

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

UNIVERSITE SAAD DAHLEB -BLIDA 1-

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme :

Master en biologie.

Domaine : **Sciences de la nature et de la vie.**

Filière : **Biologie.**

Spécialité : **Génie biologique.**

Thème :

**Investigation des propriétés antimicrobienne (*in vitro*),
anti-inflammatoire et antispasmodique (*in vivo*) de l'essence
de Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) de la région de Bouira.**

Présenté par :

M^{elle} : **Bella Imène.**

M^{elle} : **El fertas Khadidja.**

Soutenu le : 30/06/2016.

Devant la commission d'examen formée de :

Mr : **Boukhatem .M.N.**

MCB à l'université de Blida -1-

Président

Mme : **Saidi .F.**

Professeur à l'université de Blida -1-

Examinatrice

Mme : **Chelghoum .H.**

MAA à l'université de Blida -1-

Promotrice

Mme : **Negab .I.**

Chef de laboratoire de Toxicologie à Saidal,
Médéa

Co-promotrice

Année universitaire 2015/2016.

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Allah, le tout puissant de nous avoir accordé la force et les moyens afin de pouvoir réaliser ce travail.

On remercie notre promotrice de son grand aide durant la réalisation de notre travail, qui nous a orienté vers le succès avec ses connaissances et aussi son encouragement tout on long de notre épreuve, comme elle a été présente à tout moment quand on avait besoin d'elle : Mme Chelghoum. H.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury, le président : Dr. Boukhatem .M.N. et l'examinatrice : Pr. Saidi .F. pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre projet de fin d'études en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve tout au long de notre cursus.

Une partie de notre travail a été réalisé au niveau du complexe SAIDAL - Filiale ANTIBIOTICAL- de Médéa :

Nous remercions tous les membres de l'équipe de ces laboratoires pour leur accueil, leur sympathie ainsi que leurs idées constructives.

Enfin, tous ceux qui ont pratiqué de près ou de loin par la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à:

Mes parents :

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fier de trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit. Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

Mes frères, qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité, ainsi que ma douce sœur Soumia et ma belle-sœur Zahra.

A toi, ma chère binôme, Khadidja.

Toute ma famille & mes chères amies,

À tous ceux qui m'aiment & ceux que j'aime.

À tous ceux qui m'ont apporté leur savoir & contribué à ma formation, je vous dis merci.

- Bella Imène -

DÉDICACES

Au nom de Dieu clément et miséricordieux

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents, Mohamed et Ayouna Zohra, ainsi que ma grand-mère : Aouaouech, pour leurs soutiens, patiences et leurs sacrifices durant nos études et durant ce projet.

A tous nos enseignants, pour leurs bienveillances et pour leurs contributions à notre solide formation.

A mes frères : Abd Elkarim, Mohamed, Salim et Mustapha, mes sœurs : Nadia, Samia et Maria, mes neveux, ma famille, mes amis, et ma chère binôme Imène, pour leurs conseils et leurs encouragements.

A mes adorables Adam et Abd illah, mon fiancé Nadjm eddine, sa famille, et a tous ce qui ont contribué de près ou loin à la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici la traduction de notre gratitude et de notre reconnaissance.

-EL FERTAS KHADIDJA-



Liste des abréviations :

ATCC : American type culture collection.

CDC : Control disease center (Centre pour le contrôle et la prévention des maladies).

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMI : concentration minimale inhibitrice.

CML : concentration minimale létale.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DZI : Diamètre de la zone d'inhibition.

G.T.S : Gélose Trypticase Soja.

H.E : Huile essentielle.

O.N.A.B : Office national des aliments du bétail.

PGE2 : Prostaglandine E2.

ROEO : *Rosmarinus officinalis* L. essential oil.

Liste des figures :

Figure 1 : Provenance des huiles essentielles en fonction des différents organes des plantes (Bellakhdar, 1997).....	2
Figure 2: Aspects morphologiques de Romarin (Köhler et Pabst, 1883).....	5
Figure 3 : Principales localisations des sites d'action des constituants des HE (Goetz et Ghedira, 2012).....	8
Figure 4 : Structures de la membrane et de la paroi de peptidoglycane chez les bactéries Gram+ : (A) et Gram- : (B) (Bisognano, 2000).	9
Figure 5 : Analyse de l'activité antimicrobienne par diffusion sur milieu gélosé solide : Aromatogramme (Zaika, 1988).....	18
Figure 6 : Analyse de l'activité antimicrobienne par micro-atmosphère(Zaika, 1988).	18
Figure 7: Analyse comparative de l'action antimicrobienne de l'HE de Romarin en phase liquide et celle en phase vapeur.....	28

Liste des tableaux :

Tableau I: Situation botanique de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i> L.(Porcher, 2007).	5
Tableau II : Caractères microbiologiques et pouvoirs pathogènes des souches microbiennes.	10
Tableau III: Matériel animal.	16
Tableau IV : Les différents micro-organismes utilisés.	16
Tableau V:répartition des lots de souris utilisés pour réaliser l'activité anti-inflammatoire....	22
Tableau VI: Répartition des lots utilisés dans l'activité antispasmodique.	25
Tableau VII : Résultats du screening antimicrobien de l'HE de Romarin.	26
Tableau VIII: Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> de l'HE de Romarin.	30
Tableau IX : Effet de l'HE de Romarin sur le nombre de crampes abdominales induites par l'acide acétique et son pourcentage de protection.	32

Résumé

L'espèce *Rosmarinus officinalis* L. est largement utilisée dans le traitement de nombreuses affections comme les douleurs gastro-intestinales et les maladies inflammatoires. L'étude de l'activité antimicrobienne de l'HE a été accomplie par deux méthodes différentes (aromatogramme et micro-atmosphère) à différentes doses. En aromatogramme, l'inhibition de la croissance microbienne s'est révélée plus importante sur les bactéries à Gram+, avec des diamètres des zones d'inhibition (DZI) variant entre 33 et 36 mm pour une dose de 60 µL, cependant, à cette dose, la méthode de micro-atmosphère s'est avérée plus efficace avec des DZI variant entre 39 et 56 mm. L'activité anti-inflammatoire a été évaluée sur un modèle d'œdème induit par la carraghénine sur la patte de souris N.M.R.I ; l'administration orale de 3.5% de l'HE a présenté un pourcentage d'inhibition à 55.22% qui n'est pas significativement différent de celui de Diclofénac (50mg/kg). L'activité analgésique a été, quant à elle, évaluée sur un modèle de douleur à l'acide acétique sur la souris, où l'HE a exhibé un pourcentage de réduction de spasmes à 51% après administration de 1% de l'HE. Pour toutes ces activités, l'effet dose-dépendant de l'HE a été mis en évidence. Ces résultats montrent que cette plante est douée de nombreux pouvoirs thérapeutiques.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis* L.; huile essentielle ; activité antimicrobienne ; activité anti-inflammatoire ; activité analgésique.

Abstract

The species *Rosmarinus officinalis* L. is widely used in the treatment of many diseases such as abdominal pain and inflammatory diseases. The study of the antimicrobial activity of ROEO was accomplished by two different methods (agar disc diffusion and vapour diffusion) at different doses. By disc diffusion method, the inhibition of microbial growth was greater on Gram + bacteria, with the inhibition zone diameter (IZD) ranging between 33 and 36 mm for a dose of 60 μ L of ROEO, however, at this dose, vapour diffusion method proved to be more effective with IZD varying between 39 and 56 mm. The anti-inflammatory activity was evaluated using carrageenan-induced paw edema model, where white mice of the strain N.M.R.I were used; oral administration of 3.5% of ROEO presented 55.22% inhibition of swelling, which is not significantly different from diclofenac (50mg / kg). Furthermore, the analgesic activity was evaluated using acetic acid induced pain model on N.M.R.I mice, where the administration of 1% of ROEO exhibited 51% of spasms reduction. For all these activities, the dose-dependent effect of ROEO was highlighted. These results show that this plant is endowed with many therapeutic capabilities.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L.; essential oil; antimicrobial activity; anti-inflammatory activity; analgesic activity.

الملخص

تستخدم أنواع الزيوت العطرية لإكليل الجبل على نطاق واسع في علاج العديد من الحالات المرضية مثل آلام المعدة والأمعاء والأمراض الالتهابية ، ولدراسة النشاط البكتيري قمنا بإنجاز مجموعة من التجارب معتمدين في ذلك على أساليب مختلفة بجرعات مختلفة لنموذجين : (micro-atmosphère و aromatoqramme) .

في aromatoqramme لاحظنا ان تثبيط النمو الميكروبي يكون أكبر على البكتيريا غرام +، مع أقطار مناطق التثبيط (DZI) تتراوح بين 33 و 36 ملم لجرعة من 60 ميكرو لتر، ومع ذلك، في هذه الجرعة، أثبتت طريقة micro-atmosphère فعالية أكثر مع DZI تتراوح بين 39 و 56 ملم. وقمنا بتقييم النشاط المضاد للالتهاب اعتمادا على نموذج مادة الالتهاب مع الكارجينين و ذلك بخلق التهابات على القدم اليسرى للفئران من نوع N.M.R.I ، تم قدمنا للفئران عن طريق الفم 3.5٪ من هذه الزيت العطرية التي قامت بتثبيط قدر ب: 55.22٪، والتي لا تختلف كثيرا عن ديكلوفيناك (50mg / كغ). كما قمنا بتقييم النشاط المسكن اعتمادا على نموذج مادة الألم مع حمض الخليك في الفئران، حيث عرضت نسبة الحد من التشنجات إلى 51٪ بعد تناول الفئران 1٪ من هذه الزيت العطرية. إذن اعتمدنا في جميع هذه التجارب مع نتائجها ، على ابراز العديد من القوى العلاجية التي تمتاز بها الزيوت العطرية لإكليل الجبل.

الكلمات المفتاحية : إكليل الجبل، الزيوت العطرية، تثبيط النمو الميكروبي، النشاط المضاد للالتهاب، النشاط المسكن

للألم.

Table des matières

Introduction	1
I- Généralités	2
I-1- Généralités sur les huiles essentielles	2
I-1-1- Définition.....	2
I-1-2- Localisation des huiles essentielles dans les différents organes des plantes	2
I-1-3- Propriétés physico-chimiques.....	3
I-1-4- Composition chimique générale	3
I-2- Présentation de l'espèce étudiée.....	5
I-2-1- Description botanique.....	5
I-2-2- Distribution géographique	6
I-2-3- Étymologie	6
I-2-4- Dénominations internationales	6
I-2-5- Constituants chimiques de la plante étudiée.....	6
I-3- Activités biologiques étudiées	7
I-3-1- Activité antibactérienne.....	7
I-3-2- Activité antifongique	9
I-3-3- Activité anti-inflammatoire	12
I-3-4- Activité antispasmodique	12
II- Matériel et méthodes.....	15
II-1- Matériel	15
II-1-1- Matériel biologique	15
II-1-2- Matériel non biologique	17

II-2- Méthodes	17
II-2-1- Étude du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle <i>in vitro</i>	17
II-2-2- Évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	20
II-2-3- Évaluation de l'activité antispasmodique <i>in vivo</i>	23
III- Résultats et discussion	26
III-1- Résultats de l'activité antimicrobienne	26
III-2- Résultats de l'activité anti-inflammatoire	29
III-3- Résultats de l'activité antispasmodique.....	32
Conclusion.....	33

Introduction

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine. De par sa situation géographique particulière, l'Algérie bénéficie d'une gamme très variée de climats favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée. La médecine moderne a presque toutes les réponses aux problèmes de santé mais elle n'est pas toujours accessible et elle est souvent trop chère. De nombreux médicaments modernes sont fabriqués à partir de produits naturels, souvent impossibles à créer chimiquement. A cet effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches qui amène à l'identification des principaux éléments actifs de la plante.

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (AMEENAH, 2006).

La plante aromatique, *Rosmarinus officinalis* L. est parmi les plus populaires plantes aromatiques utilisées dans le monde entier. Elle est très utilisée par nos populations dans la médecine traditionnelle comme un traitement symptomatique de troubles de l'appareil digestif, ainsi que l'industrie agroalimentaire qui a récemment découvert les puissantes propriétés anti-oxydantes du Romarin, à cet effet, elle représente récemment un sujet de recherche scientifique intéressant.

Ce présent travail vise à étudier l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire et antispasmodique de l'essence de la plante aromatique, *Rosmarinus officinalis* L., qui appartient à la famille des lamiacées. Cette famille est connue depuis longtemps à cause des propriétés médicinales, aromatiques des plantes qu'elle renferme.

Outre l'introduction et la conclusion, le présent travail se subdivise en trois grandes parties :

- Le premier chapitre est consacré aux généralités sur les huiles essentielles ainsi que la présentation de l'espèce étudiée (Romarin) et les activités biologiques étudiées.
- Le deuxième chapitre est réservé aux matériels et méthodes utilisés pour conduire l'étude.
- Enfin, le troisième chapitre présente les résultats obtenus et traite leur discussion.

