarin stimulent la production d'enzymes protectrices par le foie [47].

➤ **Indication usuelles :**

Elle est prescrite dans le soin des troubles digestifs liés à une insuffisance de la fonction biliaire : dyspepsie, crampes, ballonnements, constipation. Il peut être utilisé dans les infections bronchiques et ORL (grippe, bronchite...) et il est recommandé en cas de grande fatigue. En usage externe, il apaise les douleurs rhumatismales et inflammatoires [60] .

I- Matériel

1-Matériel végétal

Le but de notre travail est de tester l'activité antibactérienne d'une huile essentielle.

La matière végétale utilisée dans cette étude est le romarin connu sous le nom scientifique de *Rosmarinus officinalis*. Elle a été récoltée de la wilaya d'Oum El Bouaghi (Est Algérien), en période de floraison, durant le mois de janvier 2013. Cette période est idéale en raison de la richesse de la plante en huile essentielle.

Pour extraire cette huile, seule la partie aérienne du matériel végétal (feuilles, fleurs), a été utilisée [48].

2- Les microorganismes utilisés

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont les suivantes:

- ❖ *Escherichia coli* ATCC 25922
- ❖ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- ❖ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire de bactériologie de l'Hôpital IBN ZOHR -Guelma-.

3- Les milieux de culture utilisés

Pour assurer la survie des bactéries et tester les huiles essentielles, plusieurs milieux de culture ont été utilisés:

* Le milieu Mac conkey (*E. Coli*), le milieu Chapman (*Staphylococcus aureus*) et le milieu King A (*Pseudomonas aeruginosa*).

*Le milieu Mueller – Hinton (MH): qui est utilisé pour tester l'activité antibactérienne d'une substance donnée (antibiotiques, huiles essentielles).

II-Méthodes

1- Les tests phytochimiques

Avant d'effectuer ces tests, les feuilles et fleurs du romarin ont été lavées à l'eau du robinet et séchées à l'ombre. Une quantité de ces derniers a été émietée, et une autre réduite en poudre et mise dans des flacons hermétiques à l'abri de la lumière. C'est à partir de cette poudre que les tests phytochimiques ont été réalisés.

1-1- Les saponosides

On prend 2 g de la drogue végétale, on lui ajoute 80 ml d'eau distillée et on met le mélange à ébullition. Après filtration, on laisse refroidir la solution. Par la suite on agite le filtrat verticalement. L'apparition d'une mousse qui dure quelques instants indique la présence des saponines [49].

1-2- Les alcaloïdes

On ajoute à 10 g de la drogue végétale pulvérisée, quelques millimètres d'HCL à 1% et on laisse le mélange en macération pendant 30 mn. Après on filtre le mélange et on ajoute le réactif de Mayer au filtrat. L'apparition d'une solution trouble indique la présence d'alcaloïdes [50].

1-3- Les tanins

A 10 g de la drogue végétale, on ajoute 200 ml d'une solution aqueuse de C_2H_5OH à 1%. On filtre et on teste le filtrat avec quelques gouttes d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ l'apparition d'une couleur verte indique la présence de tanins [49].

NB : pour préparer la solution aqueuse de $FeCl_3$: on ajoute à 1g de poudre $FeCl_3$, 2ml d'eau distillée et on agite

1-4- Les stérols et terpènes

On mélange 210 ml d'éther de pétrole avec 5 g de la drogue végétal et on filtre. On évapore le filtrat (à l'aide d'un rota-vape). Le résidu obtenu est dissout dans 0,5 ml d'acide acétique et ensuite dans 0,5 ml de $CHCl_3$.

Les deux solutions sont transférées dans un tube à essai. On ajoute par la suite 1 ml de H_2SO_4 concentré. Un cercle violet ou marron est formé dans la zone de contact entre les deux liquides. Il devient gris par la suite. Ceci indique la présence de stérols et terpènes [50].

1-4- Les flavonoïdes

On ajoute à 10 g de la drogue végétale, 150 ml d'HCL diluée à 1% .On laisse macérer 24h. Après filtration, on prend 10 ml de filtrat et on lui ajoute une goutte de NH₄OH pour le rendre basique. L'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieur du tube à essai indique la présence de flavonoïdes [51].

1-5-Les Mucilage

A 1 ml d'une solution à analyser (solution du test des saponosides), on ajoute 5 ml d'alcool absolu (95%). L'apparition de précipités floconneux montre la présence de mucilage [52].

2- Protocole d'extraction de l'huile essentielle de romarin

L'extraction de l'huile essentielle (HE) du romarin (*Rosmarinus Officinalis*) a été effectuée par hydrodistillation au niveau du laboratoire de phytochimie (Université d'Oum El Bouaghi) par hydrodistillation qui a été accomplie à l'aide d'un dispositif de type Clevenger (Figure 12) selon le protocole suivant:

150 g des feuilles et fleurs fraîches de la plante utilisée ont été introduites dans un ballon à 3 cols de deux litres, imprégné d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 2 à 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile, en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter. L'eau et l'huile se séparent alors par différence de densité. On ajoute de l'éther éthylique à la phase organique (HE) pour éliminer toute trace d'eau. La quantité d'essence obtenue est pesée pour le calcul du rendement [53].



Figure 12 : montage de l'hydrodistillation

2-1- Calcul du rendement

Le rendement de l'huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter (carée ,1953). Le rendement est exprimé en pourcentage et est calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{P}{P_a} \times 100 \quad \text{ou} \quad R : \text{rendement de l'huile en \%}$$

P_β : poids de l'huile en g

P_a : poids de la plante en g

2-2- Conservation de l'huile essentielle obtenue

La conservation de l'huile essentielle obtenue exige certaines précautions qui sont indispensables. Elle doit être récupérée dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière et conservée à une température voisine de 4°C [01].

3-Les tests de l'activité antibactérienne

3-1- Préparation de l'inoculum

Avant de déterminer l'activité antibactérienne de n'importe quelle substance, une suspension de chaque bactérie utilisée doit être préparée de la manière suivante:

Il est nécessaire d'avoir des colonies jeunes de 18h. Pour cela, chaque souche étudiée, a été repiquée sur son milieu de culture approprié(*E.coli*.(Mac conkey), *Staphylococcus aureus* (Chapman), *Pseudomonas aeruginosa* (King A)). Après croissance, une colonie bien déterminée de chaque espèce bactérienne a été prélevée à l'aide d'une pipette pasteur stérile et introduite dans un tube stérile contenant de l'eau physiologique stérile (0,9 % NaCl). La suspension bactérienne doit être trouble (densité de 0,5 Mcfarland) [03].

