République Algérienne Démocratique Et Populaire Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique Université de Jijel Faculté des Sciences Département de Biochimie- Microbiologie Memoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme des études supérieures en Biologie Option: Microbiologie Thème: et l'extrait de la plante médicinale Rosmarinus officinalis L in vitro

Etude de l'interaction entre les antibiotiques



Membres du Jury:

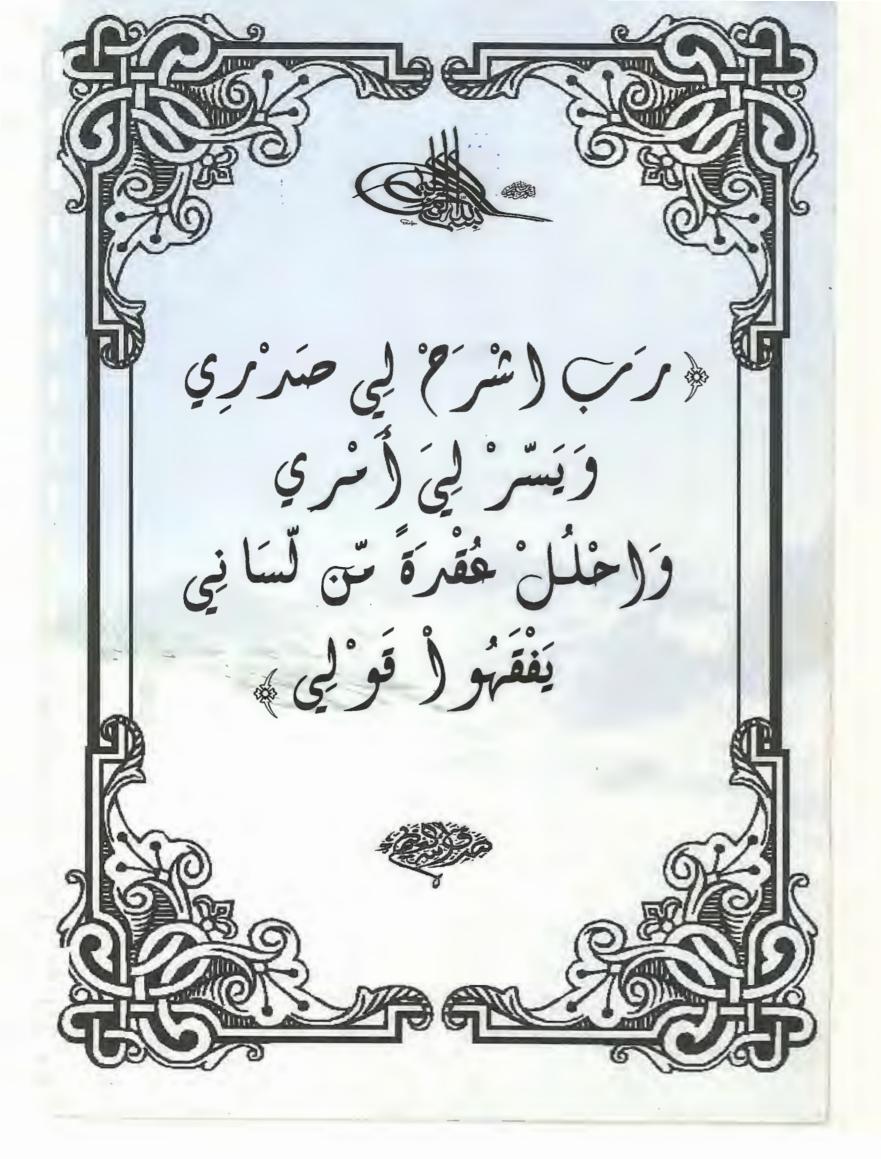
Encadreur:

Mme ROULA Sagia Président:

Examinateur: Mr BOUDJERDA Djamel Mme BENHAMADA Wahiba Réalisé Par :

BOUKERRIA Sabira OULDZEMARA Samia HAMIDA Sara

Promotion 2006





Tous nos remerciement vont tout premièrement à dieu tout puissant pour la volonté et la patience qu'il nous à donné pour terminer ce mémoire.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre sincère remerciement et notre profonde gratitude à M^{me} BENHAMADA Wahiba, notre encadreur qui n'a jamais cessé de nous témoigner et de nous prodiguer, ses précieux conseils.

Nous remercions aussi:

- ◆ M^{elle} Siham AZZOUZA et M^{er} TALEB SLIMEN Abd errahmen qui nos aide pour taper ce mémoire.
- ♦ tous les personnels du laboratoire d'hygiène de jijel.
- ♦ M^{elle} Amina BOUZIENE et M^{elle} Lylia pour son aide dans notre travail pratique.
- ♦ Tous les responsables de laboratoire de biologie
- ♦ Les enseignants du primaire jusqu'à le lycée et tous les enseignants de la biologie du première jusqu'à la quatrième année universitaire.
- ♦ Nous remercions les membres des jurys qui nous ont fait l'honneur de juger notre travail.

Samia Sabra Sara

SOMMAIRE

Sommaire

Introduction Analyse bibliographique

page

	HAPITREI: La plante médicinale: Rosmarinus officinalis L.	
	I- Généralités sur les plantes médicinales	2
	II- La plante médicinale : Rosmarinus officinalis L.	3
	II-1-Historique.	
	II-2-Caractère morphologique.	3
	II-3-Habitat.	
	II-4-Systématique de la plante.	
	II-5-Propriétés de la plante et utilisation.	5
	II-6-Principes actif élaboré par Rosmarinus officinalis L.	6
_	II-6-1-Les flavonoïdes.	
	II-6-1-1-Définition et découverte.	
	II-6-1-2-Localisation et origine des flavonoïdes.	7
	II-6-1-3-Structure et classification.	
	II-6-1-4-Biosynthèse des flavonoïdes.	10
	II-6-1-5-Les activités des flavonoïdes.	
	II-6-2-les terpènes.	13
	II-6-2-1- Définition.	
	II-6-2-2-Classification des terpènes.	13
	II-6-2-3-Rôles des terpènes.	
å	II-6-3-Les huiles essentielles.	
	II-6-3-1- Définition	16
	II-6-3-2-La répartition.	16
	II-6-3-3-Localisation.	17
	II-6-3-4-Formation	17
	11-6-3-5-Rôles et intérêt thérapeutique des huiles essentielles	17
	11-6-3-6-Composition chimique des huiles essentielles.	19
C	HAPITRE II: Les antibiotiques	
	I-Généralités sur les antibiotiques.	21
	I-1-Historique	
	I-2- Définition.	
	I-3-Origine des antibiotiques.	21
	II- Classification et structure des antibiotiques.	
	II-1- Classification.	
	II-2- Structure chimiques des antibiotiques	
	III- Mode d'action des antibiotiques.	
	III-1-Action sur la paroi bactérienne.	
	III-2- Action sur la membrane cytoplasmique.	26
	III-3- Action sur la synthèse protéique.	26
	III-4- Action sur les acides nucléiques.	
	-	

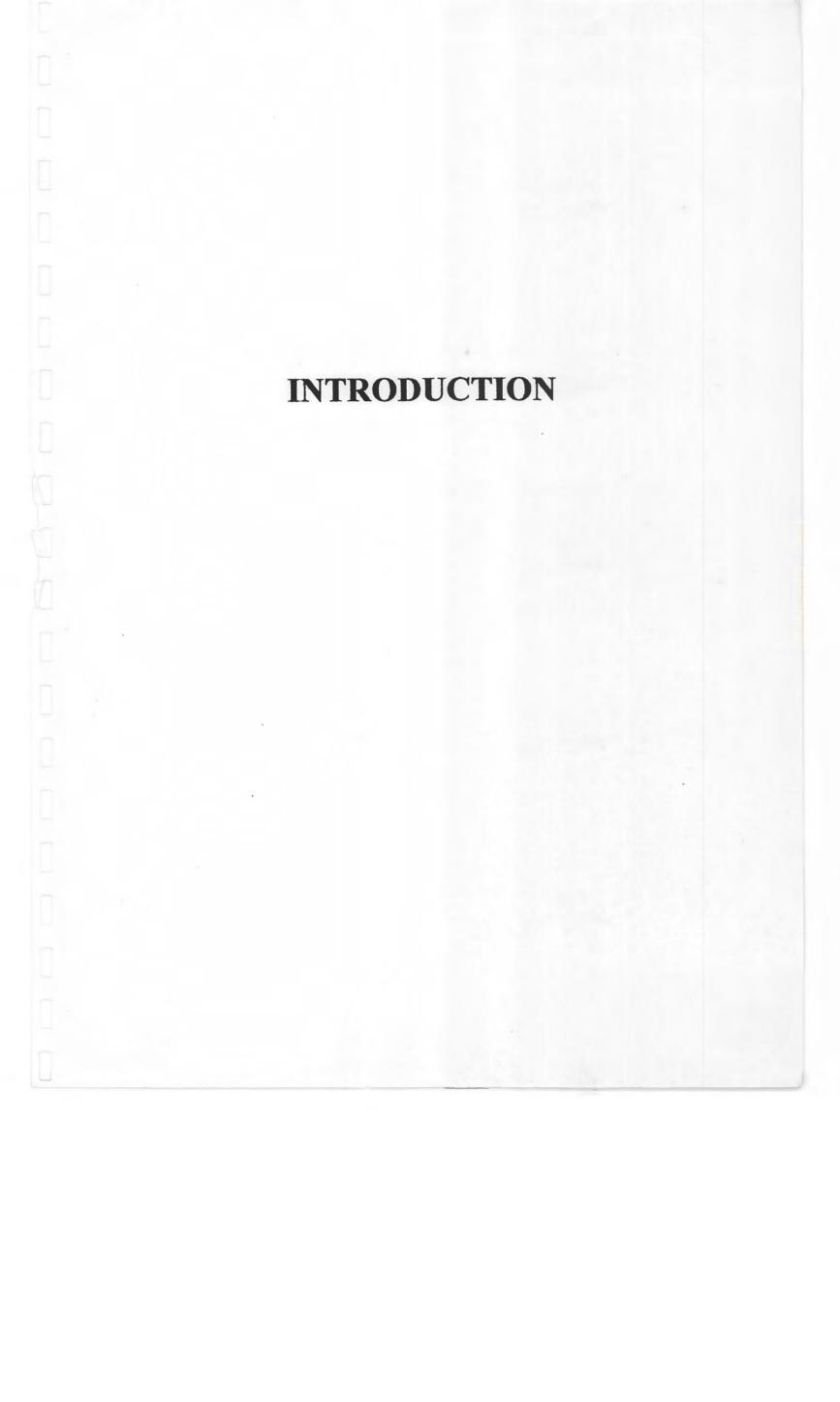
III-5- Action par inhibition compétitive (antimétabolites).	
IV -La sensibilité aux antibiotiques	
V- La résistance aux antibiotiques.	
V-1- Origine de la résistance aux antibiotiques.	
V-2-Mécanismes de résistance aux antibiotiques	
VI- Traitement des infections.	31
CHAPITRE III: Généralités sur les bactéries.	
I- Définition.	
II-Les bacilles Gram négatif	.32
II-1-Caractères généraux	, 32
II-2-Habitat et pouvoir pathogène.	. 32
II-3-Caractères culturaux.	. 32
a- Escherichia coli	. 33
b- Salmonella.	
III-Cocci Gram positif.	
a- Staphylocoque.	
b- Streptocoque.	, 36
Partie pratique.	
Matériel et méthodes.	
I- Objectif.	. 37
II-Matériel.	37
III- Méthodes.	. 37
III-1-Méthode d'extraction.	37
III-2-Identification des bactéries.	39
III-3- Préparation des dilutions	42
III-4- Préparation des suspensions bactériennes	. 43
III-5-Activité antibactérienne par diffusion sur milieu gélosé	.45
III-5-1- Milieu.	
III-5-2-Préparation des disques.	
III-5-3-Ensemencement.	
III-6- Antibiogramme.	. 46
Résultats et interprétation	
I- Résultats d'identification de la souche bactérienne	. 47
II- Résultats de la diffusion sur milieu gélosé	47
II-1-Les bacilles Gram négatif	47
II-2-Les cocci Gram positif.	
III-Résultats de l'antibiogramme.	
III-1- Les bacilles Gram négatif	
III-2- Les cocci Gram positif	. 61
Discussion	
Conclusion	. 67
Annexe	
Réferences bibliographiques	
Travar aman navaraby whiridian	

Liste des Tableaux

Tableau N°	Titre du Tableau	Page
1	Classification des flavonoïdes.	08
. 2	Classification des terpènes	14
3	Classification des antibiotiques selon leurs structures chimiques, leurs sites et leurs modes d'action sur les bactéries	23
4	Choix d'antibiotique suivant l'agent infectieux	28
5	Les différentes dilutions de la solution mère	42
6	Résultats de la galerie biochimique d'Escherichia coli	47
7	Zones d'inhibition en mm de la souche d'Escherichia coli traitée par différents extraits	
8	Zones d'inhibition en mm de la souche Salmonella traitée par différents extraits	49
9	Zones d'inhibition en mm de la souche Streptocoque traitée par différents extraits	51
10	Zones d'inhibition en mm de la souche Staphylococcus aureus traitée par différents extraits	53
11	Staphylococcus aureus traitée par différents extraits Variation des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'association de différentes phases de l'extrait avec	
12	Variation des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'association de différentes phases de l'extrait avec les antibiotiques sur la souche bactérienne Salmonella	59
13	Variation des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'association de différentes phases de l'extrait avec les antibiotiques sur la souche bactérienne Streptocoque	61
14	Variation des diamètres des zones d'inhibition en mm de l'association de différentes phases de l'extrait avec les antibiotiques sur la souche bactérienne Staphylococcus aureus	63

Liste des figures

Figures N°=	Titre du figure	Page	
1	Rosmarinus officinalis L	04	
2	Les principes actifs élaborés par la plante médicinale	06	
	Rosmarinus officinalis L		
3	Structure générale des flavonoides	08	
4	Biosynthèse des flavonoïdes	11	
5	Le squelette de base des terpènes (Isoprène)	13	
6	Formule chimique des terpènes	15	
7	Structure chimique des différentes familles des	25	
	antibiotiques		
8	Mode d'action des antibiotiques sur les bactéries	27	
9	Les principales modalités de résistance aux	30	
	antibiotiques		
10	Les différentes dilutions de la solution mère	44	
11	Zones d'inhibition d'Escherichia coli traitée par les	48	
	différents extraits		
12	Zones d'inhibition de Salmonella traitée par les	50	
12	différents extraits		
13	Zones d'inhibition de streptocoque traitée par les	52	
13	différents extraits		
14	Zones d'inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> traitée	54	
1-4	par les différents extraits		
15	Histogramme représentant l'activité antibactérienne	55	
	des concentrations les plus efficaces des trois extraits		
	Histogramme représentant l'étude de l'activité des		
16	extraits de la plante associés avec les antibiotiques	56	
	sur la souche Escherichia coli		
17	Variation de la sensibilité d'Escherichia coli aux	58	
	extraits de la plante associés avec les antibiotiques		
	Histogramme représentant l'étude de l'activité des		
18	extraits de la plante associés avec les antibiotiques	59	
	sur la souche Salmonella		
19	Variation de la sensibilité de Salmonella aux extraits	60	
	de la plante associés avec les antibiotiques		
	Histogramme représentant l'étude de l'activité des	<i>C</i> 1	
20	extraits de la plante associés avec les antibiotiques	61	
	sur la souche Streptocoque		
21	Variation de la sensibilité de Streptocoque aux	62	
	extraits de la plante associés avec les antibiotiques		
	Histogramme représentant l'étude de l'activité des		
22	extraits de la plante associés avec les antibiotiques	63	
	sur la souche Staphylococcus aureus		
-	Variation de la sensibilité de Staphylococcus aureus		
23	aux extraits de la plante associés avec les	64	
	antibiotiques		



Introduction

De puis longtemps, la vie de l'homme à été étroitement lié au monde des plantes, ces dernières ont été utilisées comme source de nutrition, mais également dans la composition de produit de bien être et de médications familiales, le plus souvent conseillés par le pharmacien d'officine. Malgré le développement de la chimie thérapeutique, l'utilisation des plantes médicinales a conservé une large place, du fait de leurs efficacités dans les divers procédures thérapeutiques grâce aux principes actifs qu'elles renferment, parmi les quels; les flavonoïdes, les alcaloïdes, les terpènes....Ces composés peuvent augmenter l'efficacité de certains composés médicales utilisés dans le traitement de certaines infections; ces composés sont appelé: antibiotiques. Ces dernières appar aient de nos jours comme des médicaments banaux, mais la spécificité antibactérienne explique l'échec de ces molécules contre les infections non bactériennes (fongiques, parasitaires, virales). Devant ce problème, les chercheurs ont dirigés leurs travaux vers l'association des antibiotiques avec d'autres métabolites secondaires des plantes médicinales pour augmenter l'effet chimiothérapeutique des antibiotiques.

Notre travail consiste a l'extraction des principaux principes actifs de la plante *Rosmarinus* officinalis L, de déterminer le CMI de chaque extrait et d'étudier l'association de cette CMI avec quelques antibiotiques contre diverses souches bactériennes.