*Chapitre I : Rappel
bibliographique*

I- Généralités

I-1- Généralités sur les huiles essentielles

I-1-1- Définition

Selon la 6^{ème} édition de la pharmacopée européenne (2008), une huile essentielle est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par différents procédés d'extraction. Elle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas un changement significatif de sa composition.

Du point de vue physico-chimique : une huile essentielle est un mélange complexe d'éléments chimiques qui sont nécessairement volatils, de poids moléculaire souvent inférieur à trois cent Daltons et hydrophobes mais pas totalement car il y a évaporation avec de l'eau (**Benazzouz, 2011**).

I-1-2- Localisation des huiles essentielles dans les différents organes des plantes

La composition d'une H.E varie en fonction de l'espèce productrice. La composition et le rendement d'une H.E varient selon la partie de la plante (**figure 1**) à partir de laquelle est extraite (**Roulier, 2000**).

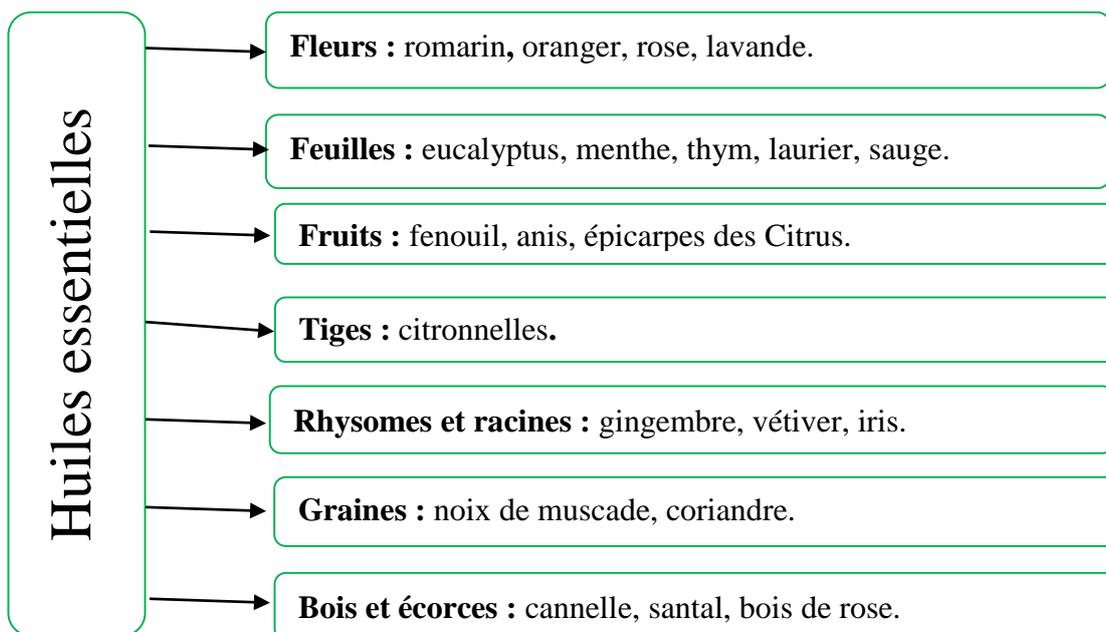


Figure 1 : Provenance des huiles essentielles en fonction des différents organes des plantes (Bellakhdar, 1997).

I-1-3- Propriétés physico-chimiques

- ❖ Les huiles essentielles sont volatiles à la température ambiante, inflammable, et très odorante.
- ❖ Elles sont liquides dans la plus part des cas sauf pour quelques-unes qui sont solide à la température ordinaire, exemple : l'huile essentielle d'Anis et de la Menthe du japon.
- ❖ Elles sont généralement incolores et peuvent peu à peu prendre une coloration jaune plus ou moins foncée, avec quelques exceptions : L'essence de Cannelle avec la couleur rougeâtre, l'essence d'Absinthe avec la couleur verte, l'essence de camomille avec la couleur bleue.
- ❖ Elles sont solubles dans les alcools, l'éther et les huiles fixes, et sont insolubles dans l'eau.
- ❖ La densité des huiles essentielles est inférieure à celle de l'eau allant de 0.85 à 0.95, et il y a présence de trois essences dites lourdes dont la densité est supérieure à celle de l'eau : l'huile de cannelle, de sassafras et de girofle.
- ❖ D'autres propriétés physiques importantes caractérisent les huiles essentielles comme : la déviation polarimétrique, elles dévient la trajectoire d'un faisceau lumineux monochromatique polarisé, soit à gauche ou à droite. Le point d'ébullition varie de 160°C jusqu'à 240°C(Djeddi, 2012).

I-1-4- Composition chimique générale

La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents.

La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés (Guenter, 1975).

Il est généralement admis que les constituants des huiles essentielles sont répartis en trois groupes provenant de trois voies de biosynthèse :

- le groupe des terpénoïdes ;
- le groupe des phénylpropanoïdes ;
- le groupe des lipides, issus de la dégradation d'acides gras et de terpènes(Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2013).

Selon (**Bruneton, 2009**), cette structure varie en fonction :

- Du nombre d'atomes de carbone qui les constitue :
 - Les monoterpènes.
 - Les sesquiterpènes.
 - Rarement les diterpènes.
- Du caractère saturé ou insaturé des liaisons.
- De leur agencement : linéaire ou cyclique.
- De la configuration spatiale (forme de chaise, de bateau, de trièdre...).
- De la nature des groupes fonctionnels à savoir :
 - Terpènes: $\text{R}_1\text{-HC}=\text{CH-R}_2$.
 - Alcools terpéniques : R-OH .
 - Cétones: $\text{R}_1\text{-CO-R}_2$.
 - Phénols: $\text{C}_6\text{H}_6\text{-OH}$.
 - Aldéhydes: R-CHO .
 - Esters: $\text{R}_1\text{-COO-R}_2$.
 - Ethers : $\text{R}_1\text{-O-R}_2$.

I-2- Présentation de l'espèce étudiée

I-2-1- Description botanique

Rosmarinus officinalis L. qui appartient à l'importante famille des *Lamiaceae* (**Tableau I**), est un arbrisseau qui se reconnaît de loin à son odeur.

Cette plante peut atteindre 2m de hauteur. La racine est profonde et pivotante. La tige est tortueuse, anguleuse et fragile. Les feuilles coriaces sont sessiles, opposées, rigides, brillantes, à bords repliés, verdâtres en-dessus, plus ou moins hispides, blanchâtres en dessous. Les fleurs bleues s'épanouissant tout au long de l'année attirent de nombreux Insectes. Le fruit est une baie ovale, sèche et lisse (**figure 4**) (**Damerdji, 2015**).



Figure 2: Aspects morphologiques de Romarin (Köhler et Pabst, 1883).

Tableau I: Situation botanique de l'espèce *Rosmarinus officinalis* L.(Porcher, 2007).

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-embranchement	<i>Magnoliophytina</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.

I-2-2- Distribution géographique

Originaire des régions méditerranéennes, En Algérie, *Rosmarinus officinalis* L. est une espèce des régions du nord essentiellement dans l'ouest de l'Oranie. Cette plante participe d'une façon dominante à des groupements s'organisant le plus souvent dans les zones sèches avec très peu de pluviométrie, elle domine largement l'étage semi-aride voir même aride. Elle apprécie les climats chauds, modérément secs ; les branches récoltées pendant l'été sont séchées à l'air et à l'abri de la lumière (Heinrich et al., 2006).

I-2-3- Étymologie

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

I-2-4- Dénominations internationales

Français : encensier, herbe aux couronnes, romarin, romarin officinal.

Anglais : rosemary.

Allemand : Rosmarin.

Espagnol : romani, romero, rome, romero comun, rosmario.

Italien : osmarino, ramerino, rosmarino, usmarino.

Arabe : eklil, اكليل (Porcher, 2007).

I-2-5- Constituants chimiques de la plante étudiée

L'huile essentielle est un mélange complexe de molécules odorantes. C'est un liquide homogène, bien que constitué d'un assemblage hétérogène sur le plan chimique par la diversité des structures présentes.

La composition chimique des huiles essentielles est parfois différente selon l'origine et la biodiversité de la plante (nature du sol, climat et pratiques culturelles) et selon les méthodes d'extraction utilisées.

La composition chimique de la plante *Rosmarinus officinalis* L. est présentée dans l'**annexe 1**.

I-3- Activités biologiques étudiées

I-3-1- Activité antibactérienne

Bien que les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et de leurs composants aient été largement étudiées, le mécanisme d'action n'a pas été élucidé entièrement (**Burt, 2004; Davidson, 2005; Dorman et Deans, 2000**).

Durant les dernières années, un intérêt accru s'est focalisé sur les substances biologiquement actives isolées des plantes, notamment en vue de l'élimination des micro-organismes pathogènes en raison de la résistance de ces derniers vis-à-vis des antibiotiques (**Essawi et Srour, 2000**) ou bien parce qu'il s'agit de composés écologiquement sains (**Lee et al., 2005**).

On distingue deux sortes d'effets des H.E. sur les microorganismes: une activité létale (bactéricide et fongicide) (**Hammer et al., 1999**) et une inhibition de la croissance (bactériostatique) (**Freeman et Carel, 2006**).

I-3-1-1- Classification

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

- **Les huiles majeures** : Appelés aussi "essence de germe", agissent sur les bacilles G+ et G-, leur action est constante et forte, et sont toujours efficaces.
- **Les huiles médiums** : Moyennement antiseptiques, elles se placent entre les huiles majeures et celles spécifiques pour chaque germe.
- **Les huiles terrains** : Des huiles qui n'ont aucune action (**Chakou et Bassou, 2007**).

I-3-1-2- Sites d'action des huiles essentielles

La structure chimique des constituants des HE conditionne leur mode précis d'action antibactérienne (**Dorman et Deans, 2000**).

Compte tenu du nombre de différents groupes de composés chimiques présents dans les HE, il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuée à un mécanisme spécifique mais qu'il y ait plusieurs cibles dans la cellule (**Carson et al., 2002; Skandamis et Nychas, 2001**).

Les principales localisations des sites d'action des constituants des huiles essentielles sont indiquées dans la **figure 3**.

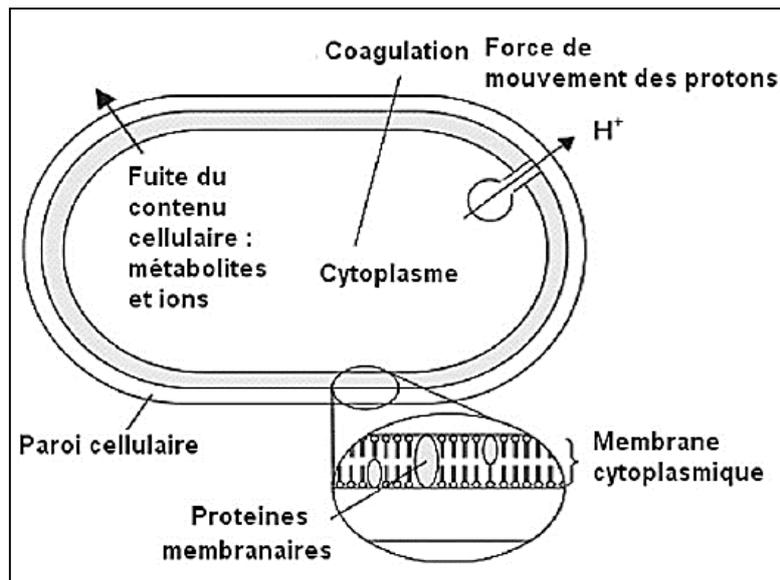


Figure 3 : Principales localisations des sites d'action des constituants des HE (Goetz et Ghedira, 2012).

Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des HE sont :

- l'altération de la paroi cellulaire
- la dégradation de la membrane cytoplasmique
- l'altération des protéines membranaires
- la fuite du contenu cellulaire
- la coagulation du cytoplasme
- l'épuisement de la force de mouvement des protons

I-3-1-3- Les bactéries à Gram positif et négatif

La paroi est une structure rigide et résistante qui protège la bactérie et lui donne sa forme. Sa nature variable est à l'origine de la coloration de Gram qui permet de distinguer deux grands groupes bactériens, les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

Malgré ces différences structurales, la paroi des Eubactéries est constituée d'un polymère complexe constant, le peptidoglycane ou muréine. Il est formé d'oses aminés (glucosamine et acide muramique, reliés par des liaisons (β 1-4) et d'acides aminés constituant des ponts peptidiques entre les chaînes glucidiques.

Il représente le principal constituant de la paroi des bactéries à Gram positif. Cette paroi présente une structure homogène et une épaisseur variant de 10 à 80 nm (**figure 4 : A**). Elle renferme des acides téichoïques et lipotéichoïques (LTA).

Les bactéries à Gram négatif possèdent une paroi de 10 nm d'épaisseur, constituée d'une fine

couche de peptidoglycane recouverte d'une membrane externe ou pariétale, renfermant des phospholipides, des lipopolysaccharides (LPS) et des protéines (figure 4 :B), (Richard et al., 2010).