3-2- L'antibiogramme

On a testé la sensibilité des bactéries par la méthode des disques ou antibiogramme standard. Le but de la réalisation de ce dernier, est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques [03].

❖ Principe

Des disques d'antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance des disques. Après incubation, les disques peuvent s'entourer de zones d'inhibitions circulaires correspondant à une absence de culture [03].

❖ Application

La surface de la gélose MH (3 boîtes correspondant au nombre de souches utilisées) a été ensemencée par la méthode d'écouvillonnage, à partir d'un inoculum de chaque souche testée, et des disques d'antibiotiques de doses connues ont été appliqués à sa surface, à des distances déterminées (3 à 5 disques/boîte). Les boîtes sont incubées à température ambiante pendant 30 mn, ensuite dans une étuve à 37°C pendant 18 à 20 heures. La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée. Les valeurs sont comparées avec celles des références (Tableau : 01).

❖ Choix des antibiotiques

Dans chaque boîte d'antibiogramme, on a utilisé scinq (5) disques d'antibiotiques.

Le choix des antibiotiques a été fait en fonction de la disponibilité (Tableau : 01)[53].

Tableau 01 : Valeurs critiques des zones d'inhibition dues aux antibiotiques (CASFM, 2009)

Antibiotique	Les familles	Abréviation	Charge du disque	Diamètre critique	
				Sensibles	Résistants
Polymixine	polypeptides	PB	300µg	>2	≤ 2
Nitroxoline	Oxyquinoléines	NI	20 µg	≥30	<12
Métronidazole	Nitro- imidazoles	MTR	4 µg	-	<4
Sulfamide	Sulfamides	SSS	200µg	≥ 17	< 12
Lincomycine	lincomisides	L	10 µg	≥ 21	< 17

3-3-L'aromatogramme

❖ Principe

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de la croissance bactérienne des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné d'huile essentielle ou de produit à base d'huiles essentielles.

❖ Application

De la même manière que pour l'antibiogramme, une suspension de chaque germe utilisé a été préparée en eau distillée stérile et la surface de la gélose MH a étéensemencée par les inoculum bactériens, par la méthode d'écouvillonnage.

On a mis pour chaque géloseensemencée, 3 disques stériles de papier buvard de 6mm dont 2 sont imprégnés de l'huile essentielle de romarin et le dernier fait office de témoin.

NB : On a testé plusieurs disques imbibés d'HE essentielle pour confirmer l'effet antibactérien de cette huile.

❖ Lecture

La lecture des diamètres d'inhibition(D) se fait après 24-48 h d'incubation à l'étuve à 37 °C. Les résultats sont exprimés selon trois niveaux d'activité : résistant ($D < 6$ mm), intermédiaire ($13\text{mm} \geq D \geq 6$ mm) et sensible ($D > 13$ mm).

Pour chaque souche étudiée on a choisi le diamètre de la zone d'inhibition le plus important [54].

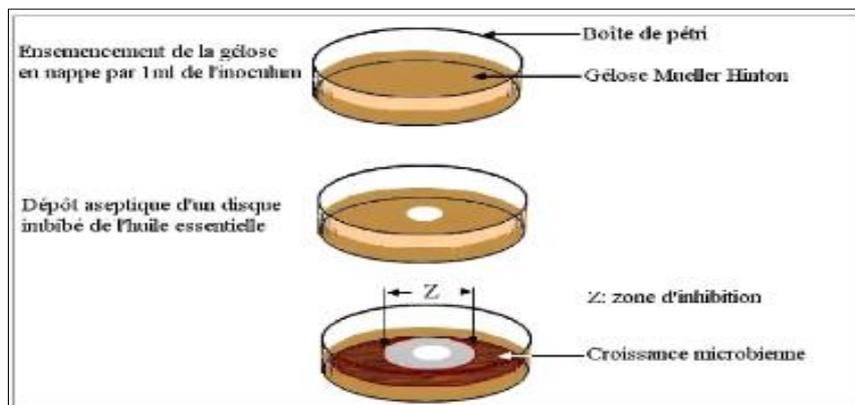


Figure 13 : Illustration de la méthode d'aromatogramme [31]

1-Les tests phytochimiques

Les tests phytochimiques sur la poudre de plante montre la présence de plusieurs principes actifs qui sont indiqués dans les figures (14, 15, 16, 17, 18, 19) et répertoriés dans le tableau suivant:

Tableau 02: Les principes actifs identifiés dans le romarin

Les principes actifs	Les saponosides	les alcaloïdes	les tanins	Les Stérols et terpènes	Les flavonoïdes	Les Mucilages
La poudre de plante	++	+	+++	+++	+++	+

+++ Forte présence

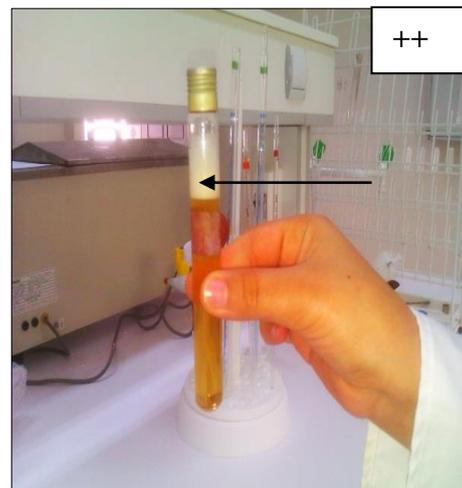
++ présence moyenne

+ faible présence

- **Les saponosides**



Avant



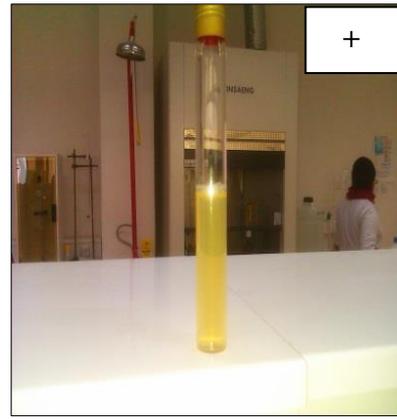
Après (++ présence moyenne)

Figure 14: Test d'identification des saponosides

- **Les alcaloïdes**



Avant



Après (+ faible présence)

Figure 15: Test d'identification des alcaloïdes.