ANALYSE

BIBLIOGRAPHIQUE

II-La plante médicinale : Rosmarinus officinalis L

II-1-Historique

On ne saura jamais si c'est à un ermite féru de botanique ou à un ange envoyé par le ciel qu'on doit la recette de la fameuse "eau de la Reine de Hongrie", que tant de femmes ont rêvé de faire figurer dans l'arsenal secret de leur beauté, mais que l'on soit avec certitude, c'est que l'élément principal en est le romarin.

Si la merveilleuse cure de Donna IZABELLA a "lancé" le romarin, celui-ci n'étant portant pas un inconnu pour les romains, il était une herbe sacré qui portait bonheur aux vivants et assurait aux morts un séjour paisible dans l'au de là, ils coiffaient pour certaines fêtes et en faisaient brûler aussi dans les cérémonies religieuses en guise d'encens.

Ce pendant cela ne l'empêchait pas d'être largement utilisé en cuisine et en médecine. (Site A).

II-2-Caractères morphologiques

Le romarin est un arbrisseau toujours vert touffu et ligneux, atteignant 2m de haut, dont l'écorce s'écaille sur les branches les plus âgées. Les rameaux velus portent des feuilles lancéolées, épaisses, cariaces, la face supérieure est verte, l'inférieure grisâtre - mâte. Les fleurs sont le plus souvent de couleur bleu pale maculées intérieurement de violets groupés par 2 à 10 aux verticilles des feuilles (BELOUED., 1998). Le fruit, ovoïde est entouré par un calice persistant (figure 1). (Site A).

II-3-Habitat

Le romarin se trouve dans toutes les contrées méridionales de l'Europe, de préférence dans les lieux secs et arides, exposées au soleil. (Site A).

La drogue est importée d'Espagne, du Maroc, de Tunisie, et de l'Europe du Sud-Est (WICHTL., 1999).

La multiplication se réalise par semis des grains, boutures, ou division des pieds, à l'automne ou au printemps, plusieurs récoltes peuvent se faire, dés le printemps, en moi de juillet et septembre.

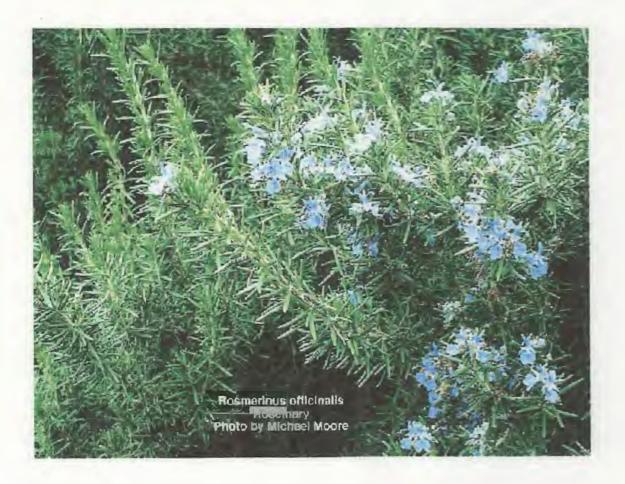




Figure (1): Rosmarinus officinalis L (Site A)

II-4-Systématique de la plante

Embranchement Spermaphytes (phanérogames).

Espèce Rosmarinus officinalis L.

Noms vernaculaires: Klil, hatssa Louban, hassalban, Lazir, Aziir, ouzbir, aklel, Louzala.

Nom botanique: Rosmarinus officinalis L (BELOUED., 1998)

II-5-Propriétés de la plante et utilisation

Odeur: Très aromatique, presque camphrée, rappelant un peu l'encens.

Saveur: âpre et aromatique, amère, un peu piquante (MAHMOUDI).

Rosmarinus officinalis L a des propriétés intéressantes dans plusieurs domaines grâce a leur diversité en composés chimiques élaborés par cette plante

*Antiseptique

Grâce à leur teneur en huile essentielle, elle est conseillée en cas de fatigue intellectuelle, elle réveille la mémoire et favorise la concentration. Excellente anti-inflammatoire et antiseptique (AUDI., 1993).

*Antispasmodique

Le romarin calme les spasmes d'origine digestive par son action spasmolytique, les intestins et l'estomac, par son effet relaxant sur les muscles lisses de système respiratoire. Elle calme aussi la toux et contribue au confort de l'asthmatique (Site A).

*Stimulant physique

Les feuilles de romarin renferment une huile essentiel à la quelle il doit ses propriétés intéressantessur le système digestif :le romarin stimule le fonctionnement de la vésicule biliaire. Il est indiqué à ce titre dans l'insuffisance hépatique et en cas d'inflammation chronique de la vésicule (Site A).

*Antivirale

Notamment pour le carnosol, cytotoxique et antitumorale (WICHTL., 1999).

*Autres usages

•En médecine traditionnelle : la drogue est utilisée en compresses pour éviter les retards de cicatrisation et l'eczéma et d'une façon générale, comme insecticide (WICHTL., 1999).

•En agroalimentaire, la drogue est très utilisée comme conservateur et antioxydant, pour la conservation de la viande et des graisses (WICHTL., 1999).

II-6-Principes actifs élaboré par Rosmarinus officinalis L:

- *Huile essentielle: la teneur comprendre 1 à 2,5%.
- *Diterpènes phénoliques tricycliques: acide carnosolique 0,35%.
- *Tanins des labiatées: acide phénol, environ 3%.
- *Flavones méthylées (genkwanine, lutéoline, diosmétique) et leurs hetérosides (phégopoline).
- *Triterpénes et stéroïdes : environ 10% d'acide olianolique et 5% de dérivés de l'acide ursolique.
 - *Lipides de la cuticule cireuse des jeunes feuilles: n-alkanes 97%.
 - * Polysaccharides: environ 6% (WICHTL.,1999).

Le schéma ce dissous représente les principes actifs élaborés par la plante médicinale Rosmorinus officinalis L.

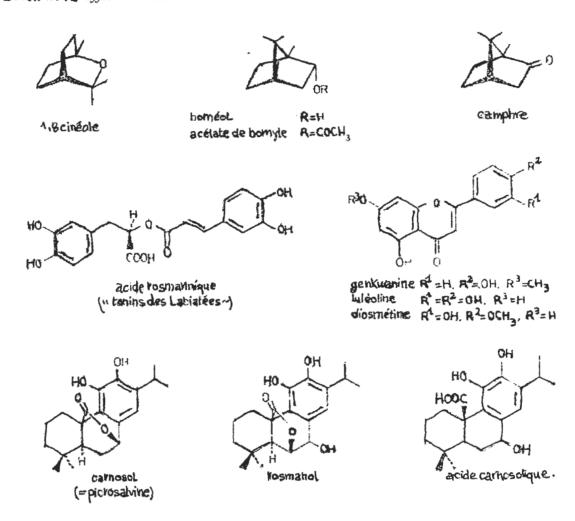


Figure 02: Les principes actifs élaborés par la plante médicinale Rosmarinus officinalis L (WICHTL., 1999)

্ব

II-6-1-Les flavonoïdes

II-6-1-1-Définition et découverte

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels appartenants à la famille des polyphénols.

Leurs fonction principale semble être la coloration des plantes (au de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaines) (Site B).

Le nom flavonoïde est dérivé du mot "flavus" en latin, qui signifié jaune, furent de couvertes en 1936 par *HONGROIS SZENT GYORGI* dans le zest de citron (BRUNETON et al., 1993).

Il a du démontrer que les agrumes renferment, outre l'acide ascorbique (vitamine c), un autre facteur responsable de la résistance capillaire. Ce second facteur fut isolé de l'écorce de citron sous le nom de citrine en 1937 et dénommé vitamine P ou vitamine de perméabilité (BLANCHE MAISON., 2000).

II-6-1-2-Localisation et origine des flavonoïdes

Les flavonoïdes s'accumulent dans le sac vacuolaire, présent dans le mésophyle et l'épiderme des feuilles, dans la cuticule épidermique des fruits, on peut en rencontrer cependant dans les racines (réglisse). En général, ils sont surtout abondants dans les organes jeunes (BRUNETON et al., 1993).

a-Origine végétale:

Les plus connus sont les citroflavonoïdes, ils se trouvent dans les écorces d'agrumes : oranges, citrons ou pamplemousses. On trouve donc des flavonoïdes dans les agrumes qui appartiennent à la classe :

- ·Les aurantiacées : (écorces d'agrumes).
- *Les rutacées : (rue, tomate, sarrasin...).
- *Les oléacées : (cyprès, frêne).
- *Les conifères : (ginkgo biloba) (BLANCHE MAISON., 2000).

b-Origine animale

Le monde animal est très concerné par les flavonoides, on trouve par exemple de la chrysine, de quercétine de la galongine dans la propolis des abeilles; ces insectes la fabriquent à partir des secrétions des bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, l'épicéa, le sapin, le soule, l'orme et la modifient par leurs enzymes saliveres (HASLEM., 1989).

II-6-1-3- Structure et classification

a-La structure générale

Le poids moléculaire des flavonoides est plus faible que celui des autres substances polyphénoliques en général, les flavonoides possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (C). (NUTR.; 1996).

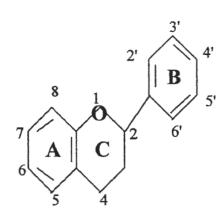


Figure 3: structure générale des flavonoides (GERHARD , 1993)

b- Classification des flavonoïdes

Il existe des milliers desmolécules dans la classe des polyphénols, qui se répartissent dans plusieurs familles moléculaires (acides phénoliques, 4-oxo- flavonoides, anthocyanes, tanins condensés). On regroupe sous le terme de flavonoides ces trois dernières classes de polyphénols. (REMESY et al., 1996).

Tout ont en commun la structure de la flavane. La provenance biosynthétique possible de son cycle A et de son hétérocycle a déjà été esquissée. La configuration variée de ce dernier permet une classification utile en sous- groupes ou familles (GERHARD., 1993), qui se repartissent en quinze familles de composés dont les plus importantes sont les suivantes: flavanos, flavanos, flavanone, flavanonoles, isoflavanones, calcones, et anthocyanes. (Site C).

Le tableau ci dessous montre les familles les plus importantes des flavonoïdes (GERHARD., 1993)

Tableau 01: Classification des flavonoïdes (GERHARD., 1993)

Nom	Structure	Radicaux	Caractères
Calcone	HO OH BI OH	R=H= isoliquiritigénie R=OH=Buteine	Sont dépourvues de l'hetérocycle centrale.
Aurones	НО	×	Les aurons sont caractérisées par une structure de 2-Benzylide NECOUMA RANONE.

Chapitre I		Analyse bibliographique		
Isoflavones	O O O O O O O O O O O O O O O O O O O	R=H= daidzeine R=CH ₃₌ formononétine R=H=2,3dihydroequol	Caractérisé par leurs propriétés oestrogéniques.	
Flavones	HO A OH OH	R=H: opigénol R=OH: Lutéoline	Entre dans la composition de la substance farineuse	
Flavonols	HO A OH OH	R=H: kaempférol R=OH: quercétine	Sont dérives des flavones par l'addition d'un nouveau groupe hydroxyle en position.	
Flavonones	HO B C OH	R=H: naringénine R=OH: ériodictyol	Les composes de ce groupe ont une double liaison de moins que les flavones dans leur hétérocycle.	
Anthocyanidols	HO OH OH	R=R ₂ =H: pélagonnidol R ₁ =OH, R ₂ =H: cyanidol R ₁ =R ₂ =OH: Defphinidol. R ₁ =R ₂ =CH ₃ : malvidol. R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =OH: pétunidol.	Existent en milieu acide sous la forme cationique.	

II-6-1-4-Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont issus de deux voies complémentaires :

-Voie de l'acide malonique : voie de synthèse du noyau A qui résulte de la condensation d'une para-coumaroyl COA avec 3 unités maloryl COA.

-Voie de l'acide shikimique: consiste à la formation du noyau B et les hetérocycles des flavonoïdes. L'acide shikimique et la phénylalanine sont les meilleurs précurseurs de cette voie.

Enfin les deux voies se condensent pour donner naissance à un précurseur commun la 2,4,6,4' tétrahydroxychalcone.

-Par action d'enzymes spécifiques cette chalcone est métabolisée en différentes classes des flavonoïdes (GERHARD., 1993).

Les principales étapes de la biosynthèse des flavonoides sont représentées par la figure (4): (HASLEM., 1993).

Anthocyanidine

Chapitre I Analyse bibliographique Phénylalanine + 4 - coumarylcoa Phénylalanine ammonia lyase (PAL) НО HO 144' tetrohydroxychalcone Aurone Chalcone isomérase (CHI) НО Flavone - synthase flavanone Flavone Flavanone 3 – hydroxylase (F₃H₄) HO HO FlavonoL-synthase **flavanoL** flavanonol Dihydroxyflavonol 4 – reductase (DFR) HO OH ОН OH HO, leucoanthocyanidine proantheyanidine Catéchine

Migure (4): Biosynthèse des fiavonoides (EASLEEL, 1993)

II-6-1-5-Les activités des flavonoïdes

De nos jours, les activités pharmacologiques des flavonoïdes sont largement étudiées, ils jouent un rôle très important dans le domaine médical. Plusieurs recherches sont effectuées d'autre sont en cours (REMESY., 1998).

a- Activités pharmacologie

Ce n'est que depuis quelque année que certaines propriétés pharmacologiques ont peut être mises en évidence et que leur étude a pris un nouvel essor :

-Activités anti-oxydante

Des milliers des flavonoïdes existant dans le nombre végétal, et nombre d'entre eux ont des fonctions antioxydants ce la veut dire qu'ils son capable d'absorber et de désactiver les radicaux libres, des formes réactives de l'oxygène. Des antioxydants pouvaient être efficaces pour protéger les acides gras des attaques oxydatives. De plus, d'autre composés, tels que les caroténoïdes ou l'acide ascorbique, participent à la protection des lipides. (REMESY., 1998).

-Activité anti-tumorale

Les flavonoïdes réduisent l'apparition de tumeurs, dans les études de cancérogenèse expérimentable chez l'animale notamment pour les cancers de la peau, du colon et du sein, leur impact se situe à différents niveaux du processus de carcinogenèse (REMESY., 1998).

-Activité anti-inflammatoire

Les flavonoïdes ont une propriété anti-inflammatoire grâce à leur capacité de réagir contre les histamines et d'autres médiateurs d'inflammation. (BRUNETON., 2000).

-Activité anti-diabétique

Les flavonoïdes peuvent améliorer la s'écrêtions de l'insuline et protégent les cellules pancréatiques qui peuvent être endommagées par les radicaux libres. (SITE .B).

-Autres propriétés: les flavonoïdes peuvent être antibactériens, le plus souvent un effet protéolytique dont ils agissent sur la perméabilité bactérienne, antiallergique, hépatoprotecteurs (isobutrine, hispéduline, flavanognanes), antispasmodiques (flavonoïdes du thym et autres Lamiaceae...), hypocholestérolémiants, diurétiques, antiviraux et pour un petit nombre d'entre eux cytostatiques in vitro (BRUNETON., ±993).

b- Activités physiologique

Les flavonoïdes pourraient avoir un rôle bénéfique sur divers paramètre de la circulation sanguine, elles sont des inhibiteurs de l'adhésion, de l'agrégation et de la sécrétion plaquettaire. Elles fournissent les fibres alimentaires indispensables au fonctionnement digestif et à l'élimination du cholestérol, elles permettent d'améliorer le statut en minéraux sans modifier le bilan énergétique (REMESY., 1998).

c- Activités biologiques

Les flavonoïdes sont responsable de la couleur chez les plantes pour attirer les insectes et cela à fin de déclencher la fécondation. Elles présentent des propriétés intéressantes dans le contrôle de la respiration et de la morphogenèse. Certains d'entre eux jouent un rôle de phytoalexine (Site D et E).

II-6-2- Les terpènes

II-6-2-1- Définition

Dans le rangement des plantes, une énorme substance sont couvres par le mot «Terpène» un terme qui est utilisée pour indiquer toutes les substances qui possèdent une voie biosynthétique commune. Ces terpènes sont tous a la base de molécule d'isoprène

$$CH_2 = C (CH_3) - CH = CH_2 (HARBORN.)$$

Les isoprènes ne soient constituées que des éléments carbone, hydrogène et oxygène, ce groupe se distingue par le nombre inhabituellement élevé de ces composes, ce sont des métabolites secondaires végétaux (GERHARD., 1993).

Figure (05): Le squelette de base des Terpènes (isoprène) (GERHARD., 1993)

II-6-2-2- Classification des Terpènes

Les Terpènes peuvent être classés par leur nombre de motifs ainsi que par arrangement :

C₅: 1 motif Hémiterpènes (isoprène).

C₁₀: 2 motifs monoterpènes.

C₁₅: 3 motifs sesquiterpènes.

C₂₀: 4 motifs diterpènes.

C₃₀: 6 motifs triterpènes.

C₄₀: 8 motifs tetraterpènes.

>C40< 8 motifs polyisoprènes (HARBORNE) 1987).