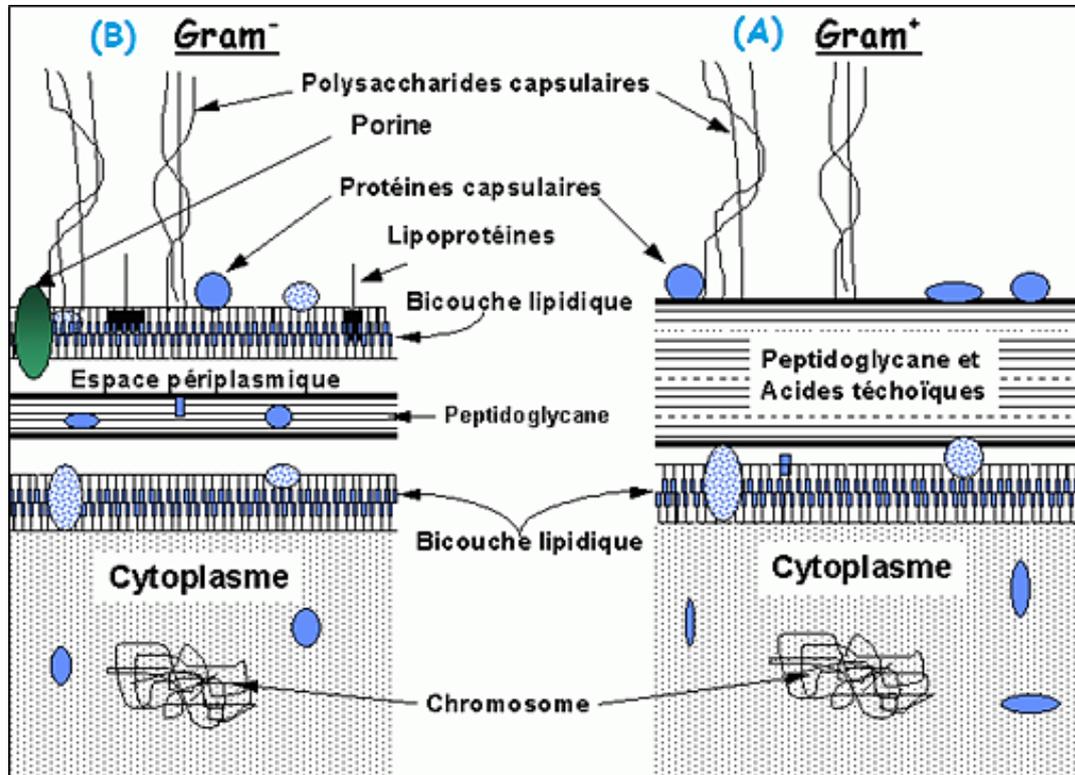


Figure 4 : Structures de la membrane et de la paroi de peptidoglycane chez les bactéries Gram⁺ : (A) et Gram⁻ : (B) (Bisognano, 2000).

I-3-2- Activité antifongique

Selon (Larrondo et Calvo, 1991), l'effet fongicide d'une huile essentielle réside dans les inhibitions du métabolisme et de la croissance des fungi, souvent en relation avec la destruction de membranes lipidiques. Ceci entraîne une plus grande perméabilité et une rupture des structures du champignon.

➤ Dans le **tableau II**, on a cité quelques souches microbiennes en citant leurs caractères microbiologiques ainsi que leurs pouvoirs pathogènes. Leurs photomicrographies sont présentées dans l'**annexe 2**.

Tableau II : Caractères microbiologiques et pouvoirs pathogènes des souches microbiennes.

		Caractères microbiologiques	Pouvoirs pathogènes
Gram+	<i>Staphylococcus aureus.</i>	<p>- Une coccobactérie Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des <i>Staphylococcaceae</i> (Garcia, 2010).</p> <p>- Il a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 µm, est immobile, asporulé et facultativement anaérobique (sauf <i>S. aureus anaerobius</i>); il est habituellement disposé en grappes.</p> <p>-De nombreuses souches produisent des entérotoxines staphylococciques, la toxine superantigénique du syndrome de choc toxique (TSST-1) et des toxines exfoliatives.</p> <p>- Il fait partie de la flore humaine et est surtout présent dans le nez et sur la peau (Kluytmans et al., 1997).</p>	<p>-Un pathogène opportuniste qui peut causer diverses maladies mortelles chez les humains telle que la nécrose et il est responsable de 75 % des cas de syndrome de choc toxique (SCT) (Garcia, 2010).</p> <p>-Une bactérie responsable d'affections cutanées et de toxi-infections alimentaire (Le Loir et al., 2003).</p>
	<i>Bacillus subtilis.</i>	<p>-Les souches de <i>B. subtilis</i> sont constituées de bacilles Gram positif de 1,4 µm habituellement observés en paires ou en chaînettes courtes (Ozhak-Baysan et al., 2012).</p> <p>-<i>B. subtilis</i> est anaérobie facultatif, mobile et capable de former des endospores, et ses colonies blanches d'aspect granuleux font entre 2 et 7 mm de diamètre.</p> <p>-Une croissance est observée à des températures se situant entre 10-20 °C et 35-45 °C, la température optimale étant d'environ 37 °C (Logan et Rodrigez-Diaz, 2006).</p> <p>- Le bacille peut produire six types de toxines, à savoir cinq entérotoxines et une toxine émétique, qui peuvent être thermostables ou thermolabiles, selon les souches (Logan et Rodrigez-Diaz, 2006).</p>	<p>-<i>B. cereus</i> est responsable d'intoxications alimentaires spontanément résolutive (24-48 heures) de deux types (syndrome diarrhéique et syndrome émétique) ainsi que d'infections opportunistes(Logan et Rodrigez-Diaz, 2006).</p> <p>-<i>B. cereus</i> peut aussi être responsable d'infections des plaies, de bactériémies, de septicémies, de méningites, de pneumonies, d'infections du système nerveux central, d'endocardites, de péricardites, d'infections respiratoires et d'infections périphériques (Logan et Rodrigez-Diaz, 2006).</p>

	<p style="text-align: center;">Sarcina lutea.</p>	<p>-Les espèces du genre <i>Micrococcus</i> sont des coques Gram positif, oxydase-positifs et aérobies stricts de la famille des <i>Micrococcaceae</i> (Kloos et al., 2006).</p> <p>-Elles se retrouvent habituellement en grappes irrégulières, en tétrades ou en paires, où les cellules individuelles mesurent de 1 à 1,8 µm de diamètre (Bannerman et al., 2006)et sont habituellement non mobiles et non sporulées (Kloos et al., 2006).</p>	<p>-Elles sont des saprophytes inoffensifs qui habitent ou contaminent la peau, les muqueuses et possiblement l’oropharynx.</p> <p>- agent responsable dans des cas d'abcès intracrâniens, de pneumonie, d'arthrite septique, d'endocardite et de méningite (Bannerman et al., 2006).</p>
<p style="text-align: center;">Gram-</p>	<p style="text-align: center;"><i>Escheria coli.</i></p>	<p>-Entérobactéries. Appelée "colibacille".</p> <p>- Bacille à Gram-, mobile le plus souvent</p> <p>-oxydase-,catalase+.</p> <p>-Nonsporulé.Aéro-anaérobies facultatifs.</p> <p>-Culture facile sur milieux ordinaires, lactosés. Sur milieux solides après 18-24h les colonies sont arrondies, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre.</p> <p>-E. coli fait partie de la flore digestive de l'homme et des animaux. C'est l'espèce prédominante de la flore fécale humaine aéro-anaérobie.</p> <p>-Sa présence dans l'eau est un indice de contamination fécale (CHU Minjoz et Besançon, 2007)</p>	<p>-Les colibacilles, hôtes normaux de l'intestin, ne provoquent normalement pas de maladie. Cependant ils possèdent un potentiel pathogène qu'ils expriment dans certaines circonstances (pathogènes opportunistes).</p>
<p style="text-align: center;">levure</p>	<p style="text-align: center;"><i>Candida albicans.</i></p>	<p>-Un champignon diploïde et encapsulé (Hazen et al., 2006) classé parmi les polymorphes car il peut prendre l'aspect de levures ou l'aspect de pseudo-hyphes selon la température, le pH et les nutriments du milieu(Ryan, 2004) .</p> <p>-Les colonies apparaissent de 48 à 72 heures après la mise en culture à 37 °C sur un milieu d'isolement des champignons(Hazen et al., 2006).</p>	<p>-<i>C. albicans</i> est un microorganisme commensal qui fait partie des flores microbiennes endogènes gastro-intestinale, oropharyngée et génitale féminine (Ryan, 2004).Cependant, il s'agit aussi chez l'humain d'un pathogène opportuniste (Odds, 2010) pouvant causer des affections potentiellement mortelles chez les sujets immunodéprimés comme immunocompétents(Schell et al., 2006).</p>

I-3-3- Activité anti-inflammatoire

En fonction de la composition chimique des huiles, elles peuvent agir comme des anti-inflammatoires qui affecte le métabolisme de l'acide arachidonique ou de la production des cytokines, ou la modulation de l'expression génétique des agents pro-inflammatoires. L'activité anti-inflammatoire est attribuée aussi aux propriétés anti-oxydantes des huiles, puisqu'au cours du phénomène inflammatoire, une grande quantité de radicaux libres est produite (**Miguel, 2010**).

A titre d'exemple, il a été constaté que l'acide rosmarinique de *Rosmarinus officinalis* L. peut augmenter la production de PGE2 et ainsi réduire la production de leucotriènes B4 dans les leucocytes polynucléaires humains et aussi inhiber le système du complément (**CA, 1999**).

I-3-4- Activité antispasmodique

De nombreuses huiles essentielles ont un effet antalgique. Leur action peut permettre de contrôler ou de diminuer la douleur, en outre, leur mécanisme d'action n'a pas été bien élucidé.

Quelques-unes, comme la Menthe, qui a été utilisée pour soulager les troubles gastro-intestinaux, où son effet analgésique est dû à l'activité de menthol, qui agit comme un antagoniste des canaux calciques (**Taylor et al., 1985**); ainsi que la Lavande, où le linalol agit par action post-synaptique médiée par l'AMP-cyclique, ou en inhibant la libération d'acétylcholine et en réduisant le temps d'ouverture des canaux ioniques de la jonction neuromusculaire (blocage des canaux Na^+ et/ou Ca^{++}) (**Lis- Balchin et Hart, 1999**).

Chapitre II : Matériel
et méthodes

II- Matériel et méthodes

L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire ainsi que l'activité spasmolytique de l'huile essentielle de Romarin.

Notre travail a été réalisé au sein des laboratoires de pharmaco-toxicologie et microbiologie au niveau du complexe SAIDAL -Filiale ANTIBIOTICAL- de Médéa pendant une période de deux mois (mars et avril).

II-1- Matériel

II-1-1- Matériel biologique

II-1-1-1- Matériel végétal

Des flacons contenant 10 mL d'huile essentielle de Romarin ont été achetés au niveau d'un point de vente de la société **ZIPHEE BIO** de « **Naturaform institut[®]** », basée à Bouira, qui est un producteur d'huiles essentielles à partir de diverses essences végétales.

L'HE est certifiée « 100 % naturelle » car n'ayant été additionnée ou mélangée à aucun solvant organique durant la phase de production. Elle est aussi certifiée « Biologique » puisqu'elle provient d'une culture de Romarin où aucuns engrais ou pesticides chimiques n'ont été appliqués durant la phase de culture. Durant toute la durée de notre travail, l'HE a été conservée dans des flacons, à 4 °C et à l'abri de l'air et de la lumière, afin d'éviter les phénomènes d'oxydation ou de contamination.

On a choisi le Romarin car cette plante dispose de nombreuses propriétés thérapeutiques.

II-1-1-2- Matériel animal

Le matériel animal et les conditions opératoires sont représentés dans le **tableau III**.

Tableau III: Matériel animal.

Race des souris	Albinos.
Nom scientifique	<i>Mus musculus</i> .
Souche	N.M.R.I (Naval Medical Research Institute).
Lignée	Swiss.
Lieu d'élevage	Complexe ANTIBIOTICAL de Médéa.
Effectif	10 lots de 5 souris.
Poids (g)	22 ± 2.
Sexe	Mâles et femelles.
Nourriture	granulés fournis par l'O.N.A.B.
Boisson	Eau de robinet (eau potable).
Température ambiante	20 à 24 °C.
Taux d'humidité	50%.
Eclairage	10h/j.

II-1-1-3- Souches microbiennes

Notre choix a été porté sur 4 souches bactériennes et une levure puisqu'elles font l'objet des expérimentations pratiques.

Les souches utilisées (**tableau IV**) ont été produites et développées à l'Institut PASTEUR et ont été fournies par le laboratoire de microbiologie du complexe SAIDAL.

Tableau IV : Les différents micro-organismes utilisés.

Souche et référence	Type du micro-organisme	Milieu de culture
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC : 6533)	Gram positif	G.T.S
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC : 6633)	Gram positif	G.T.S
<i>Sarcina lutea</i> (ATCC : 5345)	Gram positif	G.T.S
<i>Escherichia coli</i> (ATCC : 11105)	Gram négatif	G.T.S
<i>Candida albicans</i> (ATCC : 10231)	Levure	Sabouraud agar

II-1-2- Matériel non biologique

L'appareillage, verrerie de laboratoire et les réactifs chimiques utilisés sont présentés dans l'**annexe 3** et **4**.