- **Les tanins**



Avant



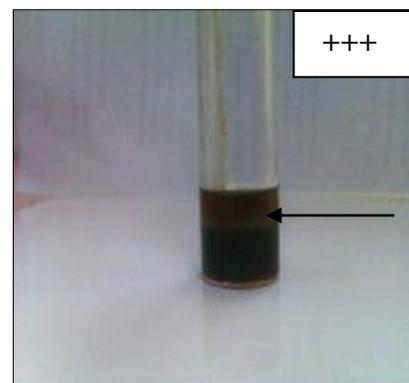
Après(+++ Forte présence)

Figure 16: Test d'identification des tanins.

- **Stérols et terpènes**



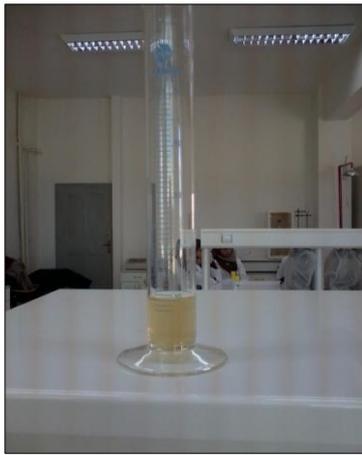
Avant



Après (+++ Forte présence)

Figure 17: Test d'identification des stérols et terpènes.

- **Les flavonoïdes**



Avant



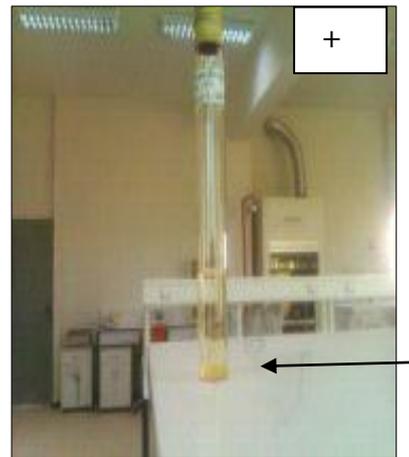
Après (+++ Forte présence)

Figure 18 : Test d'identification des flavonoïdes.

- **Mucilages**



Avant



Après (+ faible présence)

Figure 19: Test d'identification des Mucilages.

2- Rendement en huile essentielle

Nous rappelons que l'huile essentielle a été extraite des feuilles et des fleurs par un hydrodistillateur de type Clevenger (1928). Nous avons obtenu une huile de couleur jaune pâle avec une odeur aromatique assez prononcée. La quantité huileuse est plus ou moins satisfaisante avec un rendement voisin de 1,76%.

3-L'antibiogramme

Selon la sensibilité des 03 souches d'origine hospitalière, *E.coli*, *S.aureus* et *P.aeruginosa*, vis-à-vis des antibiotiques (Tableau3):

Nous avons remarqué que parmi les cinq antibiotiques utilisés (Polymixine, Nitroxoline, Metronidazole, Sulfamides et Lincomycine), deux antibiotiques (Polymixine, sulfamide), ont eu une importante activité antibactérienne contre *E. coli* avec des zones d'inhibition qui sont respectivement de 15mm et 23mm. Cette souche a développé également une sensibilité intermédiaire vis à vis de la Nitroxoline mais elle est résistante à deux antibiotiques (Lincomycine et Metronidazole)(Figure 20).

Parmi les cinq antibiotiques utilisés, *P.aeruginosa* n' a été sensible que vis à vis d'un seul antibiotique(Polymixine) avec un diamètre d'inhibition de 15mm. Cette bactérie est faiblement sensible au Sulfamide (diamètre de 12mm)(Figure 20).

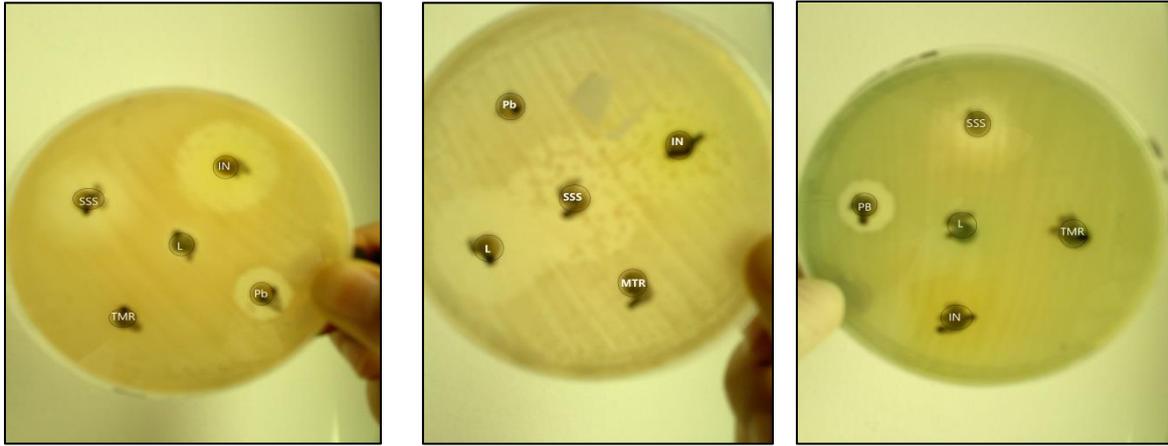
Les résultats de l'antibiogramme de *S. aureus* ont montré que sur cinq antibiotiques utilisés , la bactérie est résistance à deux (Polymixine, Metronidazole).Elle a une forte sensibilité pour le Sulfamide et la Lincomycine(29mm, 25mm) et a une sensibilité intermédiaire à la Nitroxoline(23mm)(Figure 20).

En comparant les résultats de l'antibiogramme, on peut conclure que toutes les souches utilisées possèdent un profile différent de sensibilité et de résistance aux antibiotique. Il est à noter que *P. aeruginosa* est la plus résistante d'entre toutes.

