

Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La  
Recherche Scientifique

Université de jijel  
Faculté des sciences  
Département de biochimie et microbiologie

MB. 28/05

Mémoire De Fin D'étude En Vue De L'obtention Du Diplôme Des  
Etudes Supérieures D.E.S En Biologie

OPTION : Microbiologie

جامعة محمد الصديق بن يحيى  
كلية علوم الطبيعة و الحياة  
المكتبة  
رقم الجرد : 656

Thème :

Etude de l'activité antibactérienne de l'huile  
essentielle du *Rosmarinus officinalis* L

Les membres de jury :

- Président : M. Roula Sadja .
- Examineur : Mr. Boudjerda Djamel .
- Encadreur : M<sup>lle</sup> Laggoune Souheila .

Réalisé par :

M<sup>lle</sup> Lounis Sonia .  
M<sup>lle</sup> Kias Manel .



Promotion : 2005



## *Remerciements*




*Nous tenons à remercier avant tout Dieu qui nous a donné la force et la volonté pour faire ce modeste travail.*

*Mes sincères remerciements et profonde gratitude d'abord à notre promotrice Mlle Laggoune Souheila, pour son soutien total, pour sa disponibilité, pour ses énormes compétences scientifiques et morales.*

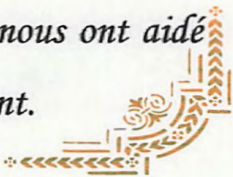
*Nous tenons à remercier également les membres du jury, pour avoir accepté de juger ce mémoire.*

*Nous ne terminons pas sans avoir exprimer notre vifs remerciements à tous les enseignants qui ont contribués à notre formation et à tous les techniciens du laboratoire de la biologie.*

*Sans oublier les membres spéciaux de la Ligue Nationale des Etudiants Algériens.*



*Enfin, Nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidé de loin ou de près même par le simple mot d'encouragement.*







## Dédicace



*Je dédie ce modeste travail à ma chère Naima, ma mère, sans oublier mon chef papa qui m'ont guidé vers le chemin de savoir, et qui m'ont encouragé durant mes années d'études.*

*A mes chers frères, le petit scout Islam, le joueur d'USMA Bilel, et le prochain Ingénieur Amine ; A ma sœur Radia qui représente ma deuxième partie, à toute la grande famille et à la promotion de Microbiologie 2004/2005.*

*Sans oublier les membres spéciaux de la Ligue Nationale des Etudiants Algériens.*



SONIA





# Dédicace

- Parce qu'il y a des choses plus facile à écrire qu'a dire, c'est avec un grand plaisir et honneur que je dédie ce modeste travail à :
- Mon cher père ( رحمه الله ) qui n'a jamais cessie de me solliciter d'avoir continuer mes études, en lui disant merci infinemet papa.
- Ma très chère Maman qui m'a entouré tout au long de ma vie, de son amour et sa tendresse.
- Tous mes frangins et frangines et en particulier: *Idriss, Abdelkadar, Neige, Rofia, Assia, Aziza.*
- Ma belle-sœur : *Safia*
- Mes beaux frères: *D' Gherzi B*, pour son aide et *Massaoud* pour son encouragement.
- Mes Chers neveux surtout : *Ahcèn, Afif, Fadi, Abdel raouf, Abdel ghafour, Walid et Amir.*
- Mes Chères nièces en particuliliér: *Mounia, Lynda, Hiba, kamilia, Hana, Miada et Norelhouda.*
- Mes chères amies chacune de son non et spécialement à mes intimes: *Oum el wafa et Kenza, Nadjiba*
- *Sans oublier: Lynda, Sonia, Sara, Nabila, Samira, Badiâa, Fatiha, Fatima, Karima,*
- Mes professeurs respectueux *M<sup>elle</sup> Laggoun S, M<sup>elle</sup> Ben gadwer L, M<sup>elle</sup> Ben hamada W, Rouibah M et D<sup>R</sup> Tilbi A.*
- A ceux qui m'ont encouragé et aidé dans la réalisation de ce projet.
- A tous ceux j'aime.

*Manel*

## Résumé :

Notre travail consiste à déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'espèce *R. officinalis* L, appartenant à la famille des Labiées (Lamiaceae). Cette dernière compte près de 4000 et 350 genres de plantes distribuées à travers le monde et plus particulièrement dans la région méditerranéenne.

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L a montré une bonne activité *vis-à-vis* des souches testées et surtout les cocci à Gram (+) : *Staphylococcus aureus* et les bacilles à Gram (-) : *Enterobacter cloacae* .

**Mots clés:** Labiées (Lamiaceae); *R. officinalis* L; Huile essentielle; Activité antibactérienne.

## Liste d'abréviation

<b>ADH</b>	: Arginine dihydrolase.
<b>ATCC</b>	: American Culture Type Collection
<b>B-gal</b>	: Beta-galactosidase.
<b>BN</b>	: Bouillon Nutritif.
<b>C°</b>	: Degré Cels us
<b>CHU</b>	: Centre Hospitalo-Universitaire.
<b>CMI</b>	: Concentration minimale inhibitrice.
<b>DO</b>	: Densité Optique.
<b>g</b>	: gramme.
<b>g/ml</b>	: gramme par milli litre.
<b>HE</b>	: Huile essentielle.
<b>h</b>	: heure.
<b>Lac</b>	: Lactose.
<b>LDC</b>	: Lysine décarboxylase.
<b>LPS</b>	: Lypopolysaccharide.
<b>M-H</b>	: Mueller-Hinton.
<b>Man</b>	: Mannitol.
<b>mm</b>	: milli mètre.
<b>µm</b>	: micro mètre.
<b>mn</b>	: minute.
<b>NCCLS</b>	: National Commite for Clinical Laboratory Standars.
<b>NB</b>	: Nota Béné.
<b>ODC</b>	: Ornithine décarboxylase.
<b>ONPG</b>	: Orterophenyl-p-galactopynoside.
<b>Oxy</b>	: Oxydase.
<b>pH</b>	: Potentiel redox hydrogène.
<b>RM</b>	: Rouge de Méthyle.
<b><i>R.officinalis</i></b>	: <i>Rosmarinus officinalis</i> .
<b>Sac</b>	: Saccharose.
<b>T°</b>	: Température.
<b>TDA</b>	: Tryptophane désaminase.
<b>Type R</b>	: Type roogh.
<b>Type S</b>	: Type smooth.
<b>VP</b>	: Voges Proskauer.

## Liste des Figures :

<b>Figure1</b> : <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	15
<b>Figure2</b> : Appareil Clevenger.....	35
<b>Figure3</b> : Effet antibactérien de l'huile essentielle du <i>R. officinalis</i> sur <i>E. coli</i> .....	46
<b>Figure4</b> : Effet antibactérien de l'huile essentielle du <i>R. officinalis</i> sur <i>S. typhimorium</i> .....	46
<b>Figure5</b> : Effet antibactérien de l'huile essentielle du <i>R. officinalis</i> sur <i>K. Pneumoniae</i> .....	47
<b>Figure6</b> : Effet antibactérien de l'huile essentielle du <i>R. officinalis</i> sur <i>E. Cloacae</i> .....	47
<b>Figure7</b> : Effet antibactérien de l'huile essentielle du <i>R. officinalis</i> sur <i>P. aeruginosa</i> .....	48
<b>Figure8</b> : Effet antibactérien de l'huile essentielle du <i>R. officinalis</i> sur <i>S. aureus</i> .....	48

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1</b> : Teneur en huiles essentielles de diverses épices et herbes.....	7
<b>Tableau 2</b> : Activités de différentes espèces du genre <i>Rosmarinus</i> .....	16
<b>Tableau 3</b> : Les composants majeurs de différentes espèces du genre <i>Rosmarinus</i> .....	18
<b>Tableau 4</b> : Caractères biochimiques d' <i>E. coli</i> .....	21
<b>Tableau 5</b> : Caractères phénotypiques de <i>S. typhimirium</i> .....	23
<b>Tableau 6</b> : Caractères biochimiques de <i>K. pneumoniae</i> .....	25
<b>Tableau 7</b> : Caractères biochimiques d' <i>E. cloacae</i> .....	26
<b>Tableau 8</b> : Caractères biochimiques de <i>P. aeruginosa</i> .....	27
<b>Tableau 9</b> : Sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques.....	31
<b>Tableau 10</b> : Les différentes dilutions de la solution mère.....	42
<b>Tableau 11</b> : Résultats de la galerie biochimique d' <i>Enterobacter</i> .....	44
<b>Tableau 12</b> : Zones d'inhibition en mm (résultats de l'aromatogramme).....	44
<b>Tableau 13</b> : Détermination de la CMI (Concentration minimum inhibitrice).....	49



# SOMMAIRE :

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Partie I : Etude bibliographique.</b>	
<b>Chapitre I : Introduction bibliographique sur les huiles essentielles.</b>	
I- Historique.....	2
II- Définition des huiles essentielles.....	3
III-La répartition.....	3
IV- La localisation.....	3
V- Formation.....	4
VI- Rôles et intérêt thérapeutiques des huiles essentielles.....	4
VI-1-Rôle biologique.....	4
VI-2 -Rôle physiologique.....	4
VI-2-A-Propriété antiseptique.....	4
VI-2-B-Propriété de défloculation.....	4
VI-2-C-Propriété de diurèse.....	5
VI- 2-D-Pouvoir osmotique.....	5
VI-2-E- Le Pouvoir bioélectronique.....	5
VI-3-Rôle thérapeutique.....	5
VI-4-Rôle cosmétique.....	6
VI-5-Rôle culinaire.....	6
VII-Propriétés fondamentales des huiles essentielles.....	8
VII-1- Propriétés physico-chimiques.....	8
VII-2- Composition chimique.....	9
VII-2-A- Composés d'origine variées.....	9
VII-2-B- Composés aromatiques.....	9
VII-2-C- Les terpènes ou terpénoïdes.....	9
VIII-Principaux domaines d'application.....	9
VIII-1-Alimentation.....	10
VIII-2- Pharmacie.....	10
VIII-3- Parfumerie et cosmétique.....	10
VIII-4- Aromathérapie.....	11
IX- Procédés d'extraction.....	11
IX-1- La distillation.....	11
IX-1-A- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	11
IX-1-A-1- L'hydrodistillation.....	11
IX-1-A-2- L'entraînement à la vapeur.....	12
IX-1-B- Extraction par les solvants organiques.....	12
IX-1-B-1- Extraction par les solvants volatils .....	12
IX-1-B-2- Extraction par le foraine 113(F <sub>2</sub> CIC-CCl <sub>2</sub> F).....	12
IX-1-B-3- Extraction par le dixique de carbone liquide ou supercritique.....	12
IX-2- L'enfleurage.....	12
IX-3-Expression.....	12
IX-4-L'incision.....	12
<b>Chapitre II : Etude antérieure sur genre <i>Rosmarinus</i>.</b>	
I-Aspect botanique.....	13
I-1-Taxonomie.....	13

I-2- Caractères généraux de la famille des labiées.....	13
I-3- Caractères généraux du genre <i>Rosmarinus</i> .....	13
I-4- Caractère généraux du l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	14
I-5- Localisation.....	14
I-6- Utilisation traditionnelle.....	14
II- Aspect chimique.....	16
II-1- Composition chimique.....	16
II-2- L'activité de l'huile essentielle de différentes espèces de <i>Rosmarinus officinalis</i> L...16	

### Chapitre III : Aperçu sur les bactéries.

Introduction.....	19
I- Les principaux germes étudiés.....	19
II- Caractères généraux sur les souches étudiées.....	20
II-1- Généralité sur la famille des enterobacteriaceae.....	20
II-2- Caractères cultureux.....	20
II-3- Caractère antigéniques.....	20
II-4- Le Pouvoir pathogène entérobactéries.....	21
II-5- Les bacilles à Gram négatif.....	21
II-5-A- <i>Escherichia coli</i> .....	21
II-5-A-1- Caractère biochimiques.....	21
II-5-A-2- Pouvoir pathogène.....	22
II-5-A-3- Propriétés antigéniques.....	22
II-5-A-4- Facteur de virulences.....	22
II-5-B- <i>Salmonella typhimurium</i> .....	22
II-5-B-1- Caractères bactériologiques.....	22
II-5-B-2- Caractères phénotypiques.....	23
II-5-B-3- Pouvoir pathogène.....	24
II-5-B-4- Toxines.....	24
II-5- <i>Klebsiella, Entérobacter</i> .....	24
II-5-C-1- <i>K. Pneumoniae</i> .....	25
II-5-C-1-a- Caractères bactériologiques.....	25
b- Caractères biochimiques.....	25
c- Pouvoir pathogène.....	25
d- Toxines.....	26
II-5-C-2- <i>Enterobacter</i> .....	26
a- Habitat et épidémiologie.....	26
b- Caractères biochimiques.....	26
c- Pouvoir pathogénie.....	26
II-5-D- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	27
II-5-D-1- Caractères bactériologiques.....	27
II-5-D-2- Caractères biochimiques.....	27
II-5-D-3- Caractères cultureux et pigments.....	27
II-5-D-4- Pouvoir pathogène.....	28
II-6- Les cocci à Gram positif : Les staphylocoques.....	28
II-6-A- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
II-6-A-1- Caractères bactériologiques.....	28
II-6-A-2- Caractères biochimiques.....	29
II-6-A-3- Substances élaborées.....	29
II-6-A-4- Pouvoir pathogène.....	29
III- Sensibilité des souches bactériennes étudiées aux agents antimicrobiens.....	30

## Partie expérimentale.

I- Matériel et méthodes.....	32
I-1- Matériel.....	32
I-1-A- Matériel bactériologiques.....	32
I-1-B- Matériel végétal.....	32
I-1-C- Les milieux de culture.....	32
I-1-D- Les réactifs.....	33
I-1-E- Autre matériels.....	33
II- Méthodes.....	33
II-1- Méthodes d'extractions de l'huile essentielle du <i>R. officinalis</i> L.....	33
II-1-A- Etude antérieure sur analyse des huiles essentielles du genre <i>Rosmarinus</i> .....	33
II-1-A-1- Matériel végétal et extraction de l'huile essentielle du <i>R. officinalis</i> L.....	33
II-1-A-2- La méthode d'extraction de l'HE du <i>R. officinalis</i> L.....	34
II-2- Méthode d'étude de l'activité antibactérienne du <i>R. officinalis</i> L.....	36
II-2-1- Méthode de l'étude bactériologique.....	36
II-2-1-A- Revivification des souches.....	36
II-2-1-B- Identification biochimique.....	36
II-2-1-B-1- Métabolisme glucidique.....	36
a- Attaque du mannitol.....	36
b- fermentation des sucres en milieu TSI.....	37
II-2-1-B-2- Recherche des produits résultant de la fermentation du glucose.....	37
a- Réaction de rouge de méthyle.....	37
b- Réaction de Voges Prokauer.....	38
II-2-1-B-3- Utilisation de l'ion citrique comme unique source de carbone.....	38
❖ Utilisation du Citrate de Simmons.....	38
II-2-1-4- Métabolisme protéique.....	39
❖ Recherche d'indole.....	39
II-2-1-B-5- Recherche de B- galactosidase.....	39
II-2-2- Aromatogramme par diffusion sur milieu gélosé (méthode de disque).....	40
II-2-3- Détermination de la CMI.....	42
III- Résultats et discussion.....	44
III-1- Identification biochimique.....	44
III-2- Résultat de l'aromatogramme.....	44
III-3- Détermination De la CMI.....	49
III-4- Discussion des résultats.....	50
Conclusion.....	52
Bibliographie.	
Annexe.	