II-2- Méthodes

II-2-1- Étude du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle *in vitro*

Les H.E ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures, donc elles peuvent servir d'alternatives naturelles aux antibiotiques. Leur activité antimicrobienne dépend de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs.

∞ But :

On a réalisé cette étude microbiologique pour confirmer et évaluer, *in vitro*, l'effet de l'H.E de Romarin sur certains micro-organismes.

II-2-1-1- Techniques d'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielle

La technique de détermination du pouvoir antimicrobien des H.E a une grande influence sur les résultats. L'origine des difficultés pratiques vient de l'insolubilité des constituants des H.E. dans l'eau ainsi que leur caractère volatile (**Bousbia, 2004**). Pour réaliser ce screening antimicrobien, trois techniques ont été mise en œuvre.

II-2-1-1-1- Aromatogramme

Les médecins utilisent l'antibiogramme pour analyser l'impact d'un médicament antibiotique sur des microbes ; l'aromatogramme (**figure 5**) fait recours au même principe où les H.E remplacent les antibiotiques(**Festy, 2009**).

L'utilisation de cette technique est réservée à la recherche d'huiles essentielles actives *in vitro* contre un microbe infectieux donné.

Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri .Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d' H.E.

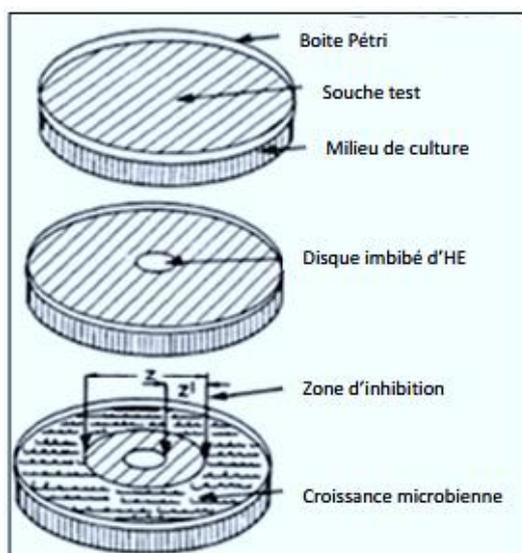


Figure 5 : Analyse de l'activité antimicrobienne par diffusion sur milieu gélosé solide : Aromatogramme (Zaika, 1988).

II-2-1-1-2- Micro-atmosphère

Contrairement à la première technique, basée sur le contact direct de l'H.E dans sa globalité avec les micro-organismes (Laghchimi et al., 2014), dans cette méthode (figure 6), le disque imprégné d'H.E est déposé au centre du couvercle de la boîte renversée après fixation de l'H.E sur le disque, donc elle s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, donc cette technique a été réalisée dans le but d'apprécier les propriétés bactéricide de la phase volatile de l'essence.

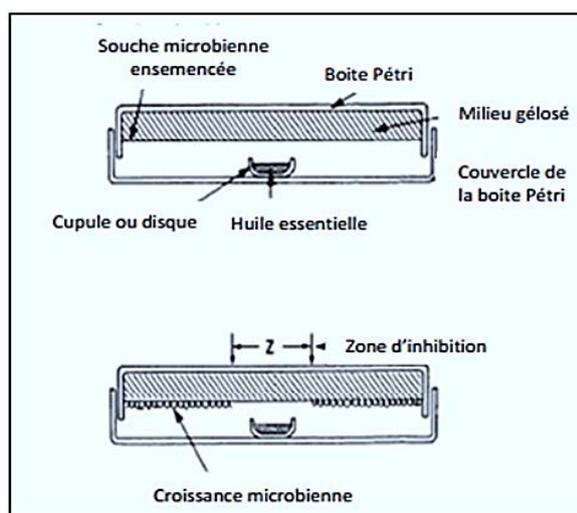


Figure 6 : Analyse de l'activité antimicrobienne par micro-atmosphère (Zaika, 1988).

II-2-1-2- Mode opératoire

a- Préparation de l'inoculum

On prépare à partir des cultures jeunes (culture de 18-24h pour les bactéries et 48h pour les levures) sur gélose nutritive, une suspension en solution saline d'eau physiologique stérile (0.9% NaCl) à une concentration de 10⁷ à 10⁸ germes/ml, par prélèvement de 3 à 5 colonies isolées et identiques à l'aide d'une anse stérile dans 5 ml d'eau physiologique, on agite au Vortex pendant quelques secondes ; on procède ainsi pour toutes les suspensions bactériennes et la suspension fongique (**annexe 6**).

b- L'ensemencement

On trempe un écouvillon stérile dans la suspension du micro-organisme, puis on étale en stries sur une boîte de Pétrie stérile de 100 mm de diamètre (**annexe 6**), coulée précédemment par le milieu de culture approprié (**annexe 5**) en la tournant horizontalement pour couvrir toute la surface.

c- Dépôt des disques et les gouttes d'H.E

A l'aide d'une pince stérile, on prend un disque en papier absorbant (papier buvard de 9mm de diamètre) et on le dépose sur la surface du milieu ensemencé par les micro-organismes à tester, on met 3 disques dans chaque boîte pour réaliser l'**aromatogramme**.

A l'aide d'une micropipette on dépose les volumes croissants suivants : 20µL ,40µL ,60µL d'H.E pure sur les disques afin d'apprécier l'effet « **dose-dépendant** » de l'HE sur l'inhibition de la croissance des germes bactériens.

Pour la technique de **micro-atmosphère**, on fait la même chose mais pour chaque boîte on utilise un disque qu'on le dépose au centre du couvercle ; pour chaque volume on utilise des disques de papier filtre de diamètre croissants afin d'avoir un bon étalement de l'huile donc une bonne évaporation ; leurs diamètres sont : 2cm, 4cm, 6cm qui correspondent aux volumes : 20µL ,40µL ,60µL d'H.E pure chargée à l'aide d'une micropipette .On a recouvert les bords de chaque boîte de Pétri à l'aide de para film pour ne pas avoir une évaporation de l'huile en dehors de la boîte.

En ce qui concerne la technique de **dilution**, on réalise une série de dilutions : $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$ de l'huile dans le D.M.S.O ; on dépose 4 disques pour chaque boîte ensemencée précédemment par le microbe à tester. Puis, on utilise une micropipette pour déposer une goutte de 10 µl pour chaque concentration d'H.E diluée.

- Il faut noter que la préparation de l'inoculum, l'ensemencement, l'incubation et la lecture des résultats ont été menés de la même manière pour toutes les méthodes réalisées.

Des antibiotiques standards (Ampicilline 10 µg/disque et Myconasol 10 mg/ml) ont été utilisés afin de contrôler la sensibilité des micro-organismes à tester en les appliquant dans les mêmes conditions.

d- Lecture des résultats

Après incubation (24h pour les souches bactériennes et 48h pour la levure) l'absence de la croissance bactérienne se traduit par un halo translucide autour du disque pour la méthode de l'aromatogramme et celle de la dilution, pour la technique de micro-atmosphère elle se traduit par une zone claire sur la gélose, de contour à tendance circulaire. On mesure avec précision les DZI à l'aide d'une règle. La sensibilité des souches aux différents agents antimicrobiens a été classifiée par le diamètre de la zone d'inhibition comme suit (**Djeddi et al., 2007**) :

1. Souche **résistante** : (-, $D < 8\text{mm}$).
2. Souche **sensible** : (+, $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$).
3. Souche **très sensible** : (++, $15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$).
4. Souche **extrêmement sensible** : (+++, $D \geq 20\text{mm}$).

II-2-2- Évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

La méthode utilisée pour réaliser cet essai, est celle de (**Halpern et Briot, 1950**), intitulé : « *The carrageenan-induced paw edema* ».

∞ But :

Le but est de vérifier et mettre en évidence la propriété « anti-inflammatoire » de l'H.E du Romarin.

∞ Principe :

L'inflammation chimique a été provoquée par l'injection de 0.1ml de carraghénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche de la souris.

Cette inflammation est la conséquence de l'augmentation de la perméabilité vasculaire ce qui permet la diffusion liquidienne dans les tissus voisins. Celle-ci peut être limitée par des substances censées être douées d'une activité anti-inflammatoire ; administrées préalablement (H.E de la plante étudiée).

II-2-2-1- Choix du modèle animal

La méthode mise en évidence recommande l'utilisation des souris puisqu'elles sont facilement maniables et elles requièrent des quantités minimales du matériel utilisé.

II-2-2-2- Choix des doses

Les doses de l'H.E diluée sont 0.01%, 1%, 2.5%, 3.5%.

II-2-2-3- Protocole expérimental

➤ **Étape préliminaire :**

- Préparation de six lots, chacun est composé de cinq souris mâles et femelles, souche N.M.R.I de poids 22 ± 2 g, qui reçoivent de l'eau et de la nourriture à volonté.
- Dilution de l'H.E dans l'eau physiologique afin de préparer quatre doses.
- Préparation de la carraghénine à 1% en diluant 20mg de cette dernière dans 2ml l'eau physiologique.
- Préparation de Diclofénac de sodium (50mg/kg) utilisé comme anti-inflammatoire officinal, sa dose efficace pour arrêter l'inflammation est 150mg (dans 3ml) pour un homme de 70kg. Pour une souris d'un poids approximatif de 20mg, la dose suffisante est de 0.04 mg, donc on a dissout un comprimé dans 1250ml d'eau physiologique.

➤ **Mode opératoire :**

La répartition des lots est présentée dans le **tableau V** et les étapes de cette expérience sont présentées dans l'**annexe 7**.

- **A T₀ :**

- Gavage de 0.5 ml de l'eau physiologique pour le lot témoin (1).
- Gavage de 0.5 ml de la solution de Diclofénac de sodium (50mg/kg) pour le lot référence (2).
- Gavage de 0.5 ml de l'H.E diluée avec l'eau physiologique en quatre doses : 0.01% et 1% ,2.5%,3.5% pour les lots d'expérience (3) et (4), (5) et (6) respectivement.

- **Après 30 min :**

- Injection à toutes les souris 0.025ml de carraghénine à 1%, sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche.
- Injection à toutes les souris 0.1 ml de l'eau physiologique sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite.

- **Après 4 h :**
 - Pour l'évaluation du degré de tuméfaction, les animaux ont été sacrifiés par écrasement du cou. Pour chaque souris, les pattes postérieures ont été amputées au niveau de l'articulation du jarret et ont été pesées séparément.

Tableau V:répartition des lots de souris utilisés pour réaliser l'activité anti-inflammatoire.

	N° lot	Essais	Voies d'administration
Témoins	1	Eau physiologique	Voie orale
		Carraghénine à 1% PPG	Injection en sous plantaire
		Eau physiologique PPD	
	2	Diclofénac (50mg/kg)	Voie orale
		Carraghénine à 1% PPG	Injection en sous plantaire
		Eau physiologique PPD	
Essais des doses de l'H.E.	3	H.E à 0.01%	Voie orale
		Carraghénine à 1% PPG	Injection en sous plantaire
		Eau physiologique PPD	
	4	H.E à 1%	Voie orale
		Carraghénine à 1% PPG	Injection en sous plantaire
		Eau physiologique PPD	
	5	H.E à 2.5%	Voie orale
		Carraghénine à 1% PPG	Injection en sous plantaire
		Eau physiologique PPD	
	6	H.E à 3.5%	Voie orale
		Carraghénine à 1% PPG	Injection en sous plantaire
		Eau physiologique PPD	

PPG : patte postérieur droite .PPD : patte postérieure gauche.

II-2-2-4- Calcul du pourcentage de réduction d'œdème

L'importance de l'œdème a été appréciée par la détermination du pourcentage d'œdème .Le calcule a était effectué comme suit :

$$\% d'oedème = \frac{PG - PD}{PD} \times 100$$

Où : PD est le poids des pattes postérieurs droites et PG est le poids des pattes postérieurs gauches.

Ensuite, l'activité anti-inflammatoire a été évaluée grâce au calcul du pourcentage d'inhibition ou de réduction de l'œdème (%INH) selon la formule suivante :

$$\% de réduction d'oedème = \frac{\% de l'oedème témoin - \% de l'oedème essai}{\% de l'oedème témoin}$$

II-2-2-5- Analyse statistique

La comparaison des pourcentages moyens d'augmentation et d'inhibition a été faite en utilisant le logiciel STATISTICA VERSION 10, en effectuant le test d'ANOVA à sens unique ou « *one way* », suivi par le test de Tukey « *post hoc* ». Une différence significative est représentée par un $p < 0,05$; $n = 4$, représente le nombre d'expériences par groupe.

II-2-3- Évaluation de l'activité antispasmodique *in vivo*

II-2-3-1- Modèles d'étude de l'activité antalgique

Il existe de nombreuses méthodes pour étudier l'activité antalgique d'une substance supposée analgésique, Dans l'expérience réalisée, le test suivant a été mis en exergue.

