

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

-----  
**Université Blida 1**

**Faculté des Sciences de la nature et de la vie**

**Département de biotechnologie**

-----  
**Mémoire**

**En vue de l'obtention du diplôme Master**

**Option : phytopharmacie appliqué**

**Thème :**

**Extraction et analyse physico-chimique et effet antimicrobien des huiles  
essentielles et de l'extrait méthanolique du Romarin « *Rosmarinus  
officinalis.L* » de deux régions Blida et Djelfa**

Présentée par : **DJAZER HIND**

Devant le jury :

<b>Mr RAMDANE S.</b>	<b>MAA</b>	<b>U.Blida1</b>	<b>Président de jury</b>
<b>MME BENRBIHA F.Z.</b>	<b>Prof</b>	<b>U.Blida1</b>	<b>Promotrice</b>
<b>MME MOUAS Y.</b>	<b>DOCTORANTE</b>	<b>U.Blida1</b>	<b>Co-promotrice</b>
<b>Mr BOUTAHRAOUI S.</b>	<b>MAA</b>	<b>U.Blida1</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mr HADJ SADOK T.</b>	<b>MCB</b>	<b>U.Blida1</b>	<b>Examineur</b>

**2013/2014**

## Résumé

**« Extraction et analyse physico-chimique et effet antimicrobien des huiles essentielles et de l'extrait méthanolique du Romarin « *Rosmarinus officinalis*L » de deux régions Blida et Djelfa »**

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété des huiles essentielles auxquels on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes.

La présente étude réalisée pour évaluer les activités antibactériennes et antifongiques *in vitro* des huiles essentielles et d'extrait méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* de Blida et de Djelfa sur cinq souches bactériennes dont trois Gram+ (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) et deux Gram- (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) et une seule souche fongique (*Candida albicans*).

La méthode de diffusion sur milieu gélosé a été utilisée pour déterminer les diamètres des zones d'inhibitions. Les résultats des tests antibactériens de l'huile essentielle montrent que quatre espèces bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*) sur cinq testées sont sensibles à l'huile essentielle de Blida et Djelfa avec un diamètre d'inhibition de 9,5mm à 23,75mm pour l'huile essentielle de Blida et de 9,5mm à 16,75mm pour l'huile essentielle de Djelfa. La seule souche résistante est *Pseudomonas aeruginosa*.

Pour l'extrait méthanolique trois souches (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*) sur cinq sont sensible avec un diamètre de 14,25mm à 17,25mm pour l'extrait de Blida et de 13,75mm à 14,24mm pour l'extrait de Djelfa. *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont deux souches résistantes.

**Mots clés :** Romarin (*Rosmarinus officinalis*), huiles essentielles, extrait méthanolique, effet antimicrobien.

## Summary

### “Extraction and physico-chemical analysis and antimicrobial effect of essential oils and methanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L of two region Blida and Djelfa “

Natural extracts from plants contain a variety of essential oils which are assigned to an inhibitor of microorganisms.

This study conducted to evaluate the antibacterial and antifungal activity in vitro of essential oils and methanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L from Blida and Djelfa against five bacterial strains including three Gram + (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) and two Gram- (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) and one fungal strain (*Candida albicans*).

The diffusion method was used to determine the diameters of the inhibition zones. The results of antibacterial test of essential oil show that four bacterial species (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, and *Escherichia coli*) were tested on five are sensitive to essential oil with an inhibition diameter of 9,5mm to 23,75mm for the essential oil of Blida and 9.5mm to 16,75mm for the essential oil of Djelfa. The only resistant strain is *Pseudomonas aeruginosa*.

For the methanol extract three strains (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*) on five are sensitive with a diameter of 14,25mm to 17,25mm for Blida extract and 13,75mm to 14,24mm for Djelfa extract. There are two resistant strains *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* .

**Key words** : Rosemary (*Rosmarinus officinalis*), essential oils, methanol extract, antimicrobial effect

## ملخص

الاستخلاص و التحليل الفيزيائي الكيميائي ودراسة التأثير المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية و المستخلص الميثانولي لإكليل الجبل لمنطقتي البليدة و الجلفة

المستخلصات الطبيعية المستخرجة من النباتات تحتوي على مجموعة متنوعة من الزيوت الأساسية و التي تحتوي على أنشطة مثبطة للنباتات

هذه الدراسة أجريت لتقييم الأنشطة المضادة للبكتيريا و الفطريات للزيوت الأساسية و المستخلص الميثانولي لنبته إكليل الجبل لمنطقتي البليدة و الجلفة تجاه سلالة واحدة فطرية (*Candida albicans*) و 5 سلالات بكتيرية ثلاثة منها Gram+ : *Staphylococcus aureus*، *Enterococcus faecalis*، *Bacillus cereus* و اثنين - Gram : *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*.

استخدمت طريقة الانتشار على الجيلوز لتحديد أقطار منطقة التثبيط. نتائج هذه الاختبارات أظهرت أن 4 سلالات بكتيرية: *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، *Enterococcus faecalis* من بين 5 أبدت حساسية تجاه الزيوت الأساسية لكل من البليدة و الجلفة بأقطار تثبيط تتراوح بين 9,5 مم و 23,75 مم لزيت البليدة و 9,5 مم و 16,75 مم لزيت الجلفة. السلالة البكتيرية الوحيدة التي أبدت مقاومة لهذه الزيوت هي *Pseudomonas aeruginosa*.

بالنسبة للمستخلص الميثانولي 3 سلالات بكتيرية *Bacillus cereus*، *Enterococcus faecalis*، *Staphylococcus aureus* من بين 5 مختبرة أبدت حساسية بأقطار تثبيط تتراوح بين 14,25 مم و 17,25 مم لمستخلص البليدة و 13,75 مم و 14,25 مم لمستخلص الجلفة.

*Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa* هما سلالتان مقاومتان للمستخلص الميثانولي.

**كلمات المفتاح :** إكليل الجبل، الزيوت الأساسية، مستخلص ميثانولي، النشاط المضاد للميكروبات.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Demande mondiale pour les parfums et les arômes (millions dollars US) (World Flavors&Fragrances, Freedonia Group, Inc. Cleveland, ohio, 2004).....	6
<b>Tableau 2</b> : Classification de plante étudiée. (Naik, 2006).....	13
<b>Tableau 3</b> : Avantages et inconvénients des différents procédés d'extractions (Richard et Milton, 1992 ; Bruneton, 1999).....	32
<b>Tableau 4</b> : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à cinéol et camphre) de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i> (Ouassila, 2010).....	41
<b>Tableau 5</b> : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à verbénone) de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i> (Ouassila, 2010).....	41
<b>Tableau 6</b> : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à cinéol) de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i> (Ouassila, 2010).....	42
<b>Tableau 7</b> : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle du romarin (Ouassila, 2010).....	42
<b>Tableau 8</b> : Les normes AFNOR d'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	43
<b>Tableau 9</b> : Rendement en huiles essentielles du Romarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ).....	60
<b>Tableau 10</b> : la densité en huiles essentielle de Romarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ).....	61
<b>Tableau 11</b> : caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de Romarin...	62
<b>Tableau 12</b> : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de romarin des deux régions étudiées.....	62
<b>Tableau 13</b> : caractères morphologiques des souches testées.....	64
<b>Tableau 14</b> : Résultats des zones d'inhibition des huiles essentielles de Blida et Djelfa.....	66
<b>Tableau 15</b> : Résultats des zones d'inhibition des extraits méthanoliques.....	72