# Introduction



## Introduction:

Le règne végétal comprend des substances organiques de structure et d'utilisation variées. En effet, les plantes renferment des composants chimiques qui se répartissent en deux grands groupes : les protides, les glucides, les lipides et les acides nucléiques d'une part, les pigments, les polymères, les tanins, les saponosides, les flavonoïdes, les vitamines, les hormones... et les essences végétales dites huiles essentielles d'autre parts. Les premiers sont les constituants du métabolisme primaire, ils existent en permanence au sein de la plante. Les autres proviennent du métabolisme secondaire et ne sont pas toujours présents chez les végétaux [19].

Au cours des siècles, l'information sur les manières dont les huiles essentielles ont été utilisées s'est transmise de génération en génération. Les scientifiques ont commencé à étudier les différents constituants des huiles et de développer des contreparties synthétiques, c'est ainsi que l'industrie moderne des médicaments est née.

Parmi les plantes médicinales les plus connues, la famille des Lamiacées (ou labiées), est une importante famille de plante dicotylédones qui comprend 4000 espèces et près de 350 genres. Ce sont le plus souvent des plantes herbacées, des arbustes et rarement des arbres ou des lianes, producteurs d'huiles essentielles.

Cette famille est une importante source d'huiles essentielles et d'antibiotiques pour l'aromathérapie, la parfumerie et l'industrie des cosmétiques. On y rencontre beaucoup d'espèces cultivées comme plantes condimentaires (romarin, sauge, thym, menthe, etc...)

Notre choix s'est porté sur l'espèce *Rosmarinus officinalis* L qui est un arbrisseau toujours vert des terrains calcaires des régions méditerranéennes [40] et connu en médecine traditionnelle par son nom « Klil ».

# Partie I

Étude bibliographique

Étude bibliographique

**C  
h  
a  
p  
i  
t  
r  
e  
I**

Introduction bibliographique  
sur les huiles essentielles

**I- Historique :**

La nature, dans sa grande générosité, nous propose une riche palette de plante pour aider à la guérison. Oubliées pendant de nombreuses années, les huiles essentielles sont redevenues des vedettes en matière thérapeutique.

Les traces d'utilisation de l'aromathérapie remontent à plus de 7000 ans, preuve en est un alambic en terre cuite retrouvé au Pakistan datant de cette époque. On trouve des inscriptions datant de 4000 ans en Mésopotamie et des écrits égyptiens datant de 3500 ans. Les Romains utilisèrent également les huiles essentielles. Mais la grande épopée des huiles essentielles débute au 15<sup>ème</sup> siècle jusqu'en 1935, date à laquelle elles furent reléguées en arrière plan avec la découverte de la pénicilline... A noter qu'aucun parfumeur n'a jamais été soumis à une quelconque contamination.

Au début du XVII<sup>ème</sup> siècle, Paracelse (médecin suisse père de la pharmacologie) étudia l'âme des végétaux sous forme de quintessence à laquelle le nom d'esprit a été donné. Puis, on lui attribua le nom d'essence et finalement d'huile essentielle [27].

C'est Valnet qui en 1970 va relancer l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles avec ses débats et son livre qui est maintenant dépassé vu les expérimentations et recherches effectuées depuis, avec les moyens modernes à notre disposition.

En 1990 la médecine aromatique qui sera renommée ainsi par l'auteur D. Penoel hérite d'un livre complet et toujours référence "L'aromathérapie exactement" comprenant les chémotypes et indications thérapeutiques se référant à des bases scientifiques [55].



## II- Définition des huiles essentielles :

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 donné la définition suivante d'une huile essentielle : C'est un produit obtenu à partir d'une matière végétale soit par entraînement à la vapeur, soit par distillation à sec.

Ensuite, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques [6, 27].

## III- La répartition [27] :

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le monde végétal. Elles se retrouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles . Au titre d'exemple, 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, etc.)

## IV- La localisation :

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

- ❖ Les sommités 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, etc...

Elles sont souvent plus concentrées dans les 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 [27].

#### **V- 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, etc.).

Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules où 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 [27].

#### **II-I-5-Rôles et intérêt thérapeutiques des huiles essentielles:**

##### **VI-1- Rôle biologique :**

La fonction biologique des terpénoïdes des huiles essentielles demeure la plus souvent obscure. Il est toutefois 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 des pollinisateurs [54].

##### **VI-2- Rôle physiologique :**

Le rôle physiologique des huiles essentielles est aujourd'hui mis en lumière par le progrès scientifique [9, 13] :

##### **VI-2-A- 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 [14].

##### **VI-2-B- Propriété de défloculation :**

Les huiles essentielles sont défloculantes (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) [12].

**VI-2-C- Propriété de diurèse [14]:**

L'huile essentielle fait fonctionner les 4 grands 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.

**VI-2-D- Pouvoir osmotique :**

Les huiles essentielles sont employées en cosmétique, en kinésithérapie et en balnéothérapie. Les huiles essentielles utilisées contre les affections de la peau ont des propriétés cicatrisantes dues à leurs activités physico-chimiques 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 [14].

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 mental (relaxation, excitation...) et sur l'organisme en général [37].

**VI-2-E- Le pouvoir bioélectronique :**

Il a été mis en avant par L.C Vincent [22] avec ses 3 mesures fondamentales qui sont recherchées dans les 3 liquides: Sang, salive, urine.

- Le pH ou mesure acido-basique pour les huiles essentielles est presque toujours acide, ce qui contrarie le développement pathogène évaluant toujours dans des valeurs basiques (7 à 14).
- L'oxydoréduction : ce paramètre indique la tendance ou non des 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) [22].

**VI-3-- Rôle thérapeutique :**

Les huiles essentielles, reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques, agissent sur la 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 aromatiques ont un rôle important dans notre vie soit physiologique ou bien thérapeutique, sans oublier le rôle biologique de ces huiles (inhibiteurs des germinations et protecteurs des plantes des prédateurs –insectes, champignons) [3, 53].

#### VII-4- 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 produits d'hygiène, on notera la présence d'huiles essentielles dans les préparations pour bains [29].

#### VII -5- Rôle culinaire [27] :

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

Le tableau (1) représente les teneurs en huiles essentielles de diverses épices et herbes aromatiques:





**Tableau-1: Teneurs en huiles essentielles de diverses épices et herbes aromatiques.**

ÉPICES	HUIES ESSENTIELLES MIN-MAX(%)
Ail	0,1- 0,25
Aneth (graines)	2,5- 4
Anis	1-4
Badiane	2-3
Basilic doux	0,1
Cardamones	4-10
Carotte	0,5-0,8
Carvi	3-6
Cassis	1-3,8
Cenelles	1,6-3,5
Clou de girofle	14-21
Cumin	2,5-5
Estragon	0,3-1,5
Genièvre (bais)	0,5-2,5
Laurier	0,5-1
Livèche	0,1-1
Macis	8-13
Marjolaine	0,2-0,3
Menthe poivrée	0,2-0,3
Noix de muscade	2,6-12
Origan	1.0 approximatif
Poivre	1,0 -3,5
Romarin	0,5
Safran	0,5 -1
Sarriette	0,1 -0,2

## **VII- Propriétés fondamentales des huiles essentielles :**

### **VII-1- Propriétés physico-chimiques :**

Les huiles essentielles diffèrent des huiles grasses, par leurs propriétés physiques et leurs compositions, du fait qu'elles se volatilisent à la chaleur et que leurs taches sur le papier sont passagères. Autrefois, les essences étaient appréciées pour leurs propriétés organoleptiques (odeur, goût, couleur et aspect) vu l'usage qui en était fait comme matière aromatisantes et parfumantes.

Aujourd'hui, les propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, solubilité dans l'alcool, indice d'acide, d'ester ...) sont exigées pour leurs évaluations commerciales.

Les huiles essentielles sont des substances caractérisées par une forte odeur aromatique liée à leur volatilité et sont généralement incolores ou faiblement colorées (jaune pâle).

Cependant, on rencontre quelques-unes d'entre elles qui sont colorées comme l'essence de cannelle, d'absinthe et de camomille qui sont respectivement colorées en rouge, vert et bleu.

La plupart d'entre elles sont plus légères que l'eau. Il existe toutefois des huiles plus lourdes comme par exemple les essences de cannelle, girofle et de saffran.

Leurs densité varie de 0,8 à 1,08, leurs température d'ébullition de 160°C à 240°C [12, 29].

Elles ont des indices de réfraction élevés et elles sont le plus souvent optiquement actives car elles contiennent des molécules asymétriques.

Ces substances sont solubles dans les solvants organiques usuels et les huiles grasses. Elles sont liposolubles et très peu solubles dans l'eau à laquelle toutefois elles communiquent leur odeur. On parle alors d'eau aromatique.

Elles se caractérisent par des indices chimiques qui permettent d'évaluer approximativement la quantité de fonctions chimiques (acides, ester, alcool...) présente dans les composants de l'essence.

De plus, elles sont sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser pour former des produits résineux [27].

**VII-2- 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 terpénoïdes, d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane d'autre part. Il existe également d'autres corps qui entrent en faible proportion dans la constitution de certaines huiles essentielles (acides, organiques, esters et autres ...) [27].

**VII-2-A- Composés d'origines variées :**

A l'intérieur de ce groupe on distingue divers hydrocarbures aliphatiques.

**VII-2-B- Composés aromatiques :**

Les composés « phénylpropanoïde ». Ce sont très souvent des allyl et propénylphénols.

On trouve parfois des aldéhydes, le cinnamaldéhyde les acides benzoïques, cinnamique et des aldéhydes phénols.

**VII-2-C- les terpènes ou terpénoïdes :**

Ce sont des hydrocarbures de structure très diverses : acycliques, monocycliques, bicycliques ... portant parfois différentes fonctions.

**VIII- Principaux domaines d'application :**

Par leurs nombreuses et diverses propriétés, les plantes aromatiques et leurs essences trouvent leur emploi dans de multiples domaines telles que : l'alimentation, la pharmacie, la parfumerie, l'aromathérapie et autres ... [27].

**VIII-1-Alimentation [27] :**

*Les vertus antiseptiques, et en même temps les propriétés aromatisantes des essences s'utilisent quotidiennement dans les préparations culinaires (thym, ail, laurier,...).*

Les essences aromatiques donnent aux condiments (poivre, gingembre,...) et aux aromates (menthe, anis, laurier,...) leurs saveurs.

Les arômes sont à base d'huiles essentielles (citron, anis, vanille,...). Ainsi les essences d'anis et de badiane sont les principales sources d'anéthol naturel, composé utilisé en liquoristerie (fabrication des boissons anisées) et en confiserie (bonbons, chocolats,...) de même la vanille sert à aromatiser les biscuits, les chocolats, les glaces,...

Par ailleurs, le pouvoir anti-oxydant de certaines essences permet la conservation des aliments en évitant les moisissures. C'est ainsi que le thym et le romarin servent à conserver le smen.

Actuellement, l'industrie agroalimentaire utilise des essences dans les préparations surgelées non seulement pour rechausser le goût mais aussi pour empêcher les contaminants alimentaires de se développer (effet antimicrobien).

**VIII-2-Pharmacie [27] :**

*Les huiles volatiles ont un grand intérêt en pharmacie. Elles s'utilisent sous la forme de préparations galéniques et dans la préparation d'infusion (verveine, thym, menthe,...).*

Aussi, elles s'emploient pour leurs propriétés aromatisantes pour masquer l'odeur désagréable des médicaments destinés à la voie orale.

Plus de 40% des médicaments sont à base de composants actifs issus de plantes. de nombreuses huiles essentielles se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de spécialités pharmaceutiques : sirop, gouttes, gélules, etc.

A titre indicatif le « Pérubore » sous forme de tablette, s'utilise pour la préparation d'inhalation rapide et se compose d'un mélange d'essences de thym, de romarin, de lavande, de bergamote, du thymol et de baume de Pérou.

**VIII-3- Parfumerie et cosmétique [27] :**

Les propriétés odoriférantes des huiles essentielles conférant à ces derniers une consommation importante en parfumerie et en cosmétique. Elles présentent environ 60% des matières premières de l'industrie des parfums synthétiques, du parfumage des savons et des cosmétiques.

La cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène emploient des essences dans les rouges à lèvres, les shampoings, les dentifrices,...

#### VIII-4- Aromathérapie [27] :

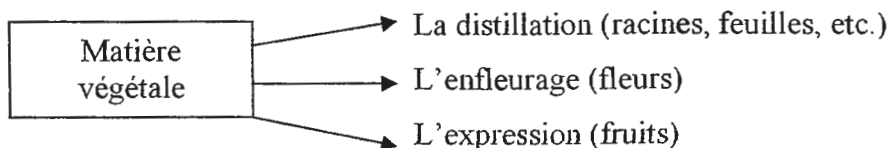
Les huiles essentielles constituent le support du traitement des maladies par les essences des plantes ou aromathérapie.

La masso-kinésithérapie, l'ostéopathie, la podologie, l'acupuncture, la rhumatologie, l'esthétique, etc. Sont autant de formes thérapeutiques médicales qui utilisent les huiles essentielles en baume, en huile de corps et en huile de bain.

#### IX-Procédés d'extraction [27]:

Les huiles essentielles sont extraites de la matière végétale par différents procédés. Le choix de la technique dépend de la localisation histologique de l'essence dans le végétal et de son utilisation dans les diverses industries.

Les principales méthodes d'extraction peuvent être représentées comme suit :



#### IX-1 – La distillation :

C'est la méthode la plus connue. Elle consiste à vaporiser partiellement un liquide (eau, solvant organique) qui entraînera avec lui substances volatiles. Les vapeurs ainsi formées sont condensées par un système de réfrigération par courant d'eau froide et seront ensuite récupérées.

#### IX-1-A- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

##### IX-1-A-1- L'hydrodistillation :

C'est la technique la plus simple et la plus répandue, consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (broyé ou pas) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité.