Le tableau 03 et la figure 20 présentent les résultats de la sensibilité des souches utilisées aux antibiotiques (l'antibiogramme).

Tableau 03: Sensibilité et résistance des souches aux antibiotiques (La zone d'inhibition)

Zone d'inhibition en mm	<i>E.coli</i>	Pb	Ni	Mt r	Sss	L
		15	26	/	23	9
	<i>P.aeruginosa</i>	Pb	Ni	Mt r	Sss	L
		15	/	/	12	/
	<i>S.aureus</i>	PB	NI	M TR	SSS	L
		/	23	/	29	25



Boite 01(*E. coli*)

Boite 02 (*S. aureus*)

Boite 03(*P. aeruginosa*)

Figure 20: Le profil de résistance aux antibiotiques des différentes souches étudiées.

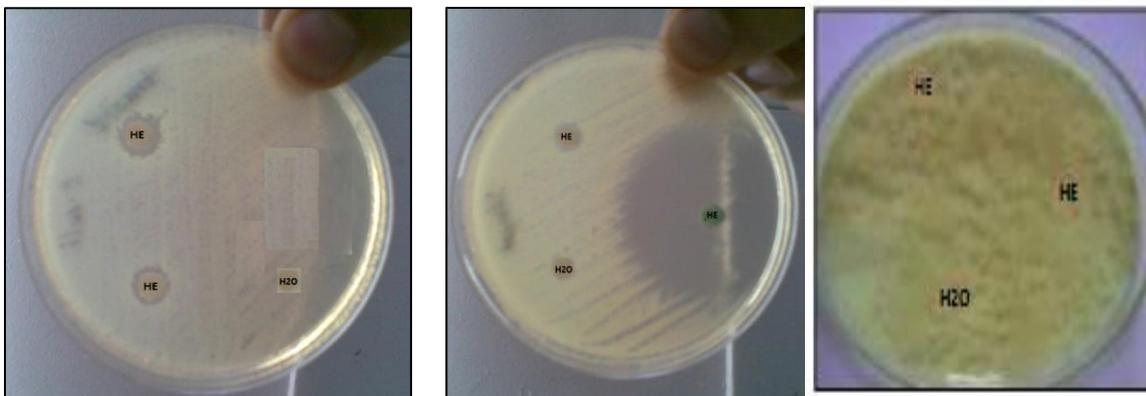
4-L'aromatogramme

l'effet des H.Es du romarin sur la croissance des souches bactériennes testées: *E. coli*, *S. aureus* et *P.aeruginosa* est représenté dans le tableau 04et la figure 21.

On remarque que *S.aureus* est plus sensible à l'huile essentielle du romarin (D=47 mm) qu'*E .coli* (D=8), tandis que *P. aeruginosa* est fortement résistante (D=0).

Tableau04 : La sensibilité des souches étudiées à l'huile essentielle de romarain.

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginos</i>
Diamètre d'inhibition en mm	8	47	/
Sensibilité	Intermédiaire	Sensible	Résistante



Boite 01(*E. coli*)

Boite 02 (*S. aureus*)

Boite 03(*P. aeruginosa*)

Figure 20: L'effet antibacterien de l'huile essentielle du romarain.

DISCUSSION

L'analyse des constituants phytochimiques du mélange (fleurs et feuilles) de *Rosmarinus officinalis*, montre que notre matériel végétal contient principalement des tanins, des flavonoïdes et des stérols et terpènes (Figure 14, 15,16, 17, 18, 19).

Le rendement en huile essentielle extraite par hydrodistillation a été de 1,76 %.

D'après Kelen et Teb (2008), ce rendement peut changer selon le choix de la période de récolte car elle est primordiale en terme de rendement et qualité de l'HE. Le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, la période de séchage et la méthode d'extraction employée, etc., sont des facteurs entre autres, qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement en HE [55].

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'HE brute de *Rosmarinus officinalis* a montré que:

Parmi toutes les souches testées, *Staphylococcus aureus* (Gram+) a été la plus sensible avec une très grande zone d'inhibition de 47mm. *E. coli* (Gram-) présente une faible sensibilité à cette huile avec une faible zone d'inhibition de 8 mm. Aucune zone d'inhibition autour des disques imbibés d'huile n'a été observée pour *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-). Cette bactérie possède un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne de l'HE de *Rosmarinus officinalis*.

On constate que l'HE de *Rosmarinus officinalis* possède un large spectre d'action (bactéries Gram+ et Gram-). Elle est plus efficace sur les bactéries à Gram+ que les bactéries à Gram-.Ce résultat concorde avec celui de Mebarki (2010), qui a étudié l'activité antibactérienne de l'HE du *Thym fontanesii* (famille des lamiacées) sur *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

D'après Kalembe and Kunicka (2003), la sensibilité d'un microorganisme aux HE dépend des propriétés de cette HE et du microorganisme lui-même. Il est bien connu que les bactéries à Gram+ sont plus sensibles aux HE que les bactéries à Gram-. Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des HE confirment ce phénomène. Le mécanisme d'action de ces huiles est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries à Gram+ et Gram- (présence d'une enveloppe externe hydrophile empêchant les substances hydrophobes telles que les HE de la traverser et arriver jusqu' à la membrane cytoplasmique pour la détruire). Les HE actives exercent leur pouvoir antimicrobien par leur interférence avec la bicouche lipidique de la cellule cible grâce à leur propriété hydrophobe, ce qui

entraîne une perturbation de la perméabilité et une perte des constituants de la cellule (lyse cellulaire) [56].

En comparant l'activité antibactérienne de l'HE du romarin avec celle de l'antibiogramme on remarque que:

Pour *E. Coli* : l'HE du romarin (diamètre de la zone d'inhibition=8mm) est plus active que le metronidazole (Absence de la zone d'inhibition). Mais les antibiotiques restants sont plus actifs que cette huile.

Pour *S. aureus*: l'HE (zone d'inhibition de 47mm) est plus active que tous les antibiotiques utilisés (la plus grande zone d'inhibition de l'antibiogramme est de 29mm pour le sulfamide).