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Sommité fleurie et fleur isolée de <i>Rosmarinus officinalis</i> ( <b>Boullard, 2001</b> ).....	14
<b>Figure 2</b> : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation ( <b>Lucchesi, 2005</b> ).....	27
<b>Figure 3</b> : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur ( <b>Lucchesi, 2005</b> ).....	28
<b>Figure 4</b> : Schéma du principe de la technique d'hydrodiffusion ( <b>Smadja, 2009</b> ).....	28
<b>Figure 5</b> : Schéma montrant un système d'extraction assistée par micro-ondes ( <b>Smadja, 2009</b> ).....	29
<b>Figure 6</b> : Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO2 supercritique ( <b>Pourmortazavi, 2007</b> ).....	30
<b>Figure 7</b> : Structure de la paroi bactérienne Gram+ (d'après LAVIGNE, 2007).....	36
<b>Figure 8</b> : Structure de la paroi bactérienne Gram- (d'après LAVIGNE, 2007).....	36
<b>Figure 9</b> : Principe de la méthode d'aromatogramme.....	38
<b>Figure 10</b> : Méthode de micro atmosphère ( <b>Pibiri, 2005</b> ).....	39
<b>Figure 11</b> : images de romarin en plein floraison et des feuilles du romarin.....	45
<b>Figure 12</b> : Carte géologique de la wilaya de Blida (ANRH, 2012).....	46
<b>Figure 13</b> : climatogramme d'Emberger de Blida pour la campagne (2012-2013).....	47
<b>Figure 14</b> : carte de Djelfa (source : carte microsoft 2004).....	48
<b>Figure 15</b> : climatogramme d'Emberger de Djelfa pour la campagne (2012-2013).....	49
<b>Figure 16</b> : dispositif de l'entraînement à la vapeur.....	50
<b>Figure 17</b> : Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme.....	55
<b>Figure 18</b> : Rendement en huiles essentielle du Romarin.....	60
<b>Figure 19</b> : l'huile essentielle de romarin.....	61
<b>Figure 20</b> : coloration de Gram, Vue au microscope x100 de <i>S.aureus</i> .....	65
<b>Figure 21</b> : coloration de Gram, vue au microscope x100 d' <i>E.faecalis</i> .....	65
<b>Figure 22</b> : Coloration de Gram, Vue au microscope x100 de <i>P. aeruginosa</i> .....	65
<b>Figure 23</b> : histogramme représente l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Blida et Djelfa.....	67

<b>Figure 24:</b> Evaluation de l'effet antibactérien d'huile essentielle de Romarin sur <i>S aureus</i> .....	67
<b>Figure 25:</b> Evaluation de l'effet antibactérien d'huile essentielle de Romarin sur <i>E.faecalis</i> .....	68
<b>Figure 26:</b> Evaluation de l'activité antibactérienne d'huile essentielle de Romarin sur <i>Escherichia coli</i> .....	68
<b>Figure 27 :</b> histogramme représente l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de Blida et Djelfa.....	73
<b>Figure 28 :</b> Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur <i>Enterococcus faecalis</i> .....	73
<b>Figure 29 :</b> Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	74
<b>Figure 30:</b> Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur <i>Bacillus cereus</i> .....	74
<b>Figure 31 :</b> Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur <i>Escherichia coli</i> .....	75
<b>Figure 32:</b> Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	75
<b>Figure 33 :</b> Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur <i>Candida albicans</i> .....	76

# Introduction

---

## Introduction

Un grand nombre de plantes aromatiques, médicinales des plantes épicées et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source des milliers de composés naturels bioactifs. Ces derniers sont accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante.

Actuellement le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales.

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve *Rosmarinus officinalis*. Cette plante largement utilisée pour traiter la fatigue, la faiblesse et les troubles digestifs et hépatiques, a constitué le sujet de plusieurs études qui ont déterminé leurs compositions chimiques, ainsi que les propriétés biologiques.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont le but principal est d'étudier les activités antimicrobiennes et antifongiques des huiles essentielles et d'extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* de deux régions : Blida et Djelfa.

Le présent travail sera réparti en cinq chapitres, initié par une recherche bibliographique où on apporte dans le premier chapitre un abrégé de l'histoire de l'utilisation des plantes médicinales. Le deuxième chapitre expose la plante médicinale *Rosmarinus officinalis*. Le troisième chapitre élucide la composition, méthodes d'extractions et les activités biologiques des huiles essentielles. La partie pratique est subdivisée en deux chapitres, le premier (quatrième chapitre) : matériels et méthodes qui présentent les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir.



## Introduction

---

- Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation
- Détermination des différents paramètres des huiles essentielles
- Préparation de l'extrait méthanolique
- Présentation des régions d'études : Blida et Djelfa
- Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles et d'extraits méthanoliques

En fin le dernier chapitre : résultat et discussion.

On rapporte aussi une étude comparative sur les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et d'extraits méthanoliques des deux régions d'études.

### 1- Historique :

Des plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales (**Nostro et al., 2000**) et en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, beaucoup cherchent les remèdes normaux sans effets secondaires et bien sûr coût élevé de médecine conventionnelle (**Schnaubelt, 1998**).

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le *métabolisme secondaire*. Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique (8000 ans av.J.C).

Dans les civilisations chinoise, indienne (médecine traditionnelle) ou aztèque, on trouve la trace d'utilisations médicinales très anciennes. Le premier livre de matière médicinale, ("Traité des plantes médicinales de l'empereur Shen Nung"), fut rédigé vers 2900 avant J.-C. 4000 ans avant J.-C, les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour soigner : 600 tablettes d'argiles mentionnent 1000 plantes pour leurs vertus curatives et plus de 800 remèdes sont décrit par les Egyptiens (**Fouché et al., 2000**). Le soin de la peau a commencé 3000 ans avant naissance du Christ, quand les Egyptiens ont enregistré en forme hiéroglyphique le soin de la peau sur des peintures de mur de temple. (**Dweck, 2002**).

A l'apogée de l'empire arabe (dont les frontières allaient de l'Inde à l'Espagne), tous les documents écrits furent réunis à Bagdad dans la plus grande bibliothèque de l'époque (entre le 7<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> siècle). Les Arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie : Abu Bakr al Razi (865-925), fut l'un des grands médecins de son temps et aussi le précurseur de la psychothérapie. Il fut suivi par Ibn Sina (980-1037) qui écrivit le "*Canon de la médecine*". Ce livre servira de base à l'enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier jusqu'aux environs de 1650. Ibn al Baytar (1197-1248) rédigea le très complet Somme de Simples : ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales dont un millier connues des auteurs grecs. (**Fouché et al., 2000**)

### 2- La demande mondiale :

La demande mondiale de parfums et d'arômes a dépassée 18 milliards de dollars US en 2004 alors qu'elle était de 8,3 milliards de dollars US en 1999. Cette forte croissance s'explique par l'augmentation rapide de la production industrielle alimentaire (boissons gazeuses, croustilles, etc.) dans certains pays en voie de développement comme la Chine, le Brésil, l'Inde et le Mexique, selon une analyse récente du marché mondiale réalisée par la Freedonia Group Inc. Le tableau 1 indique la répartition de la demande mondiale en parfums et arômes par grandes régions. Aux Etats-Unis, la demande en huiles essentielles pour les industries de la parfumerie et de l'alimentation croisse à environ 10% par an.