**IX-1-A-2- L'entraînement à la vapeur :**

Pour ce faire, la plante ou organe de plante est placé dans un ballon traversé par un courant de vapeur d'eau. Dans les deux cas les principes volatils peu solubles dans l'eau sont alors entraînés par la vapeur d'eau du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe.

Après condensation, ils sont séparés par décantation. Ces deux techniques sont souvent confondues.

**IX-1-B- Extraction par les solvants organiques :****IX-1-B-1-Extraction par les solvants organiques volatils :**

Les solvants à température d'ébullition peu élevée sont employés pour éviter la décomposition des molécules odorantes les plus fragiles.

**IX-1-B-2-Extraction par le foraine 113 (F<sub>2</sub> C1C-CCl<sub>2</sub> F) :**

C'est une méthode qui permet d'extraire un mélange d'huile essentielle et de huile lipidique en même temps.

**IX-1-B-3- extraction par le dioxyde de carbone liquide ou supercritique :**

Elle exige des pressions élevées et est basée sur le fait que le gaz CO<sub>2</sub> présente un pouvoir de dissolution accru *vis-à-vis* des huiles essentielles.

**IX-2- L'enfleurage :**

Cette opération très ancienne concerne l'extraction des parfums des fleurs par contact avec une matière grasse. Elle est basée sur la forte affinité que représentent généralement les molécules odorantes pour les huiles et les grasses.

**IX-3- L'expression :**

C'est un mode opératoire qui consiste à extraire les huiles essentielles de l'épicerie de certains fruits en les soumettant à de fortes pressions, à chaud ou à froid, à la main ou mécaniquement.

**IX-4- L'incision :**

C'est une opération très rarement utilisée. Elle est spécifique à l'écorce des arbres. Il suffit de fendre l'écorce pour en récolter le suc



**C  
h  
a  
p  
i  
t  
r  
e  
  
I  
I**

*Etude antérieure sur le genre  
Rosmarinus*

**I- Aspect botanique :****I-1-Taxonomie :**

Embranchement .....	Spermaphytes (phanérogames)
Sous embranchement.....	Angiospermes
Classe.....	Dicotylédones
Sous classe.....	Gamopétales
Ordre.....	Lamiales
Famille.....	Lamiaceae
Genre.....	<i>Rosmarinus</i>
Espèce.....	<i>Rosmarinus officinalis</i> L

**Classification du *Rosmarinus officinalis* L****I-2- Caractères généraux de la famille des labiées :**

Selon Quezel [55], la famille des labiées est une arbustes, sous-arbrisseaux ou plantes herbacées en général odorants, à tiges quadrangulaires. Feuilles en général opposées sans stipules. Inflorescences en cymes axillaires ± contractées simulant souvent des verticilles (verticillastres), ou encore condensées au sommet des tiges, et simulant des épis (spicastes). Fleurs 5 mères en général hermaphrodites. Calice à 5 divisions ± bilabié, persistant. Corolle en général bilabié, longuement tubuleux, parfois à 4-5 lobes sub-égaux ou à une seule lèvre inférieure trilobée, la supérieure bilobée. Étamines 4, la cinquième nulle ou très réduite; parfois, 2 étamines et 2 staminodes. Anthères à loges parfois dissociées et à connectif très différencié. Ovaire supère à 2 carpelles originellement bi-ovulés, ensuite uniovulés par la constitution d'une fausse cloison style bifide, en général gynobasique. Fruits constitués par 4 akènes ± soudés par leur face interne et diversement ornés.

Famille très importante dans la flore de l'Algérie. Certains genres sont de déterminations délicates en raison de la variabilité extrême des espèces [59].

**I-3- Caractères généraux du genre :**

Selon Quezel [55], le genre *Rosmarinus* est décrit comme une arbustes ou sous-arbrisseaux ligneux très odorants. Feuilles linéaires à marge révoluée, gaufrées, verdâtres en

dessus plus ou moins hispides ou blanchâtres en 02 lèvres, la supérieure entière ou à peine marginée pas plus longue que l'inférieure, cette dernière trilobée [59].

#### **I-4- Caractères généraux de l'espèce :**

Inflorescences et calice à pilosité pruineuse très courte constituée par des poils étroitement appliqués. Inflorescences en épis très courts, à bractées squamiformes de 1-2 mm, rapidement caduques pousse dans les garrigues et les forêts claires [24, 59].

#### **I-5- Localisation :**

Le romarin, répandu dans tout le bassin méditerranéen, a l'état sauvage sur les sols calcaires dans les maquis, garrigues et sur les collines arides.

Il est fréquemment cultivé dans les jardins comme plante d'ornement et comme condiment [2, 27].

#### **I-6- Utilisation traditionnelle [56] :**

Bien connu des anciens, le romarin a été célèbre au 17<sup>ème</sup> siècle, son alcoolat, connu alors sous le nom d'eau de la reine de Hongrie étant très renommé pour guérir particulier la paralysie et la goutte.

Depuis toujours, le romarin jouit d'une glorieuse réputation. Ainsi le poète latin Horace le désigne comme étant une plante sacrée douée de vertus quasi magiques.

Dioscoride l'indique en cas d'affections du foie et de l'estomac, ainsi que Galien qui en fait le meilleur remède contre la jaunisse. Les médecins arabes qui savaient en extraire l'huile essentielle en faisaient grand usage contre les maux les spagiries et les apothicaires de la renaissance le tenant également en haute estime.

C'est la reine de Hongrie Elisabeth qui immortalisa à jamais le romarin en 1378, âgée de 72 ans, souffrant atrocement de la goutte et paralysée, elle reçut d'un monastère la formule d'un élixir de jouvence qui était en fait une macération de fleurs de romarin dans l'alcool cette préparation désormais célèbre dans le nom d'eau de la reine de Hongrie permit à celle-ci de retrouver miraculeusement sa vigueur et sa fraîcheur.

Celui dont on tire l'huile essentielle pousse spontanément dans les garrigues sauvages. Stimulantes, les fleurs de romarin sont généralement recommandées en cas de fatigues physique ou intellectuelle, pour protéger et stimuler le foie et la viscère biliaire.



**FIGURE 1 : *Rosmarinus officinalis* L (Romarin) [2]**



**II- Aspect chimique :****II-1- La composition chimique :**

En dehors de l'huile essentielle, le romarin, ferme plusieurs composés intéressants pouvant intervenir dans son action, en particulier des dérivés polyphénoliques :

\*\*Pigment flavoniques : mis en évidence par Bezanger et Guilbert (1965), étudiés par les mêmes auteurs (1970) et par Brieskorn et Doenung (1968) : il s'agit de glucosides de flavones (apigénine et luteoline et de genkroanol (methyl-7 apigénine).

\*\*Acide rosmarinique : l'ancien « tanin des labiées », qui est un depside de l'acide caféique (Scarpati et Oriebte, 1959 à : il en existe 2 à 3 p 100.

\*\*Un principe amer : la picrosalvine ou carnosol. C'est une lactone diterpinique comportant 2 fonctions hydroxyles en ortho (Brieskorn et Fuchs, 1962).

De petites quantités d'un alcaloïde, la rosmaricine, ont été caractérisées par Yakhontova et Anisimova, 1962, mais d'après Wenkert et coll. (1965), il s'agit d'un artefact du à l'action de l'ammoniaque employée pour l'extraction sur l'acide carmosique (correspondant au carnosol) d'autre part, les dérivés triterpéniques sont abondants : 2 à 4 p100 d'acide ursolique (Pourrat et le Men, 1953)  $\alpha$  et  $\beta$  amyryne, etc.

L'huile essentielle (1à 2 p100) est constituée par des dérivés terpéniques : carbures, pinène, camphène, cinéol, bornéol et acétate de bornyle, Det DL camphre (Graf et Hoppe, 1964) [56].

**II-2- L'activité de l'huile essentielle de différentes espèces de *Rosmarinus officinalis* L:**

Les différentes activités thérapeutiques des espèces du genre *Rosmarinus* sont dues à leurs métabolites variés. Ces huiles essentielles de ces espèces possèdent également des activités variées (anti-microbienne...). Nous avons résumé les composants d'huiles essentielles d'espèces du *Rosmarinus* (seulement les composants majoritaires sont dressés) et leurs activités dans les Tableau -2 -, -3 -.

**Tableau -2- : Activités de différentes espèces du genre *Rosmarinus*.**

Espèce	Activité	Références
<i>Rosmarinus</i>	Fongicide	6
<i>Rosmarinus</i>	Antioxydante	25
<i>Rosmarinus officinalis</i> L	Antioxydante	50
<i>Rosmarinus</i>	Antibactérienne	57,42

Le tableau -3- montre que les composants majoritaires de différents espèces du genre *Rosmarinus* se différent d'un espèces a un autre (même dans la même espèce) selon la région, ce qui nous exprime que les condition du climat jouent un rôle important dans la diversité du genre *Rosmarinus*.



Tableau -3 - : Les composants majeurs de différentes espèces du genre *Rosmarinus* .

Espèces et origines	Composants majeurs	Pourcentages	Références
<i>Rosmarinus eriocalyx</i> Algerie	1,8-cineole, camphor. borneol, $\alpha$ -terpineol. $\beta$ -caryophyllene, $\delta$ -cadinene, $\alpha$ -humulene.	Composants majoritaires	7
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. Algerie	1,8-cineole, camphor. borneol, $\alpha$ -terpineol. bornyl acetate, $\beta$ - caryophyllene, $\delta$ -cadinene, $\epsilon$ -muurolene, $\alpha$ - humulene.	Composants majoritaires	7
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. Algerie	1,8-cineole camphor	52.4% 12.6%	10
<i>Rosmarinus eriocalyx</i> Algerie	camphor camphene $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole	32.3-37.0% 17.0-20.0% 15.2-18.2% 7.6-11.4%	1
<i>R. officinalis</i> Espagne, Italia	camphor 1,8-cineole limonene	35.3% and 17.7% 24.0% and 23.5% 11.0% and 9.5%	1
<i>Rosmarinus officinalis</i>  Chine	$\alpha$ -pinene camphene $\beta$ -pinene phellandrene 1,8-cineole $\gamma$ -terpinene $\alpha$ -terpinene camphor borneol linalool bornyl acetate $\beta$ -caryophyllene $\alpha$ -caryophyllene	32.26% 7.58% 5.10% 3.82% 31.58% 1.56% 1.65% 6.16% 3.07% 2.98% 1.28% 0.57% 0.52%	18
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. Italia	$\alpha$ -pinene camphor borneol 1,8-cineole	8.9-15.4% 1.4-14.7% 2.0-6.8% 53.7-58.6%	35
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. Espagne	$\alpha$ -pinene, 1,8-cineole camphor $\alpha$ -pinene 1,8-cineole camphene borneol $\beta$ -pinene verbenone $\beta$ -caryophyllene limonene $\alpha$ -terpineol myrcene p-cymene bornyl acetate linalool terpinen-4-ol	Composants majoritaires 17.2-34.7% 10.2-21.6% 12.1-14.4% 5.2-8.6% 3.2-7.7% 2.3-7.5% 2.2-5.8% 1.8-5.1% 2.0-3.8% 1.2-2.5% 0.9-4.5% 0.2-3.4% 0.2-2.3% 0.3-1.0% 0.4-0.9%	6

*C  
h  
a  
p  
i  
t  
r  
e  
  
I  
I  
I*

Aperçue sur  
les bactéries

**Introduction :**

Une définition précise des bactéries permet actuellement d'établir les limites du mode bactérien, elle fait intervenir tous les caractères structuraux et métaboliques qui leur donnent une individualité parmi les microorganismes et permettent de les distinguer d'une part des champignons inférieures et des protozoaires, d'autre part [45].

Les bactéries sont connues depuis 1676 (Leeuwenhoek) [31], il s'agit des microorganismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire.

De façon résumée, la cellule bactérienne se distingue de la cellule animale par sa petite taille, par la présence d'une paroi rigide contenant un polymère particulier, le peptidoglycane, par le caractère haploïde de son génome et par l'absence des mitochondries.

La coloration de Gram permet de séparer les bactéries en deux catégories dont la paroi est de structure différente. Certaines espèces bactériennes peuvent posséder des capsules [38].

**1- Les principaux germes étudiés :**

Au cours de notre étude consacrée à l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L, nous avons utilisé :

➤ Des souches de références provenant de l'institut Pasteur à Alger, qui sont :

- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

➤ Deux souches qui sont isolées de différents prélèvements de malade du CHU (Centre Hospitalo- Universitaire) : pus, ponction plurales, ponction d'ascites.

Ces souches ont été récupérées auprès du laboratoire de microbiologie du CHU Benbadis de Constantine :

- *Salmonella Typhimurium*.
- *Enterobacter cloacae*.

Certaines de ces bactéries posent avant tout le problème des multirésistances aux antibiotiques, en particulier le *S. aureus* résistant à la métiline (SARM).

## II- Caractères généraux sur les souches étudiées :

### II-1-Généralité sur La famille des *Enterobacteriaceae* :

La famille des *Enterobacteriaceae* est la plus grande famille de la section 5 du Bergey's manuel [36].

Elle contient des bacilles ou coccobacilles, asporulés Gram négatif [38] ayant en commun les caractères suivants :

Aérobies anaérobies facultatifs, mobiles par cils péritriches (*E. coli*, *P. mirabilis*) ou immobiles (*K. pneumoniae*), utilisent le glucose par métabolisme fermentatif, avec ou sans production de gaz, réduisent les nitrates en nitrites, oxydase (-), cultivent sur milieu ordinaires [38].

La famille des *Enterobacteriaceae* regroupe plusieurs espèces dont la plus part sont des commensaux de tube digestif de l'homme et des animaux (l'intestin). Mais ce caractère écologique n'est pas exclusif (peuvent être isolées à partie du sol et des végétaux) [32].

### II-2- Caractères cultureux :

Les *Enterobacteriaceae* se développent bien sur bouillon ou sur gélose ordinaire incubés pendant 18h à 37°C.

Sur milieu gélosés, les colonies d'Entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène de 2 à 3 mm de diamètre (type « Smooth » ou S), cet aspect peut évoluer après cultures successives pour donner des colonies à surface sèche et rugueuse (type « Rough » ou R) [32].

-Les colonies muqueuses sont habituelles avec les *Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10mm; elles ont une tendance à la confluence.

-Les colonies naines s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leur chaîne métabolique. Elles ne sont pas exceptionnelles chez les *E. coli* isolées d'infection urinaires [4,31].

### II-3- Caractères antigéniques [32] :

Les *Enterobacteriaceae* possèdent un antigène commun (CA) encore appelé antigène de kunin. Son existence chez certains groupes de germes comme *Yersinia*, les *Erwinia* ont permis de confirmer leur appartenance à la famille des *Enterobacteriaceae*.

On peut distinguer en outre :

- des antigènes de paroi ou antigène O, toujours présent; thermostable (résistants 2h à un chauffage à 100C°), alcoostables et très toxiques.
- des antigènes de capsule ou d'enveloppe appelés antigène K.
- des antigènes flagellaires ou antigènes H.