Le tableau suivant montre les principales familles des Terpènes :

Tableau 02: Classification des différentes Terpènes (GERHARD., 1993 et WICHTL., 1999)

Groupe de substance	Exemples	Propriétés pharmacologiques
	- Acyclique : Myrcène	- stimulant de systèm immunitaire
	- monocyclique : Thymol.	- Action révulsive sur la peau util
Monoterpènes (C ₁₀ H ₁₆)	- Bi et Tricyclique : pinane.	en cas de douleurs localisées : ils
	- réguliers	sont donc antalgiques à action
	- irrégulier : acide	percutanée.
	- chrysanthemique	
		- légèrement hypotenseurs calme
	- linéaire : farnésol.	et anti-inflammatoires,
Sesquiterpènes	- cyclique : acide	antibactériennes surtout à l'en
	abscissiques	contre des gram positif.
	- bicyclique : α-cardinéne.	- antifongique et antiparasitaires.
-	- florsholine (lamiacéae).	
Diterpènes (C ₂₀ H ₃₂)	- rosmanol.	- hypotenseur.
	- gibbérelline	
Triterpènes (C ₃₀ H ₄₈)	- linéaire : squaléne	- contraceptifs, anabolisants.
	- polycyclique : stérols.	- anti-inflammatoire, analgésique
	- les caroténoïdes	- En pharmacie comme dans
	- Acide caroténoïdique	l'industrie agro-alimentaire, ils
Tetraterpènes (C ₄₀ H ₆₄)	- la crocétine.	peuvent être utilisés comme
		colorants naturels efficaces non
		toxique.
		- l'activité vitaminique A.
	1	

Les différentes structures chimiques des différentes classes des Terpènes sont représentées dans la figure suivante :

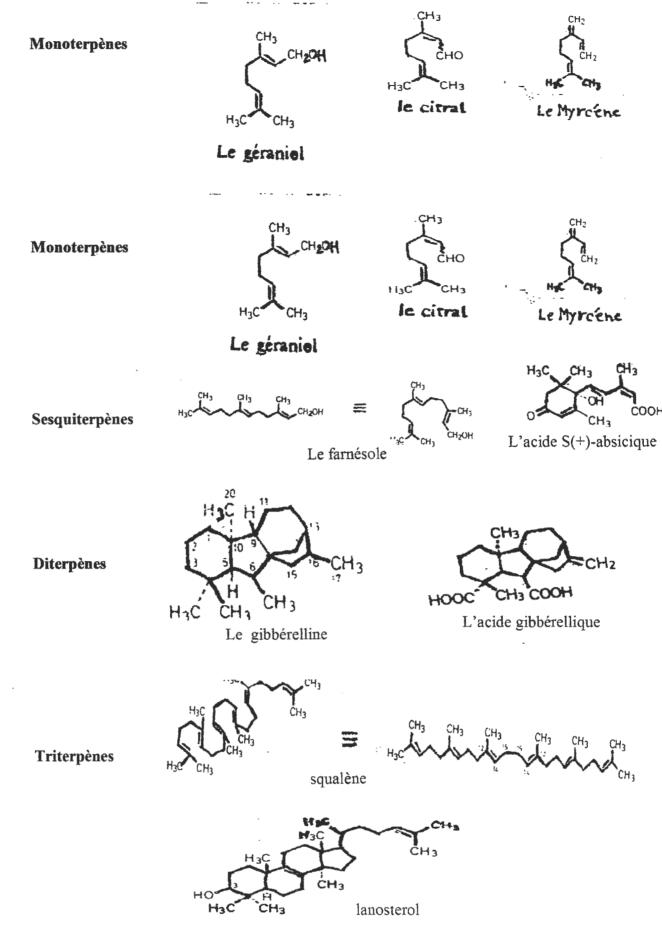


Figure (6): Formules chimiques des terpènes (GERHARD., 1993)

II-6-2-3- Rôles des Terpènes

*Activité antiseptique

Cette activité s'exerce à l'encontre des bactéries pathogènes variées, y compris des souches Habituellement antibiorésistantes. Certaines Terpènes sont également actives sur des champignons responsables de mycoses et sur des levures.

Activité spasmolytique et sedative

Les Terpènes sont efficaces pour diminuer ou supprimer les spasmes gastro-intestinaux. Ils sont fréquents qu'elles stimulent la sécrition gastrique.

* Activité irritante

Les Terpènes entrent dans la composition d'huile et de pommades comme liniment analgésique contre les rhumatismes, et comme additif de bain pour une stimulation sanguine locale et leur effet vasodilatateur.

* Rôles biologique

- Protection contre les prédateurs de la plante.
- Attraction des insectes pollinisateurs. (GERHARD., 1993 et WICHTL.,1999).

II-6-3- Les huiles essentielles

II-6-3-1- Définition

Les huiles essentielles sont des produits de composition généralement assez complexe, renferment les principes volatiles contenus dans les végétaux.

Aussi, la norme AFNOR NF-75-009 a donnée la définition suivante d'un huile essentielle : c'est un produit obtenu à partir d'une matière végétale soit par sont entraînement à la vapeur, soit par distillation à sec, Ensuite, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

II-6-3-2- La répartition

Les huiles essentielles sont largement répondes dans le monde végétal. Elles se retrouvent par quantité appréciable chez environ 2000 espèces reparties en 60 familles. Au titre d'éxemple, nous citerons certaines d'entre elles :

- Les Asteraceae (armoise, camomille, pissenlit,...).
- Les Lamiaceae (basilic, lavande, menthe, patchouli, romarin, thym,...).
- -Les Lauraceae (camphrier, cannelier, laurier,...).
- -Les Myrtaceae (eucalyptus, girofle,...).

- -Les Apiaceae (angélique, carottes, cerfeuil, persil,...).
- -Les Abietaceae (épicéa, pin, sapin,...).
- -Les Rutaceae (citron, orange).

II-6-3-3- Localisation

Ces essences peuvent se rencontrer dans toutes les parties vivantes de la plante comme :

- Les sommites fleuries du basilic de la lavande ou de la menthe.
- Les rhizomes du gingembre ou du quinquina.
- Les racines du vétiver
- Les graines de la muscade.
- Les fruits de l'anis, du fenouil ou de l'orange.
- Les fleurs du rosier.
- Les feuilles de l'eucalyptus, du laurier ou du patchouli.
- Les écorces du cannelier.
- Le bois du camphrier ou du santal,...

Elles sont souvent plus concentrées dans brindilles, les fleurs et les graines. Dans une même plante, ces huiles peuvent exister à la fois dans différents organes. La composition chimique pouvant varier d'un organe à un autre et d'une saison à l'autre (BRUNETON, 1993)

II-6-3-4- Formation

Les huiles essentielles, produites par les végétaux supérieurs, sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante (tiges, feuilles, fleurs,...).

Elles sont sécrétées au sien du cytoplasme de certaines cellules ou elles se rassemblent sous forme de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles. En suite elles sont stockées dans des cavités résultant de la fusion de plusieurs cellules. (BRUNETON., 1993)

II-6-3-5- Rôles et intérêt thérapeutiques des huiles essentielles

a-Rôle biologique

La fonction biologique des terpènes des huiles essentielles demeure la plus souvent obscure. Il est toute fois vraisemblable qu'elles ont un rôle écologique qui a été établi dans le domaine des interactions végétales (agent allopathique, notamment inhibiteurs de germination) que dans celui des interactions végétal-animal : protection contre les prédateurs insectes-champignons et attraction pollinisateurs.

b-Rôle physiologique

Le rôle physiologique des huiles essentielles est aujourd'hui mis en lumière par le progrès scientifique (BRUNETON., 1993)

* Propriété antiseptique

C'est-à-dire microbicide (tue microbes et virus pathogènes). Elles s'affirment par endroit supérieur aux antibiotiques classiques parce qu'elles ont une action bactériolytique.

Propriété de défloculation

Les huiles essentielles sont défloculants (solvants). C'est-à-dire qu'elles «lysent» collent aux mucosités visqueuses en cristallisant (noyaux durs issus des métabolismes et engendrés par les excès des viandes et d'amidons) causes profondes de la plupart des maladies (BRUNETON., 1993).

Propriété diurèse

L'huile essentielle fait fonctionner les 4 grandes émonctoires (peau-avec ses 3 glandes, reins, poumons et intestins), facilitant le drainage des déchets et résidus humoraux solubles et insolubles vers leurs émonctoires spécialisés.

* Pouvoir osmotique

Les huiles essentielles sont employées en osmotique, en Kinésithérapie et en balnéothérapie. Les huiles essentielles utilisées contre les affections de la peau ont des propriétés cicatrisantes dues à leurs activités physico-chimique et à leur action vasomotrice. Ce pouvoir osmotique s'exerce pleinement sur le système respiratoire, par la pénétration dans la voie pulmonaire au moyen de brouillard micronisé. Il apporte ainsi une voie originale de désinfection. Ainsi, dans cette même utilisation pulmonaire, la recherche fondamentale aux USA met en évidence l'intérêt de certaines chaînes aromatiques agissent sur le métal (relaxation, excitation,...) et sur l'organisme en générale.

* Pouvoir bioélectronique

Il a été mis en avant par L. C. VINCENT avec ses 3 mesures fondamentales qui sont recherchées dans les 3 liquides : sang, salive, urine.

- Le pH on mesure acido-basique pour les huiles essentielles est presque toujours acide, ce qui contrarie le développement pathogène évaluent toujours dans des valeurs basiques (7 à 14).
- L'oxydoréduction : ce paramètre indique la tendance ou non de cellules à s'oxyder et donc à former des radicaux libres. Or, les huiles essentielles sont presque toujours dans des valeurs réductrices s'opposant à l'oxydation (0 à 28).

- La résistivité ou résistance ionique, les huiles essentielles ont des taux très élevés de ce facteur (résistance) (BRUNETON ., 1993).

c-Rôle thérapeutique

Les huiles essentielles, reconnues pour leurs propriétés, agissent sur personne dans sa globalité.

Les huiles essentielles possèdent des propriétés thérapeutiques variées. Elles :

- Remédient aux problèmes respiratoires.
- Diminuent la tension nerveuse.
- Améliorent la circulation sanguine.
- Aident le corps à traiter les impuretés
- Soulagent la nervosité et les douleurs rhumatismales.

Il semble que les huiles essentielles extraites de certaines plantes aromatiquesont un rôle important dans notre vie soit physiologique ou bien thérapeutique, sans oublier le rôle biologique de ces huiles.

d-Rôle cosmétique

Les huiles essentielles produisent un effet incontesté sur l'humeur et l'état d'esprit. Leurs vapeurs peuvent être relaxantes, toniques ou stimulantes. A la limite de la pharmacie et des produites d'hygiènes, on notera la présence d'huiles essentielles dans les préparationspour bains (BRUNETON ., 1993).

e-Rôle culinaire

Les huiles essentielles sont des produits d'origines végétales utilisées dans notre alimentation comme des épices pour assaisonner les plats. Elles apportent une flaveur originale à la préparation culinaire.

II-6-3-6- Composition chimique

La composition chimique des huiles essentielles est généralement très complexe d'un double point de vue, à la fois par le nombre élevé de constituants présents et surtout par la diversité considérable de leurs structures.

Il n'est pas possible dans le cadre de cette étude de présenter d'une manière exhaustive tous les constituants des huiles essentielles. On se limitera aux plus caractéristiques par leur fréquence et abondance.

En effet, elles comprennent deux classes de composés caractérisés par des origines biogénétiques bien distinctes.

Le groupe des Terpènes, d'une part et le groupe des composés aromatique dérivés du phénylpropane d'autre part. Il existe également d'autre corps qui entrent en faible proportion dans la constitution de certaines huiles essentielles (acides organiques, esters et autre...)

(BRUNETON., 1993).

CHAPITRE II: Les antibiotiques

I- Généralité sur les antibiotiques

I-1-Historique

L'ère véritable des antibiotiques commença en 1929 lorsque FLEMING Feit Cette observation apparemment anodine: sur une boite de pétri ensemencée avec des STAPHYLOCOCCUS, la présence de quelques colonies d'une moisissure du genre PENICILLIUM, un contaminant, provoque une inhibition de la croissance des bactéries mises en culture. Il proposa d'appeler: pénicilline. En 1939, deux chercheurs britanniques, FLORY et CHAIN n'avaient entre pris d'extraire et de purifier la pénicilline sur une grande échelle en vue d'essais thérapeutiques en 1953, la céphalosporine C à été découverte par NEWTON et ABRAHAM. Depuis 1965 une nouvelle période semble prolonger est caractérisée par les antibiotiques semi-synthétiques en particulier les B-Lactamines (MEYER, et al., 1994).

I-2- Définition

Un antibiotique est une substance antimicrobienne d'origine biologique, c'est-à-dire produit par un microorganisme (champignon microscopique et bactérie) ou de synthèse chimique et qui est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres microorganismes. (BOULAHBAL.,1993).

I-3-Origine des antibiotiques

a-Origine naturelles

Parmi les 10 000 antibiotiques d'origine naturelle recensés dans le monde :

- -20% proviennent de champignons: Pénicillium, Céphalosporium, Aspergillus.
- -70% proviennent d'Actinomyctes, Microfilamants dont le genre Streptomyces est un producteur majeur d'antibiotiques, aminoglycosides, entre 1988 et 1992, 1000 nouveaux agents anti-infection issus des Actinomycetes on été isolés.
- -10% proviennent des bactéries (nom Actinomycetes, en particulier des genres bacilluries et *Pseudomonas*), la bacitracine utilisée pour certains traitements locaux en un exemple (BAMBEKE et al., 1997).

b-Origine synthétique

Sulfamides, metronidazole, isoniazide, acide nalidixique, les fluoroquinolones et pénenes.

c-Antibiotique de semi synthèse

Ce sont des Antibiotiques d'origine naturelle mais industriellement améliorés.

d-Dans le futur

La biotéchnologie permettra:

- -L'exploitation des mutations pour une surproduction d'antibiotique.
- -La génération de nouveaux antibiotiques.
- -L'hybridation par ingénierie génétique et transformation de L'ADN (BAMBEKE et al.,1997).

II- Classification et structures des antibiotiques

II-1-Classification

Il existe plusieurs critères de classification des antibiotiques, certains sont fondés sur:

*Le spectre d'activité

Soit par inhibition de la croissance bactérienne en ralentissant puis arrêtant la multiplication (activité bactériostatique). Soit par une lyse bactérienne (activité bactéricide). (BOULAHBAL., 1993).

*Le site d'action

Les antibiotiques agir en site bien précis de la cellule. Selon l'antibiotique, ce site d'action peut être la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique ou la machinerie de synthèse des protéines; ou encore une enzyme impliquée dans la synthèse des acides nucléiques. (SINGLETON., 1999).

En générale, c'est la classification chimique qu'est le plus souvent en usage (EBERLIN., 1994).

Le tableau ci dessous représente les différentes classes des antibiotiques.

II-2-Structure chimiques des antibiotiques

La classification chimique part du principe que les antibiotiques sont composés d'unités chimiquement définies et que le nombre de ces unités est toujours faible et varie d'une famille à une autre (MAYER. et al., 1994).

A l'intérieur d'une même famille, diverses particularités de spectre, mais aussi de propriétés pharmacocinétiques ou de tolérance, font l'originalité et l'intérêt des différents produits (DUVAL et al., 1990).

Tableau 03: Classification des antibiotiques selon leurs structures chimiques, leurs sites et leurs modes d'action sur les bactéries. (EBERLIN., 1994).

Familles d'antibiotiqu	les	Site d'action	Mode d'action
Antifolates	Sulfamides	Matériel nucléique	20
	Triméthoprime		ĕ
Phénicoles	Chloramphenicol	Fraction 50 _s	Bactériostatiques
	Thiamphenicol		
Macrolides	Erythromycine	Fraction 50 _s	
	Lincomycine		i
	Spiramycine		ér
	Pristinamycine		2
	Virginiamycine		B
Cyclines	Tétracycline	ARN/ ribosomes	
Béta-lactamines			
pénicillines	Pénicilline		
	Ampicilline		
	Amoxicilline	Paroi	
	Oxacilline		
	Ticarcilline		
Céphalosporines	Céfaloridine		
	Céfalotine		es
	Céfazoline		j.
	Céfotaxine		Bactéricides
Aminosides	Streptomycine		E
	Gentamycine		2
	Tobramycine	Fraction 30 _s	Ä
	Amikacine		
	Kanamycine		
Rifampicine	Rifampicine	Matériel nucléique	
Polypétides	Colistine		
	Bacitracine	Membranes	
	Polymyxine		_
Quinolones	Acide	ADN	
	Nalidixique		
	Pefloxacine		
	Nitroxoline		
	Fosfomycine		
Divers	Novobiocine	Matériels nucléiques	
	Vancomycine	Paroi	
	Furanes		

B-lactamine pénicilline pénicilline CH₃

Pénicilline G

céphalosporine

CH-CONH

CH-CONH

COOH

CH-CONH

CH-CONH

COOH

CH-CONH

CH-CONH

COOH

CH-CONH

CH

O2N-CH-CH-CH2OH

chloramphenicol

OH O OH O OH CNH

chlortétrecycline

H₂N-N=N-SO₂NH₂

Brontosil

Phénicol

Cycline

Sulfamide

Quinolone

Macrolide

Aminoside

Figure 07: Structures chimiques des différentes familles d'antibiotiques (EBERLIN., 1994, DUVAL et al., 1990).