**Tableau 1** : Demande mondiale pour les parfums et les arômes (millions dollars US)

Marchés	1999	2004	Croissance annuelle moyenne (%)
États-Unis	3 865	4 770	4,3
Canada, Mexique	560	790	7,1
Europe occidentale	4 300	5 215	3,9
Japon	1 875	2 100	2,3
Autres Asie/Pacifique	1 680	2 720	10,1
Reste du monde	1 870	2 805	8,4
<b>Total</b>	<b>14 150</b>	<b>18 400</b>	<b>5,4</b>

**Source** : (World Flavors & Fragrances, Freedonia Group, Inc. Cleveland, Ohio, 2004)

Quelques grandes entreprises dominent les échanges commerciaux dans le monde. Elles réalisent entre 60 et 80% des volumes des ventes mondiales, selon les dernières estimations. Les principaux pays consommateurs d'huiles essentielles représentent à eux seuls près de 75% du marché mondial. Ces marchés commerciaux exigent des approvisionnements réguliers, des produits fiables et de haute qualité ainsi que des prix compétitifs.

### 3- Les régions productrices dans le monde :

La production d'huiles essentielles est principalement réalisée dans les pays en voie de développement. En effet, environ 55% de la valeur de la production mondiale en huiles essentielles provient de 25 pays en voie de développement dont les plus importants restent la République Populaire de Chine, le Brésil, l'Indonésie et l'Inde.

- **En Algérie**

L'Algérie a toujours été un pays riche en plante médicinales et aromatiques, ainsi que ces huiles essentielles, c'est un pays présentent une flore spontanée importante.

En effet plusieurs espèces se trouvent répandues sur des certaines d'hectares dans toutes les régions du pays

L'Algérie possède des espèces rustiques dont la production, très recherchée, est largement insuffisante. Le développement d'activités dans ces créneaux permettra non seulement de contribuer à la préservation de la biodiversité mais aussi à l'amélioration du revenu des populations rurales dans les zones marginalisées **(Laoular, 2003)**.

Le nombre de genres et d'espèces présents en Algérie se situe aux environs de 980 genres et 3300 espèces. Sur cet ensemble, la flore saharienne correspond approximativement à 400 genres et 1100 espèces dont plus du tiers se trouve en Algérie méditerranéenne et steppique, bien que l'inventaire de la flore ne soit pas encore exhaustif, et les travaux d'évaluations et de synthèses encore fragmentaires. **(Snoussi, et al., 2003)**

- **Le marché des huiles essentielles :**

Comme la plupart des marchés des productions végétales, le marché des huiles essentielles est soumis à des fluctuations importantes. En effets, de nombreux facteurs peuvent entrer en jeu et même avoir des effets cumulés qui vont se répercuter sur leur prix. Parmi les principaux facteurs qui peuvent influencer les prix nous mentionnons :

- ✓ Les conditions climatiques dans les régions de production qui influencent la quantité produite, et la qualité des récoltes ;
- ✓ Les catastrophes naturelles
- ✓ La variation des stocks d'une année sur l'autre ;

- ✓ Le nombre de producteurs qui fait augmenter l'offre plus rapidement que la demande ;
- ✓ La durée de conservation de certaines huiles ;
- ✓ Les prix d'huiles de substitution ;
- ✓ Les fluctuations du taux de change ;
- ✓ Les variations de la demande dues à des changements dans les préférences des consommateurs ;
- ✓ Le fonctionnement des canaux de distribution qui peut être perturbé par des conflits armés, la paralysie des transports et des ports et la qualité de l'huile essentielle. **(Grysole, 2004)**

#### 4- Utilisation des plantes médicinales et aromatiques

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, depuis XVIII<sup>ème</sup> siècle, des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent. On considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs. La recherche des principes actifs extrait des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels. Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la diagoxine qui soigne le cœur ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes.

Il y a eu donc un réveil vers un intérêt progressif dans l'utilisation des plantes médicinales dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement, parce que les herbes fines guérissent sans effet secondaire défavorable. Ainsi, une recherche de nouvelles drogues est un choix normal **(Scientific Correspondence, 2003)**.

- **Utilisation en médecines en tant que médicament pour l'homme ;**  
exemple :
  - ✓ en urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et désordres nerveux, **(Svoboda et Hampson, 1999)**.
  - ✓ systèmes cardiovasculaires, ex : Flavoce est un médicament constitué par la flavone non substitué en combinaison avec la rutine et isoquercetine est utile dans le traitement de l'athérosclérose **(Narayana et al., 2001)**.

- ✓ drogues immunostimulantes, antispasmodiques et anti-inflammatoires (*Melaleuca alternifolia*, *Echinacea angustifolia*, *Chrysanthemum parthenium*, *Achillea millefolium*,...etc.) (**Svoboda et Hampson, 1999 ; Pedneault et al., 2001; Amjad Hossain, 2005**).
  - ✓ contre le diabète (*Azadirachta indica*) (**Amjad Hossain, 2005**).
  - ✓ les maladies du stress, des activités antioxydantes ; tels le thé noir, le thé vert et le cacao sont riches en composé phénoliques, parmi lesquels theaflavine, le resveratrol, le gallate et epigallocatechine procyanidine, très étudié en raison de leur rôle en tant qu'agent chemopreventifs basés sur leurs capacités antioxydantes (**Lee et al.,2003**).D'excellentes capacités à inhiber les réactions oxydatives ont été mises en évidence pour les huiles essentielles de romarin, sauge, thym, origan, sarriette, clou de girofle, gingembre et curcuma (**Cuvelier et al., 1990, 1992,1996**)
  - ✓ Activité antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire: Les produits naturels des plantes depuis des périodes très anciennes ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques ex: la quinine obtenue à partir du quinquina "*Cinchona*" a été avec succès employée pour traiter le malaria (**Dastidar et al., 2004**), l'arbre de thé (*Melaleuca alternifolia*) est renommé pour ses propriétés : antibactériennes, anti-infectieux, antifongiques, antivirales (**Svoboda et Hampson, 1999**), aussi comme antiviral (*Azadirachta indica*, *Aloe vera*, *Andrographis paniculata*, *Withania somnifera*, *Astragalus membranaceus*, *Curcuma longa*...etc.) (**Amjad Hossain, 2005; Lyons et Nambiar, 2005**) mais aucune plante n'est aussi efficace que les médicaments antirétroviraux pour arrêter la réplication du VIH (**Lyons et Nambiar, 2005**), antibacterienne (*Azadirachta indica* ), antifongiques (*Adenocalyma alleaceum*, *Allium ampeloprasum*, *Allium ramosum*, *Allium sativum*,*Tulbaghia violacea*, *Capsicum annum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens*) (**Wilson et al., 1997**).
- **En Agriculture exemple :**  
l'arbre *Azadirachta indica*, qui se développe dans tout le subcontinent indien, est une des plantes médicinales les plus importantes au Bangladesh, de 12 à 18 mètres de hauteur avec un périmètre atteignant jusqu'à 1,8 à 2,4 mètres.

Les huiles de cet arbre ont des utilisations dans l'agriculture dans le contrôle de divers insectes et nématodes (vers parasites) (**Amjad Hossain, 2005**).