Pour *P. aeruginosa*: l'action des antibiotiques est, légèrement meilleure que celle de l'HE. Cette dernière, n'a aucun effet sur la souche étudiée alors que deux antibiotiques sur cinq (Polymixine et Sulfamide) ont une action sur la souche étudiée [01].

En résumé, on conclut que l'HE du romarin peut rivaliser avec les antibiotiques. Le meilleur effet antibactérien de celle-ci est observé sur la souche *S. aureus* [30].

Conclusion

Les plantes médicinales constituent une source fiable de principes actifs ayant une multitude de propriétés thérapeutiques. Un grand nombre de plantes aromatiques représente une source de composés chimiques doués d'activité antimicrobienne.

Notre travail porte sur une espèce de la famille des lamiacées: le *Rosmarinus officinalis*. Largement répandue en Algérie, le genre *Rosmarinus* a fait l'objet d'un grand nombre d'études.

Les études phytochimiques menées sur cette plante ont montré qu'elle contenait principalement : des tanins, des flavonoïdes, des stérols et terpènes.

L'extraction de l'huile essentielle de la plante a été réalisée par hydrodistillation. Le rendement a été de 1.76%.

L'étude de l'activité antibactérienne de notre huile essentielle vis-à-vis des bactéries Gram positif et Gram négatif montre que cette dernière est plus efficace contre le *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 - Gram+) que *Escherichia coli* (ATCC 25922 - Gram-) Mais aucun effet antibactérien vis-à-vis de *P.aeruginosa* (ATCC 27853-Gram -) n'a été enregistré.

Il a été remarqué également que l'HE de romarin est plus efficace que les antibiotiques principalement, pour la souche *S. aureus*.

Perspectives

Ce travail a permis de mettre en évidence, les propriétés antibactériennes de l'HE. Il est intéressant d'envisager dans un proche avenir de:

- Déterminer par CPG couplée à la spectrométrie de masse, les différents composants de l'HE du romarin.
- Purifier le ou les principes actifs de cette HE.
- Tester l'effet antibactérien de ces principes individuellement ou leur combinaison.
- Mettre en évidence les mécanismes d'action des principes actifs.
- Élargir l'échantillonnage (utiliser plus de souches bactériennes) et refaire les tests de l'activité antibactérienne.
- Utiliser d'autres méthodes de l'aromatogramme.
- Utiliser des dilutions de l'HE dans les tests de l'activité antibactérienne.
- Calculer la CMI et la CMB.

- Tester *in vivo* l'action des HE, sur les maladies infectieuses (rats malades par ex).

Références bibliographiques

- [01] **Hallal Z**, Contribution à l'étude des propriétés antibactérienne et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des citrus, Application à la sardine. Magister de biologie : Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 120p. 65-66p. 2011.
- [02] **Mebarki N**. Extraction de l'huile essentielle de thymus et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Thèse de magister Génie des procédés chimiques et pharmaceutique. Boumerdes : Université M'hamed Bougara. 2010, p185.
- [03] **Mohhamdi Z**. Etude de pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de l'obtention de MAGISTRE : Université Abou Bakr Belkaid, 2006, 115P.
- [04] **Hachemie O., Ruis**, microbiologie clinique, édition d'office des publications universitaires, 173P, 2002.
- [05] **Precott., Harley., Klein., Wiley., Sherwood et Woolverton**, microbiologie, debook, Paris, 1088p, 2010.
- [06] **Baltimore., Berk., Darnell., Lodish et Matudaira**, Biologie Moléculaire de la cellule, Paris, 1344p, De Boeck, 2000.
- [07] **Gerald**, Biologie cellulaire et moléculaire, De Boeck. Maloine. 850P, 2004.
- [08] **Nicklin J., Gramecook K., Paget T et Killington R**, l'essentiel en microbiologie, BERTI, Paris, 365P, 2000.
- [09] **Abd Elali M., Benzine-Challam H., Amadou D.**, cytologie et physiologie cellulaire. Office des publications universitaires, P 120, 1999.
- [10] **Benzeggouta N**. Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments. L'Obtention du Diplôme de Magister en Pharmacochimie : Université Mentouri de Constantine, 2005, 153p.
- [11] **Singloeton P**, Bactériologie, Doin, Paris, 345P, 1999
- [12] **Vimont A**, Optimisation de la recherche des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), 2007, 318p.
- [13] Groupe scientifique sur l'eau, *Escherichia coli*, Fiche, Institut national de santé publique, Québec, 4p, 2003.
- [14] Aucié CN, Vilde JL (2005) bactériologie médicale. Masson. Paris, 257P.
- [15] **Truan, Grimont F**, Caractérisation moléculaire des *Escherichia coli* O111 Et diversité

des souches isolées en France, Rapport de stage, Unité Biodiversité Bactéries Pathogènes Emergentes, 44p ,2004.

[16] **Chaibdraa A., Medjellekh M.S., Saouli A., et Bentakouk M.C,** Le Pseudomonas, PMCID, 21(4), 210-218,2008.

[17] **Saint J., Besançon C.,** GDR PSEUDOMONAS .GROUPEMENT DE RECHERCHE. C ENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. Faculté de Médecine,73p, 2011.

[18] **Auckenthaler R., Bergogne-Berezin B., Dellamonica P,**Antibiothérapie en pratique clinique. Masson, 496 p, 1995.

[19] **Clive P.page., Michael J., Curtis Morley C., Sutter, Michael J., Walker,Brian B., Hoffman ,**Pharmacologie intégrée, De Boeck Université. Paris, Bruxelles. 420 p. 1999.

[20] **Chantal B, Huguette B ,**Microbiologie Immunologie.Porphyre.France.123 p.2006.

[21] **Pourriat J L., Claude Martin .,** Principes de réanimation chirurgicale.Arnette.France. 1425 p. 2005.

[22] **Benouda A., Tagajdida M R.,** Antibiogramme : choix, interprétation et limites, les technologies de laboratoire, (V3), p 10,2008.

[23] **Amhis W., Benslimane A., Tiouit D., Naim M.,** test de sensibilité utilise aux traitements antibiotique, Médecine du Maghreb, (v3):p 22-25,2001.

[24] **Peyrou M,** antibiorésistance bactérienne des souches d'origine équine : étude bibliographique, L'HOPITAL VÉTÉRINAIRE DE ST-HYACINTHE)Toulouse, page :27, 2001.