#### II-4- Le pouvoir pathogène des Entérobactéries :

Le pouvoir pathogène des Entérobactéries concerne les syndromes digestifs, les infections viscérales, les infections du tractus urinaire la peste, la dysenterie bacillaire, la fièvre typhoïde et diverses septicémies N'oublions pas que les Entérobactéries sont aussi des phytopathogènes [32].

Les principaux genres appartenant à la famille des Enterobacteriaceae sont : *Escherichia*, *Citrobacte*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus*.

#### II-5- Les bacilles à Gram négatif :

##### II-5-A- *Escherichia coli* (*E.coli*):

Les colibacilles ou *Escherichia coli* ont été découverts par Escherich en 1885 [32]. *E.coli* est un bacille à Gram négatif, cette bactérie est connue depuis longtemps comme banale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire [48].

*Escherichia coli* est une espèce commensale de tube digestif de l'homme et des animaux (dans l'intestin). La présence d'*E. coli* dans l'eau est le témoin d'une contamination fécale récente [4].

##### II-5-A-1- caractères biochimiques :

Les caractères biochimiques d'*E.coli* sont représentés dans le tableau-4.

Tableau-4: caractères biochimiques d'*E. coli* [38]

Caractères biochimiques	mob	uréase	indol	Lac	Sac	H <sub>2</sub> S	Gaz	Citrat	B.gal	Gélatin	VP	RM	LDC	ODC
<i>E. coli</i>	+	-	+	+	V	-	+	-	+	-	-	+	+	V

V : variable, irrégulier ou lente ; (-) ou (+) : majorité des biotypes – ou +.

(+): réaction positive, (-):réaction négative.

**II-5-A-2-Pouvoir pathogène [32] :**

*E. coli* peut provoquer plusieurs types d'infections avec de syndromes polymorphes :

- Les infections abdominales; suppurations péritoneales.
- Les infections bactériennes (bactérimies): elle sont dues au pouvoir invasif et leur résistance à la phagocytose et à l'action du complément.
- Méningites des nouveaux nées ou nourrissons et les syndromes diarrhéiques.

**II-5-A-3- Propriétés antigéniques [40] :**

Il existe plus de 170 antigènes somatiques, 52 antigènes flagellaires et 70 antigènes capsulaires permettant de les classer en sérotypes.

**II-5-A-4- Facteurs de virulence [40] :**

- Présence d'endotoxine, liée au LPS (lypopolysaccharide).
- Adhésines : très nombreuses, responsables d'attachement aux cellules uroépithéliales et aux entérocytes.
- Hémolysines et facteurs cytotoxiques (CNF cytotoxic necrotizing factor).
- Résistance à l'activité bactéricide du sérum.

**III-5-B- *Salmonella typhimurium*:**

Jusqu'à ce jour, près de 1900 types de *salmonella* ont été identifiés. Elles se distinguent les unes des autres par les formules antigéniques [11], la maladie causée par *S. typhimurium* appelée fièvre typhoïde.

**II-5-B-1-Caractère bactériologiques :****Morphologie :**

C'est un bacille à Gram négatif, de 2 à 3  $\mu\text{m}$  de long et 0,6 à 0,8  $\mu\text{m}$  de large, très mobile par une ciliature péritriches, non capsulé, asporulé [11].

**Habitat :**

Les *salmonella* sont essentiellement des parasites du tube digestif de l'homme et des animaux. Elle peuvent être disséminées dans le milieu extérieur par les excréta, mais ne s'y multiplient pas [32].



**Culture :**

La culture est facile dans les milieux usuels en aérobie, et facultativement en anaérobie. La T° optimale est de 37C°, le pH optimum est de 7,6.

En bouillon, le milieu se trouble donnant d'abord l'aspect d'ondes soyeuses, puis uniforme.

Sur gélose, les colonies sont petites, arrondies, claires à surface, blanchâtres, bombées et brillantes [11].

**Transmission :**

La transmission de la fièvre typhoïde d'homme à homme se fait par l'intermédiaire de l'eau ou de l'aliment souillé (coquillages), par des selles de malades ou convalescent ; porteurs sains.

La contamination de l'homme par *S. typhi* se fait par voie buccale, la fréquence d'infection à *salmonella* est en augmentation, elle est favorisée par le développement des repas pris en collectivité où les aliments sont préparés bien avant d'être consommés et dans lesquels les bactéries se multiplient [33].

**II-5-B-2-Caractères phénotypiques :**

Les caractères phénotypiques (biochimiques) de *salmonella typhimurium* sont représentés dans le tableau-5.

**Tableau -5** caractères phénotypiques de *S.typhimurium* [4,38].

Caractères phénotypiques	mob	Gaz	Lac	B.gal	Uréase	Indol	VP	RM	H <sub>2</sub> S	Citrate	Mannitol	Gélatin	LDC	TDA
<i>S.typhimurium</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-

**II-5-B-3-Pouvoir pathogène [4]:**

Les salmonelloses peuvent revêtir trois aspects :

- ✓ Les formes septicémiques: ce sont les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes dues à *S. typhi*, *S. paratyphi* A, B et rarement C. Ce sont des septicémies à point de départ lymphatique.
- ✓ Les salmonellose purement digestives : les toxi-infections alimentaires à *Salmonella* se manifestent par diarrhées, de la fièvre, et des vomissement.
- ✓ Les formes extra digestives: Elles sont plus rares: infections urinaires, méningites,

cholécystites, infections pulmonaires ..., ces formes surviennent plus volontiers chez les malades immuno-déprimés.

#### **II-5-B-4- Toxines:**

Vincent a décrit une neurotoxine thermolabile qu'il obtenait par culture du germe en sac de collodion, dans la cavité péritonéale du cobaye, elle détermine la mort du cobaye par Voie péritonéale.

En réalité la véritable toxine du germe paraît être l'endotoxine, obtenue par broyage du germe et qui s'identifie à l'antigène O thermostable de Boivin. Par voie intraveineuse, elle détermine chez les animaux la congestion de l'intestin grêle, des fusions hémorragiques de la muqueuse et une tuméfaction des plaques de Peyer.

#### **II-5-C-*Klebsiella, Enterobacter* :**

Dans cette rubrique, figurent les entérobactéries qui sont capable de produire de l'acétoïne : réaction de voges proskauer positive.

Ce caractère biochimique commun permet le regroupement de bactéries autrefois étudiées dans des genres distincts : *Klebsiella, Enterobacter; Serratia* (groupe K.E.S). Al'intérieur de chaque genre des espèces peuvent être différenciées en fonction de modalités de la réaction de VP ou d'autres caractères biochimiques [32].

On peut leur attribuer un certain nombre de caractères communs :

- ❖ biochimiques: à cote des caractères communs à toutes les Entérobactéries, les tests: indole, rouge de méthyle, réaction de voges prokauer, Citrate de Simmons sont identiques pour les deux genres sans oublier le genre *Serratia*.
- ❖ Relatifs au pouvoir pathogène: l'importances en cliniques de ces entérobactéries s'accroît en fonction de l'extension de l'antibiothérapie responsable du déséquilibre de la flore normale et de l'exaltation du pouvoir pathogène des souches résistantes.

Les infections dues à ces germes se retrouvent principalement en milieu hospitalier et chez les sujets débilés. Elle réaliseront: des septicémies d'évolution souvent mortelles, des infections broncho-pulmonaires secondaires à grippe, rougeole, ou apparaissant chez les sujets en réanimation respiratoire [31].

**II-5-C-1-Klebsiella Pneumoniae** (bacille de friedlander) :

Entrevu par klebs en 1880, décrit en 1882 par Friedlander dans les crachats de sujets atteints de pneumonie, le pneumobacille à été considéré comme l'agent de pneumonie [33].

**II-5-C-1-a-caractères bactériologiques :****Habitait :**

Répondues dans la nature, elle sont des hôtes normaux du tube digestif [32], il peut être trouvé dans le rhinopharynx, la salive des sujets sains, sur les muqueuses normales de l'oesophage et des bronches, sur les téguments, dans la terre, les poussières, les eaux ; il paraît capable d'y mener une vie saprophytique [33].

**Morphologie et caractères cultureux :**

Dans les produits pathologiques : gros bacille, Gram négatif, coloration souvent bipolaire, entouré d'une capsule souvent volumineuse.

En milieu liquide : dépôt glaireux et collorette; sur gélose: grosse colonies bombées, opaques, visqueuses "en goutte de miel" [15].

**II-5-C-1-b- Caractère biochimiques :**

Les caractères biochimiques de *K. pneumoniae* sont représentés dans le tableau-6.

**Tableau-6-** Caractères biochimiques de *K. pneumoniae* [38].

Caractères biochimiques	Mob	urée	indol	Lac	sac	H <sub>2</sub> S	Gaz	citra	B.gal	Géla	VP	RM	LDC	ODC
<i>K. pneumoniae</i>	-	+	-	+	+	-	+	+	+	v	+	-	+	-

**II-5-C-1-c- Pouvoir pathogène :**

La souris est l'animal de choix pour l'étude de pouvoir pathogène de *K. pneumoniae*, la virulence pour les souris paraissant le fait de *Klebsielles* responsables d'infections pulmonaires.

Par voie sous cutanée, on détermine un abcès, puis une septicémie avec splénomégalie. Dans le Sang du cœur et les frottis de viscères, *Klebsiella pneumoniae* apparaît muni d'une fort belle capsule. La voie intrachéale détermine une série de foyer

d'alvéolite oedémateuse, compliqués ultérieurement de septicémie; la voie péritonéal: une péritonite suivie de septicémie [33].

#### II-5-C-1-d-Toxines:

Dans le cadre des toxines élaborés par *klebsiella*, il semble qu'on puisse faire entrer l'effet inhibiteur, signalé par les anciens auteur, cet effet observé *invitro*, et retrouvé *invivo* chez le lapin qui survit plus longtemps s'il reçoit, en injection, un mélange de bactérie et de pneumobacilles qu'une culture de seules bactériidies [33].

#### II-5-C-2-Enterobacter :

Les *Enterobacter* sont des Enterobacteriaceae VP (+), voisines des *klebsiella* dont elles se distinguent par leur mobilité, par la présence d'un ODC, parfois ADH et par l'absence d'uréase. La TDA, la DNase, la production d'indole et H<sub>2</sub>S sont négatif [4].

#### II-5-C-2-a-Habitat et Epidimologie :

Les *Enterobacter* sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve dans les eaux, sur le sol, sur la peau et les muqueuses, ce sont des bactéries de l'hospitalisme (*Enterobacter cloacae*) [4].

#### II-5-C-2-b-Caractères biochimiques :

Les caractères biochimiques qui permettent de distinguer l'espèce *E. cloacae* sont indiqués dans le tableau-7.

**Tableau-7:** Caractères biochimiques d'*E. cloacae* [38].

Caractères biochimiques	mob	uréas	indol	Lac	Sac	H <sub>2</sub> S	Gaz	citrat	B.gal	Gélatin	VP	RM	LDC	ODC
<i>E. cloacae</i>	+	V	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+

#### II-5-C-2-c-Pouvoir pathogénie :

Comme *Klebsiella pneumoniae* les domaines pathologiques par *E. cloacae* sont les même [33].

**II-5-D-Pseudomonas aeruginosa :**

C'est le bacille du pus bleu de l'ancienne pourriture d'hôpital, isolé en 1882 par Gessard [32].

**II-5-D-1-Caractères bactériologiques :****Habitat :**

*Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique est un bacille à Gram (-), aérobie strict, très mobile par ciliatures monotriche, ubiquitaire, présent dans les sites naturels humides : eau, sol, végétaux, dans la partie initiale du tube digestif et dans la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux [26].

**Transmission :**

Les infections à bacilles pyocyaniques surviennent surtout en milieu hospitalier, les germes sont apportés aux malades soit par l'environnement (fleurs), soit par l'alimentation (légumes) soit par les soins médicaux (antiseptiques et les matériels souillés)[32].

**II-5-D-2-Caractères Biochimiques :**

Les caractères Biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa* sont représentés dans le tableau-8.

**Tableau-8 : Caractères biochimiques de *P. aeruginosa* [4.38].**

Caractères biochimiques	mob	urée	indol	Lac	glu	citra	oxy	Géla	LDC	ODC	ADH	nitra
<i>P.aeruginosa</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+

**II-5-D-3-Caractères cultureux et pigments :**

Sa culture est facile à des T° comprises entre 10 et 42°C°. Les colonies sont transparentes, à bords circulaires. Le bacille pyocyanique élabore deux pigments hydrosolubles; la pyocyanique (pigment bleu soluble dans le chloroforme), et la pyoverdine (pigment jaune-vert fluorescent, non soluble dans le chloroforme). Avec certaines souches peu ou pas pigmentées (en particulier certaines souches résistantes aux antibiotiques), on devra rechercher les pigments caractéristiques sur des milieux d'épreuve sensibles (milieu A et B de King par exemple). La culture a une odeur particulière et caractéristique [32].

**II-5-D-4-Pouvoir pathogène :**

*Pseudomonas aeruginosa* est l'exemple type de la bactérie pathogène, il est impliqué dans diverses infections parmi lesquelles : les infections cutanées, broncho-pneumopathies, oculaires, digestives, infections méningée et dans des septicémie, sans oublier les infections urinaires [4].

Les malades particulièrement sensibles sont les nourrissons, les diabétiques et surtout les cancéreux [4]. Toutefois, *P. aeruginosa* dispose d'un nombre important de facteurs de virulence liés soit à sa structure(LPS), soit à l'élaboration d'exoproduits: Enzymes (protéase, phospholipase C... ), exotoxine [26].

**II-6-Les cocci à Gram positif : Les staphylocoques**

Découverts par pasteur en 1880, Ces germes ont été dénommés staphylocoques par Ogston en 1881 en raison de la morphologie particulière de leur groupement [32].

**II-6-A-Staphylococcus aureus :****II-6-A-1-Caractères bactériologiques :****Habitat :**

Le *S. aureus* est très réparti dans la nature (eau, air, sol,...) et vivent souvent à l'état commensal sur la peau et les muqueuses des organismes humains et animaux (nez, main, gorge, selle ...)[32].

**Morphologie et caractères culturels :**

Dans le pus *S. aureus* se présente sous l'aspect de cocci en diplocoques en petits amas et en courtes chaînettes mesurant 0,8 à 1 µm. Sur milieu solide, il se dispose en « grappes de raisin ». Il est immobile, non sporulé et habituellement ne possède pas de capsule [4, 31,44].

*S. aureus* est une bactérie aérobie-anaérobie facultative. Il cultive facilement sur milieux ordinaires et pousse en présence de forte concentration saline (milieu sélectif de Chapman à 7,5% de NaCl). Il s'accommode de grande variations de T° de 10 à 45C°et de pH. Avec une T° optimale à 37C° et un pH optimal à 7,5 [4,31].