❖ Writhing test:

L'injection intra-péritonéale d'une solution de phénylbenzoquinone ou d'acide acétique à 1% chez la souris ou le rat provoque un syndrome douloureux qui se manifeste par des contorsions caractéristiques de type de mouvement d'étirement des pattes postérieures et du muscle dorso-ventral (spasmes) qui peuvent être réduites par un produit analgésique.

☞ But :

Afin d'évaluer et confirmer l'effet spasmodique de l'H.E de Romarin sur les souris.

∞ Principe :

La vérification de l'action inhibitrice de l'H.E sur la douleur induite chez les souris par injection intra-péritoniale d'une solution diluée d'acide acétique à raison de 0.1/10 g de poids corporel de l'animal.

II-2-3-2- Choix du modèle animal

La méthode mise en évidence recommande l'utilisation des souris de souche N.M.R.I pour des raisons de commodité.

II-2-3-3- Choix des doses

Les doses de l'H.E diluée sont 0.01%, 1%.

II-2-3-4- Protocole expérimental

➤ Étape préliminaire :

- Préparation de quatre lots, chacun est composé de cinq souris mâles et femelles, souche N.M.R.I de poids 22 ± 2 g, qui ont été maintenues à jeun pendant 18 h avant le début de l'expérience.
- Dilution de l'H.E dans l'eau physiologique afin de préparer deux doses (**tableau VI**).
- Préparation de l'acide acétique à 1% dilué avec l'eau physiologique.
- Préparation de Phloroglucinol (80mg/kg) utilisé comme anti-spasmodique officinal, qui porte le nom commercial : Spasfon; sa dose efficace pour arrêter l'inflammation est 160mg (dans 3ml) pour un homme de 70kg. Pour une souris d'un poids approximatif de 20mg, la dose suffisante est de 0.09 mg/ml, donc on a dissout deux comprimés dans 800ml d'eau physiologique.

➤ Mode opératoire :

La répartition des lots est présentée dans le **tableau VI** et les étapes de cette expérience sont présentées dans l'**annexe 8**.

- **A T₀ :**

- Gavage de 0.5 ml de l'eau physiologique pour le lot témoin (1).
- Gavage de 0.5 ml de la solution de Phloroglucinol (80mg/kg) pour le lot référence (2).

- Gavage de 0.5 ml de l'H.E diluée avec l'eau physiologique en deux doses : 0.01% et 1% pour les lots d'expérience (3) et (4) respectivement.
- **Après 30 min :**
 - Toutes les souris reçoivent 0.2 ml de la solution d'acide acétique à 1% par voie I.P.
- **Après 5 min :**
 - Comptage du nombre de spasmes observé chez les souris pendant 10 min (**Vogel et Vogel, 1997**).

Tableau VI: Répartition des lots utilisés dans l'activité antispasmodique.

	N° lot	Essais	Objectifs
Témoins	1	Eau physiologique puis l'acide acétique à 1%.	Mise en évidence de l'activité spasmodique de l'acide acétique.
	2	Solution de Phloroglucinol (80mg/kg) puis l'acide acétique à 1%.	Vérification de l'effet spasmolytique du médicament.
Essais des doses de l'H.E.	3	H.E à 0.01% puis l'acide acétique à 1%.	Mise en évidence de l'activité analgésique de l'H.E
	4	H.E à 1% puis l'acide acétique à 1%.	et la relation dose/effet.

II-2-3-5- Calcul du pourcentage de réduction des spasmes

Le pourcentage de réduction des spasmes (pourcentage de protection), est calculé selon la formule suivante (**Rouibi et al., 2013**):

$$\% \text{de protection} = \frac{\text{Moyenne des spasmes du lot témoin} - \text{Moyenne des spasmes du lot essai}}{\text{Moyenne des spasmes du lot témoin}} \times 100$$

Chapitre III :
Résultats et
discussion

III- Résultats et discussion

III-1-Résultats de l'activité antimicrobienne

L'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L. a été faite en mettant en évidence deux méthodes : aromagramme, micro-atmosphère et pour l'évaluation quantitative : la méthode de dilution. Les résultats de celles-ci sont présentés ci-dessous, où le pouvoir antimicrobien de l'HE est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètre, ainsi que la sensibilité des souches à l'huile par des signes :- ,+,++,+++ .

Tableau VII : Résultats du screening antimicrobien de l'HE de Romarin.

		Techniques micro-biologiques Souches bactériennes	Aromatogramme						Micro-atmosphère			Disques d'ATB
			Volume de l'HE (µL/disque)						Volume de l'HE (µL/disque)			
			20		40		60		20	40	60	
Diamètres des zones d'inhibition (cm)	Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	16	+	26	+	33	+	14	38	39	Am*=24
		<i>Sarcina lutea</i>	18	+	22	+	35	+	13	31	41	NT**
		<i>Bacillus subtilis</i>	23	+	29	+	36	+	15	37	56	Am=25
	Gram-	<i>Escherichia Coli</i>	15	+	20	+	22	+	12	28	35	Am=11
Levure	<i>Candida albicans</i>	19	+	24	+	35	+	13	36	49	M*=24	

*Disques d'antibiotiques : Ampicilline (10µg/disque) et l'antifongique : Myconasol 10 mg/mL. **NT : non testée.

- Il faut savoir que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans la mesure de la zone d'inhibition.

❖ En phase liquide (**tableau VII**), l'essence de Romarin a présenté une activité antibactérienne importante (**annexe 9**), particulièrement sur les bactéries à Gram+ où les DZI varient entre 16 et 23 mm, pour celle à Gram- : 15mm et la levure : 19mm pour les disques chargés avec 20 µL ; Gram+ entre 26 et 29 mm et Gram- : 20mm et la levure : 24mm pour les disques chargés avec 40 µL ; Gram+ entre 33 et 36mm , Gram- : 22mm et la levure à 35mm pour les disques chargés avec 60 µL d'HE.

Concernant les disques d'antibiotiques qui ont servi de contrôle positif, les DZI varient selon les germes étudiés. L'activité bactériostatique de l'HE, à la dose de 40 µL, semble être supérieure à celle des ATB (*B. subtilis* = 29 mm et Ampicilline (Am, 10µg)= 25 mm ; *E.coli*=26mm et Ampicilline (Am, 10µg)= 11mm ; *S.aureus* = 26 mm et Ampicilline (Am, 10µg)= 24 mm).

L'action anticandidosique paraît, plus ou moins, bonne, à une dose de 40µ, on a enregistré un DZI=24mm qui est le même avec celui de l'antimycosique (Myconazol), mais plus supérieure (35mm) à un volume de 60 µL d'HE. Selon les travaux antérieurs, l'activité antifongique de Romarin est moins marquée et s'exerce notamment vis-à-vis de *Fusarium graminearum* (**Angioni et al., 2004**) et elle est particulièrement inférieure sur l'espèce *C.albicans* en comparaison avec l'HE d'autres plantes comme : *Thymus vulgaris* et *Clinopodium acinos* L. (**Panizzi et al., 1993**).

B. subtilis semble être l'espèce la plus sensible avec des DZI de 23, 29 et 36 mm pour les trois doses croissantes utilisées de l'HE, ainsi, *S. aureus* et *S. lutea* présentent une sensibilité supérieure par rapport à celle de *E. coli*, ce qui nous a menés à remarquer qu'il existe une certaine dissimilitude de sensibilité entre les bactéries à Gram+ et à Gram- vis-à-vis l'HE, ce qui est en accord avec des recherches antérieures (**Boukhatem et al., 2014b; Smith-Palmer et al., 1998**) qui confirment que les Gram+ sont plus sensibles à l'action antimicrobienne de l'HE que les Gram-. Ceci est dû au fait que les produits agressifs (les antibiotiques naturelles et synthétiques) sont incapables de traverser la membrane externe des bactéries à Gram- qu'elles stockent dans leur périplasme un arsenal d'enzymes de dégradation de molécules complexes.

❖ En phase vapeur (**tableau VII**), l'HE de Romarin présente une efficacité remarquable sur les bactéries à Gram+ avec des DZI allant de 13 à 15mm pour les disques chargés avec 20 µL,

entre 31 et 38mm pour les disques chargés avec 40 μL , entre 39 et 56mm pour les disques chargés avec 60 μL (**annexe 10**). La bactérie à Gram- a été légèrement inhibée par rapport aux Gram+ avec des DZI : 12mm, 28mm, 35mm pour les trois doses d'HE. Il faut se rappeler que l'effet antimicrobien étudié est « dose-dépendant ».

Tout comme l'aromatogramme, *B. subtilis* est la souche la plus sensible. Ainsi, l'action anticandidosique paraît plus efficace en micro-atmosphère qu'en diffusion sur milieu solide avec des DZI croissants allant de 13 à 49mm.

- ❖ Vue la divergence remarquable entre les résultats de l'aromatogramme et ceux de micro-atmosphère, il a été tout à fait envisageable de faire une comparaison entre ces derniers, à la plus grande dose : 60 μL (**figure 7**), où on a une différence d'inhibition plus ou moins importante en phase gazeuse qu'en phase liquide, plus particulièrement de: *B. subtilis*, *S. aureus* et *C. albicans*.

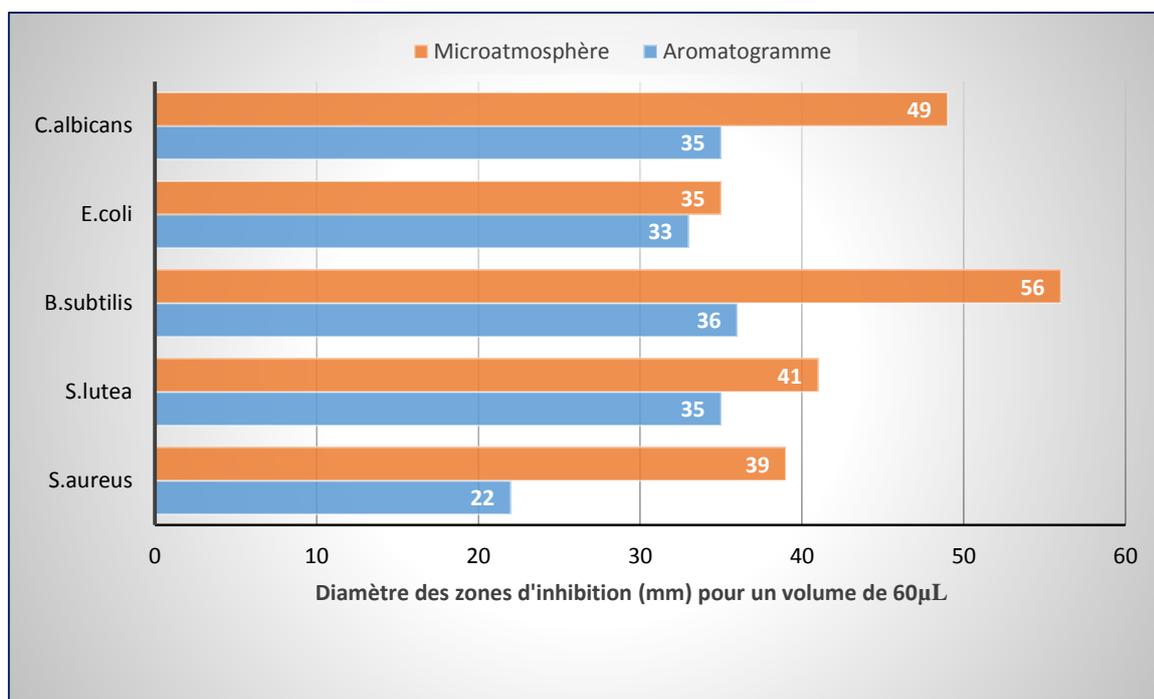


Figure 7: Analyse comparative de l'action antimicrobienne de l'HE de Romarin en phase liquide et celle en phase vapeur.

Il existe un nombre restreint de publications scientifiques qui mettent en évidence l'effet inhibiteur des essences en micro-atmosphère, cependant, (**Boukhatem et al., 2014a; Nedorostova et al., 2008**) suggèrent que les HE sont hautement plus efficaces en phase vapeur qu'en phase liquide.

Ceci peut être dû au fait que les molécules actives de l'HE, non miscible, diffuse mal en milieu solide, d'autre part, en micro-atmosphère, ses composants biocides seront plus en contact avec le micro-organisme à tester.

Il est à noter que les HE contenant: alcools, cétones, esters, oxydes et les hydrocarbures, l'inhibition est supérieure en micro-atmosphère, par ailleurs, elle est supérieure en diffusion sur milieu gélosé pour les essences qui contiennent des quantités supérieures d'aldéhydes (**Inouye et al., 2006**).

Dans cette méthode, la zone d'inhibition qui en résulte n'est pas seulement une mesure d'activité, mais aussi la vitesse d'évaporation des composés actifs de l'HE, qui dépend aussi de la température.

Néanmoins, il n'y a pas une cohérence générale pour laquelle on sait précisément quelle HE en phase vapeur sera efficace sur un type de germe bien déterminé, donc, le spectre d'activité de chaque essence doit être identifié expérimentalement.