[25] **Ghabiche S,** La phytothérapie, Certificat Thalasso-thérapie, Ecole supérieure des sciences et techniques de la santé, Sousse, 7 p, 2009.

[26] **Ragot M.,** Conversion à l'agriculture biologique: le cas de la production laitière.Educagri.347 pages.

[27] **Zeghad S.,** Etude de contenu polyPhénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économiques (Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis) et évaluation de leur activité antibactérienne, Biotechnologie végétale, Constantine, UniversitéMentouri ,2009.

[28] **Bruneton J.,** Pharmacognosie Phytochimie, Plantes médicinales. Tec & Doc Lavoisier, Paris, 1120, 1999

[29] **Hans W,**1000plantes aromatiques et médicinales, terres édition, France.336 p. 2007.

[30] **Boudjemaa N.,Ben guesa H.L'**effet Antibactérien de Nigella sativa.Mémoire d'ingénieur.Université Kasdi merbeh-Ouargla.Algerie.60p,2010.

[31] **Paul iserin ,** L'arouse encyclopédie des plantes médicinales ,Paris.335p,2001.

[32] **Boukhris M A**, Activites larvicides des extraits de plantes sur les larves de moustiques vecteurs de maladies parasitaires, sciences et techniques, Fès : Faculté des sciences et techniques, 2009,80p.

[33] **Ben Ayad N**, Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Laboratoire des Substances Naturelles et Thermolyse Eclair : Université Mohammed V – Agdal, 2008,59p.

[34] **Duval L**, Les Huiles Essentielles, Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. U.F.R.Médecine-Pharmacie de ROUEN, 2012,153p.

[35] **Boubricit S., Boussad N**, Détermination "in vitro" du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée, Biologie et Médecin, Tizi-ouzou : Université Mouloud Mammeri, 2007

[36] **Géraldine GIRARD**. les propriétés des Huiles Essentielles dans les soins Bucco-Dentaires d'aujourd'hui. Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. université Henri Poincaré Nancy-1, 2010,100p.

[37] **Rahayour K**. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium*, thèse de doctorat national, université : Sidi Mohammed ben Abdellah. Faculté des sciences, Dar Mehraz. Fès. 2002,212P.

[38] **BELOUED abd el kadar**, Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires. 203p,2001.

[39] **Hoffler C**, Contribution à l'étude pharmacologique des extraits de *Rosmarinus officinalis* L., et notamment des jeunes pousses : activités cholérétiques, anti-hépatotoxiques, anti-inflammatoires et diurétiques, obtenir le diplôme de doctorat, Université de Metz, 1994,170p.

[40] **Benoît B**, *Rosmarinus officinalis* L, BDNFF, v(4),02p.2013

[41] **Bérence R S., Goetz P., Paris M**, Les plantes médicinales. sélection du reaper's digest, Paris,235p, 2000

[42] **Zermane A**. étude de l'extraction super critique application au système agroalimentaire, diplôme de doctorat, Constantine. Université Mentouri, 14/06/2010.148p

[43] **Brunton J**, Romarin (*Rosmarinus officinalis*), institut européen des substances végétales, (v2), 249-250p, 1999

[44] **Zhiri A., Baudoux D**, huiles essentielles chymotypées et leurs synergies, ISBN, v(4), p6-8, 2006.

[45] **Blanc M.** Propriétés et usage médical des produits de la ruche .pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. universite de limoges , 2010,144p.

[46] **Kabouche A** , Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae. Diplôme de Doctorat d'état en chimie, Université Mentouri-Constantine, 2005,385 p.

[47] **Jhonson I**, antioxydants et anticancéreux, Biofutur, v(186): 14-15, 1999.

[48] **Merghache S., Hamza M et Tabti B.**, Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta Chalepensis* L, Algérie. *Afrique SCIENCE Tlemcen*, 05(1).67 – 81p.2009

[49] **Karumi Y., Oneyjili P A., Ougbuaja V O.**, identification of active principles of *M. balsamina* (balsam apple) leaf extract. *J Med Sci* 4 : 179- 182p.2004

[50] **Dohou N., Yamni K., Tahrouch S**, Screening phytochimique d'une plante endémique Ibéro-marocaine, *Thymelaeoalcyonoides*. *Bull Soc Pharm. Bordeaux* 142 : 61-87 p.

[51] **Okmu D E**, Vitamins and mineral contents of two Nigerian medicinal plants. *Int J Mol Adv Sci* 1: 375-381p.2005.

[52] **Adiaratou T** , etude de la phytochimie et de l'activité antipalodique de *Alchornea cordifolia* Schmach (Euphobiaceae), Doctorat en pharmacie, Bamako (Mali), p 42 , 2001.

[53] **Boukhatem MN., Haidia MS., Saidi F et Hakim Y**, Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature & Technologie*, (V2) 38-45p, 2006

[54] **Roques C**, Détermination de CMI et QMI des produits air pharma sur des souches bactérienne multirésistante, rapport de stage, Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Microbiologie Industrielle, Toulouse, 10 p, 2003.

[55] **Kellen M., Tepe B**, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three saliva species from Turkish Flora. *Bioresource technology*. 99.4096-4104p, 2008

[56] **KALEMBA and KUNICKA**. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*. 10.8012-829p, 2003.

Sites Web :

[57] Anonyme

Site : membres.multimania.fr/boudyachhassan/Site_microbiologie/cours_imprimable.pdf.

(consulter le : 15/01/2013)

[58] Glossaire de bactériologie. Concentration minimale bactéricide.