En bouillon la culture déjà visible au bout de 5-6 heures, est très abondante après 24 h [44]. Sur milieu gélosé, les colonies bien développées au bout de 24 h sont lisses, bombées et habituellement pigmentées en jaune doré, la production de ce pigment est souvent associée avec d'autres caractères de pathogénicité [4,31,44].

**Transmission :**

La transmission interhumaine s'opère généralement par contact direct (manuportage). Elle peut aussi être indirect par les vêtements, la literie ou les aliments [38].

**II-6-A-2-Caractères biochimiques :**

*S. aureus* possède un équipement enzymatique très complet qui le rend capable d'agir sur de nombreux hydrates de carbone, lipides, protéine. Les caractères biochimiques qui permettent le diagnostic rapide de genre sont: la présence d'une catalase, l'utilisation du glucose en anaérobiose. Le diagnostic d'espèce fait intervenir la fermentation du mannitol et la recherche de certaines enzymes essentiellement coagulas [32].

**II-6-A-3-Substances élaborées :**

Elles sont particulièrement nombreuses chez les *S. aureus*, on a les toxines et les enzymes :

**❖ Les toxines :**

- Staphylolysine : la principale est la Staphylolysine  $\alpha$  (pouvoir nécrotique).
- Leucocidine : pouvoir toxique vis-à-vis des leucocytes.
- Exfoliatine : toxine épidermolytique [4].
- Entérotoxines: responsable de manifestation pathologique digestives; intoxications alimentaires et entérocolites aiguës [32].

**❖ Les enzyme [32]:**

- La coagulas (staphylocoagulase): exoenzyme capable de coaguler le plasma d'homme ou de lapin.
- la fibrinolysine.
- Les hyaluronidase.
- Lipases et estérases, capable de métaboliser les graisses cutanées.
- bêta – lactamases.

**II-6-A-4- Pouvoir pathogène [4] :**

Les *S. aureus* sont responsable des :

- Infection cutanéomuqueuses (abcès).
- Agent de septicémies.



- Agent d'intoxication alimentaire et entérocolites aiguës.
- syndrome de choc toxique.

### III- Sensibilité des souches bactériennes étudiées aux agents antimicrobiens:

*Il existe deux types d'agents antimicrobiens :*

□ **Les agents physiques :**

Ils assurent la destruction des germes en modifiant leur environnement physico-chimique ainsi leur multiplication est arrêtée et leur survie compromise.

□ **Les agents chimiques :**

Ce sont des substances dont le contact avec les bactéries entraîne soit l'arrêt de leur multiplication bactériostase, soit leur destruction (bactéricide) [44].

La découverte des antibiotiques a marqué une étape capitale de lutte contre les maladies infectieuses. Ces molécules ont permis d'épargner un grand nombre de vies. Ainsi, pour chaque souche isolée, la recherche de la résistance doit être effectuée. La résistance aux antibiotiques est un phénomène rencontré chez l'homme et chez l'animal. Cette résistance constitue une caractéristique propre à l'espèce et délimite le spectre d'activité des antibiotiques. Le Tableau -9- représente la sensibilité de certaines souches bactériennes aux antibiotiques:

Tableau -9 : sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques

Souches bactériennes	Antibiotique auxquels les souches sont sensibles
<i>Escherichia coli</i>	Amino-Pénicilline, Céphalosporines, quinolones, aminosides Triméthoprine-sulphaméthoxazole [4,15]. L'ampicilline, Colistine Les tétracyclines [15].
<i>salmonella typhimurium</i>	L'ampicilline, céphalosporines, tétracyclines [46].
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Céphalosporine [4, 32], aminosides, la colistine, l'acide nalidixique, l'association thriméthoprine-sulfaméthoxazole [4].
<i>Enterobacter</i>	aminosides, la colistine, l'acide nalidixique, l'association triméthoprine- sulfaméthoxazole.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbénicilline, ticarcilline, (gentamicine, tobramycine) Costistine [32,46], céphalosporine de la 3ème génération (cefsulodine, cétazidime).
<i>Staphylococcus aureus</i>	Aminosides (Gentamicine et tobramycine), Macrolides (érythromycine et spiromycine), Les lincosamines (la lincomycine et la clyndamycine). vancomycine, pristinamycine [4].

# Partie II

Etude expérimentale

# Matériel et Méthodes

**I- Matériel et méthodes :**

Dans notre travail l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L a été effectuée au laboratoire de microbiologie du université, Abd Elhak ben Hamouda de Jijel, sur les souches bactériennes suivantes : *Esherichia coli* ATCC, *Klebsiella pneumoniae* ATCC, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC.

**I-1- Matériel :****I-1-A- Matériel bactériologique :**

Comme on a déjà dit les souches utilisées proviennent de l'instituer Pasteur à Alger, et a partir de différents prélèvements de malade de CHU.

**I-1-B- Matériel végétal :**

Le type de l'HE utilisée ont été préparé par hydrodistillation, au niveau de l'université de Constantine, à partir de la plante du *Rosmarinus officinalis* L (feuilles et fleurs).

La plante ont pour origine la région de Constantine et elle étant récolté le moi Avril 2005 (Université Mantouri).

**I-1-C- Les milieux de culture :**

Les milieux de culture utilisés (Leur composition: voir annexe) sont les suivants :

- Gélose Héктоen et BN ou coeur cervelle :pour faire des repiquages des souches : *E. coli*, *S. typhimurium*, *K. pneumoniae* et *E. Cloacae*.
- Gélose Chapman et BN ou coeur cervelle : pour *S. aureus* (même but).
- Gélose M-H (Mueller-Hinton) : pour tester l'effet de l'HE du *R. officinalis* L sur les souches étudier.
- Eau distillé : pour la préparation de l'inoculum.
- Milieu TSI.
- Milieu Clark et Lubs.
- Milieu Citrate de Simmons.
- Milieu Urée-indole.
- Gélose mannitol- mobilité.
- L'eau peptonée.

Pour l'identification biochimique  
d'*Enterobacter*.

**I-1-D- Les réactifs**

- ❖ VPI
  - ❖ VPII
- } Pour mettre en évidence l'acétoïne.
- ❖ Kovacs: Pour mettre en évidence la présence d'indole.
  - ❖ Disque ONPG: Pour mettre en évidence la présence du  $\beta$ -galactosidase.

**1-I-E- Autre matériels :**

Parmi le matériel utilisé on note :

- ✓ L'appareille Clevenger : pour l'extraction de l'HE du *R. officinalis* L.
- ✓ l'étuve: pour l'incubation des culture.
- ✓ Pipettes Pasteur.
- ✓ Pipettes graduer.
- ✓ Disques stériles de papier Wattman N°3.
- ✓ Pince stérile.
- ✓ Ecouvillons.
- ✓ Boîtes de Pétri.
- ✓ Anse de platine.
- ✓ Micro pipettes (1ml, 5ml, 10ml) pour l'application des dilutions d'HE dans les disques de papier Wattman N°3..
- ✓ L'éthanol diluée : pour faire les dilutions de l'huile essentielle.
- ✓ Série de tubes contenant 18ml de M-H ( Milieu Müller- Hinton) fondu et ramené à 50°C.
- ✓ Bouillon de culture de 18h de bactérie à étudier ou une suspension en densité équivalente.

**II- Méthodes:****II-1- Méthode d'extraction de l'huile essentielle du *R. officinalis* L :****II-1-A- Etudes antérieures sur l'analyse des huiles essentielles du genre *Rosmarinus* :****II-1-A-1- Matériel végétal et extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L :**

La plante a été récoltée à l'Université de Constantine au mois d'avril 2005, elle a été séchée à l'ombre.

**II-1-A-2- Parties utilisées :**

Les parties utilisées de la plante sont les parties aériennes: feuilles et fleurs.

**II-1-A-3- La méthode d'extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L :**

L'extraction de l'huile essentielle de notre plante a été réalisée au niveau du "Laboratoire d 'Obtention de Substances Thérapeutiques"(LOST), Faculté des sciences, Université Mentouri- Constantine.

Notre échantillon a subi une hydrodistillation dans un appareil: Clevenger; selon la pharmacopée anglaise en respectant les étapes suivantes:

- a- 100 g du matériel végétal (feuilles et fleurs) sont immergés dans l'appareil Clevenger à moitié rempli d'eau.
- b- On chauffe le mélange jusqu'à l'ébullition.
- c- Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur la surface du serpentín formant deux phases :
  - \* La phase inférieure; celle de l'eau.
  - \* La phase supérieure; celle de l'huile essentielle, elle a une densité plus faible que celle de l'eau.
- d- L'huile essentielle obtenue (1,2g), de couleur jaune pâle, est mise dans un flacon et conservée à une température de + 4°C.







## **II-2- Méthode d'étude de l'activité antibactérienne du *R. officinalis* L :**

### **II-2-1- Méthode de l'étude bactériologique :**

#### **II-2-I-A- Revivification des souches :**

Dans cet opération on réalise des repiquages sur milieux liquides (BN ou Cœur-Cervelle), milieux solides sélectifs (Chapman pour *S.aureus*, Héктоen pour les Entérobactéries étudiés dans le but a l'obtention des souches pures et jaunes.

**NB :** Le repiquage des souches se fait après chaque semaine.

#### **II-2-1-B- Identification biochimique :**

La plupart des souches testés (4 souches) sont des souches connues (ATCC), sauf les *S.typhimirium* et l'*Enterobacter*.

L'espèce du *Salmonella. typhimirium* a été diagnostiquée au CHU/ Constantine. Dans ce travail on effectue une galerie biochimique pour confirmer l'espèce d' *Enterobacter*.

Parmi les tests d'identification d'*Enterobacter*, nous avons réalisé les tests suivants :

#### **II-2-I-B-1- Métabolisme glucidique [38] :**

##### **a-Attaque du mannitol:**

###### **➤ Principe:**

Le mannitol est un produit de la réduction du D-mannose.

La dégradation du D-mannose conduit à la production des acides à chaîne très courtes, comme acide acétique et acide formique.

Le milieu mannitol mobilité permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol, et la mobilité bactérienne.

###### **➤ Technique:**

Le milieu est ensemencé par piqûre centrale avec une anse de platine à partir d'une culture pure âgée de 24h puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

###### **➤ Lecture:**

La dégradation du mannitol se traduit par virage du rouge phénol au jaune (milieu acide ).

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

**b- La fermentation des sucres en milieu TSI (Lactose, H<sub>2</sub>S ) [38]:****➤ Principe:**

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

**➤ Technique:**

La pente du milieu estensemencé par des stries et le culot par piqûre centrale puis incubé à 37°C pendant 24h.

**➤ Lecture:**

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

-Le sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) 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 noir.

-Le lactose est fermenté, la pente est jaune, s'il ne l'est pas la pente est rouge.

-S'il y a formation de bulles de gaz le glucose est fermenté avec production de gaz.

-S'il y a production de H<sub>2</sub>S, la pente et le culot sont noires.

**II-2-1-B-2- Recherche des produits résultant de la fermentation du glucose[38]:****a-Réaction du rouge de méthyle (RM):****➤ Principe:**

La réaction au rouge de méthyle permet de caractériser la fermentation de l'acide mixte. Que ce soit en aérobiose ou anaérobiose, on obtient à partir de l'acide pyruvique des acides organiques à courtes chaînes.

Ces acides organiques maintiennent la pH de la culture à degré suffisamment bas pour que le rouge de méthyle garde sa coloration rouge.

**➤ Technique:**

Prélever 1ml d'une culture pure âgée de 24h sur milieu Clark et Lubs puis ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle.

➤ **Lecture:**

La couleur reste rouge:  $\text{pH} < 4,5 \rightarrow \text{RM (+)}$ .

La couleur devienne jaune:  $\text{pH} > 6 \rightarrow \text{RM (-)}$ .

**b- Réaction de Voges- Prokauer:**

➤ **Principe:**

Elle permet la mise en évidence de la production d'acétyl méthyle carbinol ou acétoïne à partir de la décarboxylation du pyruvate.

➤ **Technique:**

Prélever 1ml de culture sur milieu Clark et Lubs, le mettre dans un tube, ajouter 0,5ml de solution d' $\alpha$  naphthol à 6% dans l'alcool (VPI), 0,5ml d'une solution de potasse à 15% d'eau distillée (VPII), on agite et on laisse agir 10 à 15 minutes.

➤ **Lecture:**

La production de l'acétoïne se traduit par l'apparition d'une coloration rouge.

**II-2-I-B-3- Utilisation de l'ion citrique comme unique source de carbone [38]:**

❖ **Utilisation du Citrate de Simmons:**

➤ **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 utilisées pour cette étude est celui au Citrate de Simmons.

➤ **Technique:**

Le milieu de Simmons au Citrate estensemencé, à partir de la culture pure âgée de 24h, en surface par stries longitudinales et incubé à 37°C pendant 24heures.

➤ **Lecture:**

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

#### II-2-I-B-4- Métabolisme protéique [38]:

❖ **Recherche d'indole:**

➤ **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 1ml d'urée estensemencé par le germe étudié 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 réactif de Kovacs-Ehrliche, à la surface de milieu.

#### II-2-1-B-5- Recherche de la $\beta$ -galactosidase (réaction O.N.P.G) [38]:

➤ **Principe:**

L'objet du teste est d'étudier l'existence d'une  $\beta$ -galactosidase, donc la possibilité de fermentation effective du lactose, indépendamment de la présence ou de l'absence de la  $\beta$ -galactosidase perméase. La lecture est alors très rapide et on dispose ainsi d'une réaction complémentaire d'étude pour les germes lactose négatif.

La  $\beta$ -galactosidase est libérée du corps bactérien grâce à une lyse par le toluène. On fait alors agir l'enzyme sur un galactose substitué: l'orthonitrophényl  $\beta$ -galacto pyranoside (ONPG) qui sera hydrolysé en galactose et en orthonitrophénol qui présente une coloration jaune très stable.

➤ **Technique:**

-Réaliser une suspension épaisse des bactéries à étudier (*Enterobacter*) dans 0,5ml d'eau distillée.

- Ajouter une goutte de toluène (pour la lyse de la paroi cellulaire).
  - Introduire dans le tube un disque imprégné du réactif ( disque ONPG).
- Incuber à 37°C.
- Observer toutes les 15 ' pendant une heure.

➤ **Lecture:**

Apparition d'une coloration jaune:  $\beta$ -galactosidase (+).

Couleur inchangée:  $\beta$ -galactosidase (-).

Dans ce travail l'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée en deux étapes:

- Aromatogramme par diffusion sur milieu gélosé (Méthode des disques ).
- Détermination de la CMI.