- ❖ Pour tous les germes utilisés, les résultats de la méthode de l'aromatogramme avec dilution (**annexe 11**) ont révélé une inefficacité de l'HE de Romarin avec des DZI inférieurs à 8mm, à des concentrations de : 25%, 12,5%, 6.25%, mais, à une concentration de 50%, les zones d'inhibition ont été inférieurs à 14mm, ce qui voudrait dire que les CMI sont à 50%, ainsi, en diluant l'HE, son effet diminue, donc, l'activité est proportionnelle à la concentration.

III-2-Résultats de l'activité anti-inflammatoire

L'essai primordial le plus largement utilisé pour évaluer l'activité d'un nouvel agent anti-inflammatoire est sa capacité de réduire l'œdème local induit dans la patte postérieure de la souris par l'injection d'un agent irritant : carraghénine à 1%.

Les résultats de l'effet de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. sur la tuméfaction des pattes induite par la carraghénine sont portés dans le **tableau VIII** provainsi que l'**annexe 12**.

Tableau VIII: Activité anti-inflammatoire *in vivo* de l'HE de Romarin.

Lots	% d'œdème, moyenne \pmSEM*	Inhibition (%)
Témoin	35,05 \pm 3,05^a	--
Diclofénac	11,67 \pm 1,20^c	66,70
0.01% HE	33,69 \pm 2,20^a	3,86
1% HE	28,89 \pm 5,25^{a,b}	17,56
2,5% HE	25,11 \pm 2,26^{a,b}	28,34
3,5% HE	15,69 \pm 2,13^{b,c}	55,22

*SEM: Standard Error of Means.

N.B : Les moyennes dans la même colonne suivit par les mêmes petites lettres ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$) selon les résultats d'analyse de la variance simple ou « *One way ANOVA* » suivi par le test de « *hoc post* » Tukey de comparaison multiple.

L'effet anti-inflammatoire de l'HE a été évalué en 4 doses : 0.01%,1%,2.5%, 3,5%.

On a calculé le pourcentage d'œdème pour chaque souris, puis la moyenne de ces derniers pour chaque lot, ensuite, leurs pourcentages d'inhibition d'œdème.

Les résultats (**tableau VIII**) indiquent que les pourcentages d'inhibition à 0.01% et 1% ,2.5% sont croissants : 3.68% et 17.56%, 28.34%, respectivement. Ces derniers sont significativement différents du pourcentage d'inhibition du médicament référence.

En outre, à une dose de 3.5% de l'HE, où le pourcentage d'inhibition d'œdème est de : 55,22%, qui n'est pas significativement différent de celui de diclofénac (50mg/kg) à 66.70%, ce qui indique que l'administration orale de l'HE de Romarin produit un effet anti-inflammatoire significatif face à une inflammation induite par un agent phlogogène : la carraghénine.

Il existe une relation inversement proportionnelle entre le pourcentage d'œdème et celui d'inhibition, ainsi, un effet « dose-dépendant » de l'HE pour réduire l'œdème et donc une augmentation du pouvoir anti-inflammatoire.

On peut expliquer ce phénomène comme suit :

Le développement de l'œdème de la patte après injection de la carraghénine est décrit comme un évènement biphasé (**Vinegar et al., 1969**), une phase initiale observée durant la première heure, qui est attribuée à la libération de l'histamine et de la sérotonine (**Crunkhorn et Meacock, 1971**) et une deuxième phase de gonflement qui est due à la libération des substances prostaglandin-like ;celle-ci est sensible aux agents anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens (**Di Rosa et Willoughby, 1971; Vinegar et al., 1969**).

Les souris prétraitées par le Diclofénac, administré par voie orale, marquent une réduction significative de l'œdème des pattes gauches postérieures. Cette diminution du pouvoir inflammatoire de la carraghénine est attribuée au pouvoir anti-inflammatoire du Diclofenac, un médicament anti inflammatoire non stéroïdien (AINS) qui inhibe la cyclo- oxygénase 2(COX2) inducible, intervenant au sommet d'une cascade de réactions aboutissant à la formation de prostaglandines de l'inflammation.

Selon (**D'Acquisto et al., 2002; Landino et al., 1996**), les radicaux libres (également appelés dérivés réactifs de l'oxygène) jouent un rôle principal dans la physiopathologie d'un processus inflammatoire

Des travaux antérieurs suggèrent que la concentration élevée d'acides phénoliques dans l'extrait de *R.officinalis* L. est liée à son pouvoir antioxydant (**Erkan et al., 2008; Moreno et al., 2006**) et anti-inflammatoire (**Peng et al., 2007**).

Une étude récente (**Rocha et al., 2015**) ,a identifié le potentiel anti-inflammatoire de l'acide rosmarinique, un composé phénolique, qui est le constituant principal de *Rosmarinus officinalis*. Après l'administration de l'acide rosmarinique et d'un extrait méthanolique de *R.officinalis* L., les résultats indiquent que ces derniers ont la capacité de réduire 60% d'œdème de la patte du rat en comparaison avec le témoin, vu que tous les deux ont la même ampleur du pouvoir anti-inflammatoire, cela suggère que c'est l'acide rosmarinique qui a principalement contribué à cet effet, en réduisant les radicaux libres.

III-3-Résultats de l'activité antispasmodique

Les résultats de l'activité antalgique ont été enregistrés en observant le nombre moyen des spasmes des souris par lot.

Ceux-ci sont présentés dans le **tableau IX** .

Tableau IX : Effet de l'HE de Romarin sur le nombre de crampes abdominales induites par l'acide acétique et son pourcentage de protection.

N° de lot	Nombre de spasmes moyen	Pourcentage de réduction
1 : Témoin	72	0
2 : Contrôle	15	79
3 : Dose 0.01% d'H.E	50	31
4 : Dose 1% d'H.E	35	51

On constate que l'essence de Romarin a l'aptitude de diminuer les spasmes à une dose minime de 0.01% de 72 à 50 crampes, avec un pourcentage d'inhibition de contractions de 31%. A 1%, le nombre de crampes moyen passe de 72 à 35, le pourcentage de protection, quant à lui, augmente de 31% à 51%.

L'acide acétique met en jeu les mécanismes périphériques de la douleur. Il induit la libération de nombreux médiateurs chimiques impliqués dans la douleur tels que l'histamine, les prostaglandines (PGE₂ et PGE_α), la sérotonine (**Amresh et al., 2007**).

Quant au Phloroglucinol (médicament référence) il agit en inhibant la pénétration du calcium dans la cellule (**Allain, 2000**).

Ces résultats indiquent que l'HE de *Rosmarinus officinalis* L. présente un effet analgésique significatif et qu'il pourrait avoir un effet inhibiteur sur la libération des médiateurs impliqués dans la douleur périphérique. De plus, il y a une relation inversement proportionnelle entre la concentration et le nombre de spasmes : la plus grande concentration donne le plus faible nombre de spasmes.

Conclusion

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs essences dans les soins de santé. L'ensemble de nos travaux a permis de souligner le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de Romarin en phase liquide et vapeur ainsi que son effet anti-inflammatoire et analgésique.

Pour les trois tests, on a utilisé des doses différentes de l'huile essentielle ; les résultats indiquent que l'effet de l'essence est « dose-dépendant » et directement proportionnelle à la concentration de ce dernier.

Les résultats du screening antimicrobien ont montré que les bactéries à Gram + sont plus sensibles que les Gram- à l'action inhibitrice de l'huile essentielle de Romarin et que l'effet de ce dernier en phase vapeur est plus apprécié qu'en phase liquide, même pour son effet antifongique qui paraît supérieur à celui de l'ATB utilisé comme référence.

Par voie orale et à une dose de 3.5%, le pouvoir anti-inflammatoire de l'HE n'était pas significativement différent à celui de Diclofénac.

Ainsi, l'administration par voie orale de l'HE de Romarin a exhibé une réduction remarquable des spasmes à une dose de 1% par rapport à celle de Phloroglucinol.

Donc, l'essence de Romarin possède des pouvoirs anti-infectieux ainsi que curatifs.

On sait qu'une HE est un mélange de nombreux composés chimiques et qu'il est difficile d'attribuer des activités biologiques à un ou à quelques constituants majeurs de celle-ci, néanmoins, l'étude d'une HE ne se conduit pas seulement sur ses caractéristiques chimiques mais aussi sur la possibilité de faire le lien entre les constituants chimiques avec des propriétés fonctionnelles spécifiques. De cet effet, des recherches plus poussées sont nécessaires afin d'accentuer non seulement les pouvoirs de l'HE de Romarin, mais aussi ses constituants majeurs.

Références

bibliographiques

Allain, P. (2000). *Les médicaments* (CdM Ed. 3 ed.). Bouchemaine ,France.

Amresh, G., Reddy, G., Rao, C. V., Singh, P. (2007). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cissampelos pareira* root in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 110(3), 526-531.

Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J. D., Arlorio, M., et al. (2004). Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(11), 3530-3535.

Bannerman, T. L., Peacock, S., Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M., et al. (2006). *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci. Manual of clinical microbiology: Volume 1*(Ed. 9), 390-411.

Bellakhdar, J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. I. PRESS (Ed.), (pp. 764). Paris.

Benazzouz, M. (2011). *Les huiles essentielles, importance et potentialités : Mise à jour bibliographique des dernières recherches sur leurs, emplois et toxicité et analyse de la composition des huiles essentielles de quinze plantes des plus consommées au Maroc.* (Doctorat), Mohamed V, Maroc.

Bisognano, C. (2000). *Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de Staphylococcus aureus : étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires.* (Doctorat en sciences biologiques), Université de Genève, Genève, Suisse.

Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., Mekarnia, M. (2014a). Liquid and vapour phase antibacterial activity of *Eucalyptus globulus* essential oil= susceptibility of selected respiratory tract pathogens

American Journal of Infectious Diseases, 10(03), 105.

Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., Taibi, H., Djamel, T. (2014b). Valorisation de l'essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris* L.) en aromathérapie anti-infectieuse [Potential application of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil as

antibacterial drug in aromatherapy]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 8(4), 1418.

Bousbia, N. (2004). *Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antimicrobiennes.* (Thèse de Magistère, option Sciences Alimentaires), Alger (Algérie).

Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales (4e ed.).* Lavoisier (Ed.), (pp. 567-571-573-574).

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

CA, R. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian journal of experimental biology*, 37, 124-131.

Carson, C. F., Mee, B. J., Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.

Chakou, M., Bassou, K. (2007). *Efficacité antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha Spicata* L. de la région de Ouargla sur quelques germes pathogènes: *E.coli*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albican*.*

CHU Minjoz, J., Besançon, F. d. M.-P. d. (2007). BACTERIO-WEB. from <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/>

Crunkhorn, P., Meacock, S. (1971). Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. *British Journal of Pharmacology*, 42(3), 392-402.

D'Acquisto, F., May, M. J., Ghosh, S. (2002). Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-B). *Molecular interventions*, 2(1), 22.

- Damerdjji, A. (2015).** Les Orthoptéroïdes sur différentes plantes dans la région de Tlemcen (Algérie). *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 8(3), 82-92.
- Davidson, P. (2005).** *Food antimicrobials: Back to nature*. Paper presented at the I International Symposium on Natural Preservatives in Food Systems 709.
- Di Rosa, M., Willoughby, D. A. (1971).** Screens for anti-inflammatory drugs. *J Pharm Pharmacol*, 23(4), 297-298.
- Djeddi, S. (2012).** Les huiles essentielles "Des mystérieux métabolites secondaires"
P. a. francophone (Ed.), (pp. 31-32-33-42-43-44).
- Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I., Skaltsa, H. D. (2007).** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(4), 487-490. doi: 10.1007/s10600-007-0172-4
- Dorman, H., Deans, S. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. (2008).** Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110(1), 76-82.
- Essawi, T., Srour, M. (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 70(3), 343-349.
- Festy, D. (2009).** *Les huiles essentielles, ça marche !: Tous les bons gestes pour se soigner autrement*: Leduc.s éditions.
- Freeman, L., Carel, Y. (2006).** Aromathérapie. NUTRA NEWS Science. *Nutrition, Prévention et Santé*.

Garcia, L. S. (2010). *Clinical microbiology procedures handbook*: American Society for Microbiology Press.

Goetz, P., Ghedira, K. (2012). Phytothérapie anti-infectieuse (Vol. Rosmarinus officinalis (Lamiaceae): Romarin, pp. 11-193-194-340-341-342).

Guenter, E. (1975). *The essential oils* (Vol. II, III, IV, V, VI). New York USA.

Halpern, B. N., Briot, M. (1950). [Pathogenic and therapeutic study of an edema syndrome caused by ovalbumin in the rat]. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 82(3), 247-296.

Hammer, K. A., Carson, C., Riley, T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*, 86(6), 985-990.

Hazen, K., Howell, S., Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M., et al. (2006). Candida, Cryptococcus, and other yeasts of medical importance. *Manual of clinical microbiology: Volume 2*(Ed. 9), 1762-1788.

Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M. (2006). Ethnobotany and ethnopharmacology—Interdisciplinary links with the historical sciences. *Journal of ethnopharmacology*, 107(2), 157-160.

Inouye, S., Uchida, K., Maruyama, N., Yamaguchi, H., Abe, S. (2006). A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 47(2), 91-98.

Kaloustian, J., Hadji-Minaglou, F. (2013). La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie. S. S. B. Media (Ed.), (pp. 13-20): Springer, Paris.