- **En alimentation**

- ✓ assaisonnements, des boissons, des colorants (**Svoboda et Hampson, 1999; Porter, 2001**) et des composés aromatiques (**Smallfield, 2001**). Les épices et les herbes aromatiques utilisées dans l'alimentation sont pour une bonne part responsables des plaisirs de la table (**Delaveau, 1987**), considérées comme condiments et aromates.

La popularité des épices et herbes aromatiques a été et reste très liée à leurs propriétés organoleptiques. La notion de flaveur des épices et aromates recouvre l'ensemble des perceptions olfacto-gustatives. Ces perceptions résultent de stimuligénérés par une multitude de composés organiques dont certains sont volatils et constituent ce qu'on appelle en général l'huile essentielle, les autres non volatils, sont plus particulièrement responsables de la saveur et de la couleur (**Richard et Multon, 1992; Takeoka, 1998; Belitz et Grosch, 1999**).

- ✓ Des suppléments diététiques (**Smallfield, 2001**).

- **En cosmétique**

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

## Chapitre II : Etude de Romarin

---

### 1- Généralités

Le romarin sauvage très répandu sur les côtes de la méditerranée en particulier dans les garrigues arides et rocailleuses, sur terrains calcaires (**Jean-claude Rameau et al., 2008**), en Afrique du nord on le trouve au Maroc, en Algérie et en Tunisie et au Moyen-Orient, en Egypte et Liban, En Italie, en Espagne, en France. C'est une plante rustique, elle peut vivre 30 ans.

Cette plante se retrouve dans la cuisine méditerranéenne, et une variété améliorée se cultive dans les jardins, elle est employée aussi pour améliorer et stimuler la mémoire. Encore aujourd'hui en Grèce, les étudiants en font brûler dans leurs chambres en période d'examens. (**Stefanovits-Banyai et al., 2003**)

### 2- Historique

Dans l'antiquité, le romarin était utilisé pour des rituels religieux et planté sur les tombes afin que les défunts puissent transmettre leur savoir et leurs conseils aux vivants.

Le romarin, symbole d'amour et de fidélité, était intégré dans la couronne des mariées. Dans les hôpitaux français et les salles d'audience, on brûlait du romarin pour purifier l'air. Les Britanniques plaçaient du romarin sous leur coussin pour éviter les cauchemars.

En outre, la variété de ses emplois, en pharmacie comme en cuisine, fit connaître au romarin, durant le moyen âge, un véritable « succès individuel » puisque de courts traités de pharmacologie lui furent consacrés exclusivement. (**Fery-Hue, 2005**)

Aujourd'hui le romarin est un aromate culinaire et fournit une huile essentielle encore recherchée par l'industrie des parfums. (**Guy-Gilly, 2005**)

### 3- Origine du nom :

Romarin (Rosmarinus) dérive du latin « Ros marinus » :

«Ros» : rosée

«Marinus» : marin ou de marin

Dont le nom vient simplement du fait qu'il pousse spontanément au bord de la mer. (**Iserin et al., 2007**)



## Chapitre II : Etude de Romarin

### 4- Classification botanique de la plante

La classification de plante est répartie dans le tableau ci-dessous

	Romarin
Règne	Plantae
Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnolipsida
Ordre	Lamiales
Familles	Lamiaceae
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>R.officinalis L</i>

**Tableau 2:** Classification de plante étudiée. (Naik, 2006)

### 5- Description botanique

Cette plante appartient à la famille des Labiées. Elle se présente sous forme d'arbuste, sous arbrisseau ou herbacée (Bekkara et al., 2007), de 50cm à 1,50m à l'état sauvage voire jusqu'à 2m en culture.

La tige est recouverte d'une écorce grisâtre, écailleuse et fissurée, elle se divise en nombreux rameaux opposés, tortueux. Les rameaux dressés portent en toute saison des feuilles persistantes, opposées, coriaces sessiles et linéaires de 1,5 à 4,5cm de long à bord roulés en dessous, face supérieure vert sombre et luisante, face inférieure blanche (figure 1), tomenteuse, parcourue par une nervure saillante portant des poils articulés et des poils glandulaires fortement serrés.

Les fleurs bilabiées ont une corolle bleu pâle maculée de taches violettes. Elles ne possèdent que deux étamines. Ainsi que le romarin est une espèce de jardin bien connue pour son odeur d'encens, camphrée cultivée pour ces feuilles aromatiques utilisées comme condiment ou aromate et pour son huile volatile, présente dans les poils glanduleux. (Sell et al., 2002).

Il peut y avoir des fleurs toute l'année, mais la période de floraison maximale s'étale sur une longue période allant de Janvier à mai. Elle est toutefois très

## Chapitre II : Etude de Romarin

dépendante des conditions climatiques au cours de l'hiver, elle atteint généralement un pic d'abondance au début du printemps (mars-avril). **(Silberfeld, 2012)**

Cette espèce très polymorphe, présente plusieurs variétés. Mais, à cette différenciation morphologique très aléatoire, nombreux botanistes préfèrent s'appuyer sur la composition chimique de l'huile essentielle pour lister quatre chémotypes, suivant le composé dominant :

- ✓ romarin à cinéole,
- ✓ romarin à verbénone,
- ✓ romarin à camphre, bornéol,
- ✓ et parfois, romarin a myrcène.



**Figure 1** : Sommité fleurie et fleur isolée de *Rosmarinus officinalis* **(Boullard, 2001)**.

### 6- Répartition géographiques :

Le romarin est originaire de bassin méditerranéen, peu exigeant se cultive dans les terrains arides et ensoleillés, comme les garrigues, les maquis et rocailles, mais le jeune plant peut craindre les gelées. Sur les rivages marins, on le rencontre jusqu'à 1500 m d'altitude. Si l'espèce se rencontre souvent en terre calcaire, on peut aussi le rencontrer sur sol acide quand la pinède est peu favorable à d'autres espèces **(Guy-Gilly, 2005)**. Les sols argilo-calcaires à pH 7-8 sont les plus favorables **(Péron, 2006)**.

## Chapitre II : Etude de Romarin

---

### 7- Production mondial

Le romarin est cultivé à large échelle en Espagne, en Tunisie, au Maroc, en Italie, en France, en Algérie et au Portugal, principalement pour en extraire de l'huile essentielle (**Panda, 2009**). La production mondiale d'huile essentielle de romarin atteint 200 à 300 tonnes en 2005. (**Azhar Ali Farooqui et al., 2005**)

En Inde, la CIMAP (Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants) a introduit la production de romarin à la fin des années 80, qui s'est développée au cours des années 90 (**Panda, 2009**). Cette production est concentrée dans le sud, dans les Nilgiri et autour de Bangalore. (**Azhar Ali Farooqui et al., 2005**)

### 8- Exigences écologiques et pédagogiques de la plante :

Le romarin est une plante thermophile, mais le jeune plant peut craindre les gelées. Sur les rivages marins, on le rencontre jusqu'à 1500m d'altitude. Si l'espèce se rencontre souvent en terre calcaire, on peut aussi le rencontrer sur sol acide quand la pinède est peu favorable à d'autres espèces (**Guy-Gilly, 2005**). Les sols argilo-calcaires à pH 7-8 sont les plus favorables. (**Péron, 2006**)

### 9- Multiplication de romarin :

Le romarin se multiplie par graine, bouture et éclat de touffe.