### II-2-2- Aromatogramme par diffusion sur milieu gélosé (Méthode des disques) :

La technique utilisée dans notre travail est la technique NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard)[23, 49].

Cette méthode diffère selon que la bactérie soit exigeante ou non.

Dans notre étude les souches bactériennes utilisées sont des bactéries non exigeantes.

Les conditions techniques suivantes doivent être respectées :

➤ **Milieu [28, 46] :**

- La gélose Mueller-Hinton est coulée en boîte de pétri sur une épaisseur de 4mm.
- Les géloses sont pré-séchées avant l'emploi.

➤ **Préparation des disques [46] :**

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

Les disques, une fois préparés, sont placés dans un tube à essai et autoclavés 20min à 120°C.

➤ **Inoculum :**

- A partir d'une culture de 18heures sur milieu d'isolement. Racler cinq colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 10ml d'eau distillé stérile à 0,9%.
- bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland ou à des DO de 0,08 à 0,1 lue à 625nm.

- 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 forte.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

➔ **Ensemencement :**

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface glosé, sèche, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération, deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois.
- Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de pétri. Il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.
- Préparation des dilutions utilisés pour l'aromatogramme(même dilutions utilisés pour la CMI)
- Application immédiate des disques imprégnés de 10µl de chaque dilution de l'HE utilisée.

➔ **Pré incubation :**

Les boîtes sont laissés pendant 15 min à température ambiante (sur la paillasse).

➔ **Incubation :**

- Incuber 18 heures à 37°C.

➔ **La lecture :**

- On mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition avec un pied à coulisse ou une règle.
- Comparer les résultats aux valeurs critiques.
- Classer les bactéries dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante.

Une fois l'aromatogramme réalisé et les diamètres des zones d'inhibition mesurés avec précision, on passe à la deuxième étape de l'étude de l'activité antibactérienne ; il s'agit de la détermination de la CMI.

### II-2-3- Détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice):

#### ➤ Définition :

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 étudiée [32].

#### ➤ Réalisation :

La solution a été préparée en solubilisant 20mg de l'huile essentielle de la plante du *Romarinus officinalis* L dans une solution de 10ml d'éthanol et on appelle cette solution, la solution mère.

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

**Tableau -10 - :** Les différentes dilutions de la solution mère[20, 21] :

Concentration initiale en $\mu\text{g/ml}$	Volume en ml	Volume d'éthanol en ml	Concentration finale en $\mu\text{g/ml}$
2000	6,4	3,6	128
1280	2	2	64
	1	3	32
	0,5	3,5	16
	0,5	7,5	8
80	2	2	4
	1	3	2
	0,5	3,5	1
	0,5	7,5	0,5
5	2	2	0,25
	1	3	0,125
	0,5	3,5	0,063
	0,5	7,5	0,032

Pour avoir la concentration de 128 $\mu\text{g/ml}$  à partir de la solution de 2000 $\mu\text{g/ml}$  on prend 6,4 ml de cette dernière à la quelle on ajoute 3,6 ml d'éthanol .

Cette gamme de concentrations qui a été utilisée pour déterminer la CMI de l'huile essentielle de la plante *Rosmarinus officinalis* L, a été réalisée de manière classique.



**NR :**

L'éthanol étant un alcool possédant donc une activité antiseptique, la question qui se pose : est ce que la zone d'inhibition de la croissance des germes est due à l'huile essentielle au solvant ou aux deux à la fois ?

Pour répondre à cette question, il faut préparer une boîte témoin pour chaque souche dont laquelle, le disque est chargé de l'éthanol seulement.

**➤ Procédé :**

- Préparer une culture en phase exponentielle en milieu liquide de la bactérie à étudier.
- Repiquer 0,1ml ( bacille à Gram négatif), 0,3 ml ( *S. aureus*, *p. aeruginosa*) de la culture de 18 heures dans 10ml de bouillon M-H. (ou autre bouillon adéquat pour la bactérie à étudier).
- Mettre à l'étuve à 37°C pendant 3 à 5 heures, jusqu'à l'apparition d'une légère opalescence.
- Ajouter 1 ml de ce bouillon à 10 ml de bouillon M-H. préalablement chauffé à 37°C.
- Mettre 2ml de chaque dilution de la gamme de l'extrait déjà préparé dans une boîte de pétri, en allant de la concentration la plus forte vers la concentration la plus faible.
- Ajouter 18ml de la gélose M-H chauffé à 45°C, bien mélangée aux boîtes de pétri.
- Laisser les boîtes de pétris quelque minutes sur la paillasse pour que la gélose se solidifie.
- Sécher Les boîtes pendant 30 minutes à l'étuve à 37 C°.
- Ensemencer en strie. à l'aide d'une anse de platine ou à la pipette rodée. sur toutes les boîtes contenant l'huile essentielle sans oublier la boîte témoin.
- Incuber les boîtes pendant 18 à 37C°.

**➤ Lecture :**

Lire les concentrations minimales inhibitrices (CMI) : concentration d'huile essentielle du *R. officinalis* L pour laquelle il n'y a pas de culture bactérienne visible.

# Résultats et discussion

**III- Résultats et discussion:****III-1- Identification biochimique:**

Les résultats de la galerie biochimiques sont représentés dans le tableau-11.

**Tableau –11 :** Résultats de la galerie biochimique d'*Enterobacter*.

Caractère biochimique	Citrate	H <sub>2</sub> S	Lac	Mobilité	indole	VP	RM	ONPG
<i>Enterobacter</i>	+	-	+	+	-	+	-	-

A partir de ces résultats on conclure que l'espèce d' *Enterobacter* c'est *E. cloacae*.

**III-2- Résultats de l'aromatogramme (Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L sur les différentes souches bactériennes utilisées):**

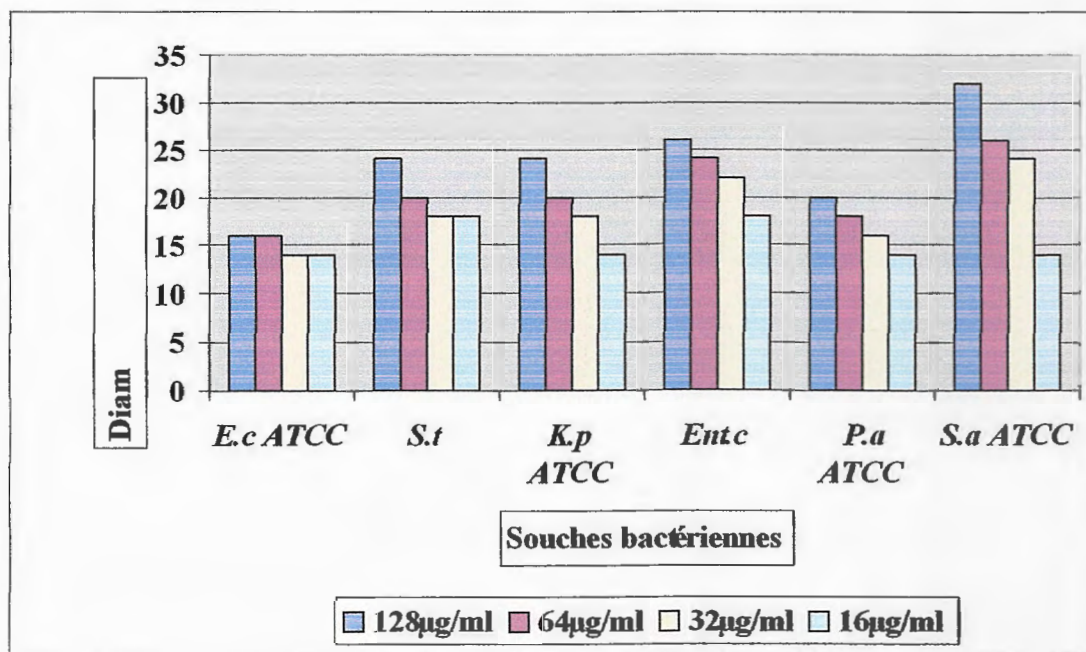
Après 24h d'incubation à 37C°, on a récupéré les boîtes et on mesuré les zones d'inhibition de chaque souche bactérienne testée, on obtenu les résultats dressés dans le tableau –12 :

**Tableau –12- :** Zones d'inhibitions en mm (Résultats de l'aromatogramme).

Souches bactériennes	Diamètre des zones d'inhibitions en mm			
	128µg/ml	64µg/ml	32µg/ml	16µg/ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16	16	14	14
<i>Salmonella typhimurium</i>	24	20	18	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	24	20	18	14
<i>Enterobacter cloacae</i>	26	24	22	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	20	18	16	14
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	32	26	24	14

**NB :**

128µg/ml, 64µg/ml, 32µg/ml, 16µg/ml: sont des concentrations de l'huile essentielle du *R. officinalis* L.



**Histogramme1:** Activité antibactérienne (Aromatogramme) de différentes concentrations de l'huile essentielle du *R. officinalis* L, en présence de différentes souches.

Tel que :

*E.c* ATCC : *Escherichia coli* ATCC 25922.

*S.t*: *Salmonella typhimurium*.

*K.p* ATCC: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

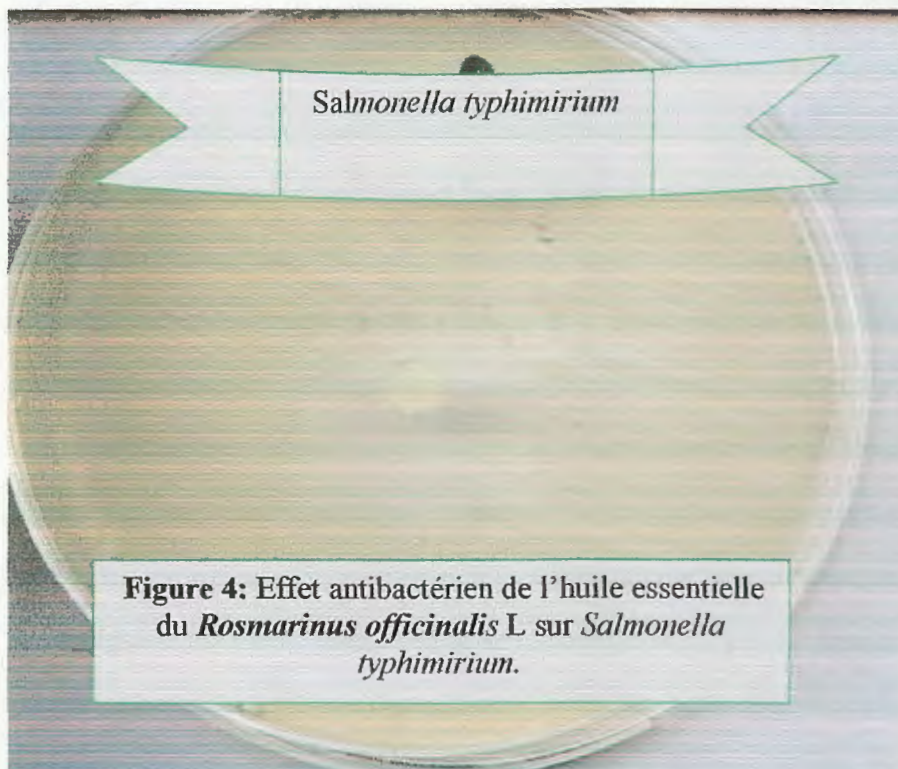
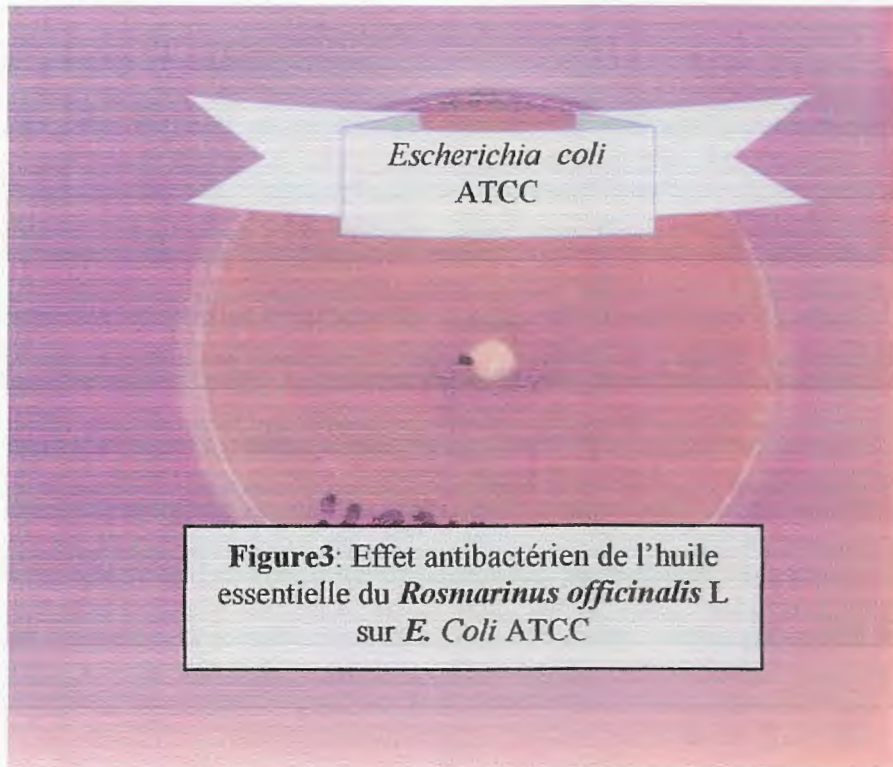
*Ent.c*: *Enterobacter cloacae*.