<http://www.microbe-edu.org/glossaire/detail.cfm?cle=11>. (consulter le : 18/01/2013)

[59] Anonyme :

Site : http://www.microcsb.net/IMG/pdf/DETERMINATION_DE_LA_CMB.pdf. (Consulter le 16/01/2013)

[60] Anonyme :

tarot.amateur.free.fr/Pageverte/Romarin.pdf (consulter le : 28/02/2013)

Annexe :

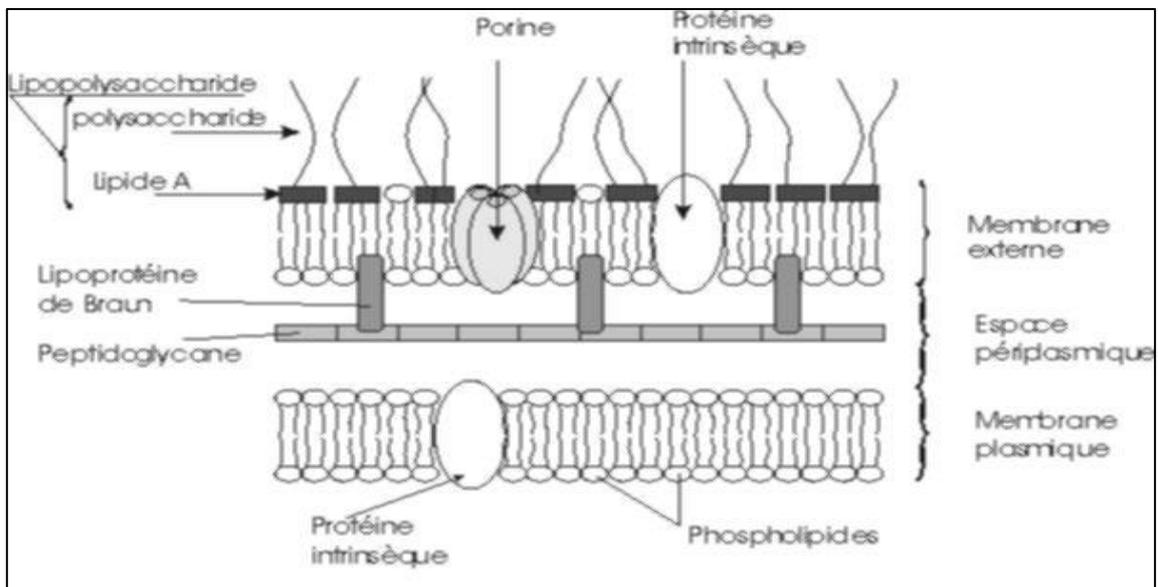


Figure 01 : la paroi des bactéries gram négatif

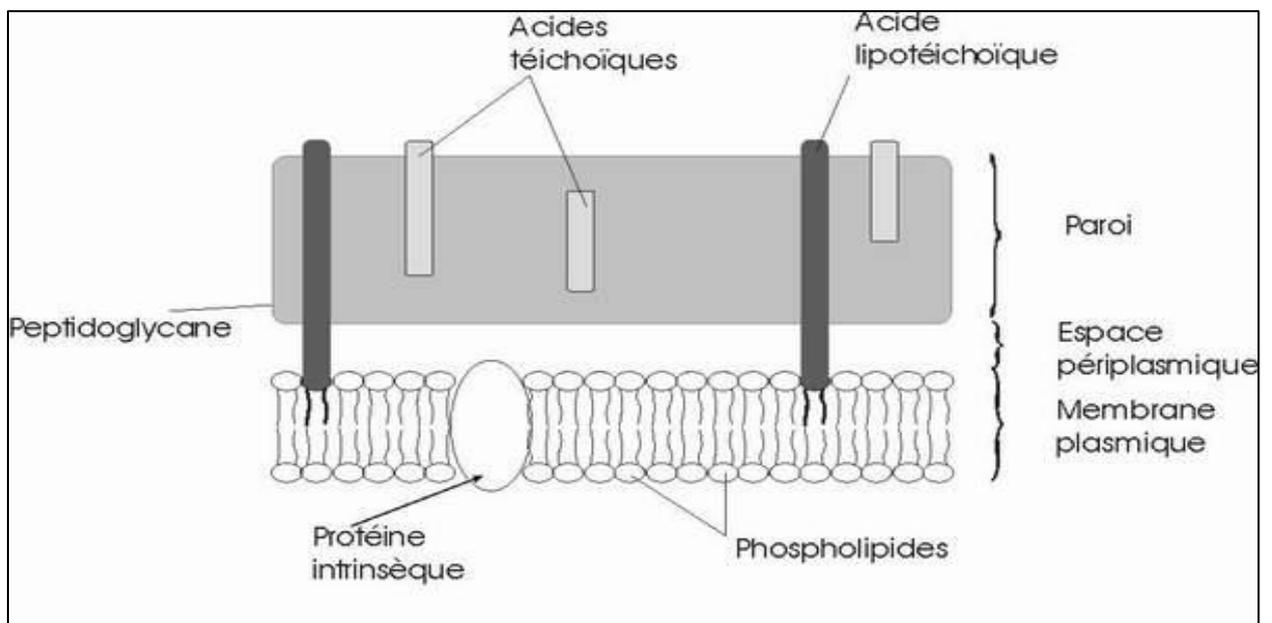


Figure 02 : la paroi des bactéries gram positif

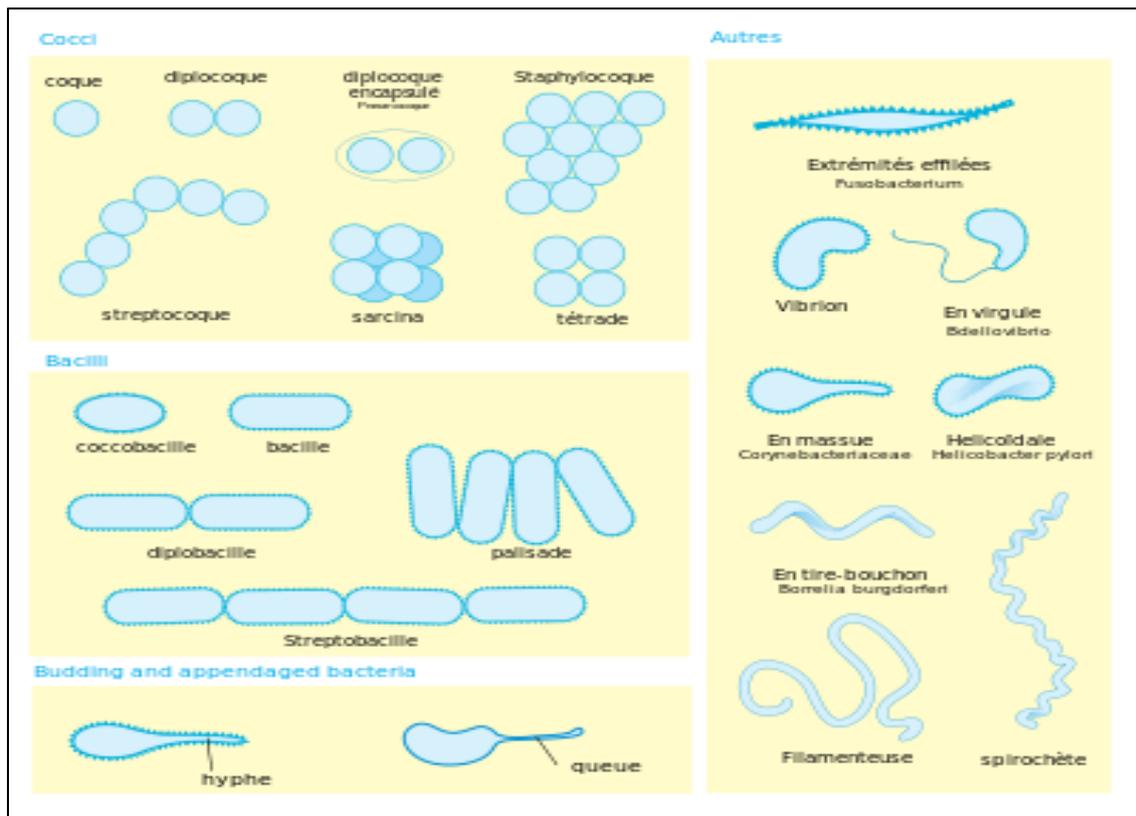


Figure 03 : Les différentes formes des bactéries

Milieux de culture

Préparation pour 1 litre

Gélose nutritive (GN)

Extrait de viande de bœuf	1g
Extrait de levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g

pH =7.2 pour devient liquide autoclave pendant 20 min

Gélose de MacConckey

Peptone bactériologique.....	20g
Sels biliaires.....	1.5g
Chlorure de sodium.....	5g
Lactose.....	10g
Rouge neutre.....	0.03g
Cristal violet.....	0.001g