Kluytmans, J., Van Belkum, A., Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews*, 10(3), 505-520.

Köhler, F. E., Pabst, G. (1883). *Köhler's Medizinal-Pflanzen in Naturgetreuen Abbildungen Mit Kurz Erläuterndem Texte: Atlas Zur Pharmacopoea Germanica, Austriaca, Belgica, Danica, Helvetica, Hungarica, Rossica, Suecica, Neerlandica, British Pharmacopoeia, Zum Codex Medicamentarius, Sowi: Friedrich von Zezschwitz.*

Laghchimi, A., Znini, M., Majidi, L., Renucci, F., El Harrak, A., Costa, J. (2014).
Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme (Chemical composition and effect of liquid and vapor phase of *Lavandula multifida* essential oil on mycelial growth of fungi responsible for the rot of apple).

Landino, L. M., Crews, B. C., Timmons, M. D., Morrow, J. D., Marnett, L. J. (1996).
Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(26), 15069-15074.

Larrondo, J., Calvo, M. (1991). Effect of essential oils on *Candida albicans*: a scanning electron microscope study. *Biomedical letters*, 46(184), 269-272.

Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*, 2(1), 63-76.

Lee, H. C., Cheng, S. S., Chang, S. T. (2005). Antifungal property of the essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum* leaf against tree pathogenic fungi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(12), 2047-2053.

Lis-Balchin, M., Hart, S. (1999). Studies on the mode of action of the essential oil of Lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). *Phytotherapy Research*, 13(6), 540-542.

Logan, N. A., Rodriguez-Diaz, M. (2006). *Bacillus* spp. and related genera. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*, 2, 139-158.

Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287.

Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free radical research*, 40(2), 223-231.

Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M. (2008). Comparison of antimicrobial properties of essential oils in vapour and liquid phase against foodborne pathogens. *Planta Med*, 74(09), PI6. doi: 10.1055/s-0028-1084914

Odds, F. C. (2010). Molecular phylogenetics and epidemiology of *Candida albicans*. *Future Microbiology*, 5(1), 67-79.

Ozhak-Baysan, B., Ogunc, D., Colak, D., Ongut, G., Donmez, L., Vural, T., et al. (2012). Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing nosocomial candiduria. *Medical mycology*, 50(5), 529-532.

Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P. L., Morelli, I. (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *J Ethnopharmacol*, 39(3), 167-170.

Peng, C.-H., Su, J.-D., Chyau, C.-C., Sung, T.-Y., Ho, S.-S., Peng, C.-C., et al. (2007). Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(9), 2223-2232.

Porcher, M. H. (2007). M.M.P.N.D. Sorting *Rosmarinus* names. from <http://www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Rosmarinus.html>

Richard, D., Chevalet, P., Fournel, S., Giraud, N., Gros, F., Laurenti, P., et al. (2010). *Biologie -Tout le cours en fiches: 300 fiches de cours, 270 QCM et bonus web:* Dunod.

Rocha, J., Eduardo-Figueira, M., Barateiro, A., Fernandes, A., Brites, D., Bronze, R., et al. (2015). Anti-inflammatory Effect of Rosmarinic Acid and an Extract of *Rosmarinus officinalis* in Rat Models of Local and Systemic Inflammation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 116(5), 398-413. doi: 10.1111/bcpt.12335

Rouibi, A., Chabane, D., Saidi, F., Azine, K. (2013). Étude comparative de l'activité antispasmodique de l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* L. et de l'ibuprofène chez les souris. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 8(2).

Roulier, G. (2000). Les huiles essentielles pour votre santé. Dangles (Ed.), (pp. 336).

Ryan, K. (2004). Candida, Aspergillus, and Other Opportunistic Fungi. *Sherris Medical Microbiology*, 659-668.

Schell, W. A., Fleming, D., Hunt, D. (2006). Mycotic agents of human disease. *Biological safety: principles and practices*(Ed. 4), 163-178.

Skandamis, P., Nychas, G. J. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico- chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of applied microbiology*, 91(6), 1011-1022.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol*, 26(2), 118-122.

Taylor, B., Duthie, H., Luscombe, D. (1985). Calcium-antagonist activity of menthol on gastrointestinal smooth-muscle. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 20(3), P293-P294.

Vinegar, R., Schreiber, W., Hugo, R. (1969). Biphasic development of carrageenin edema in rats. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 166(1), 96-103.

Vogel, H., Vogel, W. (1997). Drug Discovery and Evaluation, Pharmacological Assays. : Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

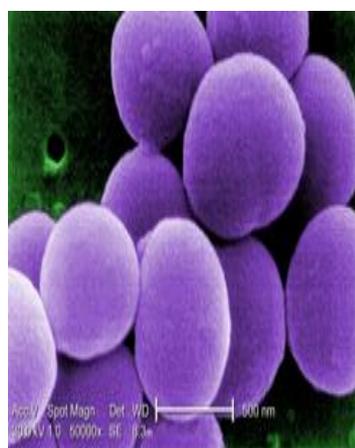
Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination1. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.

Annexes

Annexe 1 : Constituants chimiques de *Rosmarinus officinalis* L. (Goetz et Ghedira, 2012).

Familles de constituants	Constituants
Huile essentielle (1 à 2,5 %)	Camphre (1 à 38%), 1,8-cinéole, α -pinène (7 à 80%), bornéol (4 à 19%), verbénone (1 à 37%), l'eucalyptol (1 à 35%), acétate de bornyle(jusqu'à 10%), camphène, α -terpinéol, β -pinène, β -caryophyllène, myrcène...
Diterpènes phénoliques tricycliques	Diterpènes phénoliques tricycliques Acide carnosolique, carnosol, rosmanol, rosmadial...
Flavonoïdes	- Hétérosides de la lutéoline, de la diosmétine - Flavones méthoxylées : genkwanine et dérivés, cirsimaritine, scutellaréine
Acides phénols (3,5 %) = « tanins des Labiées »	Acides caféique, chlorogénique, rosmarinique
Triterpènes, stéroïdes	Acide oléanolique (10 %), dérivés de l'acide ursolique et α - et β -amyrine (5 %)
Lipides (cuticule cireuse des jeunes feuilles)	n-alcanes, isoalcanes, alcènes
Constituants divers	Polysaccharides acides (6 %), traces de salicylate

Annexe 2 : photomicrographies des souches microbiennes.



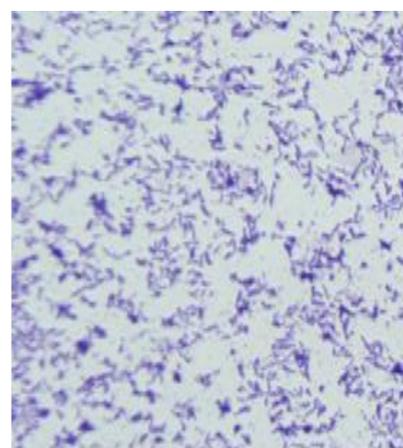
Staphylococcus aureus au microscope électronique à balayage (x10000) par CDC.



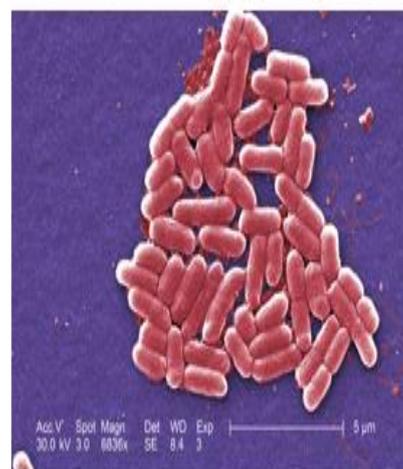
Candida albicans au microscope électronique à balayage (x13331) par CDC.



Sarcina lutea au microscope électronique à balayage (x12230) par CDC.



Bacillus subtilis au microscope électronique à balayage (x10000) par CDC.



Escherichia coli de souche O157:H7 au microscope électronique à balayage (x6838) par CDC.

Annexe 3 : Matériel non biologique

	Activité Antimicrobienne	Activité antispasmodique et anti-inflammatoire
Matériels de laboratoire	<p>-Agitateur, Autoclave et étuve pour stérilisation, Bain Marie à 45°C, Bec bunsen, Etuve d'incubation (32.5 ± 2.5°C).</p> <p>-Boite de Pétri de 100 mm de diamètre, disques stériles (9mm), disques d'antibiotiques (Ampicilline 10 µg/disque et Myconazol 10 mg/ml) Ecouvillons stériles, pipettes Pasteur, pipettes graduées de 1 ml et 10 ml stériles, micropipette (20 à200µL) pince de laboratoire ,portoir, papier filtre, poire ,seringue de 5 cc à 10 cc ,tubes à essai stériles, para film.</p>	<p>-Agitateur Baro Magnétique.</p> <p>-Balance pour petits animaux.</p> <p>-Cages de stabulation des souris.</p> <p>-lots de souris de laboratoire.</p> <p>-Seringue stériles en verre de 1 ml.</p> <p>-Fioles.</p>
Réactifs	<p>-Huile du romarin.</p>	<p>-Acide acétique à 1%.</p> <p>-Comprimés Phloroglucinoldihydrate 80mg.</p> <p>-Comprimés Votrex 50mg (pour l'activité anti-inflammatoire).</p> <p>-Carraghénine à 1% (pour l'activité anti-inflammatoire).</p> <p>-Huile du romarin.</p>
Solvants	<p>-Eau physiologique.</p> <p>-Eau distillé.</p> <p>-Myristate d'isopropyle (DMSO).</p>	<p>-Eau physiologique.</p> <p>-Eau distillé.</p>
Milieux de culture	<p>-<u>Soja agar</u> : Agar bactériologique (15g), Chlorure de soduim (5g), Caséine (15g), Peptone de soja (5g).</p> <p>-<u>Milieu Sabouraud</u> : paptone de viade de caséine(10g), glucose monohydrate, (40g), gelose(15g), Eau purifiée (1000 ml).</p>	<p>-</p>

Annexe 4: Appareillage de laboratoire.