*P.a* ATCC: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

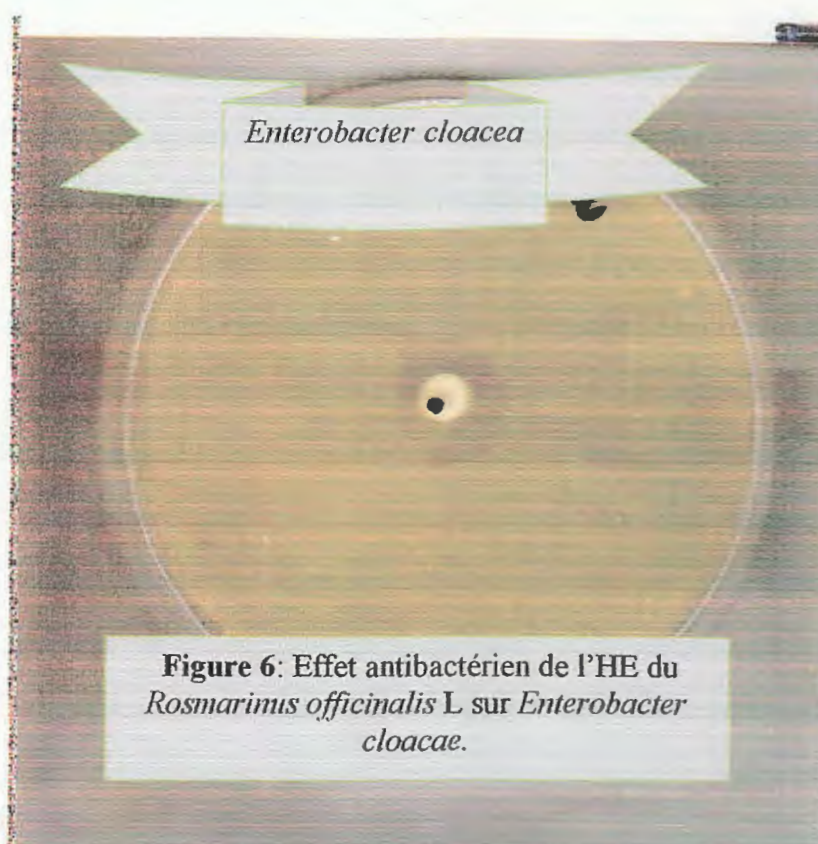
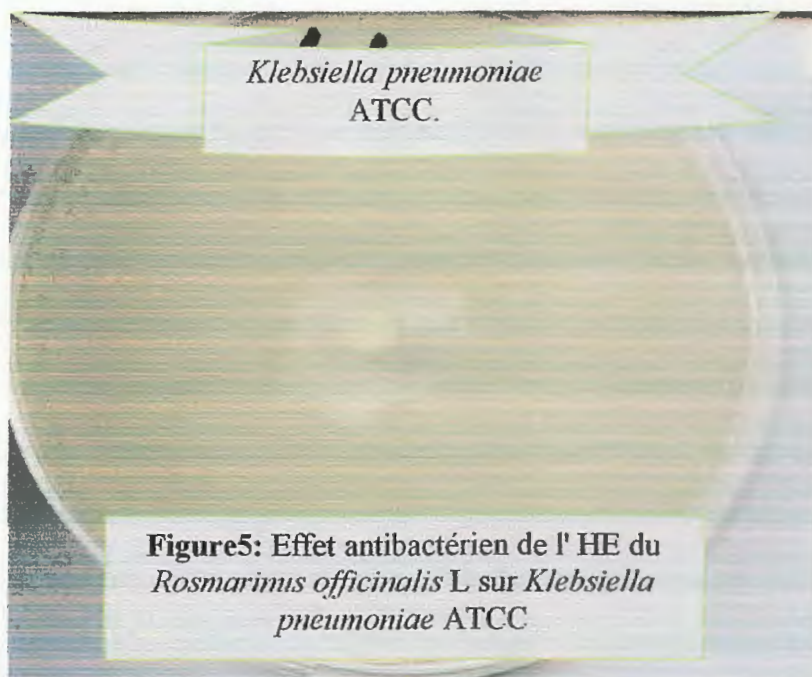
*S.a* ATCC: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

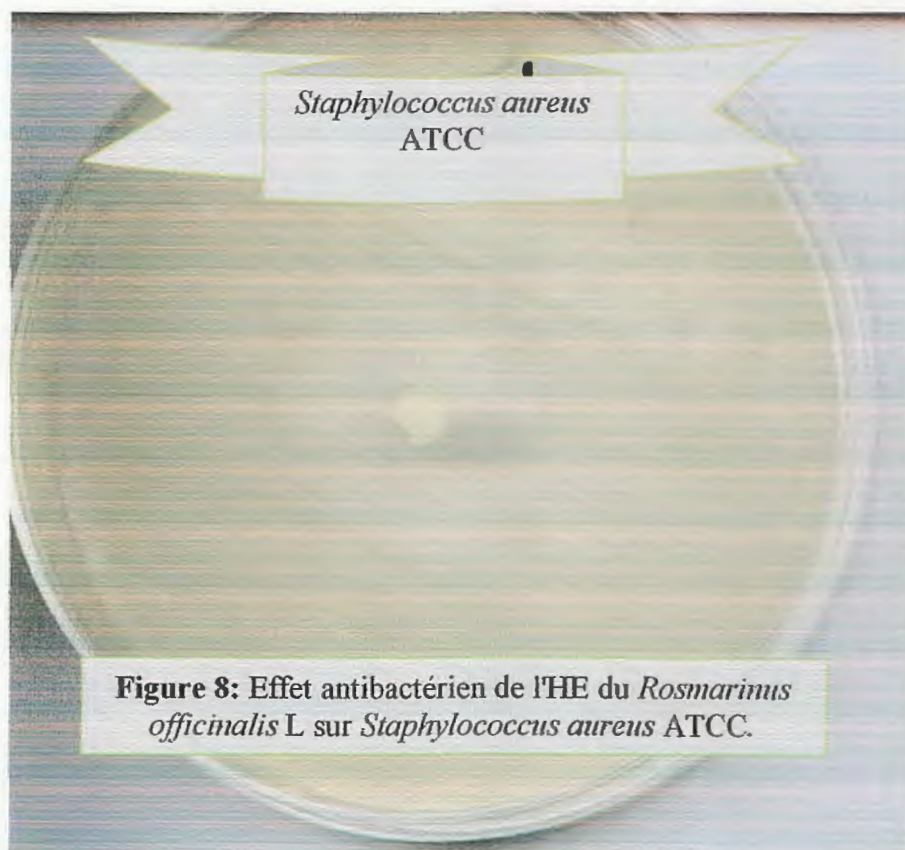
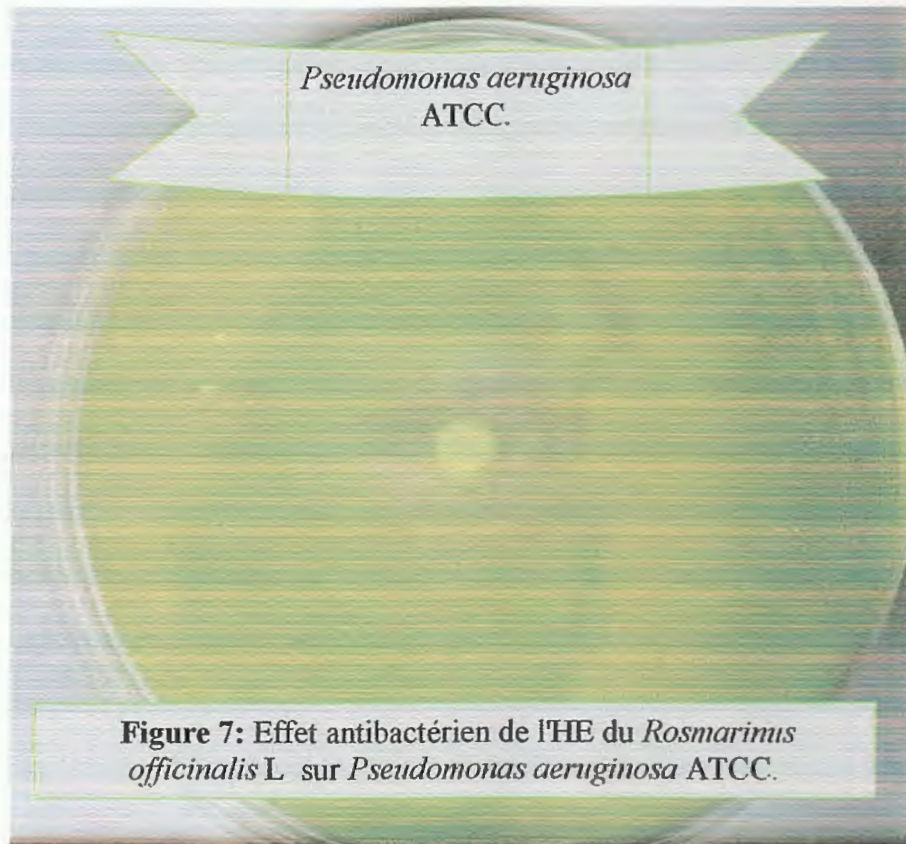
**NB:**

Diam : Diamètre des zones d'inhibition (mm).











### III-3- Détermination de la CMI (Concentration minimale inhibitrice)

Les résultats de la CMI de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L figurent dans le tableau-13- :

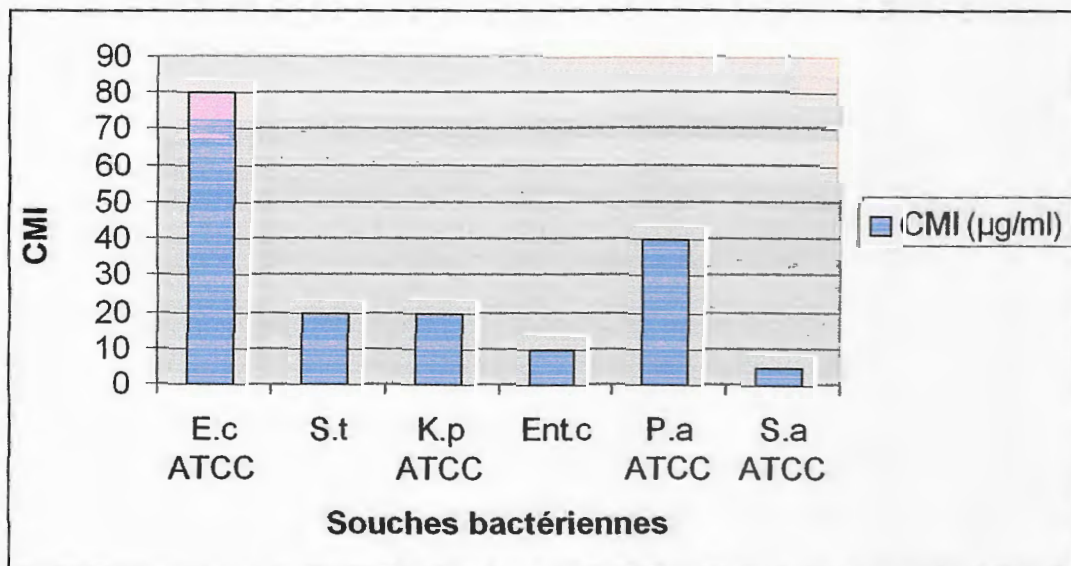
Tableau -13- : CMI( $\mu\text{g/ml}$ ) de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L.

Souches bactériennes	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	80
<i>Salmonella typhimurium</i>	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	20
<i>Enterobacter cloacae</i> .	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	40
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	5

NB :

- Pour chaque souche testée la CMI est déterminée trois fois pour nous assurer que les résultats sont reproductibles.

- La CMI peut être déterminée soit en milieu solide soit en milieu liquide. Nous avons choisi la première méthode parce qu'elle est plus facile à réaliser.



Histogramme 2: Activité antibactérienne des Concentrations Minimales Inhibitrice de 128 à 16  $\mu\text{g/ml}$ .



### III-4- Discussion des résultats:

Nous avons réalisé un aromatoigramme et déterminé la CMI de l'huile essentielle du *Romarinus officinalis* L vis-à vis de plusieurs souches (souches de références et germes isolés à partir de prélèvements pathologiques).

Quelques soit la souche bactérienne et /ou la nature (origine) des germes utilisée dans ce travail , concernant l'étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle du *R .officinalis* L, les présents résultats indiquent la présence d'une action antibactérienne importante. Cette activité inhibitrice observée avec les différentes souches peut être traduite soit par le large spectre d'action et de l'efficacité au produit utilisé ou par l'utilisation des concentrations expérimentales importantes.

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du *R. officinalis* L, sur différents germes (Gram (+), Gram (-)) par la méthode de l'aromatoigramme donne des diamètres qui varient en fonction de la souche testée. Nous constatons des valeurs plus importants de diamètres d'inhibition qui expriment une action inhibitrice maximale sensiblement augmentée surtout pour les cocci Gram (+) : *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition environ 32 mm, et les bacilles Gram (-) surtout : *Enterobacter cloacae* avec une inhibition moyenne de 26 mm.

On constate aussi une action inhibitrice moyenne enregistrée chez quelque souches testées dont : *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella thiphymurium* avec une inhibition moyenne d'environ 24 mm.

Pour le reste des souches testées, on constate une action inhibitrice peut faible par rapport aux autres *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* avec des zone d'inhibitrices respectives: 20 mm et 16mm, ceci traduit probablement une sensibilité relativement différente des bactéries et /ou par la présence d'une activité antibactérienne éventuellement sélective de notre produit.

Ces résultats peuvent être expliqués par les qualités caractéristiques de chaque souche telles que la présence d'une résistance naturelle et/ou la capacité de certaines souches bactériennes d'acquérir une éventuelle résistante.

D'une manière générale, les résultats de l'aromatogramme montrent que l'huile essentielle du *R. officinalis* L à différentes doses, inhibe toutes les souches testées et entraîne des diamètres d'inhibition variés.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices chez les différentes souches bactériennes utilisées. Les résultats obtenus révèlent la présence de deux groupes (au deux niveaux de réponse); un premier groupe relativement sensible (*S. aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*) aux doses relativement faibles de l'ordre de 5 à 20 µg /ml de huile utilisée et un deuxième groupe qui reste moins sensible aux doses expérimentales de notre huile (*P. aeruginosa*, *E. coli*).

Ces résultats indiquent qu'en plus de la concentration, d'autres facteurs peuvent jouer un rôle non négligeable dans le processus inhibiteur antibactérien de notre extrait telles que la souche, la nature, l'origine des germes utilisés et la nature des voies métaboliques caractéristique du processus de développement et de la croissance bactérienne.

# Conclusion

### Conclusion :

L'huile essentielle du *R.officinalis* (*Lamiaceae*) obtenue par hydrodistillation dans l'appareil de Clevenger a manifesté une activité antibactérienne *vis-à-vis* des souches testées.

Les résultats obtenues par la méthode de l'aromatogramme montrent que notre huile a une activité antibactérienne très importante *vis-à-vis* les cocci Gram(+): *Staphylococcus aureus* ATCC, les bacilles Gram (-) et *Enterobacter cloacea* avec un diamètre d'inhibition d'environ 32 et 26 respectivement .

De plus les valeurs de la CMI montra que l'huile est plus active aussi *vis-à-vis* de *S. aureus* et *E. cloacea* pour les quelles on trouve une CMI d'environ (5-10 µg/ml) .

Par comparaison avec les valeurs de la littérature concernant les études chimiques et celles de l'ativité antibactérienne des différentes espèces du genre *Rosmarinus*, on remarque : qu'il existe une relation entre l'effet antibactérien de l'huile et sa composition. Cette activité est probablement due à l' $\alpha$ -pinène et  $\beta$ -pinène qui sont connus pour leur activité antibactérienne.