- **Par graine :**

Selon Munoz les graines auraient une dormance difficile à lever ; aussi seulement 40% de graines germent-elles à 20°C durant 20 jours à l'obscurité ; on préfère le semis en pépinière. Le semis est fait au plus tard début mars, en plein champ ou bien en sac-pépinière (il faut attendre 2 ans pour repiquer au champ) ou bien en hors sol avec des repiquages successifs. (**Guy-Gilly, 2005**)

- **Par bouture :**

Cette multiplication est délicate. Selon le lieu géographique et l'altitude, la date de prélèvement des boutures. Le type de bouture peut varier, Munoz conseille la partie médiane d'une tige qui va fleurir. L'enracinement prend deux mois et se fait en pépinière plein air-pleine terre ou bien en mini motte ou bien en hors sol (**Guy-Gilly, 2005**)

## Chapitre II : Etude de Romarin

- **Par éclat de touffe :**

La division de touffe est possible ; on rabat presque à ras de terre 6 mois avant l'arrachage des plants. Puis on pratique soit une mise en place directe soit un enracinement en pépinière. **(Guy-Gilly, 2005)**

### 10- Culture de romarin

- **Préparation du sol :**

La préparation du sol peut être sommaire ; on ne travaille que la raie de plantation, inter ligne de 0,8 à 1,6m avec enfouissement de fumer et fumure minérale. La raie est bien ameublie et profonde de 20cm. **(Guy-Gilly, 2005)**

Bien que s'accommodant des terres arides, en culture le romarin exige une bonne fumure organique apportée à la fin de l'hiver (30-40t d'équivalent fumier de bovins) et une fumure minérale proche de la formule suivante : **(Péron, 2006)**

N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O
100kg/ha	80 à 100 kg/ha	100 à 150 kg/ha

- **Installation de la culture :**

Le romarin peut rester en place 5 à 10 ans. La mise en place de la culture intervient soit au printemps, soit à l'automne après prélèvement de boutures semi-ligneuses de 10 à 15cm sur les plantes en place suivi d'un élevage en élevage en pépinière de 6 mois environ.

Dates de prélèvement	Mars/avril	Septembre/octobre
Dates de plantation	Automne	Printemps

La plantation peut être également effectuée deux mois après la mise en pépinière (50 à 60% de réussite)

La distance entre les rangs dépend du matériel de binage et de récolte. En culture intensive, la distance entre les rangs est de 1 à 1,5m pour une densité de 15000plantes/ha. **(Péron, 2006)**

## Chapitre II : Etude de Romarin

---

- **Soins et entretien**

Si avant plantation le sol est trop propre, on ne fait de binage que les premières années au stade de jeune plant ; le romarin élimine les mauvaises herbes, on dit que les vapeurs de l'huile essentielle tombent sur le sol et éliminent les plantules. C'est au niveau de la pépinière qu'il faut intervenir avec du Liuron ou du Terbacyle (**Guy-Gilly, 2005**)

- **Fumure de couverture et irrigation**

La fumure de couverture est appliquée à la fin de chaque hiver sous forme d'engrais organique (60kg/ha de  $P_2O_5$ , 100kg/ha de  $K_2O$ ). Quand à l'irrigation elle ne s'avère pas nécessaire. (**Péron, 2006**)

- **Désherbage chimique**

Aucune spécialité commerciale n'est autorisée sur le romarin, Cependant, le terbacile, appliqué à la dose de 0,8kg/ha, a montré son efficacité (traitement à réaliser 3 semaines après la plantation des boutures racinées puis renouvellement de traitement tous les ans en février-mars). (**Péron, 2006**)

- **Récolte et opération de post-récolte**

Pour la production destinée à l'herboristerie ou à l'industrie alimentaire, la récolte intervient au printemps (avril-mai) avant la floraison, plus exceptionnellement à l'automne en raison de la sécheresse de l'été. Pour la production des pousses fraîches, la récolte peut se réaliser toute l'année, en onction des impératifs commerciaux. (**Péron, 2006**)

### 11- Composition chimique : (Bruneton, 1999)

Les composés rencontrés dans le *Rosmarinus officinalis* peuvent se classer comme suit :

- ✓ Huile essentielle : 1,8-cinéole, camphre,  $\alpha$ -pinène, autres monoterpènes (bornéol, limonène, camphène,  $\alpha$ -terpinéol).
- ✓ Diterpènes phénoliques tricycliques : acide carnosolique, carnosol, rosmanol, épimosmanol, isorosmanol, rosmaridiphénol, rosmari-quinone, rosmadial...
- ✓ Acides phénols : acides caféique, chlorogénique, rosmarinique
- ✓ Flavones méthylées : genkwanine, lutéoline, diosmétine

## Chapitre II : Etude de Romarin

---

- ✓ Triterpènes et stéroïdes : acide oléanolique, dérivés d'acide ursolique,  $\alpha$ - et  $\beta$ -amyrines
- ✓ Autres constituants : polysaccharides acides, traces de salicylates

### 12- Utilisation de romarin

#### • Gastronomie

Le romarin à une saveur piquante et parfumée assez prononcée, l'utiliser à petites doses afin de ne pas masquer la saveur des aliments.

Les branches feuillues s'utilisent de préférence fraîches, mais peuvent également se conserver séchées. Les fleurs ont une saveur plus douce et se consomment crues, saupoudrées pour parfumer un plat ou un dessert.

Il est très estimé dans le sud de la France et en Italie ou on l'incorpore a une grande quantité de mets, telles les soupes, les farces, les sauces, les marinades. Il aromatise également les pâtes alimentaires, les ragouts, poissons,...etc (**Scimeca et Tetau, 2005**)

Il est signé aussi que le romarin était également efficace pour retarder l'oxydation des lipides pendant le stockage des viandes. (**Ricke, 2012**)

Plus audacieux, le romarin est parfois utilisé en infusion pour parfumer des desserts comme les flans, les crèmes ou certaines confitures.

#### • Parfumerie

Le romarin est utilisé aussi en parfumerie. Le premier parfum alcoolique dont ont connaisse l'existence est l'eau de Hongrie, alcoolat fréquemment utilisé au XVII<sup>e</sup> siècle et qui pourrait dater du XIV<sup>e</sup>siècle, dont la romarin était l'un des principaux composants. (**Polese, 2006**)

Il entre dans la composition de parfums surtout masculins, dans la composition d'onguents, de savons et de champoings. Leur huile essentielle utilisée pour éloigner les moustiques frottée sur les champs.

#### • Médecine et phytothérapie

Le romarin à aussi des propriétés sur les fonctions digestives, il les facilite, en particulier l'activité de la vésicule biliaire. C'est aussi un antispasmodique et il a des propriétés stimulant le système nerveux. Autrefois, il était utilisé en compresse contre les rhumatismes. Il est aussi un excellent désinfectant, stimulant, antidépresseur, soulage l'arthrose, aide à la digestion des graisses, antipelliculaire, eau de cologne. Il

## Chapitre II : Etude de Romarin

---

est utilisé aussi comme antiseptique, antifongique, stomatique, antibactérien, antitumorigénique (de nombreuses études indiquent que le romarin permettrait de prévenir et de limiter la progression de certains types de cancers), tonique, contre les problèmes circulatoires (en frictions), cicatrisant (sommités fleuries) **(Ouassila, 2010)**.

L'utilisation d'huile de romarin dans un bain stimule la circulation dermique et améliore l'hémodynamique pour les problèmes d'occasion artérielle.