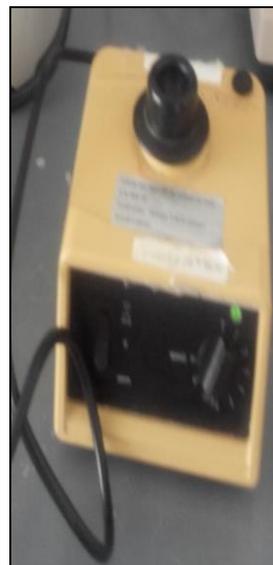
Balance pour petits animaux



Balance électronique de laboratoire



Agitateur Baro Magnétique



Agitateur Vortex



Autoclave



Etuve de stérilisation

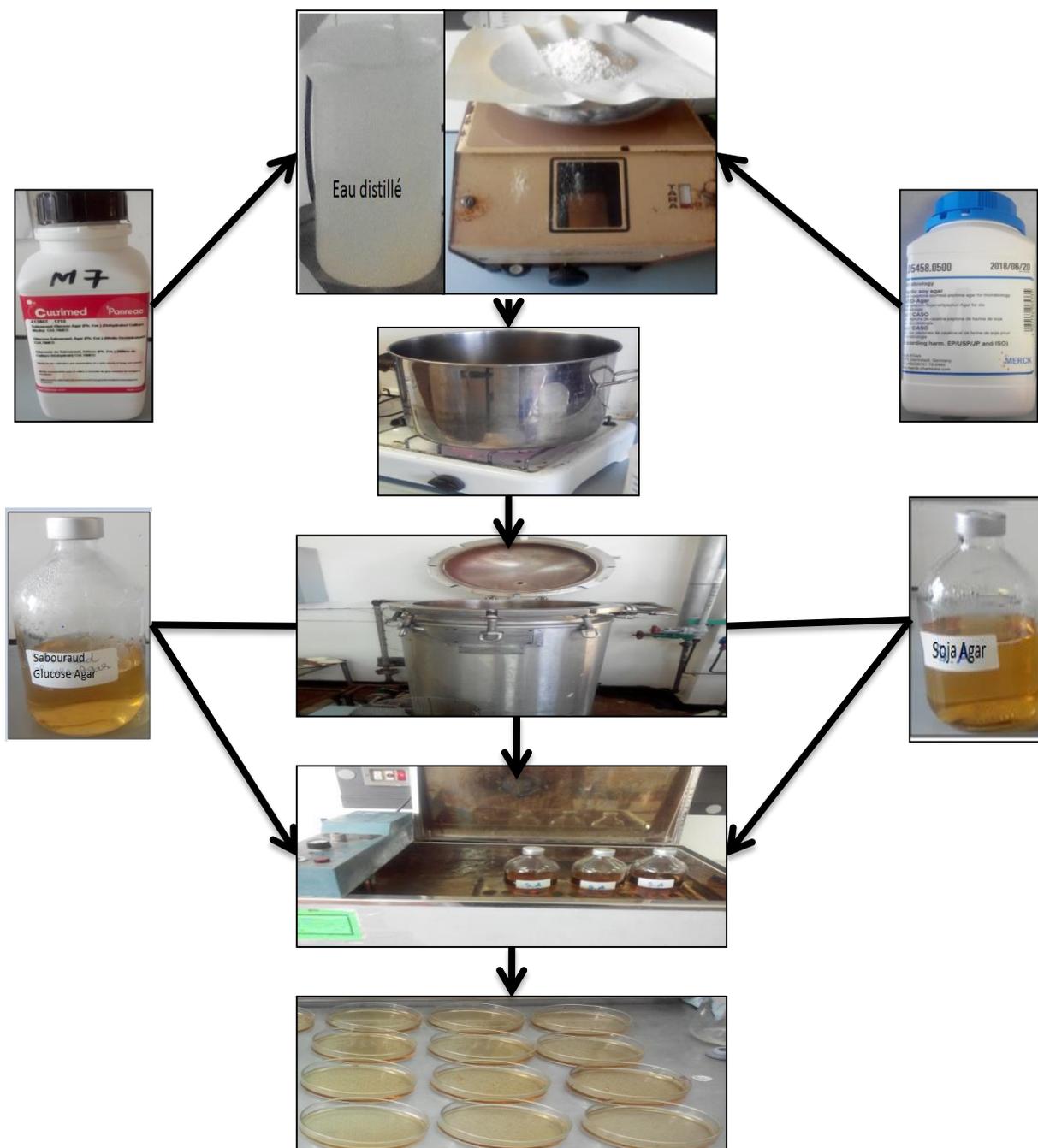


Etuve d'incubation



Bain marie

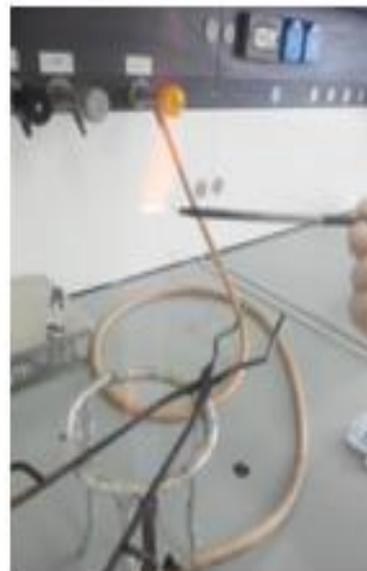
Annexe 5: Etapes de la préparation des milieux de culture.



Annexe 6 : Etapes de la réalisation de l'activité antimicrobienne.

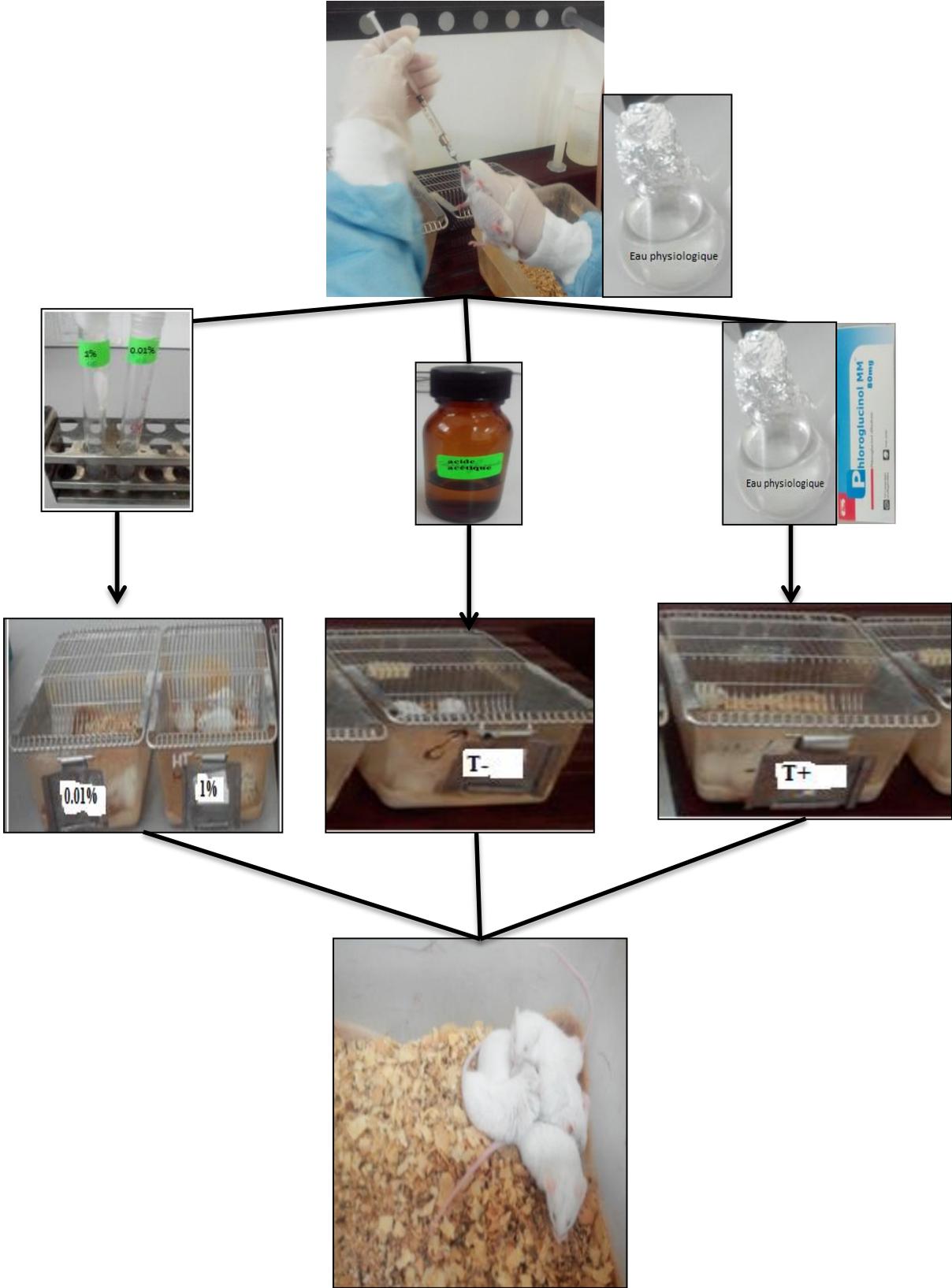


-Préparation de l'inoculum.



-Ensemencement.

Annexe 8: Etapes de la réalisation de l'activité antispasmodique de Romarin.



Annexe 9: Résultats de la méthode d'aromatogramme.



Staphylococcus aureus



Bacillus subtilis



Candida albicans

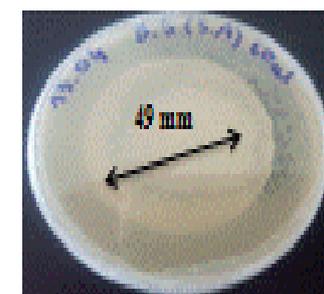
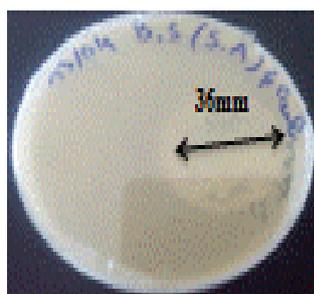
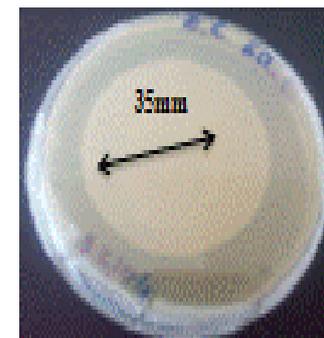
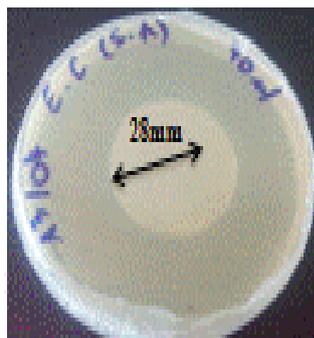
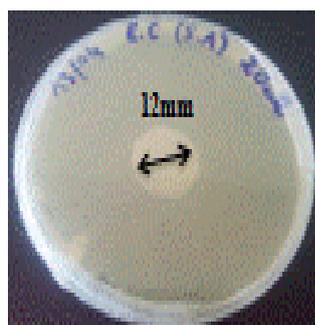
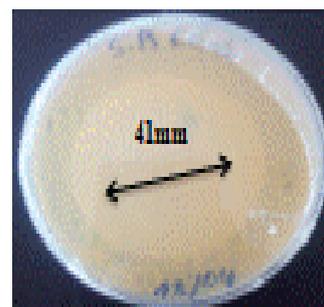
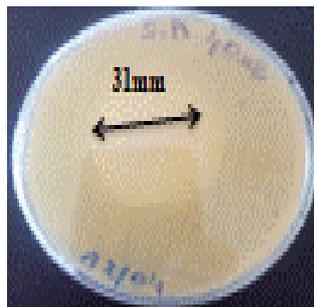
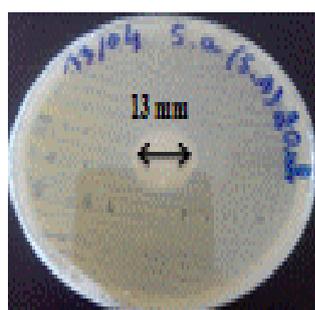
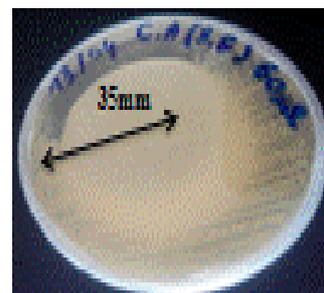
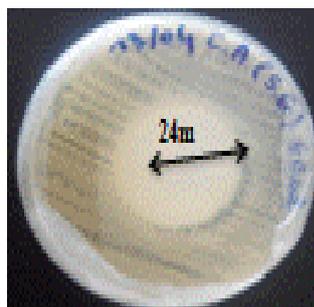


Sarcina lutea



Escherichia coli

Annexe 10: Résultats de la méthode de micro-atmosphère.



**20 µl d'HE/
disque de 2cm de diamètre.**

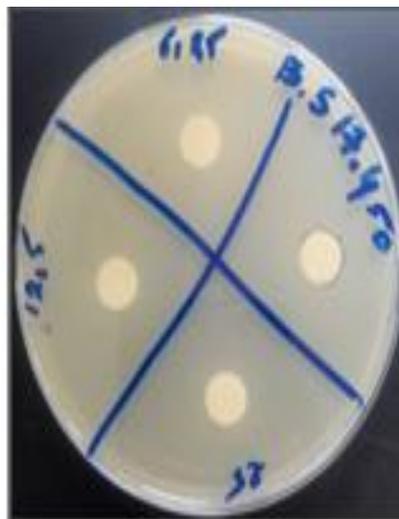
**40 µl d'HE/
disque de 4cm de diamètre.**

**60 µl d'HE/
disque de 6cm de diamètre.**

Annexe 11 : Résultats de la méthode de dilution.



Staphylococcus aureus



Bacillus subtilis



Candida albicans



Sarcina lutea



Escherichia coli

Annexe 12 : Résultats de l'activité anti-inflammatoire

Tableau : Poids des pattes postérieures gauches et droites et leurs pourcentages d'œdème.

	PPD	PPG	% d'œdème
Témoin	0,1533	0,2046	33,4637965
	0,1558	0,2091	34,2105263
	0,1776	0,2291	28,9977477
	0,145	0,2081	43,5172414
Diclofénac	0,1179	0,1278	8,39694656
	0,1521	0,172	13,0834977
	0,1448	0,1648	13,8121547
	0,1396	0,1555	11,3896848
0.01%	0,1439	0,1929	34,0514246
	0,1414	0,1835	29,7736917
	0,1544	0,2026	31,2176166
	0,1432	0,2001	39,7346369
1%	0,1311	0,1697	29,4431732
	0,1778	0,2053	15,4668166
	0,1752	0,2269	29,5091324
	0,1553	0,2192	41,1461687
2.5%	0,143	0,1744	21,958042
	0,1128	0,1475	30,7624113
	0,1355	0,164	21,0332103
	0,1378	0,1746	26,7053701
3.5%	0,1537	0,1769	15,0943396
	0,1336	0,1628	21,8562874
	0,1371	0,1539	12,2538293
	0,1356	0,154	13,5693215

PPG : pattes postérieurs gauches.

PPD : pattes postérieurs droites.

Résultats des statistiques descriptives par STATISTICA 10 :

	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
T	35,04733	6,09767	3,04883
DIC	11,67057	2,40681	1,20341
0,01% HE	33,69434	4,40145	2,20073
1% HE	28,89132	10,50531	5,25266
2,5% HE	25,11476	4,51109	2,25555
3,5% HE	15,69344	4,26936	2,13468

Test de Tukey HSD par STATISTICA 10 :

Tukey HSD test; variable %Oedème (Spreadsheet2) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 35,214, df = 18,000				
Lots	%Oedème	1	2	3
DIC	11,67057			****
0,035	15,69344		****	****
0,025	25,11476	****	****	
0,01	28,89132	****	****	
0,0001	33,69434	****		
T	35,04733	****		