III-Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques ne doivent agir que sur les cellules procaryotes afin de ne pas atteindre les cellules des patient traité leurs effets se porteront donc sur des structures ou des voies métaboliques propres à ce type de cellules. (EBERLIN.,1994).

Le plus souvent l'antibiotique se comporte comme un analogue de substrat (B.Lactamines, suflamides); d'autre peuvent agir au niveau des coenzymes, par fois par analogie stérique, ou plus souvent en inhibant leur synthèse. Donc la sélectivité de leur pénetration peut expliquer la spécificité de leur action sur certains microorganismes (MEYER et al., 1994).

III-1 Action sur la paroi bactérienne

Le peptidoglycane est un élément essentiel de la paroi bactérienne, aussi bien pour les bactéries Gram positif que Gram négatif.

Du fait de leur complexicité de leur synthèse, des inhibiteurs peuvent agir à divers endroits. En autre, on peut envisager une action de destruction du peptidoglycane. Une action sur la synthèse devrait se traduire par une inhibition de la croissance du germe (effet bactériostatique).

En revanche, une action directe sur le peptidoglucane se traduit par une non survie du germe (effet bactéricide) parmi les antibiotiques actifs sur la paroi: les B-Lactamines, les sulfamides et la Vancomycine (EBERLIN.,1994).

III-2-Action sur la membrane cytoplasmique

Les antibiotiques de nature polypeptidique comme les polymixines, les gramicidines et les antibiotiques voisins agissent sur la membrane cytoplasmique à la manière des agents tensioactifs du fait d'une charge positive. Les molécules de gramicidine forment un pore traversant une partie de la membrane plasmique ce qui permet le passage d'ions monovalents. L'intégrité de structure de la membrane n'est plus maintenue en particulier l'effet de barrière osmotique. Les cellules, dont la plupart des constituants s'échappent, dégénèrent puis meurent, atteintes dans leurs fonctions vitales essentielles.

III-3Action sur la synthèse protéique

Un certain nombre d'antibiotiques agissent sur la synthèse des protéines au niveau des ribosomes en empêchant la lecture du code ou en la faussant, ce qui aboutit à la synthèse des protéines anormales. Parmi les antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines on peut citer: Les macrolides, les aminosides et les chloramphénicol (MEYER et al., 1994).

III-4-Action sur les acides nucléiques

-Les quinolones sont des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN on observe une inhibition de l'incorporation de thymidine tritiée par les bactéries. Ainsi qu'ils inhibent l'action de la gyrase, ce dernier est une topo-isomérase de type II qui coupe les deux brins de l'ADN et les superenroule négativement.

-L'actinomycine empêche la progression de l'ARN polymérase le long de l'ARN matrice. Tandis que la novobiocine inhibe à la fois la synthèse de l'ADN puis, de façon moins nette, celles d'ARN. (MEYER et al., 1994).

III-5- Action par inhibition compétitive (antimétabolites)

L'inhibition compétitive est le mode d'action antibactérien de certaines substances appelées analogues structuraux parce qu'elles interfèrent avec les métabolites normaux de la cellule, on peut distinguer trois types principaux d'antimétabolites:

- Les analogues de vitamines, comme les sulfamides, l'aminopterine.

- Les analogues d'acides aminés, comme: 1,2,3 triazole 3- alanine, parafluorophénylalanine.
- Les analogues de bases puriques et pyrimidiques comme: la 5- bromo-uracile, la 8- azaguanine et la 5 fluorouracile (MEYER et al., 1994).

En général, le mode d'action des antibiotiques est montré dans la figure suivante :

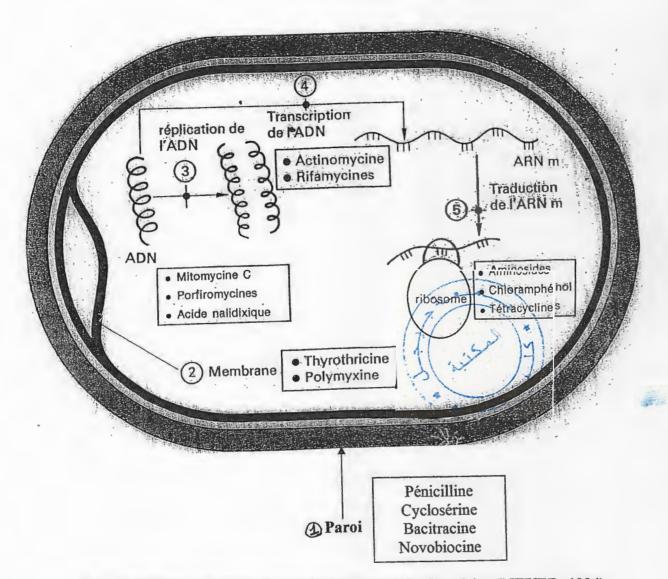


Figure 08: Mode d'action des antibiotiques sur les bactéries (MEYER.,1994)

IV-La sensibilité aux antibiotiques

Une souche est dite sensible à un antibiotique si sa croissance peut être réduite par un traitement standard à base de cet antibiotique.

Le large choix d'antibiotiques aujourd'hui disponibles permet de traiter la plus part des infections bactériennes. Ils connaissent cependant des échecs, souvent dus à la résistance développée par certaines bactéries. (EBERLIN., 1994).

Le tableau ci-dessous montre le choix d'un antibiotique su ivent l'agent infectieux.

Tableau 4: Choix d'antibiotique suivant l'agent infectieux (LECHAT., 1982).

Agent infectieux	Antibiotique préférentiel	Autres antibiotiques utilisables
Cocci Gram positif:	Pénicilline G	Macrolides, lincomycine,
-Streptocoques	rememme G	synergistines.
pyogènes, groupe	Pénicilline G avec ou	Céphalosporine, macrolides
A,B,C.	sans Streptomycine.	avec Streptomycine
-Streptocoques du	sans sucpromycnic.	avec sucptomycine
groupe viridans.	Pénicilline G, macrolides	Céphalosporine,
Staphylocoques	1 cmemme o, macrondes	gentamycine, kanomycine .
dorés:	Pénicilline résistant à la	Céphalosporine,
a/ne produisent pas	pénicillinase,	gentamycine,
de pénicillinase.	synergistine, lincomycine.	tobramycine, vancomycine, rifampi
b/produisent de la	syncigistine, incompenie.	cine
pénicillinase.		
Bacilles Gram		
positif:	Pénicilline G	Macrolides, tétracycline
Bacillus anthracis	Pénicilline G -	Tétracyclines, macrolides
Listéria	ampicilline	Tétracycline
monocytogènes	Pénicilline G	Macrolides, clindamycine
Clos t ridium tétani	Pénicilline G	ivinoi o incos, o initiami y o inc
Clostridium	T cincinnic G	
perfringens		
Bacilles Gram		
négatif:	Chloramphénicol,	Sulfaméthosazale,
Salmonelles	ampicilline	triméthoprine
Shigella	Ampicilline	Polypeptide oral,
Escherichia coli	Polypeptidique oral	thamoycine oral
intestinal	Ampicilline, gentamine,	Kanamycine oral.
Escherichia coli	tobramycine	Colistine, acide nalidiscique
septicémique	Gentamycine,	
Entérobacter	tobramycine	Kanamycine,
Klebsiella	Gentamycine,céphalospor	colistine, carbénicilline
pneumoniae	ine	Kanamycine,
		chloramphinicol, colistine
Proteus:		
*mirabilis	Ampicilline	Céphalosporine, aminosides
*autres	Gentamycine, tobramycin	Kanamycine, carbénicilline

Pseudomonas		
aéruginosa		
(pyocyonique)		
Infections urinaires	Carbénicilline	Gentamicine
Autros infactions	Gentamycine, tobramycine,	Carbénicilline
Autres infections	colistine.	céphalosporine

*L'antibiogramme

L'antibiogramme apparaissant comme un paramètre trop artificiel, les praticiens ont parfois recours à des évaluations plus proches du patient.

La plus courante consiste à rechercher le pouvoir bactériostatique ou bactéricide du sérum ou, plus rarement, d'un autre liquide biologique.

Cet examen permet de vérifier que le sérum du malade recevant des antibiotiques a bien un pouvoir sur le germe infectieux isolé (EBERLIN., 1994).

Technique

La méthode la plus employée est celle de la diffusion en gélose: un disque de buvard imprégné d'antibiotique est déposé dans une boite de gélose ou pousse une culture de germe a étudier. L'antibiotique diffuse dans la gélose, s'il est actif sur le germe, inhibe la croissance de celui-ci suivant un cercle concentrique au disque et plus ou moins grand selon la sensibilité du germe à l'antibiotique en question. Cet examen qui peut se faire simultanément avec plusieurs disques contenant des antibiotiques différents, permet le choix d'un antibiotique adapté lors d'une infection dont le germe a pu être isolé (EBERLIN., 1994).

V- La résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques d'une espèce bactérienne n'est pas un phénomène stable dans le temps. L'évaluation des résistances est extrêmement variable selon les antibiotiques ou les germes.

La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise (EBERLIN., 1994).

V-1-Origine de la résistance

*La résistance naturelle

Il s'agit d'une propriété intrinsèque, préexistant chez le germe. C'est ce qui intervient lorsque la cible de l'antibiotique n'existe pas chez le germe. Les résistances naturellespeuvent être une propriété commune à l'ensemble de l'espèce voire d'un genre ou d'une famille comme pour les mycoplasmes. (EBERLIN., 1994).

*La résistance acquise

Ce type de résistance n'affecte initialement qu'une souche .la modification de cette souche provient d'une mutation ou d'une acquisition d'un plasmide .donc la résistance acquise qui est responsable de l'apparition des souches multi-résistantes particulièrement difficiles à traiter. (EBERLIN., 1994).

V-2-Mécanismes de résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne s'explique par différents mécanismes qui aboutissent schématiquement à deux situations différentes:

a- Modification aux niveau de l'antibiotique

Certaines bactéries ont la capacité de produire des enzymes qui, en modifiant ou en clivant la molécule d'antibiotique, en assurent l'inactivation. On comprend aisément que telles bactéries résistent à l'antibiotique qu'elles sont capables d'inactiver ce mécanisme est actuellement connu

pour les B-lactamines, les aminosides, le chlorophénicol, les streptogramines. Il est très largement rependu parmi les souches isolées en clinique (DUVAL et al., 1990).

b-Modification auxniveau de la cellule bactérienne

Dans ce cas, la bactérie est capable de croître en présence de l'antibiotique non modifié. Ceci recouvre des faits différents, souvent encore mal connus, de trois types principaux:

-Non pénétration de l'antibiotique dans la bactérie; il n'atteint pas son site d'action; ceci résulte d'une imperméabilité des membranes bactériennes à l'antibiotique, conséquence parfois de la modification des porines impliquées dans la pénétration.

-Particularité de structure du site d'action, conditionnant un manque d'affinité pour l'antibiotique, qui ne ce fixe pas sur lui:

-Développement d'une autre voie métabolique, suppléant la voie métabolique inhibée par l'antibiotique (uniquement dans le cas de la résistance acquise).

Beaucoup de ces phénomènes de résistances intrinsèque sont donc liées au mode d'action de l'antibiotique considère, au contraire de l'inactivation enzymatique (DUVAL et al., 1990).

La figure ci dessous résume les différents types des mécanismes de résistance aux antibiotiques.

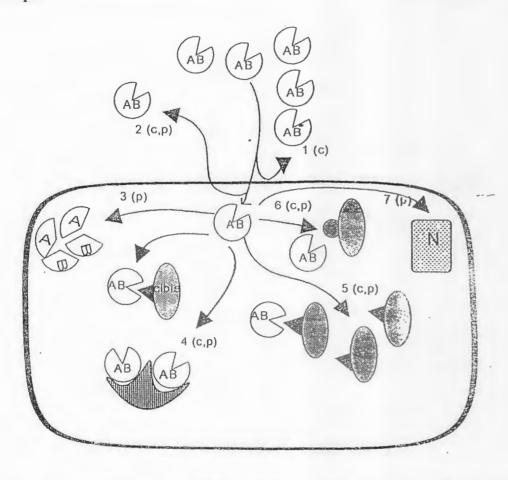


Figure09: Les principales modalités de résistance aux antibiotiques (MEYER et al., 1994).

Antibiotique, cible = lieu ou l'antibiotique viragis l'origine de ces mécanismes est soit chromosomique (C) soit plasmidique (P).

- 1-Réduction de la perméabilité de la paroi.
- 2-Excrition active.
- 3-Destruction de l'antibiotique.
- 4-Sequestration de l'antibiotique par une protine.
- 5-Production accrue de la cible.
- 6-Modification de la cible.
- 7-Changement de voie métabolique.



VII-Traitement des infections

Les antibiotiques sont devenus des agents thérapeutiques courants, utilisés à la fois dans des pathologies bénignes (angine par exemple) et dans des pathologies ou la vie du patient est en danger (endocardite). Il est bien évident que l'utilisation de l'antibiotique ne s'effectue pas de la même manière selon la gravité de l'état du patient. Il existe donc des approches très différentes que nous envisageons au fur et mesure. (MOLLARET., 1984).

CHAPITRE III : Généralités sur les bactéries

I-Définition

Les bactéries sont des microorganismes à structure unicellulaire procaryotique, ubiquitaire, qui peuvent être bénéfique à l'homme ou pathogènes; c'est-à-dire responsables des maladies infectieuses, pour l'homme et l'animal (BUGNICOURT., 1995).

II-Les bacilles Gram négatif

*Famille des Enterobacteriaceae

Les enterobacteriacéae, comme semble l'indiquer leur nom seraient des hôtes du tube digestif de l'homme et des animaux mais cette appartenance est beaucoup moins stricte qu'on ne l'avait supposé car de nombreuses souches de la famille ont été isolées de l'environnement aquatique ou terrestre (LECLERC et al., 1995).

II-1-Caractères généraux

Les enterobactériaceae sont caractérisées par:

- -Bacilles, **6**-ram négatifs dont les dimensions varient de 1 à 6 μ m de long et 0,3 a 1 μ m de large.
 - -Mobiles (le plus souvent flagellés péritriches) ou non.
 - -Non sporulant.
 - -Anaérobies facultatifs.
 - -Chimioorganohétérotrophes.
 - Oxydase négatifs.
 - -Catalase positifs, à l'exception de quelques souches.
 - -Réduisent le nitrate en nitrites
 - Fermentent le glucose avec ou sans production de gaz. (SINGLETON., 1999).

Parmi Les germes appartenant à la famille des Enterobacteriaceae en peut Site:

Buttiauxella, Cedecea, Citrobacter, Adwardsiella, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Ewingella, Hafnia, Klebsiella, Kluyvera, Moellerella, Koserella, Leclercia, Morganella, Obesumbacterium, Proteus, Providencia, Rahnella, Salmonella, Serratia, Shigella, Tatumella, Xenorhabdus, Yersinia et Yokenella.

II-2-Habitat et pouvoir pathogène

Parmi les nombreuses espèces d'Enterobactériaceae certaines sont trouvés dans l'environnement, d'autres chez les végétaux ou les animaux.

Il en est qui ont un pouvoir phyto-pathogène. Parmi les espèces qui peuvent être isolées chez l'homme, certaines (*Shigella*) sont constamment pathogènes. D'autres espèces se comportent comme des bactéries pathogènes opportunistes responsables d'infections chez des malades fragilisés (AVRIL et al., 1992).

II-3Caractères culturaux

Les Enterobactériaceae se développent dans un bouillon ou sur une gélose ordinaire incubés 18 heurs à 37°C mais la culture est possible entre 20°C et 40°C. Leur temps de division varie de 20 à 40 minutes.

Sur gélose, les colonies sont lisses et régulières et atteignent 2mm de large sauf celles des *yersinia* qui sont plus petites.

Les proteus on tendance à envahir la gélose et a y former un tapis uniforme.

Les Klebsielles forment des colonies souvent très muqueuses, larges, grasses et luisantes. En Bouillon, les Enterobactéries donnent un trouble homogène (AVRIL et al., 1992).

A-Escherichia coli

Isolée pour la première fois par ESCHERICH en 1885. Escherichia coli est l'espèce bactérienne qui à été la plus étudiée par les fondamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique (AVRIL et al., 1992).

Habitat

Escherichia coli est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. Dans l'intestin, Escherichia coli est l'espèce aérobie quantitativement la plus importante, présente à raison de 10⁷ à 10⁹ corps bactériens par gramme de selles .Cette population bactérienne ne représente qu'environ 1‰ de celle des anaérobies.

La recherche de *Escherichia coli* dans l'eau d'alimentation (colimétrie) est faite pour apprécier sa potabilité. La présence de *Escherichia coli* dans l'eau est le témoin d'une contamination fécale récente et la rend impropre à la consommation (AVRIL., 1992).

Caractères bactériologiques

Escherichia coli est un Bacille à Gram négatif appartenant à la famille des Enterobactéries, aéro-anaérobie facultatif, possède une catalase, pousse facilement sur milieux ordinaires à 37°C et pH 7,5 sur gélose nutritif elle donne des colonies arrondies, humides, brillantes, de couleur blanchâtre ou légèrement jaunâtre.

Sur gélose EMB les colonies sont de couleur violette foncée avec un éclat métallique verdâtre caractéristique.