## Bibliographie :

- [1] Arnol, N., Valentini, G., Bellomaria, B., Laour, H, (1997). Journal of essential oil research, 9(2), 167-175.
- [2] Albouy, V, (1996). Pratique du jardin, 3<sup>ème</sup> édition. Ed. Clause jardin, France.306.
- [3] Abrassart, J. L, (1992). Guide pratique d'aromathérapie: usage et bienfaits des huiles essentielles des plantes. Ed. Masson, France.95-98.
- [4] Avril, J. L., Dabenat, H., Denis, F., Motel, H, (1992). Bactériologie clinique. 1<sup>ère</sup> édition. Ed. Marketing, France. 14-15, 125, 167, 266.
- [5] Boussebouah, H, (2002). Elément de microbiologie générale. Ed. Université Mentouri, Constantine, Algérie.161, 167.
- [6] Bartyska, M., Budzikur, R., Elizbieta, (2001). Bulletin of polish Academy of Sciences: Biological sciences, Krakow, Pol. 49(4), 327-331.
- [7] Benhabiles, N. E., Ait-Amar.H., Boutekdjiret., Belabbes, R, (2001). Comparative study of Algeria's Rosmarinus eriocalyx and Rosmarinus officinalis L. Perfumer&Falvorist, Institut de chimie industrielle, Algeria, Algeria. 26(5), 40, 42, 44-48.
- [8] Baudoux, D, (2000). L'aromathérapie; se soigner par les huiles essentielles. Ed. Maloie. 58-59.
- [9] Bhaskara, R. M. V et Coll, (1998). Characterization and the use of essential oil of Thymus Vulgaris against Botrytiicineria and Rhizopus stolifer in strawberry fruits. Phytochemistry 47(8), 1520-1515.
- [10] Boutekdjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R., Bessiere, J. M, (1998). The essential oil from Romarinus officinalis L in Algeria.Laboratoire de valorisation des especes vegetales regionales.Ed: Departement de genie chimique Ecole Nationale Polytechnique, Journal of essential oil Research, Algeria, Algeria. 10(6), 680-682.
- [11] Boulahbal, F, (1994). Microbiologie clinique.S<sub>1</sub> clinique. Ed. Office despublications-ministères universitaires, Alger.
- [12] Boulahbal, F, (1993). Microbiologie clinique. S<sub>1</sub>clinique. Ed. Officedes publications ministères universitaires, Alger.
- [13] Bruneton, J, (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, techniques et documentation, 2<sup>ème</sup> édition. Ed. Lavoisier, France. 422, 266.
- [14] Bezager, L et Coll, (1992). Les plantes dans le thérapeutique moderne, 6<sup>ème</sup> édition. Ed . Maloie, France. 420.
- [15] Berche, P., Gaillard, J. L., Simone, M, (1989). Bactériologie médicale: les bactéries des infections humaines. 1<sup>ère</sup> édition. Ed. Flammarion, Paris, France. 54.
- [16] Bernadet, M, (1983). Phyto-aromathérapie pratique.Ed. Masson, France. 89-78.
- [17] Christain, L, (2004). Le petit Larousse illustré. 10<sup>ème</sup> édition. Ed. Malesherbes, France.
- [18] Chen, Z., Yang, J., Wange, C., Cui, S, (2001). Study on chemical constituents of essential oil of Rosmarinus offinalis. Xilan tiancheng, Zhongcaoyao, China. 32(12), 1085-1086.
- [19] Courvalin, P., Drugeon, H., Flandrois, J. P., Goldstein, F, (1991). Bactéricides: aspects théoriques et thépeutiques. Ed. Maloie, Paris. 223.
- [20] Courvalin, P., Flandrois, J. P., Goldstein, F., Philippon, A., Sirot, J, (1988).L'antibiogramme automatisé mpc-vigt Paris.
- [21] Carbonelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G., Vargus, R, (1987). Bactériologie médicale: techniques usuelles. Ed. Sime (2ème tirage), France.
- [22] CRETTE, L, (1981). Les plantes aromatiques médicinales. Ed. Atlas. 15-68.
- [23] Comité OMS d'experts de la standardisation biologique, (1977). 28<sup>ème</sup> rapport, serie de rapports technique n°610, OMS Genève. 106, 138.

- [24] Djerroni, A., Nacef, M, (2004). 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed. Palais des livres, Algérie.126.
- [25] Dang, M. N., Takacsova, M., Nguyen, D. V., Kristianova, K, (2001). Antioxidant activity of essential oils from various spices.
- [26] Dabena, H, (1997). Infectiologie de A à Z. Ed. Arnette, France. 500, 501, 502.
- [27] El-abed, D., Kambouche, N, (2003). Les huiles essentielles. Ed. Dar-El-Gharb, Oran, Algeria. 28-72.
- [28] Ericsson, H. M., Sherris, J. C, (1971). Antimicrobial susceptibility testing-Report of an international collaborative study.
- [29] Emets, Y. A et Coll, (2001). Biologically active additive for foods. Ed. Academic presse, Russia. 4-20.
- [30] Eberlin, T, (1994). Les Antibiotique. Ed. Nathan, Paris. 28.
- [31] Ferron, A, (1979). Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 10<sup>ème</sup> édition. Ed. Groun et Roques, France. 14, 20, 26.
- [32] Ferron, A, (1974). Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 8<sup>ème</sup> édition. Ed. Groun et Roques, France.
- [33] Fasquelle, R, (1974). Élément bactériologique médical. 9ème édition. Ed.Flammarion médecine, Paris. 108, 111.
- [34] Ferron, A, (1972). Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 5<sup>ème</sup> édition. Ed. Groun et Roques, France.
- [35] Guazzi, E., Maccioni, S., Monti, G., Flamini, G., Cioni, P. L., Morelli, I, (2001). *Rosmarinus officinalis* L in the gravine of Palagianello (Taranto, South Italy). Ed: Parco delle Alpi Apuane, Servizio Ricercae Conservazione, Journal of Essential Oil Research, Massa, Italy. 13(4), 231-233.
- [36] Guiling, P. A., Dambara, H., Guirrey, D.G., Laxa, J, (1993).Molecular analysis of SVp virulence genrs of *salmonella* plasmides. Rev. Mol. microbial. 7.
- [37] Gattefosse, M, (1990). Aromathérapie. 2ème congré international des huiles essentielles grasses.
- [38] Guiraud, J., Galzy, P, (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed. L'usine, France.
- [39] Houvhit, J, (1992). Pharmacie naturelle. Ed. Aubanel.
- [40] Jack, A., Jack, M, (1995). Les maladies infectieuses. Ed. Vigot, Paris. 540.
- [41] Jean, V, (1984). Traitement des maladies par essences des plantes. 10<sup>ème</sup> édition. Ed.Masson, Paris. 264- 270.
- [42] Laggoune, S., Boutaghane, N., Kabouche, Z., Kabouche, A., Ait-kaki, Z., Benlabeled, K, (2005). Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. Article in press.
- [43] Lemire, N, (2000). Gazettes thérapeutiques. Ed. Atlas. 26-30.
- [44] Leclerc, H, (1975). Microbiologie générale. Ed. Dozn.
- [45] Loiseau-Marolleau, M. L, (1968). Bactériologie à l'usage des infirmiers.2ème édition. Ed. Flammarion, Paris. 11.
- [46] Le minor, L., Varon, M, (1989). Bactériologie médicale. Ed. Flammarion. 2ème édition, Paris.
- [47] Mahmoudi, Y, (1983). La thérapeutique par les plantes les plus communes en Algérie. Ed. Palais du livre, Blida.
- [48] Nauciel, C, (2000). Bactériologie médicale. 2ème édition. Ed. Masson, France. 389.
- [49] NCCL Standard for antimicrobial susceptibility testing by diffusion methods. NCCLS, (1985). Documents. 5:4.
- [50] Oranges, R., Passet, G., Teulade, (1973). Les plantes médicales à essences et chimiotaxanome. 17ème journée de l'aromate lourd.

- [51] Puertas, M. M., Hillebrand, S., Stashenko, E., Winterhalter, P, (2001). Flavour and Fragrance journal. 17(5), 380-384.
- [52] Paris, M., Hurabielle, M, (1981). Abrégé de matière médicale (pharmacognosie). Tome I, Ed. Masson, Paris. 45.
- [53] Ponel, D, (1991). Urgences et soins intensifs en médecine aromatique intégrée. Ed. Lavoisier, France. 255-259.
- [54] Paris, R. R., Moyses, H, (1971). Collection de précis de pharmacie. Tome III, Ed. Masson, Paris, Newyork. 276-279.
- [55] Quezel, P., Santa, S, (1963). La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed. Cnrs, Paris. 360-361.
- [56] Robert, C, (1982). Les plantes médicinales. Ed. Sdar, Paris. 263, 264.
- [57] Salido, S., Altarejos, J., Nogueras, M., Sanche, A., Luque, P, (2003). Chemical composition and seasonal variations of rosemary oil from southern Spain. Journal of essential oil research. 15(1), 10-14.
- [58] Shin, S, (2003). Anti-aspergillus activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B.
- [59] Voirin, B, (1970). Thèse de Doctorat. Université de Lyon.

# Annexe

## Les milieux de culture

### 1. Bouillon nutritive ordinaire.

➤ Peptone	10g
➤ Extrait de viande	5g
➤ Chlorure de sodium	5g

pH=7,2. Autoclaver 20 mn à 120C°.

### 2 .Bouillon Cœur-Cerveille.

➤ Protéose-peptone	10g
➤ Infusion de cervelle de veau	12,5g
➤ Infusion de cœur de bœuf	5g
➤ Chlorure de sodium	5g
➤ Phosphate disodique	2,5g
➤ Glucose	2g

pH=7,4. Autoclaver 15mn à 120C°.

### 3. Gélose Mueller- Hinton.

➤ Extrait de viande	2g
➤ Hydrolysate acide de caséine	17,5g
➤ Amidon	1,5g
➤ Gélose	10g

pH=7,4. Autoclaver 15mn à 115C°.

### 4. Gélose Hektoen.

➤ Protéose-peptone	12g
➤ Extrait de levure	3g
➤ Chlorure de sodium	5g
➤ Thiosulfate de sodium	5g
➤ Sels biliars	9g
➤ Citrate de fer ammoniacal	1,5g
➤ Salicine	2g
➤ Lactose	12g
➤ Saccharose	12g
➤ Fuschine acide	0,1g
➤ Bleu de bromothymol	65mg
➤ Gélose	13mg

pH=7,6. stériliser par 5mn d'ébullition.



### 5. Gélose Chapman.

➤ Extrait de viande	1g
➤ Peptone	10g
➤ Chlorure de sodium	5g
➤ Mannitol	10g
➤ Rouge de phénol	25mg
➤ Gélose	15g

pH=7,4. Autoclaver 15mn à 120C°.

### 6. Milieu Mannitol-mobilité.

➤ Peptone	20g
➤ Nitrate de potassium	1g
➤ Mannitol	2g
➤ Rouge de phénol	40mg
➤ Gélose	4g

pH=8,1. Autoclaver 15mn à 120C°.

### 7. Milieu TSI .

➤ Peptone	20g
➤ Extrait de viande	3g
➤ Extrait de levure	3g
➤ Chlorure de sodium	5g
➤ Glucose	1g
➤ Lactose	10g
➤ Saccharose	10g
➤ Citrate de fer	0,5g
➤ Hyposulfite de Sodium	0,5g
➤ Rouge de phénol	25mg
➤ Gélose	12g

pH=7,4. Autoclaver 15mn à 115C°.

### 8. Citrate de Simmons.

➤ Sulfate de magnésium	0,2g
➤ Phosphate monoammonique	1g
➤ Phosphate dipotassique	1g
➤ Citrate de sodium	2g
➤ Chlorure de sodium	5g
➤ Bleu de bromotymol	80g
➤ Gélose	12g

pH=6,8. Autoclaver 20mn à 120C°.

### 9. Bouillon Urée-Indole.

➤ Tryptophane	3g
➤ Phosphate monopotassique	1g
➤ Phosphate bipotassique	1g

- Chlorure de Sodium 5g
- Urée 20g
- Alcool à 95° 10ml
- Rouge de phénol 25mg

pH6,7. Stériliser par filtration.

#### 10. Milieu Clark et Lubs.

- Peptone 10g
- Phosphate dipotassique 2g
- Glucose 5g

pH=7. Autoclaver 20mn à 120C°.

#### 11. Eau peptonée.

- Peptone exempte d'indole 15g
- Chlorure de Sodium 5g

pH=7,2. Autoclaver 15mn à 120C°.

### réactif.

#### 1. ONPG

- Orthonitrophényl B galactopyranoside 0,6g
  - Tampon Phosphate 0,01M 100ml
- pH=7,5

#### 2. Kovacs.

- Paradiméthyl aminobenzaldehyde 1g
- Alcool amilytique 15g
- Acide chlorhydrique pur 25g

#### 3. Réactif au Rouge de Méthyle.

- Rouge de méthyle 0,5g
- Alcool étylique 100g

Réalisé par :

Thème :

Date de soutenance :

▪ Lounis Sonia

Etude de l'activité antibactérienne

02/07/2005

▪ Kias Manel

de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L

---

### الملخص

يكن هدف بحثنا في دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيت الطيار لنبه *R. officinalis* L من العائلة الشفوية (Lamiaceae) تحوي هذه الأخيرة حوالي 4000 نوع و350 جنس من النباتات العشبية التي تتوزع في جميع أنحاء العالم وبصفة خاصة في منطقة البحر الأبيض المتوسط.

أبدى الزيت الطيار فعالية مضادة للعديد من السلالات البكتيرية وبشكل خاص الكرويات

الموجبة *S. aureus* والعصويات السالبة الغرام *E. cloacae*.

الكلمات المفتاحية : الشفويات، الزيت الطيار، التأثير المضاد للبكتيريا، *Rosmarinus officinalis* L

---

### Résumé :

Notre travail consiste à déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'espèce *R. officinalis* L, appartenant à la famille des Labiées (Lamiaceae). Cette dernière compte près de 4000 espèces et 350 genres de plantes distribuées à travers le monde et plus particulièrement dans la région méditerranéenne.

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *R. officinalis* L a montré une bonne activité *vis-à-vis* des souches testées et surtout les cocci à Gram (+) : *S. aureus* et les bacilles à Gram (-) : *E. cloacae*.

**Mots clés :** Labiées (Lamiaceae); *R. officinalis* L; Huile essentielle; Activité antibactérienne.

---

### Abstract :

Our work consisted to study of the antibacterial activity of the spices *R. officinalis* L, belonging to Lamiaceae. This family includes 4000 species and 350 genus, widely distributed in the Mediterranean area.

The study of antibacterial activity of the essential oil showed a good activity against the different tested strains particularly the Gram(+) bacteria : *Staphylococcus aureus* and the Gram (-) bacteria : *Enterobacter cloacae*.

**Key words :** Labiées; *Rosmarinus officinalis* L; Essential oil; Anti-bacterial activity.