Agar.....	15g

pH =7.1 pour devient liquide autoclave pendant 20 min

Gélose King A

Peptone de viande.....20g
Glycérol (glycérine).....100ml
Potassium sulfate1.5g
Agar.....20g

pH =7.2 pour devient liquide autoclave pendant 20 min

Gélose Chapman

Extrait de viande.....1g
Extrait de levure.....3g
Tryptone.....5g
Peptone bactériologique.....10g
Chlorure de sodium.....70g
Mannitol10g
Rouge de phénol.....0.025g
Agar.....15g

pH =7.4 pour devient liquide autoclave pendant 20 min

Mueller Hinton (Gélose)

La préparation de 500ml de Mueller Hinton

Mueller Hinton déshydraté19g

L'eau distillée 500ml

Agitation son température puis autoclave pendant 20 min

2eme Agitation son température puis autoclave pendant 20 min

pH =7.2 pour devient liquide autoclave pendant 20 min

Eau physiologique 9 % (NaCl)

Sodium chloride9g

H2O déminéralisée1000ml

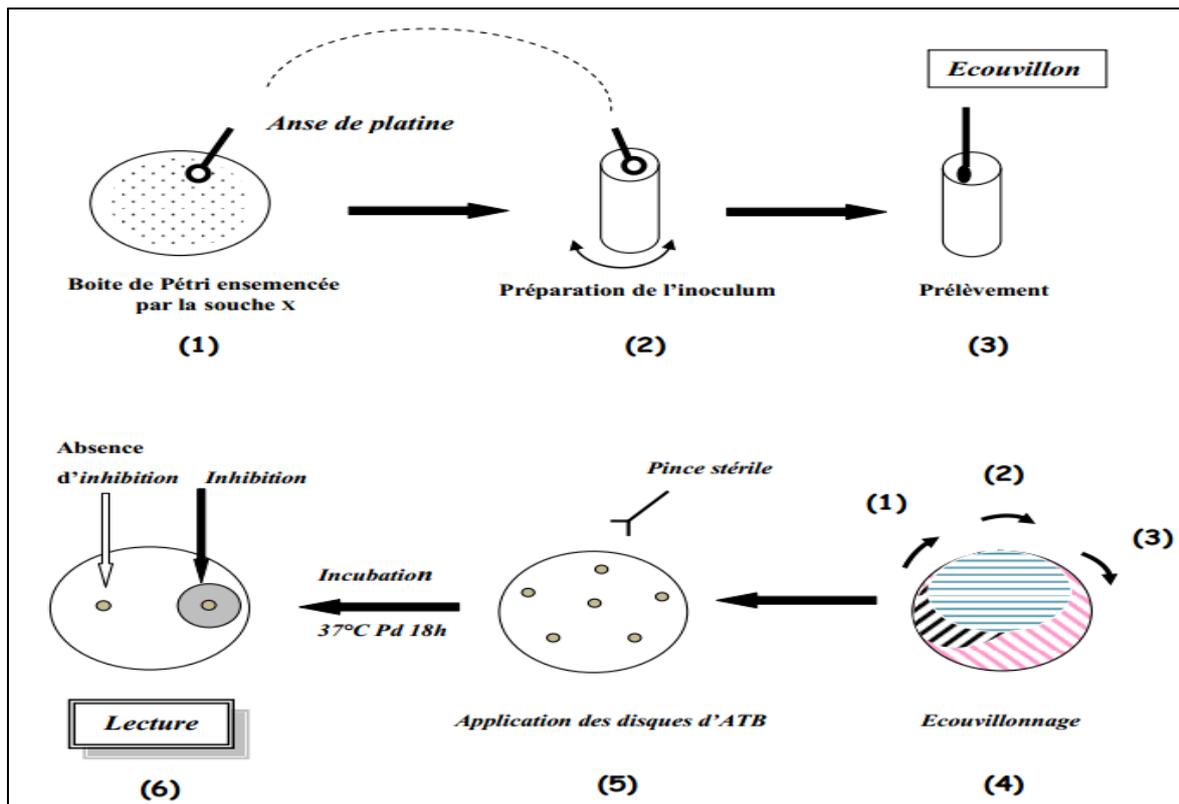


Figure 04 : Protocol de la méthode de diffusion sur disque