Sur gélose BCP elle donne des colonies épaisse, brillante et de couleur jaunâtre, en Bouillon elle donne un trouble homogène abondant avec dépôt grisâtre par fois léger voile en surface.

Les principales propriétés biochimiques qui caractérisent L'Escherichia coli sont:

Lactose (+), indole (+), fermente le glucose avec production de gaz (+).(AVRIL., 1991).

Pouvoir pathogène

-Infection extra-intestinales

Escherichia coli est connu comme agent pathogène au cours d'infections diverses:

- **-Urinaires:** La majorité des infections urinaires de la femme jeune observées en pratique médicale de ville est due à *Escherichia coli*.
- -Abdominales: Les *Escherichia coli* de la flore peuvent être en cause dans des péritonites, des cholécystites, des salpingites et des suppurations post-opératoires.
- -Méningites néo-natales: Un tiers d'entre elles sont dues à Escherichia coli. (AVRIL., 1991)
- -Infections intestinales: L'existence de diarrhées à *Escherichia coli* est connue depuis 1940. Ces diarrhées sont dues à des souches de sérotypes particuliers qui provoquent soit des cas sporadiques, soit des petites épidémies.

Les différents syndromes chimiques sont dus à des *Escherichia coli* différents dont nous préciserons plus loin le support de la virulence, on reconnaît aujourd'hui 4 types de souches responsables de diarrhées

-Les souches entéropathogènes ou "entéro-pathogénic E.coli" (E.P.E.C)

Elles étaient responsables, dans les années 50, des diarrhées infantiles graves ou toxicoses survenant par épidémies dans des crèches ou des maternités. Les souches encore appelées Escherichia coli G.E.I (Gastro-Entérites Infantiles). Et sont responsables de déshydrations aigues.

-Les souches entérotoxinogènes ou "entéro-toxigenic E.coli" (E.T.E.C)

Elles sont responsables de diarrhée très liquides survenant dans les pays en développement ces diarrhées s'observent principalement chez les voyageurs (Turista). Elles sont souvent épidémiques chez les enfants de ces pays.

-Les souches entéro-invasives ou "entéro-invasive E.coli" (E.I.E.C)

Elles sont isolées de syndromes dysentériques tout chez l'adulte que chez l'enfant, la présence de leucocytes dans selles est le témoignage du processus invasif.

-Les souches entéro-hémorragiques ou "entéro-hémorragiques-colitis- E.coli" (E.H.E.C)

Ces souches ont été décrit en Amérique du Nord ou elles ont été responsables d'épidémies de diarrhée aqueuse puis hémorragique à une intoxication alimentaire (AVRIL., 1991,1992).

B-Salmonella

Le germe salmonella, doit surtout au vétérinaire Américain DANIEL ELINER SALMON, les bactéries du genre salmonella sont de petits bâtonnets (CARBONNELE et al., 1987).

Habitat

Le réservoir des salmonelles est très large, et de nombreux animaux (mammifères, dont l'homme et les rongeurs), oiseaux, reptiles, poissons, insectes....) sont susceptibles d'héberger, de multiplier et d'excréter ces bactéries. La très grande majorité des salmonelles présentes dans l'environnement (terre, eau, matières premiers pour l'alimentation de bétail....) ou dans les aliments destinés à l'homme proviennent d'une contamination fécale (SUTRA.,1998).

Caractères bactériologiques

Les salmonelles sont des bacilles Gram négatif, souvent mobiles par leur ciliature péritriche (rarement immobiles), non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs, cultivant sur milieux ordinaires en 24 heurs à 37°C et à pH neutre, et donnent des colonies plus ou moins caractéristique (BUG NICOURT., 1995).

Sur gélose Hektoen, elles donnent des colonies bleu ou vert à centre noire, elles peuvent croitre sur les milieux de base et par exemple, sur la gélose de Macconkey et la gélose desoxycholate-citrate on bouillon, elles donnent un trouble homogène. Leurs milieux d'enrichissement incluent notamment le bouillon sélénite (AVRIL., 1992 et SINGLETON., 1999).

Les principaux caractères permettant l'identification biochimique du genre salmonella sont l'absence de fermentation du lactose, l'absence de bêta-galactosidase, d'uréase et de production d'indole. Ces bactéries produisent de l'H₂S (AVRIL., 1991).

Pouvoirs pathogènes

Les salmonelles font parties des bactéries entéropathogènes invasives à multiplication intra cellulaire (EYQUEM et al., 1998).

Les salmonelloses peuvent revêtir trois aspects:

*Les formes septicémiques

Certaines salmonella sont strictement adaptées à l'homme comme S.typhi, S.paratyphi A, S.sendai, responsables de la fièvre typhoïde humaine; elles ne manifestent pas de pouvoir pathogène en dehors de l'espèce humaine.

D'autres sérotypes sont adoptés à une espèce animale: S. gallinarum chez les volailles, S. typhisuis chez les porcs (LECLERC et al., 1995).

*Les formes purement digestives

Les toxi-infections alimentaires à salmonella se manifestent par des diarrhées, des vomissements et de la fiève premiers signesce surviennent 8 à 10 heurs après l'ingestion de l'aliment contaminé. L'évolution de ces gastro-entérites est en règle générale spontanément favorable en quelques jours (AVRIL .,1991).

*Les formes extradigestives

Elles sont plus rares: Cholécystite, Méningite, Ostéomyélite, Spondylodiscite, Glomérulonéphrite, atteinte pulmonaire. Ces formes surviennent plus volontiers chez des malades immunodéprimés, les déficits enzymatiques des globules rouges et la drépanocytose sont des circonstances favorisantes (AVRIL., 1991).

III-Les cocci Gram positif

A-Staphylocoques

Les staphylocoques en été découvertes dans un pays par PASTEUR en 1880, en 1883 OGSTON a crée le nomde "staphylocoque" pour décrire ces grains (KOKKOS) groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (staphylos). En 1884, ROSENBACH a obtenu des cultures pures de ces bactéries,

Il a scindé le genre *staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées (AVRIL et al., 1992).

Habitat

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquistes, leur habitat est très variable souvent les muqueuses de l'homme et de l'animal (JOFFIN., 1998).Il peuvent être :

- -Saprophytes: retrouvés dans le sol, l'aire, l'eau et les aliments.
- -Commensaux: retrouvés sur la peau et les muqueuses de nombreuses mammifères, ils sont surtout localisés dans les cavités buccales et nasales, les plis cutanés, le périme et le colon (LARPENT., 1997).

Caractères bactériologiques

Le genre straphylococcus, regroupe des espèces bactériennes constituées des cellules arrondies (cocci) à Gram positif, immobiles, asporulés, disposées en amas, à la façon d'une grappe de raisin. Les staphylocoques produisent une catalase. Ils sont anaérobies facultatif et cultivent facilement sur milieu ordinaire à 37°C et à pH égale à 7. Sur gélose les colonies sont lisse de 1 à 3 mm de diamètre, circulaire, opaque et légèrement bombée ou aplaties. En bouillon donnent un trouble homogène (AVRIL., 1991).

Les staphylocoques peuvent se multiplier en présence de concentrations élevées de chlorure de sodium (en général jusqu'à 10%) (SUTRA., 1998).

Les principales propriétés biochimiques qui caractérisent le genre staphylocoque sont: Catalase (+), Oxydase (-), fermentation du glucose (+).

Les staphylocoques sont répartis en souches coagulase – positives et souches coagulase – négatives.

Pouvoir pathogène

Les staphylocoques ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large.

-Les suppurations localisées

On peut distinguer:

- -Les infections cutanées: Furoncle, abcès, panaris, anthrax, impétigo, staphylococcie maligne de la face.
 - -Les infections de séreuses: arthrite, pleurésie, péritonite.
 - -Les infections osseuses: osteomyélite, spondylodiscite.
- -Les infections viscérales: abcès du poumon, abcès du cerveau, phlegmon périnéphrétique (AVRIL., 1991).

Les septicémies

Les staphylococcémies sont causées et entretenues par un foyer infectieux primaire compliqué de thrombophlébite; ce sont des infections fréquentes, d'une gravité préoccupante. L'évolution est émaillée de métastases septiques (AVRIL et al., 1992).

Les manifestations digestives

Les toxi-infections alimentaires surviennent deux à six heurs après l'ingestion d'un aliment contaminé contenant l'enterotoxine staphylococcique thermostable. Elles sont caractérisées par des vomissements incoercibles chez un malade sans fièvre (TORTORA et al., 2003).

-Le syndrome de choc toxique

Ce syndrome associe une fièvre avec éruption scarlatiniforme, hypotension et atteinte cérébrale, rénale, hépatique et musculaire. Les hémocultures et le liquide céphalo-rachidien sont stériles. La symptomatologie est due à une toxine du staphylocoque.

B-Streptocoques

En 1874, le chirurgien VIENNOIS CHRISTAIN BILROTH observe dans des lésions d'erysipèle un micro-organisme en forme de chaînettes. En 1875, Louis pasteur observe ce micro-organisme dans les sécrétions vaginales et le sang malade atteint de fièvre puerpérale, mais dés 1869 à Strasbourg COZA et FELTZ avaient déjà observé, lors d'une épidémie de fièvre puerpérale.

En 1933, Rebecca Lancefield établit la classification moderne des streptocoques basés sur les propriétés antigéniques des hydrates de carbone (.AVRIL et al., 1992).

Habitat

Les streptocoques sont ubiquitaires. Certains d'entre eux sont rencontrés dans le milieu extérieur. Ils peuvent survivre longtemps dans celui-ci; ainsi la découverte d'entérocoques dans les eaux ou les aliments signe une contamination fécale d'origine humaine ou animale.

D'autre sont plus fragiles et vivent à l'état commensale au niveau des téguments ou des muqueuses de l'homme ou des animaux. La présence normale de streptocoques au niveau cutanéo- muqueux explique qu'ils peuvent contaminer fréquemment des prélèvements et constituer des souillures (AVRIL., 1992).

Caractères bactériologiques

Le genre *streptococcus* regroupe un grand nombre d'espèces aéro-anaerobies très différentes, caractérisées par leurs formes ovoïdes, sphérique ou quelques fois allongées en fuseaux, à gram positif (LECLERC et al., 1995).

Non sporulant. Capsule souvent présente, chimioorganohétérotrophes. Les streptocoques sont des germes fragiles, sensible à l'acidité. Certaines espèces on besoin de milieux enrichis. La gélose au sang convient bien à leur culture. Après 24 heurs – 48 heurs de culture, à 37°C et à pH 7,3, les colonies des streptocoques ont un diamètre de 0,5mm, elles sont transparentes, translucides, en dôme. En bouillon donne un trouble homogène (AVRIL., 1992).

Les streptocoques fermentent les glucides en produisant presque exclusivement de l'acide lactique, sans production de gaz, absence de catalase (LECLERC et al., 1995).

Pouvoir pathogène

Les streptocoques peuvent être responsables d'infection de gravité variable. Elles sont des hôtes inconstant du rhino-pharynx des individus en bonne santé; peuvent déterminer des infections aigues (angines érythémateuses, rhinites, sinusites, otites), de la peau et des muqueuses (érysipèle, impétigo, pyodermite), des complications non suppurées (rhumatisme articulaire aigu, glomérulonéphrite aigue) (LECLERC et al., 1995).

Les streptocoques provoquent des infections périnatales, des méningites, pneumonie chez les nouveaux nés. Chez les bovins, les streptocoques sont l'agent causale de la mammite (LECLERC et al., 1995).

I- Objectifs

Le choix d'un agent anti-microbien (antibiotique) pour traiter une infection est basé sur son activité propre vis-à-vis de l'agent pathogène et sur ses caractéristiquespharmacocinétiques, cela nécessite des testes bactériologiques par différentes méthodes in vitro au niveau du laboratoire afin d'établir l'influence de l'agent anti-infectieux sur la croissance de germe.

Notre travail consiste à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait de la plante Rosmarines officinalis L et étudier l'activité des différentes CMI déterminées des extraits en association avec les antibiotiques contre diverses souches bactriennes.

II- Matériel

Notre matériel de travail est composé d'un :

- Matériel végétal (Romarin et ses extraits). La plante a été récoltée de l'université de Jijel.
- Les solvants organiques (éthanol, éther de pétrole, éther diéthylique et l'acétate d'éthyle).
- Les milieux de cultures (bouillon nutritif, milieu SFB, gélose nutritive, milieu Chapman et gélose Muller-Hinton).
- Les souches bactériennes (Escherichia Coli, Salmonella, Streptocoque et Staphylococcus aureus) issus du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Jijel.

III- Méthodes

III-1- Méthodes d'extraction (BRUNETON 14993)

La plante étudiée appartient à la famille des Lamiaceae = Rosmarinus officinalis L. On la récolte au printemps (Avril – Mai).

L'extraction se fait selon le protocole expérimental suivant :

III-1-1- Séchage

Après lavage par l'eau distillée on fait séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant 21 jours au laboratoire puis dans l'étuve de 50 °C pendant 24 heurs.

III-1-2- Broyage

On a broyé les feuilles séchées de la plante a fin d'obtenir une poudre fine, cette dernière est passée ensuite à travers d'un tamis de 1mm. Le poids récupéré est égal à 300g.

III-1-3- L'extraction Hydro-Ethanolique

L'extraction hydro-éthanolique s'effectue en ajoutant au 300g de matériel végétal (poudre tamisée) un mélange contenant 70% éthanol et 30% d'eau distillée. Pour les 300g de la plante, le volume total du solvant est égale à 1500 ml (1050 ml éthanol et 450 ml eau distillée).

On laisse macérer pendant 48 Reurs a fin de récupérer le maximum des composantes de la plante.

La filtration du mélange hydro-éthanolique

On filtre le mélange au papier filtre, cette opération permet de récupérer les substances organiques.

❖ L'évaporation à sec

Elle se fait dans le but de séparer l'extrait sec de la phase aqueuse, et ce ci se réalise grâce au rotavapeur à température 50 °C, on a obtenu 65 g de l'extrait.

❖ La reprise par l'eau distillée

65 g de l'extrait obtenu est reprit par l'eau distillée tiède (50 °C) à pourcentage de 30 %. Après 24 h du contact avec l'eau, le mélange est filtré à fin d'éliminer les impuretés. Le volume de l'extrait récupéré après la filtration est de 150 ml, ce dernier est appelé la phase aqueuse.

III-1-4- L'affrontement : (BRUNETON., 1993 et HARBORNE-, 4987)

On affronte la phase aqueuse par trois solvants différents :

- Ether de pétrole ou chloroforme : solvant préférentiel des terpènes et des lipides.
- Ether diethylique : solvant préférentiel des aglycones flavoniques.
- Acétate d'éthyle : solvant préférentiel des monoglycosides.

Affrontement par l'éther de pétrole

On a déversé à la phase aqueuse 100 ml d'éther de pétrole, on fait l'agitation après un repos de 10 minutes, on met le mélange dans une ampoule à décanter pendant 3 heures, deux phases sont obtenues :

- La phase éther de pétrole en haut.
- La phase aqueuse en bas.

La phase aqueuse est remise dans un flacon à descendre, a fin de procéder à une 2^{éme} et 3^{éme} extraction par l'éther de pétrole dans le but de récupérer le maximum de produit alors que la phase éther est récupéré dans un bécher.

* Affrontement par l'éther diéthylique

La phase aqueuse obtenue après affrontement à l'éther de pétrole, est traitée de même manière que précédemment mais avec un autre solvant qui est l'éther diéthylique.

On ajoute à la phase aqueuse récupérée, 100 ml d'éther diethylique, après une agitation on remet le mélange dans une ampoule à décanter pendant 3 heures, à la fin on a obtenu :

- La phase éther diéthylique en haut.
- La phase aqueuse en bas.

La phase aqueuse est remise dans une fiole a fin de répéter l'opération deux fois par l'éther diéthylique dont la même but que précédemment, alors que la phase éther diéthylique est récupérer dans un bécher.

Affrontement par l'acétate d'éthyle

Même procédure que précédemment seulement le solvant utilisé est l'acétate d'éthyle, on récupère deux phases :

- La phase aqueuse dans un flacon.
- La phase d'acétate d'éthyle dans un bécher.

III-1-5- Evaporation à sec

Les différentes phases récupérées (phase d'éther de pétrole, phase d'éther diethylique et phase d'acétate d'éthyle) sont évaporées à sec à l'aide d'un rotavapeur ; pour l'éther de pétrole la température utilisée est 40 °C, par contre pour l'éther diéthylique et l'acétate d'éthyle la température est de 35 °C.

Les résidus sec obtenus sont additionnées à des volumes d'eau distillée tiède égale à celui du poids des résidus (a fin d'obtenir des concentration de l'ordre de 1 g/ml) on récupéré pour :

- L'éther de pétrole : 2 g de résidu sec.
- -L'éther diethylique : 4 g de résidu sec.
- L'acétate d'ethyle : 2 g de résidu sec

III-2- Identification des bactéries

L'identification d'une souche bactérienne inconnue se fait par l'étude comparative de ses caractères avec les caractères de souche de référence, définies et répertoriées de manière à l'assimiler pour comparaison à une espèce déjà connue et classée.

III-2-1-Etude morphologique

*Etude macroscopique

Elle permet de connaître :

L'aspect des colonies qui poussent sur le milieu sélectif solide.