### 1- Définition :

Le terme huiles essentielles (HES) dérive de « quintaessentia », un nom donné par le médecin suisse Paracelsus aux extraits de plantes obtenues par distillation, il signifie la fragrance et la quintessence de la plante. **(Hart K.J et al., 2008)**

Plusieurs définitions disponibles d'une huile essentielle convergent sur le fait que les huiles essentielles, communément appelées « essence ». Ce sont des extraits volatiles et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau pressage **(Iserin et al., 2007)** ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes.

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les HES ne contiennent pas de corps gras (lipides), et ne sont pas « essentiel » dans le sens qu'elles sont nécessaires à la croissance ou au métabolisme.

Le terme « huile » provient du fait que les substances volatils sont visqueuses et hydrophobes et qu'elles ont la propriété de se solubiliser dans l'alcool et l'huile gras mais pas dans l'eau, la dénomination « essentielles » reflète le caractère principale des plantes à dégager des odeurs agréables. **(El Abed et al., 2003)**

Plus récemment, la norme **AFNOR NF T 75-006 5 Février 1998** a donné la définition suivante d'une huile essentielle, « produit obtenu à partir d'une matière première végétale soit par entrainement à la vapeur soit par procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention. Elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. **(Bruneton, 2008)**

### 2- Localisation et répartition :

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Il y aurait, selon Lawrence 17500 espèces aromatiques. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont repartis dans un nombre limité de familles : *Myrtacées, lauracées, rutacées, lamiacées, astéracées, opiacée, cupressacées, zingibéracées, pipéracées....etc.*

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux :

- ✓ Feuilles d'Eucalyptus du laurier



- ✓ Fleurs des rosiers
- ✓ Ecorces du cannellier
- ✓ Bois du camphrier ou santal
- ✓ Racines du Vétiver
- ✓ Rhizomes du Gingembre ou de guinguina
- ✓ Fruits de l'Anis, Fenouil ou de l'orange
- ✓ Sommités fleuries du basilic, de la lavande et de la menthe.

Dans le cas le plus simple, les huiles essentielles se forment dans le cytosol des cellules où, soit elles se rassemblent en gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles, soit elles s'accumulent dans les vacuoles des cellules épidermiques ou des cellules du mésophile de nombreux pétales (**Gerhard; 1993**). D'autres structures histologiques spécialisées souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante sont impliquées dans l'accumulation des huiles volatiles. Ces structures regroupent les poils et canaux secteurs et les poches sécrétrices (**Bruneton ,1999** ).

### 3- Rôle des huiles essentielles

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu (**Rai et al., 2003**)

Plusieurs effets ont été décrits :

- ✓ Attraction des insectes pour favoriser la pollinisation
- ✓ Protection de la plante contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides
- ✓ Source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, conservent l'humidité dans les climats désertiques.

### 4- Caractéristiques physico-chimique des huiles essentielles :

#### 4-1- Propriétés physiques

Les huiles essentielles forment un groupe homogène, possèdent des propriétés physiques proches les unes des autres :

- ✓ A température ambiante, elles sont liquides, mais à plus faible température, bon nombre d'entre elles cristalliseront.

✓ Elles sont très volatiles contrairement aux huiles végétales grasses, ce qui explique leur caractère odorant et leur entrainement à la vapeur d'eau lors de distillation.

✓ Leurs densités sont en générale inférieure à celle de l'eau (densité  $<1$ , varie de 0.7 à 0.99).

✓ Elles sont solubles dans la plupart des solvants organiques (l'alcool, l'éther, le chloroforme, ...etc) et ne se mélangent pas à l'eau.

✓ Elles sont incolores à jaune pâle, mais il existe toutefois des exceptions.

✓ Le pouvoir rotatoire marquant leur activité sur la lumière polarisée est une constante physique qui définit chaque huile essentielle.

✓ Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévie la lumière polarisée.

✓ Leur point d'ébullition varie de 160° à 240°c.

✓ Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels.

### 4-2- Propriétés chimiques

Exposé à la lumière et à l'oxygène les huiles essentielles s'oxydent, se résinifient leur odeur change, leur point d'ébullition augmente et leur solubilité diminue. Elles se combinent avec l'eau pour former des hydrates, avec la potasse elles donnent des composées d'addition. **(Beguin, 1977 ; anonyme 3 ,2003)**

### 5- Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles représentent un mélange complexe de molécules chimiques qui peuvent comporter plus de soixante composants différents, parmi lesquels deux ou trois sont des composants majeurs constituant de 20 à 70% du mélange comparativement aux autres qui se trouvent le plus souvent sous forme de traces. **(Bakkali F et al., 2008.)**

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane. **(Gildo, 2006)**

### 5-1-Les terpénoïdes

Dans le cas des huiles essentielles, seuls les terpènes les plus volatiles, c'est à-dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas élevée sont observés. Ils répondent dans la plupart de cas à la formule générale  $(C_5H_8)_n$

Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones ( $C_5H_8$ ), communément appelée isoprène.

Selon le nombre répétitif de cette unité, les terpénoïdes sont classés en :

#### 5-1-1- Les monoterpènes

Ils sont des composés volatils entraînables à la vapeur d'eau, d'odeur agréable, constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (citrus, térébinthines) **(Bruneton, 2008)**. Ils peuvent être acycliques, monocyclique ou bicyclique, composés essentiellement de  $\alpha$ -pinène, (3- pinène,  $\delta$ -terpinène,  $\beta$ -caryophyllène, camphène,  $\alpha$ -phéllandène,  $\beta$ -phéllandène, limonène et myrcène.

#### 5-1-2- Les sesquiterpènes

Sont des composés caractéristiques des arômes produits par les plantes et donnent à celles-ci leur goût amer. Ce sont de structure très divers, les carbures, les alcools et les cétones sont les plus fréquents. **(Bruneton, 2008)**

### 5-2- les composés aromatiques

Ils sont moins fréquents par rapport aux terpénoïdes, très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol.

Ces composés sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle. **(Kunle et okogum, 2003)**

### 5-3- Les composés d'origine diverses

Les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire entraînable lors de l'hydro distillation : alcools, aldéhydes, cétones, phénols, esters, acides, des composés soufrés ou azotés. **(Inouye et abe, 2003)**

- **Les alcools** : ce sont des produits de la série terpénique. Ils peuvent être acycliques (géraniol et linalool), monocycliques ou bicycliques.

- **Les aldéhydes** : les aldéhydes contenus dans des huiles essentielles qui dégagent en général un arôme puissant. Les aldéhydes sont le plus souvent

acycliques, tels que le géraniol, le néral et le citronellal.

- **Les cétones** : les quantités des cétones dans les huiles essentielles sont négligeables, tels que : le Carvone, le Tagénone, le Camphre et le Fenchone.

- **Les acides et les esters** : ce sont des composés existants chez le végétal, ils sont très répandus dans les huiles essentielles et jouent un rôle important dans les essences. Ce sont des dérivés oxygénés des terpènes qui ont la particularité de présenter un arôme fruitier.

- **Autres** : éthers, composés soufrés, composés azotés, sesquiterpène,...

**(Inouye et al, 2003).**

### 5-4- Les chémotypes

Le chémotype d'une huile essentielle est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'huile essentielle. C'est l'élément qui permet de distinguer des huiles essentielles extraites d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les huiles essentielles pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Ce polymorphisme chimique existe chez certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*. Il est important de noter que les huiles essentielles à chémotypes différents présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables. **(Pibiri, 2005)**

### 6- Les facteurs influant sur la variabilité des huiles essentielles :

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par plusieurs facteurs :

#### 6-1- Facteurs intrinsèques :

Sont liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, à l'interaction avec l'environnement (type de sol ou climat,...) et au degré de maturité du végétal concerné, voir au moment de la récolte au cours de la journée.

Les cellules productrices d'huile peuvent se situer dans différents organes, il est donc possible d'obtenir différentes huiles selon les parties sélectionnées d'une même plante. Ainsi les huiles essentielles extraites à partir des baies et des feuilles de piment ne sont pas identiques.

En 1987, les travaux de Maffei et Sacco ont montré des différences de composition des huiles essentielles en raison d'organes différents (feuilles et fleurs) et de sous-espèces différentes (peppermint nothomorphs *pallescens* Camus et *rubescens* Camus). Avec *Cinnamomum zeylanicum* ou Cannelier de Ceylan, il est possible de produire 3 huiles essentielles : à partir de ses feuilles, une huile essentielle riche en Eugénol ; à partir de son écorce, une huile essentielle riche en Cinnamaldéhyde ; et à partir de ses racines une huile riche en Bornéone **(Besombes, 2008)**.

Nykänen et Nykänen et al, en 1987, ont comparé les huiles essentielles d'*Origanum marjorana* d'Égypte, obtenues à partir de plantes fraîches ou de plantes sèches. Une fois encore les compositions sont différentes. En 1991, Cioni et al ont effectué la même comparaison à partir du Romarin frais et sec **(Besombes, 2008)**.

### 6-2- Facteurs extrinsèques :

Il s'agit de l'incidence des facteurs de l'environnement et des pratiques culturales, la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents exercent une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles. **(Bruneton, 1999 et Guinard, 2000)**

### 6-3- Facteurs technologiques :

Une huile essentielle peut subir de profondes modifications lors de son exploitation. La composition du produit obtenue par hydrodistillation est plus souvent différente de celle de mélange de constituant initialement présent dans les organes sécréteurs. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters. **(Bruneton, 1999)**

Le temps de distillation reste cependant le facteur déterminant dans la mesure où la cinétique d'extraction de chacun des composants varie selon sa structure et ses propriétés physico chimiques. **(Nazli, 2003)**

## 7- Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (par

exemple, les flavonoïdes, les huiles essentielles, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées.

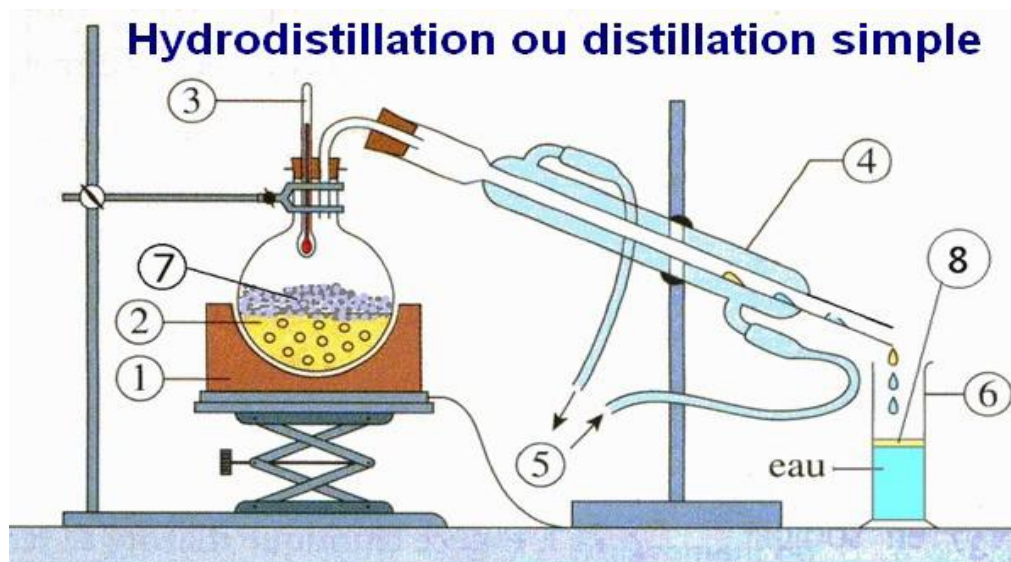
Parmi les différents procédés d'extractions, nous citerons principalement :

### 7-1-La distillation

Selon Piochon (2008), il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

#### 7-1-1- Hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et, de ce fait la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau. On porte à ébullition ce mélange d'eau et de matière végétale, les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolysât par simple différence de densité dans un vase florentin. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysât (figure 2).



**Figure 2:** Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005).

1- Chauffe ballon

2- Ballon

3- Thermomètre

4- Réfrigérant

5 - Entrée et sortie d'eau

6 - Erlenmeyer

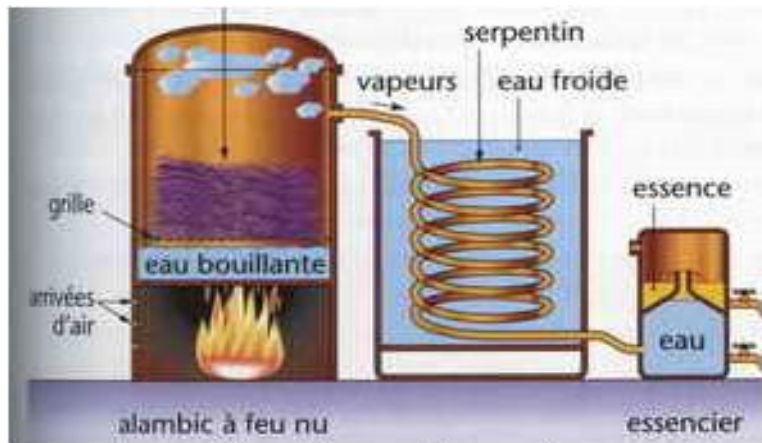
7 - Matière à extraire l'essence

8 - La couche d'H.E

#### 7-1-2-Extraction par entrainement à la vapeur :

C'est l'un des procédés d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques les plus anciens, basé sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau.

La masse végétale n'est pas en contact avec l'eau mais placée sur une grille vers laquelle la vapeur sèche est pulsée. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques (figure 3).

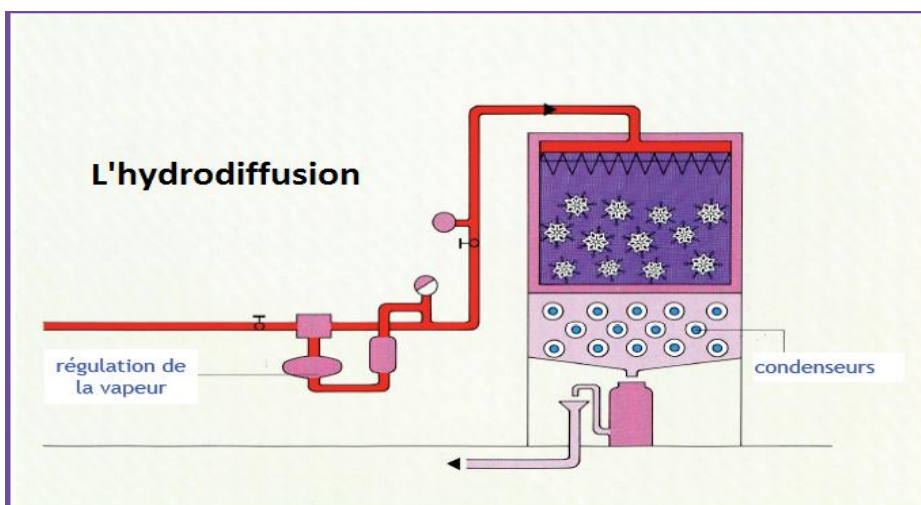


Alambic pour Lavande.