Les caractères physiques des colonies : leur taille, couleur, aspect ainsi que leur surface.

*Etude microscopique

Coloration deGram (BOUSSEBOUA., 2002)

Elle permet de différencier les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif.

Technique

- fixation du frottis

- · laisser sécher le frottis à température ambiante.
- fixer le frottis en le passant trois ou quatre fois lentement sur flamme.
- · laisser refroidir.

- Coloration

- . Recouvrir le frottis de violet de gentiane pendant 1 minute.
- . Rincer à l'eau courante, égoutter.
- . Recouvrir le frottis de lugol pendant 1 minute.
- . Rincer à l'eau courante, égoutter.
- . Incliner la lame, verser l'alcool-Acetone jusqu'à disparition du reflet bleu.
- . Rincer à l'eau courante immédiatement et égoutter.
- . Recouvrir le frottis par la fushine de Ziehl pendant 2 minutes.
- . Rincer à l'eau courante, égoutter puis sécher.

Lecture

- .Lecture au microscope (gros 100 à émersion).
- . Les bactéries Gram+ sont colorées en violet.
- .Les bactéries Gram- sont colorées en rose.

III-2-2-Identification biochimique

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

*Métabolisme glucidique

Il est intéressant d'étudier pour des fins taxonomiques la possibilité pour les glucides d'être utilisés comme seul source de carbone et d'énergie.

Principe

La faculté pour un germe d'utiliser comme source d'énergie la dégradation d'un glucide s'accompagne généralement de la production des composés organiques variable.

Dans ce cas, il suffit de rechercher la variation du PH de milieu grâce à un indicateur coloré (DJELOUNAT., 1980).

•L'attaque du mannitol .(LARPENT., 1997)

Le mannitol est un produit de la réduction du D-mannose le milieu mannitol mobilité permet de rechercher simultanément la mobilité et la fermentation du D-mannose qui conduit à la production des acides à chaîne très courte comme l'acide acétique et l'acide fornique

Technique

Le milieu est ensemencé par piqûre centrale avec une anse de platine, puis incubé à 37°c pendant 24h.

Lecture

-Le mannitol (+) se traduit par le virage du rouge au jaune (milieu acide).

Matériel et méthodes Partie pratique

-La mobilité bactérienne se traduit dans ce milieu par l'apparition d'un développement bactérien sous forme d'un nuage autour de la piqûre centrale.

•Fermentation des sucres en milieu TSI (GUIRAUD.,1998)

C'est un milieu qui est utilisé pour l'identification des bacilles Gram négatif et essentiellement pour différentier entre elles les entérobactéries, ce milieu contient outre les éléments nutritifs de base du glucose (1g), et du lactose (10g) et saccharose, du rouge de phénol, de l'hyposulfite de sodium et du sulfate ferreux ammoniacale.

Technique

Le milieu est ensemencé à la surface par des stries et en profondeur par piqûre centrale puis incubé à 37°c pendant 24 heures.

Lecture

L'utilisation des deux sucres, fait virer le milieu du rouge au jaune.

Le sulfure d'hydrogène (H₂S) est formé à partir des acides aminés soufrés. La présence d'hyposulfite de sodium et du sulfate ferreux ammoniacal entraîne la formation de sulfure de fer qui est un composé de couleur noire.

• Utilisation de l'Ion citrique comme unique source de carbone

Utilisation du citrate de Simmons (BOUSSEBOUA., 2002)

Principe

Certaines bactéries sont capables d'utiliser l'ion citrique comme unique source de carbone. De telles bactéries sont aptes à cultiver sur des milieux synthétiques dont la seule source de carbone est constituée par le citrate de sodium.

Cette croissance peut s'accompagner d'une libération d'ammoniaque d'où, le plus souvent, alcalinisation du milieu et entraîne ainsi le virage l'indicateur coloré (bleu de bromothymol). L'un des milieux utilisés pour cette étude est celui au citrate de simmons.

Technique

Le milieu de simmons au citrate est ensemencé, à partir de la culture pure agée de 24 heures, en surface par stries longitudinales et incubé à 37°c pendant 24 heures.

Lecture

L'utilisation du citrate se traduit par un développement bactérien accompagné d'un virage de l'indicateur coloré du vert au bleu.

*métabolisme protéique

•Recherche d'indole (LARPENT., 1997)

Principe

Certaines bactéries dégradent le Tryptophane en indole acétique, seules les bactéries indologènes permettent cette dégradation jusqu'à la formation d'indole.

Technique

Un tube de 1 ml d'urée est ensemencé par le germe étudie et incubé à 37°c pendant 24 heures.

Lecture

La présence de l'indole se traduit par la formation d'un anneau rouge, en présence de réactifs de KOVACS-EHRLICHE, à la surface de milieu.

• Recherche décarboxylases des acides aminés

Les décarboxylases catalysent la décarboxylation des acides aminés et entraînants la formation de l'amine correspondante avec la libération de CO₂ suivant la réaction.

•Lysine décarboxylase LDC (DJELOUNAT., 1980)

Principe

Certaines bactéries possèdent une décarboxylase qui agit sur un acide aminé particulier : la lysine dégradée en cadavrine.

La cadavrine réagit avec la ninhydrine en donnant une coloration violette.

Technique

Le milieu de moeller enrichi de lysine est ensemencé par la culture et incubé à 37°c pendant 24 heures.

•l'ornithine décarboxylase : ODC (CARBONNELE., 1987)

Principe

Pour lornithine, la réaction semble directe, ce qui conduit à sa transformation en putre x ine. L'amine formée alcalinise le milieu de culture et amène le virage de l'indicateur de couleur.

Technique

Le milieu moeller enrichi de l'ornithine est ensemencé par la culture et incubé à 37°c pendant 24 heures.

Lecture

La présence de l'ornithine décarboxylase se traduit par la production de la putrexinequi réagit avec la ninhydrine en donnant une coloration violette.

• Recherche de l'argenine dihydrolase(ADH).(PGUIRAUD.,1998)

Principe

Certaines bactéries décarboxylase l'argenine et conduisent à la production de l'agmatine ou la cadavrine avec libération de NH₃ par désamination oxydative de l'argenine.

Technique

Le milieu moeller enrichi avec de l'argenine est ensemencé par une culture fraîche de bactéries, puis il est incubé à 37°c pendant 24 heures.

Lecture

L'apparition de la couleur violette témoigne de l'existence de l'argenine dihydrolase.

*Recherche d'uréase (GUIRAUD., 1998)

But

L'hydrolyse de l'urée en carbonate d'ammoniaque par l'urease est un élément important de diagnostic des germes qui utilise l'urée comme seule source d'azote.

Principe

C'est l'hydrolyse de l'urée avec formation d'ammoniaque et carbonate d'ammonium.

Technique

1ml de milieu urée indole est ensemencé par l'anse, et incubé à 37°c pendant 24 heurs.

Lecture

Le virage de l'indicateur de PH au rouge violacé prouve la dégradation de l'ammoniac et la production de carbonate d'ammonium qui induisent l'alcalisation du milieu.

*Nitrate réductase (LARPENT., 1997)

Technique

-Emulsionner dans 1ml de la solution de NaNO₃ (substrat) une anse pleine de culture prélevée à la surface du milieu solide.

-Incuber à 37°c pendant 2 heurs.

-Ajouter 0,25 ml du mélange des réactifs 1+2 (volume à volume).

-Lire 20 minutes après, en laissant les tubes à température ambiante.

Lecture

On doit observer un virage à la couleur rouge. S'il y a virage au rouge, le test est positif. S'il n'y a pas changement de couleur, ou bien le test est négatif ou bien il y a réduction des nitrites.

Pour confirmer ajouter un peu de poudre de zinc au mélange de la réaction. La poudre de zinc réduit le nitrate en nitrite en agissant comme catalyseur. On observe alors une réaction vraiment négative se manifestant par un virage au rouge dés que le réducteur est ajouté.

Remarque

L'ensemble des testes d'identification ont été réalisés pour confirmer la souche bactérienne Escherichia coli.

IH-3-Préparation des dilutions

La méthode de dilution nous a permis de déterminer les valeurs de la CMI .on peut définir la CMI par la concentration minimale inhibitrice ou bien la plus faible concentration d'un antibiotique capable d'inhiber dans un milieu (soit milieu liquide soit milieu solide), tout culture visible de la souche bactérienne étudiée.

Réalisation

La solution mère à été préparé en solubilisant 1g de l'extrait sec de la plante *Rosmarinus* officinalis L de differnts solvant (Ether de pétrole, éther diéthylique et acétate d'ethyl) dans une solution de 1ml d'eau distillée. Afin d'obtenir une solution de 1g/ml.

A partir de la solution mère on réalise une série des dilutions.

Ces dilutions sont montrées dans le tableau ci dessous

Tableau (5): Les différentes dilutions de la solution mère (CARBONNELE.,1987).

Concentration initiale (mg/ml)	Volume de l'extrait (ml)	Volume de l'eau (ml)	Concentration finale (mg/ml)
1000	6,4	3,6	640
	2	2	320
640	1	3	160
	0,5	3,5	80
	0,5	7,5	40
	2	2	20
40	1	3	10
	0,5	3,5	05
	0,5	7,5	2,5

Matériel et méthodes Partie pratique

III-4-Préparation des suspensions bactériennes

- -A partir d'une culture pure sur milieu d'isolement .Racler cinq colonies bien isolées et parfaitement identiques, puis décharger l'anse dans le bouillon nutritif (SFB pour *Salmonella*) et incuber à 37°c pendant 18 heurs pour l'obtention d'une culture jeune.
- -A partir de chaque bouillon trouble, prélever une anse puis la décharger dans 10ml d'eau physiologique stérille (NaCl 0,9%).
- -Pour préparer les suspensions bactériennes destinées au test d'antibiogramme, ces suspensions sont lues au spectrophotomètre à longueur d'onde 625n m, l'absorbance doit être comprise entre 0,08 et 0,1 afin d'obtenir une opacité équivalente à 0,5 MC ferland (LEYRAL et al., 1998).
- -L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.
 - -L'ensemencement doit se faire les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.







Figure (10): Les différentes dilutions de la solution mère

III-5-Activité antibactérienne r par diffusion sur milieu gélosé (méthode des disques)

La technique de diffusion nous a permet de gagner du temps et économiser du milieu en mettant en œuvre des disques. la technique utilisée dans notre travail est la technique NCCLS (National Commite for clinical Laboratory Standard). Son principe est relativement simple:

-Lorsqu'un disque imprégné de substance testée est placé sur la gélose préalablement inoculée avec la bactérie testée, il s'humidifie et l'extrait de la plante diffuse radicalement du disque, dans la gélose on obtient ainsi un gradient de concentration.

-La substance antimicrobienne est présente en forte concentration à proximité du disque et affecte des microorganismes même faibles (les organismes résistants se développent jusq'au disque) (PRESCOTT et all., 1995)

III-5-1-Milieu

La gélose Muller-Hinton est coulée en boit de pétri sur une épaisseur de 4 mm.

-Les géloses sont pré- séchées avant l'emploi.

III-5-2-Préparation des disques

On a utilisé le papier Wattman N°3 coupés en disque de 6mm ce dernier doit avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer.

Les disques, une fois préparés, sont placés dans une papier d'aluminium et autoclaver 20 min à 120°c.

III-5-3-Ensemencement

- -Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- -L'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de décharger aux maximum.
- -Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosé sèche de haut en bas en stries serrées.
- -Dans le cas ou on ensemence plusieurs boites de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.
- -Préparation des dilution utilisée pour l'aromatogramme permet de déterminer les valeurs de la CMI (concentration minimal inhibitrice) de l'extrait à base de l'éther de pétrole, à base d'éther diéthylique et à base d'acétate d'ethyl.
- -Pour chaque souche nous prenons deux boites de pétri; on place cinq disques imprégné de l'extrait à base d'éther de pétrole dans chaque boite.

De même pour les deux extraits à base d'éther diéthylique et à base d'acétate d'ethyl.

-Les boites sont laissées pendant 30 min sur un plan horizontal à température ambiante pour faciliter la diffusion des extraits.

Incubation

Les boites sont incubées à 37°c pendant 18 heurs.

Remarque

- Les disques sont imprégnés dans des dilutions décroissantes de l'extrait de chaque base (Solvant).

-Pour les quatre souches, le nombre des boites utilisées est 24.

Lecture

Après incubation, les boites sont examinées, les disques sont entourés par les zones d'inhibition.

On mésure avec précision les diamètres des zones d'inhibition avec une règle.

III-6-L'antibiogramme

Pour une majorité des bactéries responsables de pathologie infectieuse, il est hasardeux voire impossible aujourd'hui de connaître a priori les antibiotiques aux quels une espèce sera systématiquement sensible.

L'utilisation rationnelle des antibiotiques en clinique humaine passe donc par la réalisation in vitro de technique particulière d'étude de la souche bactérienne incriminée face aux différentes molécules d'antibiotiques (CARBONNELE et al., 1987)

Technique

Pour chaque souche bactérienne on a utilisé une série de 07 boites de pétri:

- -Une boite comme témoin (la souche bactérienne est traitée seulement par les antibiotiques).
- -Pour les 06 autres boites, dans chaque 02 boites la souche bactérienne est traitée par des antibiotiques imprégnés dans chaque phase.
 - .02 boites pour la phase d'éther de pétrole.
 - .02 boites pour la phase d'éther diéthylique.
 - .02 boites pour la phase d'acétate d'ethyl.

Après les manipulations, les boites ont été placées sur un plan horizontal pour faciliter la diffusion des antibiotiques.

Après 30min, les boites ont été incubées à 37°c pendant 18 heures.

Lecture

Après incubation, les boites sont examinées, les disques sont entourés par les zones d'inhibition.

On a mesuré avec précision les diamètres des zones d'inhibition avec une règle.

Remarque

- Les antibiotiques utilisés sont:
- . AM: Ampicilline
- . AMX: Amoxicilline.
- . E: Erythromycine.
- . S: Streptomycine.
- . TE: Tetracycline.
- . 1E. Tellacycinic.
- . CTX: Céfotaxime.
- -Dans le test d'antibiogramme, on à utilisé 28 boites de pétri ensemencées par 4 souches bactériennes.

-En total le nombre des boites utilisées est 52 (28 boites pour l'antibiogramme et 24 boites pour l'aromatogramme).

RESULTATS ET INTERPRETATIOPN

I- Résultat d'identification d'une souche bactérienne

-La coloration de Gram permet d'observer des bacilles colorées en rose il s'agit des bacilles Gram négatif.

-Les résultats de la galerie biochimique sont représenté dans le tableau suivant:

Tableau(6): Résultats de la galerie biochimique d'Escherichia coli.

Caracteres		TSI		manitol	citrate	indole	LDC	ODC	ADH	urease	Nitrate
biochimiques	Sucre	Gaz	H ₂ S								reductase
Escherichia	+	+	_		_	+	+	+	+	_	+
coli.											

Les autres souches (Staphylococcus aureus, streptocoque et Salmonella) on été déjà identifiées au niveau de laboratoire d'hygiène de JIJEL.

II-Résultats de la diffusion sur milieu gélosé (diamètre des zones d'inhibition de l'extrait du *Rosmarinus officinalis L* sur les differentes souches bactériennes étudiées)

Après 18 heures d'incubation à 37°c, on a retiré les boites et on a mesuré les zones d'inhibition en mm de chaque souche bactérienne traité par les differentes extraits .les résultats obtenu sont résumés dans les tableaux suivants:

II -1 Les bacilles Gram négatif

a-Escherichia coli

Tableau (7): Zones d'inhibition en mm de la souche Escherichia coli traitée par différentes extraits.

Dilution(mg/ml)		Diamètre des zones d'inhibition en mm									
	1000	640	320	160	80	40	20	10	5	2,5	
Extrait à base											
Ether de pétrole	24	15	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ether diethylique	27	20	15	10	9	8	0	0	0	0	
Acétate d'ethyle	11	11	0	0	0	0	0	0	0	0	

La détermination de l'activité antibactérienne est réalisée par le test de diffusion, en testant la sensibilité d'*Escherichia coli*. vis-à-vis des extraits de la plante (Ether de pétrole, Ether diéthylique et acétate d'ethyl) (tableau (7)), (Fig(11))

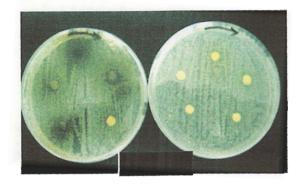
Pour les disques imprégnées dans l'extrait à base d'éther de pétrole, on a remarqué la formation des zones d'inhibition correspondantes à une absence de culture, ces zones ont un diamètre de 24 mm et 15 mm respectivement pour la solution mère (1000mg/ml) et la dilution 640mg/ml. Ce pendant les autres dilutions n'ont pas un effet sur la croissance bactérienne (absence des zones d'inhibition). La concentration inhibitrice la plus importante est 1000mg/ml pour l'extrait à base d'éther de pétrole et la même pour l'extrait à base d'éther diéthylique, tandis que la CMI est 640mg/ml pour l'extrait à base d'acétate d'ethyl.



Extrait à base d'éther de pétrole



Extrait à base d'éther diéthylique



Extrait à base d'acétate d'éthyl

Figure (11):Zones d'inhibition d' *Escherichia coli* traitée par les différents extraits

b- Salmonella

Tableau (8): zones d'inhibition en mm de la souche Salmonella traitée par les différents extraits.

Dilution		Diamètre des zones d'inhibition en mm									
(mg/ml)	1000	640	320	160	80	40	20	10	5	2,5	
Extrait à base											
Ether de pétrole	20	13	13	13	0	0	0	0	0	0	
Ether diethylique	11	11	11	10	9	0	0	0	0	0	
Acétate d'ethyle	35	32	31	30	30	27	25	0	0	0	

Comme le tableau montre, les zones d'inhibition apparaient avec les dilutions 1000mg/ml, 640 mg/ml, 320mg/ml et 160mg/ml ce qui concerne l'extrait à base d'éther de pétrole et jusqu'à la dilution 80mg/ml pour l'extrait à base d'éther diéthylique d'une part. d'autre part , les zones d'inhibition sont aussi apparues avec les dilutions 40mg/ml et 20mg/ml.

Pour l'extrait à base d'éther de pétrole, la concentration la plus éfficace est 1000mg/ml.

Pour l'extrait à base d'éther diéthylique, la CMI est 320 mg/ml.

Pour l'extrait à base d'acétate d'ethyl, la concentration la plus efficace est 1000mg/ml.

Les zones d'inhibition représentées dans la figure (12).



Extrait à base d'éther de pétrole



Extrait à base d'éther diéthylique



Extrait à base d'acétate d'éthyl

Figure(12): Zones d'inhibition en mm de la souche Salmonella traitée par les différents extraits.

II-2- Les cocci Gram positif

a-Streptocoque

Tableau (9): Zones d'inhibition en mm de la souche Streptocoque traitée par les différents extraits.

Dilution(mg/ml)		Diamètre des zones d'inhibition en mm								
Extrait à base	1000	640	320	160	80	40	20	10	5	2,5
Ether de pétrole	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ether diethylique	27	19	16	12	11	0	0	0	0	0
Acétate d'ethyle	35	37	20	15	11	0	0	0	0	0

Ce tableau montre la présence d'une seule zone d'inhibition de diamètre 15 mm avec la dilution 1000mg/ml pour l'extrait à base d'éther de pétrole. Par contre, on observe des zones d'inhibition jusqu'à la dilution 80mg/ml pour les deux phases restées (à base d'éther diéthylique et à base d'acétate d'ethyl).

Pour l'extrait à base d'éther de pétrole: la concentration la plus efficace est 1000mg/ml. Pour l'extrait à base d'éther diéthylique : la concentration la plus efficace est 1000mg/ml.

Pour l'extrait à base d'acétate d'ethyl : la CMI est 640mg/ml.



Extrait à base d'éther de pétrole



Extrait à base d'éther diéthylique



Extrait à base d'acétate d'éthyl

Figure(13): Zones d'inhibition en mm de la souche Streptocoque traitée par les différents extraits.

b- Staphylococcus aureus

Tableau (10): Zones d'inhibition en mm de la souche Staphylococcus aureus traitée par les différents extraits.

Dilution		Diamètre des zones d'inhibition en mm								
(mg/ml)	1000	640	320	160	80	40	20	10	5	2,5
Extrait à base										
Ether de pétrole	25	20	11	9	0	0	0	0	0	0
Ether diethylique	27	20	17	14	13	9	0	0	0	0
Acétate d'ethyle	29	20	19	14	8	8	8	8	8	0

On a remarqué que les dilutions 1000mg/ml, 640mg/ml, 320mg/ml et 160mg/ml apparaient des zones d'inhibition qui sont respectivement de diamètre 25mm, 20mm 11mm et 9mm cela pour l'extrait à base d'éther de pétrole, mais pour l'extrait à base d'éther diéthylique et d'acétate d'ethyl, les zones d'inhibition sont aussi apparaient avec les dilutions 80mg/ml et 40mg/ml.

Pour l'extrait à base d'éther de pétrole : la concentration la plus efficace est 1000mg/ml. Pour l'extrait à base d'éther diéthylique : la concentration la plus efficace est 1000mg/ml. Pour l'extrait à base d'acétate d'ethyl : la concentration la plus efficace est 1000mg/ml. Les zones d'inhibition représentées dans la figure (14).



Extrait à base d'éther de pétrole



Extrait à base d'éther diéthylique



Extrait à base d'acétate d'éthyl

Figure(14): Zones d'inhibition en mm de la souche Staphylococcus aureus traitée par les différents extraits.

Comparaison entre l'effet des différents extraits

L'histogramme ci dessous nous a permis de comparer entre les concentrations les plus efficaces de l'extrait à différentes bases sur les souches bactériennes étudiées.

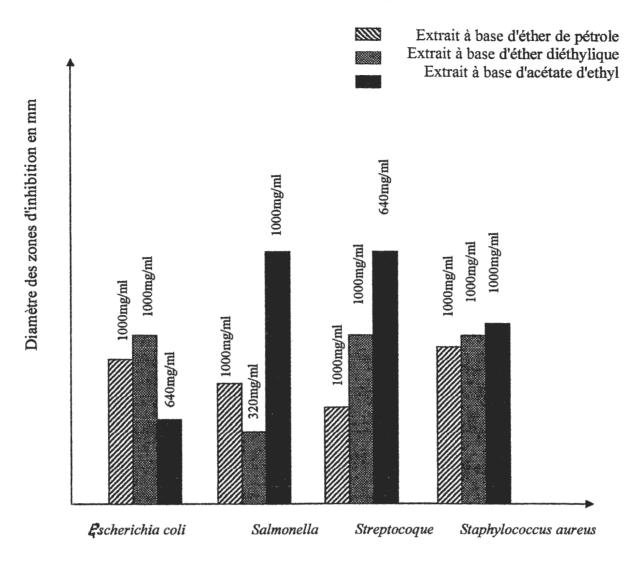


Figure (15): Histogramme représentant l'activité antibactérienne des concentrations les plus efficaces des trois extraits.

Interprétation

D'une manière générale, les résultats de l'activité anti-bactérimmontrent que les différentes extraits de la plante Rosmavinue officinalis L à différentes doses inhibent toutes les souches bactériennes testées et entraînent des diamètres d'inhibition variées.

Parmis les 04 souches bactériennes étudiées on a remarqué que la phase d'acétate d'ethyl a l'effet antibactérienne le plus important sur les trois souches suivantes : Salmonella, Staphylococcus aureus et Streptocoque.

Par contre la 4^{éme} souche *Escherichia coli* on a remarqué que la phase d'éther diéthylique a l'effet antibactérienne le plus important en comparaison avec les autres phases.

III- Résultats de l'antibiogramme

L'étude pratique de l'association des antibiotiques avec les différentes phases de l'extrait de la plante (Rosmarinus officinalis L) à permet de conclure les résultats présentés dans les tableaux suivants.

III-1Bacilles Gram négatif

a-Escherichia coli

Tableau (11): variations du diamètre d'inhibition en mm de l'association des différentes phases de l'extrait avec les antibiotiques sur la souche bactérienne Escherichia coli.

Antibiotiques Association avec l'extrait	AM	AMX	S	TE	E	CTX
Témoin	00	00	26	20	16	40
à base d'éther de pétrole	25	28	27	26	27	32
à base d'éther diéthylique	24	25	27	25	21	37
à base d'acétate d'éthyl	32	32	35	32	20	37

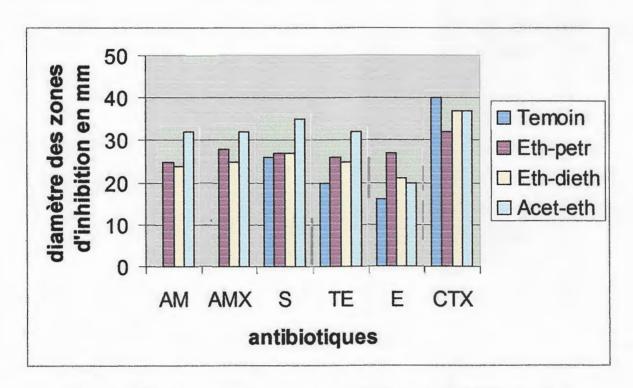


Figure (16): histogramme représentant l'étude de l'activité des extraits de la plante associes avec les antibiotiques sur la souche Escherichia coli.

On a remarqué que la souche bactérienne *Escherichia coli* qui a été résistante aux deux antibiotiques Ampicilline et Amoxicilline a devenue sensible dans le cas d'association de ces 02 antibiotiques avec les 03 extraits étudiés.

Dans le cas de Streptomycine, Tetracycline et Erythromycine, on a noté une augmentation significative du diamètre des zones d'inhibition en comparaison entre les témoins et l'association de ces 03 antibiotiques avec les extraits.

En ce qui concerne l'antibiotique Céfotaxime, on a constaté une régression du diamètre de la zone d'inhibition qui a été de 40 mm dans le témoin et devenu 32 mm en cas d'association avec l'extrait à base d'éther de pétrole et 37 mm en cas d'association avec les deux autres extraits.



Témoin



Extrait à base d'éther de pétrole



Extrait à base d'éther diéthylique



Extrait à base d'acétate d'éthyl

Figure (17) : variation de la sensibilité d'*Escherichia coli* aux extraits de la plante associés avec les antibiotiques

b-Salmonella

Tableau (12): variations du diamètre d'inhibition en mm de l'association des différentes phases de l'extrait avec les antibiotiques sur la souche bactérienne *Salmonella*.

Antibiotiques Association avec l'extrait	AM	AMX	S	TE	Е	CTX
Témoin	32	40	23	20	16	40
à base d'éther de pétrole	32	33	30	30	30	36
à base d'éther diéthylique	29	41	25	25	25	32
à base d'acétate d'éthyl	33	41	37	32	30	43

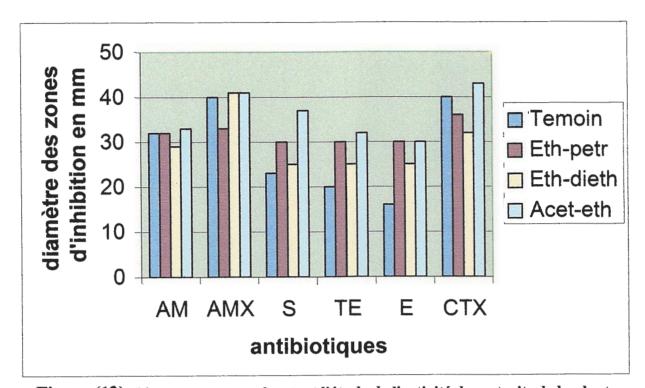


Figure (18): histogramme représentant l'étude de l'activité des extraits de la plante associes avec les antibiotiques sur la souche Salmonella.

Pour les deux antibiotiques ampicillines et amoxicilline on a remarqué que les variations des zones d'inhibition sont négligeables à l'exception de l'association de l'amoxiciline avec l'extrait à base d'éther de pétrole ou on a noté une régression du diamètre de la zone d'inhibition.

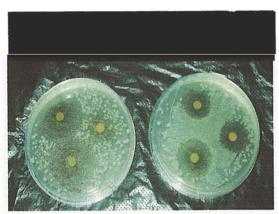
En se qui concerne les 03 antibiotiques: Steptomycine, Tetracycline et Erythromycine on a constaté une angmentation remarquable de diamètre des zones d'inhibition et ceci dans le cas de tous les extraits. Au revanche pour l'antibiotique Céfotaxime on a remarqué une diminution importante du diamètre de la zone d'inhibition dans le cas de l'association avec les deux extraits à base d'éther de pétrole et à base d'éther diéthylique.



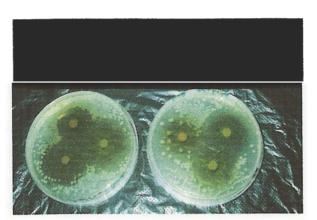
Témoin



Extrait à base d'éther de pétrole



Extrait à base d'éther diéthylique



Extrait à base d'acétate d'éthyl

Figure (19): variation de la sensibilité de Salmonella aux extraits de la plante associés avec les antibiotiques

III- 2-Les cocci Gram positif

a- Streptocoque

Tableau (13): variations du diamètre d'inhibition en mm de l'association des différentes phases de l'extrait avec les antibiotiques sur la souche bactérienne *Streptocoque*.

Antibiotiques						
Association avec l'extrait	AM	AMX	S	TE	E	CTX
Témoin	17	30	36	36	35	23
à base d'éther de pétrole	40	46	40	43	41	35
à base d'éther diéthylique	50	45	33	45	44	50
à base d'acétate d'éthyl	35	45	35	40	42	42

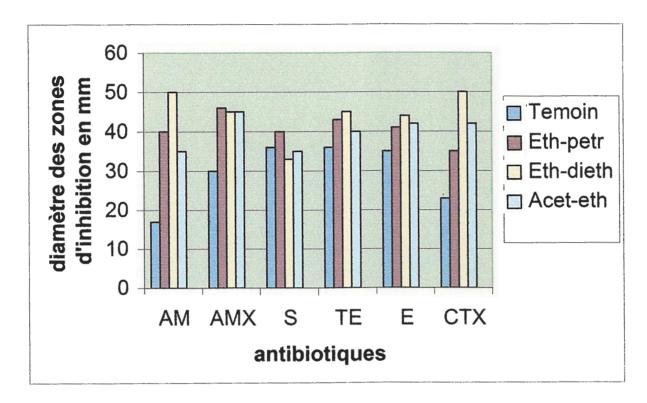
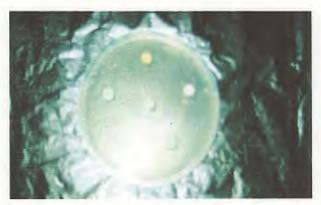


Figure (20): histogramme représentant l'étude de l'activité des extraits de la plante associes avec les antibiotiques sur la souche *Streptocoque*.

D'une façon générale, on a remarqué une augmentation importante de diamètre des zones d'inhibition de tous antibiotiques associés avec les extraits de la plante à l'exception dans le cas de l'antibiotique Streptomycine ou on a noté que le diamètre de la zone d'inhibition reste presque la même en association avec l'extrait à base d'acétate d'ethyl, ainsi on a remarqué une diminution de diamètre de la zone d'inhibition en association avec l'extrait à base d'éther diéthylique.



Témoin



Extrait à base d'éther de pétrole



Extrait à base d'éther diéthylique



Extrait à base d'acétate d'éthyl

Figure (21) : variation de la sensibilité de Streptocoque aux extraits de la plante associés avec les antibiotiques.

b- Staphylococcus aureus

Tableau (14): variations du diamètre d'inhibition en mm de l'association des différentes phases de l'extrait avec les antibiotiques sur la souche bactérienne: Staphylococcus aureus.

Antibiotiques						
Association avec l'extrait	AM	AMX	S	TE	Е	CTX
Témoin	27	35	28	16	40	26
à base d'éther de pétrole	35	40	37	32	50	35
à base d'éther diéthylique	45	43	41	47	40	45
à base d'acétate d'éthyl	30	38	33	30	36	30

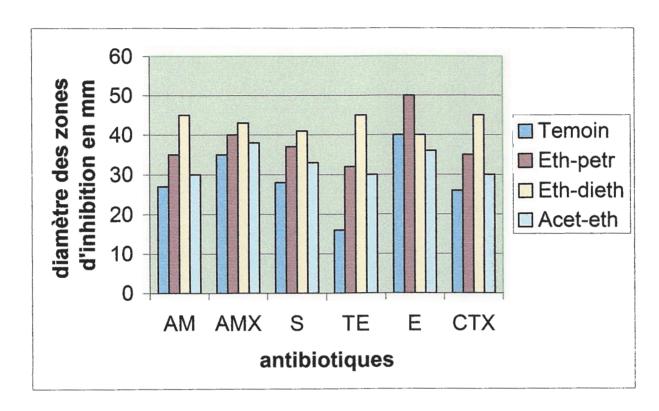


Figure (22): histogramme représentant l'étude de l'activité des extraits de la plante associes avec les antibiotiques sur la souche Staphylococcus aureus.

En général, on note une augmentation significative des zones d'inhibition des disques d'antibiotiques associées aux extraits à base d'éther de pétrole, d'éther diéthylique et d'acétate d'ethyl a l'exception de l'antibiotique Erythromycine ou la zone d'inhibition reste la même à celle du témoin (40mm) pour la phase d'éther diéthylique d'une part, d'autre part elle diminue jusqu'au 36 mm pour la phase d'acétate d'ethyl.



Témoin Extrait à base d'éther de pétrole



Extrait à base d'éther diéthylique



Extrait à base d'acétate d'éthyl

Figure (23) : variation de la sensibilité de Staphylococcus aureus aux extraits de la plante associés avec les antibiotiques.

DISCUSSION

Discussion

Dans le cadre de l'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait de la plante Rosmarinus officinalis L vis-à-vis des différentes souches bactériennes et selon le test de sensibilité par diffusion en gélose (méthode de disques). On a constaté que l'extrait à un effet sur toutes les bactéries testées et entrainent des diamètres d'inhibition variées et que les valeurs des CMI varient d'un extrait à un autre et d'une souche à une autre, on a noté que l'extrait à base d'acétate d'éthyl à l'effet le plus important sur les trois souches Salmonella, Streptocoque et Staphylococcus aureus alors que l'extrait à base d'éther diethylique à l'effet le plus significatif sur Escherichia coli.

L'interaction entre les extraits de la plante Rosmarinus officinalis L et les antibiotiques a montré un effet remarquable sur les deux catégories bactériennes Gram négatif et Gram positif, cet effet se manifeste par des variations et des changements des diamètres des zones d'inhibition.

La sensibilité des quartes souches bactériennes étudiées aux antibiotiques est très différente Elle se diffère d'une souche à une autre, cette différence entre les différents antibiotiques chez la même bactérie est due à la résistance ou à la sensibilité de la bactérie vis-à-vis des antibiotiques.

On a remarqué que la souche *Escherichia coli* est la plus résistante alors que la souche streptocoque est la plus sensible.

Pour les souches Gram (-):

Chez *Escherichia coli*: on a observé pour l'Ampicilline et Amoxicilline que la souche qui à été résistante a devenue sensible en cas de l'interaction, donc il ya une forte influence sur cet espèce bactérien.

Chez Salmonella : les diamètres des zones d'inhibition sont augmentés en comparaison avec le témoin.

Pour les souches Gram (+):

Chez Streptocoque: on a noté un fort effet et ceci pour tous les antibiotiques à l'exception de l'antibiotique streptomycine où l'effet est négligeable en cas de l'interaction avec l'extrait à base d'acétate d'éthyle.

Chez Staphylococcus aureus: on a noté un fort effet et ceci pour tous les antibiotiques à l'exception de l'antibiotique érythromycine où l'effet est négligeable en cas d'interaction avec l'extrait à base d'éther diéthylique.

Finalement, d'après les resultats obtenues au cours de notre étude sur l'interaction entre les antibiotiques et les différents extraits de la plante sur quelques germes bactériens, on a constaté qu'il y a un effet important sur les bactéries à Gram négatif comme *Escherichia coli* et

Discussion Partie pratique

Salmonella. Cet effet se traduit par une augmentation significative de diamètre des zones d'inhibition (SEMIAM et al., 2005).

Les variations de la sensibilité des catégories bactériennes Gram positif et Gram négatif vis à vis des agents antibactériens peuvent être expliquées par la différence de la composition chimique de la paroi de ces deux types des bactéries.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs recherches effectuées dans ce domaine (FRENEY et al., 2000, JEHLL et al., 2000).

CONCLUSION

CONCLUSION

Le monde des végétaux est plein de ressources d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives contre plusieurs troubles particulièrement ceux liés au tube digestif ainsi contre plusieurs infections notamment d'origine bactérienne.

On a pu prouvé l'activité de l'extrait de la plante Rosmarinus officinalis L (Extrait à base d'éther de pétrole, éther diéthylique et d'acétate d'éthyle) in vitro sur les souches bactériennes utilisées dans notre travail, cette activité est remarquable sur certaines souches bactériennes à Gram(-) telle que : Escherichia coli et salmonella et aussi sur certaines souches à Gram (+) telle que : Streptocoque et Staphylococcus aureus. Cette activité est déterminée à partir de l'apparition des zones d'inhibition aux tours des disques imprégnés dans ces extraits.

De même on a pu déterminé la CMI de deux extraits (acétate d'éthyle et éther diéthylique), chez les trois souches bactériennes *Escherichia coli* (avec l'extrait d'acétate d'ethyl), *Streptocoque* (avec l'extrait d'éther diéthylique) et *Salmonella* (avec l'extrait d'éther diéthylique) par contre on a trouvé que la concentration la plus efficace de l'extrait (à base d'éther de pétrole, à base d'acétate d'éthyle et à base d'éther diéthylique) est celle de la solution mère chez la souche *Staphylococcus aureu*.

Parallèlement l'interaction ente les trois extraits et les antibiotiques ont donné dans presque la totalité des cas des résultats significatif autrement dit augmentation de diamètre des zones d'inhibition en comparaison avec chaque agent anti-bactérien séparément.

On peut dire que la plante étudiée est très riche en principes actifs donc l'amélioration des antibiotiques par leurs interactions avec les extraits de cette plante et plus importante pour la lutte contre les différentes infections bactériennes.

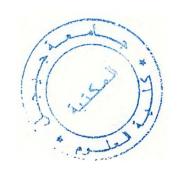
ANNEXE

Annexe

75 - 174 - 1 4 4
Bouillon nutritive
Peptone
Extrait de viande
Chlorure de sodium5g pH = 7,2 autoclaver 20min à 120°c
pri – 7,2 autociaver zomin a 120 c
Milieu TSI
Peptone
Extrait de viande3g
Extrait de levure3g
Chlorure de sodium
Glucose1g
Lactose
Saccharose
Citrate de fer0,5g
Hyposulfite de sodium
Rouge de phenol
Gélose
pH=7,4 autoclaver 15 min à 115°c
Citrate de Simmons
Sulfate de magnésium0,2g
Phosphate monoammoniaque1g
Phosphate dipotassique1g
Citrate de sodium2g
Chlorure de sodium
Bleu de bromotymol80g
Gélose
PH=6,8 autoclaver 20 min à 120°c
Milieu mannitol-mobilité
Peptone
Nitrate de potassium1g
Mannitol2g
Rouge de phénol
Gélose4g
Bouillon urée-indole
Tryptophane3g
Phosphate monopotassique1g
Phosphate dipotassique1g
Chlorure de sodium5g
Urée
Alcool à 95°
Rouge de phénol25mg
PH= 6,7 stérilisé par filtration
-

Milieu nitr	ate
Nitrate de sodium.	0,01M
	0,085g
	0,117g
	0,485g
_ , _	100ml
PH=7	
Milieu Mo	ller
	5g
Extrait pourpre de	bromocrésol5g
Pourpre de bromoc	résol0,1g
Rouge de crésol	5mg
Pyridoxal	5mg
Glucose	0,5g
PH=6 autoclaver 1	5 min à 120°c
Eau physic	ologique
Chlorure de sodiur	n8,5g
Eau distillée	1litre
Autoclaver 20min	à 120°c
Gélose nut	· ····································
Peptone	10g
Peptone Extrait de viande	10g
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodium	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodium Gélose	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodium	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodium Gélose PH=7,2 autoclavem Gélose cha	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodium Gélose PH=7,2 autoclavem Gélose cha Extrait de viande	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodium Gélose PH=7,2 autoclavem Gélose cha Extrait de viande Peptone	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodium Gélose PH=7,2 autoclavem Gélose cha Extrait de viande Peptone Chlorure de sodium	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodium Gélose PH=7,2 autoclavem Gélose cha Extrait de viande Peptone Chlorure de sodium Mannitol	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodium Gélose PH=7,2 autoclavem Gélose cha Extrait de viande Peptone Chlorure de sodium Mannitol Rouge de phénol	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodium Gélose PH=7,2 autoclavem Gélose cha Extrait de viande Peptone Chlorure de sodium Mannitol Rouge de phénol Gélose	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodium Gélose PH=7,2 autoclavem Gélose cha Extrait de viande Peptone Chlorure de sodium Mannitol Rouge de phénol	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodiur Gélose PH=7,2 autoclaver Gélose cha Extrait de viande Peptone Chlorure de sodiur Mannitol Rouge de phénol Gélose PH=7,4 autoclaver	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodiur Gélose PH=7,2 autoclaver Gélose cha Extrait de viande Peptone Chlorure de sodiur Mannitol Rouge de phénol Gélose PH=7,4 autoclaver Gélose Mu Extrait de viande.	
Peptone	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodiur Gélose PH=7,2 autoclaver Gélose cha Extrait de viande Peptone Chlorure de sodiur Mannitol Rouge de phénol Gélose PH=7,4 autoclaver Gélose Mu Extrait de viande. Hydrolysat acide of Amidon	
Peptone Extrait de viande Chlorure de sodiur Gélose PH=7,2 autoclaver Gélose cha Extrait de viande Peptone Chlorure de sodiur Mannitol Rouge de phénol Gélose PH=7,4 autoclaver Gélose Mu Extrait de viande. Hydrolysat acide of Amidon	

REFERENCES BIBLIOGRAPHIE



Bibliographie

- p (125) من الأعشاب و النباتات الطبية -1- AUDI.B.,1993
- 2- AVRIL.J.L., 1991 Dictionnaire pratique de bactériologie clinique., p: 44, 89, 91, 105,106,107 et 110.
- 3- BAMBEKE.F.V.,PHARM.D,FRANCOISE et TULKENS.P.,1997 pharmacologie et pharmacothérapie. Anti-infectieuse.,p:1, 2, 3, 10, 15, 17, 23, 24, 26, 34, 38, 44, 49 et 59.
- 4- BELOUED.A .,1998-plantes médicinales d'Algérie., p (184).
- 5-BLANCHE MAISON.P., 2000- les phlébotoniques de 1930 à nos jours, vol 54,n°=4 473.
- 6-BOISSONNET.B et BOISSONNET.G; 1976 Abrégé de bactériologie générale et applique; Ed MarKeting.,p(181).
- 7-BOULAHBAL.F., 1993 Microbiologie s₁ clinique., p(127).
- 8-BOUSSEBOUA.H., 2002-Microbiologie générale., p(148).
- 9- BRUNETON.J., 2002- Phytotherapie "les donnée de l'evaluation"., Ed. lavoisier.
- 10- BRUNETON.J., 1993- Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales, 2^{éme} édition TEC et DOC.lavoisier., p:268,274, 277, 267,406,409, 422,423 et 555.
- 11- BUGNICOURT.M., 1995-Dictionnaire de microbiologie générale., Paris., p. 146 et 991.
- 12- CARBONNELE.B., DENIS.F., MARMONIER.A., DINON.G et VARGUES.R., 1987-Bactério- logie médicale " techniques usuelles" Ed.SIMAP. SA., Paris., p. 121et 130.
- 13- CHRISTIAN.R., MANACH.C., DENIGNE.C., TEXIER.O et REGERAT.F "Intérêt nutritionnel des flavonoïdes".médecine et nutrition 32., p:17 et 27.
- 14- DARBERNAT.H et DENIS.F., 1992-Bactériologie clinique, J-Avril., p. 149, 152, 156, 268 et 335.
- 15- DJELOUNAT.S-Le diagnostique biochimique bactérien, Ed science et technique, Constantine 1980., p(118).
- 16- DUVAL. J et SOUSSY. C. J., 1990-Antibiothérapie, 4ème Edition.
- 17- EBERLIN.T- Les Antibiotiques, classification, Mode d'action, utilisation thérapeutique., Pris 1994.,pp.
- 18- EYQUEM.A., ALOUF.J et MONTOGNIER.L.,1998 Traité de microbiologie clinique., p: 1297 et 1299.
- 19- FRENEY.J., RENAUDE.F., HANSEN.W et BOLLET.C., 2000- Précis de bactériologie clinique., Ed. ESKA Février .,p: 709, 714, 1071 et 1095.
- 20- GUIRAUD.J.P., 1998 Microbiologie alimentaire., p. 220 et 262.
- 21- HARBORNE.J.B- Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. second Ed., p:5,100-107

- 22- HASLAM.E., 1989-Plant polyphénols végétal, tannins.
- 23- HASLAM.E., 1993 -Shikimic acid, metabolism and metabolites.,.
- 24- HERTOG. M.G.L., HOLLMAN.P et KATAN.M., 1993- "Dietary antioxidant flavonoids and risk of caronory heart disease., p: 1007 et 1011.
- 25- JEHL.F., CHOMARAT.M et GERARD.A., 2000- De l'Antibiogramme à la prescription.Ed. Biomérieux.
- 26- JOFFIN.CH., 1998- Microbiologie alimentaire.5^{ème} Ed. p(31).
- 27-KEZZAL.K.,1993 Les antibiotiques (classification, mode d'action, résistance, action in vitro)., p:87 et 88.
- 28- LARPENT.J.P., 1997- Elément de microbiologie., p(177).
- 29- LARPENT.J.P., LARPENT.M et GOURGAUD, A., 1997-Mémento technique de microbiologie 3 ème Ed., p(73).
- 30-LECHAT .,1982-Abrégé de pharmacologie., Paris., p. 114 et 115.
- 31- LECLERC.H., GAILLARD.L et SIMONET.M., 1995 -Microbiologie générale "La bactérie et le monde bactérien" ., Paris., p: 420, 423, 440 et 441.
- 32- LEYRAL.G et JOFFIN.J.N., 1995 -Microbiologie technique.,p(69).
- 33- MAHMOUDI.Y La thérapeutique par les plantes les plus communes en Algérie., p(89).
- 34- MEYER.A., DEIANA.J et LECLERE.H., 1994 -Cours de microbiologie générale nouveau programme., nouvelle Ed., p:220,221,223,225,226,227et 230.
- 35- MOLLARET.H., 1984 Médecine et maladies infectieuses " 1^{ère} et 2^{ème} partie"., p: 760 et 775.
- 36- NUTR.J., 1996- Flavonoïde, chemistry, cardioprotectrice, effet antidirectery, source, biochen. vol7., p(165).
- 37- PRESCOTT., HARLEY et KLEIN., 1995- Microbiologie., p:328, 329 et 673.
- 38- RICHTER.G., 1993 -Métabolisme des végétaux(physiologie et biochimie).,p:287,315,331et339.
- 39- SEVENET.T., 1994- Plantes, molécules et médicaments., paris., p : 7et 8.
- 40- SINGLETON.P., 1999 2^{ème} cycle bactériologique.4^{ème} Ed. Paris., p: 331, 332, 386, 391, 392 et 393.
- 41- SUTRA.L., 1998 Manuel de bactériologie alimentaire., p: 32, 33, 39, 40, 53, 57, 58, 59 et 60.
- 42- TORTORA.J.G., BERDELLR.F et CHRISTINEL.C.,2003 -Introduction à la microbiologie. Ed. du renouveau pédagogique. INC., p:762et763.

43- WICHTL.M et ANTON.R., 1999-Les plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique.,p: 478,479et480.

Sites d'Internet :

A: www.google.fr/rosmarinus.

B: www.google.fr/file://a:/flavonoides.htm.

C: http://www.perso.xanador.fr/francis george/plante-méd.htm.

 $\label{eq:D:http://www.memberes.lycos.fr//jj.www/flavonoides.htm.} D: http://www.memberes.lycos.fr//jj.www/flavonoides.htm.$

E: http://www.perso.wana.doc.

F: http://www.google/fr/flavonoides.

		ė		
,				
	•			•
,				
			•	

téalisé	par	:	
,			

OULDZMARA Samia BOUKERRIA Sabira HAMIDA Sara Thème

Etude de l'interaction entre les antibiotiques et l'extrait de la plante médicinal Rosmarinus officinalis L in vitro

Date: /07/2006

لغص

دراسة نشاط النبئة الطبية إكليل الجبل المضاد للبكتيريا بين أن طور أسيتات الإيثيل الذي يحتوي خصوصا على السكريات الأحادية له التأثير الأكثر أهمية على البكتيريا المدروسة (سالمونيلا، سترابتركوك و س.أوريوس) باستثناء إشيرشياكولي أين لاحظنا أنها جد حساسة للفلافونويدات اللاسكرية بالنسبة لدراسة التداخل بين مستخلصات هذه النبتة مع المضادات الحيوية النتائج بيّت أن البكتيريا سالبة الغرام جد حساسة للسكريات الأحادية بينما البكتيريا موجبة الغرام للفلافونويدات اللاسكرية بالإضافة إلى ذلك السبحات الكروية أيضا حساسة للترينويدات.

الكلمات المفتاح: نشاط مضاد للبكتيريا ، إكليل الجبل، السكريات الاحادية ، الفلافونويدات اللاسكرية، التربنويدات، السالية الغرام، الموجية الغرام، مضادات حيوية.

Résumé

L'étude de l'activité antibactérienne de la plante médicinale Rosmarinus officinalis L a montré que la phase acétate d'ethyl qui contient principalement des monoglycosides à l'effet le plus important sur les bactéries étudiées (Salmonella, Streptocoque et Staphylococcus aureus) à l'exception d'Escherichia coli où on a remarqué qu'elle est très sensible aux aglycones flavoniques. Concernant l'étude de l'interaction des extraits de cette plante avec les antibiotiques les résultats ont monté que les gram négatif sont sensibles aux monoglycosides tandis que les gram positif aux aglycones flavoniques de plus les Streptocoques sont aussi sensibles aux terpènes.

Mots clés: activité antibactérienne, Rosmarinus, monoglycosides, aglycones flavoniques, terpènes, gram négatif, gram positif, antibiotiques.

Summary

The survey of the antibacterial activity of the plant medicinal Rosmarinus officinalis L showed that phase acetate of ethyl that contains monoglycosideses mainly to the most important effect on the studied bacteria (Salmonella, Streptococcus and Staphylococcus aureus) to the exception of Escherichia coli where one noticed that it is very appreciable to aglyconeses flavoniqueses. Concerning the survey of the interaction of excerpts of this plant with antibiotics results showed that the negative gram are appreciable to monoglycosideses while the positive gram to aglyconeses flavoniqueses besides streptococci are as appreciable to terpenoïdes.

Key Words: antibacterial activity, Rosmarinus, monoglycosideses, aglyconeses flavoniqueses, terpenoides, negative gram, positive gram, antibiotics.

Responsable de recherche :

Madame: BENHAMADA Wahiba