**Figure 3:** Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur (Lucchesi, 2005).

### 7-1-3- Hydrodiffusion

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression du haut vers le bas à travers la matière végétale (figure 4). L'avantage de cette méthode est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie de temps, de vapeur et d'énergie (Bassereau, 2007)



**Figure 4 :** Schéma du principe de la technique d'hydrodiffusion (Smadja, 2009).

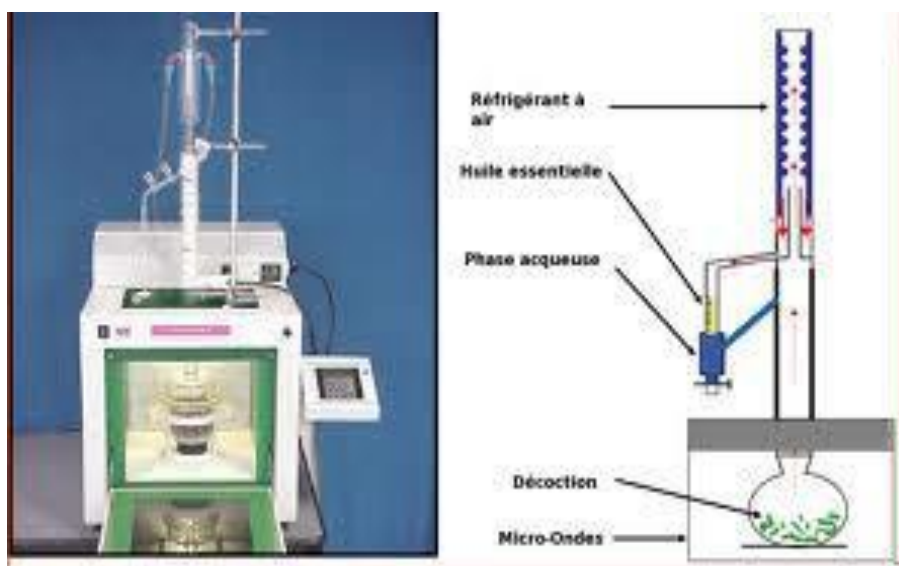


### 7-2- L'expression à froid :

Souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes comme le citron, l'orange, la mandarine, bergamote, limette, pamplemousse, ..... etc. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences contenues dans le zeste frais du fruit à l'aide d'un genre de cuillère en bois. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau (**Chaintreau et al., 2003**)

### 7-3- Extraction assistée par micro-ondes

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques condensation, refroidissement, et décantation (figure 5). Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé (**Hemwimon et al., 2007**).



**Figure 5 :** Schéma montrant un système d'extraction assistée par micro-ondes (**Smadja, 2009**).



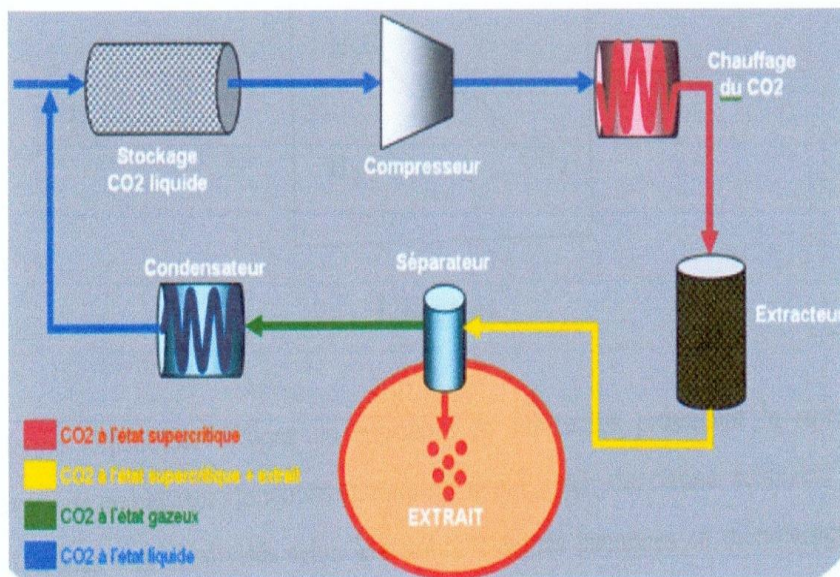
### 7-4- Extraction par CO<sub>2</sub> super critique :

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO<sub>2</sub> supercritique. A l'état supercritique, le CO<sub>2</sub> possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression.

La technique se base sur la solubilité des constituants dans le CO<sub>2</sub> et de son état physique. Grâce à cette propriété, il permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux.

Le CO<sub>2</sub> est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, ensuite il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, après le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant (figure 6).

Cette technique présente énormément d'avantages. Tout d'abord, le CO<sub>2</sub> supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, inflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puisqu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation (**Pellerin, 1991**).



**Figure 6** : Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO<sub>2</sub> supercritique (**Pourmortazavi, 2007**).

### 7-5- Extraction par les solvants et les graisses

Il s'agit d'extrait de plantes obtenu au moyen de solvants non aqueux (hexane, éther de pétrole etc.), mais aussi de graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par les corps gras). Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également un bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras. Un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé « absolu », et sa composition se rapproche de celle d'une H.E.

L'extraction à l'aide de solvants organiques pose de problème de toxicité et de solvants résiduels (**Hernandez-Ochoa, 2005**).

### 7-6- Extraction par un solvant organique volatil

Certaines huiles essentielles ont une densité voisine de l'eau et le procédé par distillation à la vapeur d'eau ne peut être utilisé. C'est pourquoi on utilise les solvants (**Salle, 1991**).

Cette technique est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi continu ou en discontinu. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont surtout des hydrocarbures aliphatiques (hexane, éther de pétrole), des hydrocarbures aromatiques (toluène), des alcools ou des solvants carbonylés, et moins fréquemment des hydrocarbures halogénés (dichlorométhane) (**Endrias, 2006**).

L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants. Un autre désavantage de cette extraction par les solvants est leur manque de sélectivité de ce fait de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, cires, etc) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure. (**Shellie et al., 2004**)

Les principaux avantages et inconvénients des différents procédés d'extraction sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 3** : Avantages et inconvénients des différents procédés d'extractions.

Procédés d'obtention	Avantages	Inconvénients
<b>Hydrodistillation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rendement élevé en huiles essentielles.</li> <li>- Essences de bonnes qualités, très concentrés.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altération de certaines substances odorantes à la température d'ébullition de l'eau.</li> <li>- Perte d'une partie d'essences par évaporation, oxydation dissolution et cyclisation.</li> </ul>
<b>Entrainement à la vapeur d'eau</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réduire l'altération des constituants d'huiles essentielles.</li> <li>- Economie d'énergie et de temps d'extraction.</li> <li>- Efficacité d'extraction</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agglutination de la charge végétale sous l'effet de la vapeur d'eau.</li> <li>- Réaction secondaire hydrolyse.</li> </ul>
<b>Micro-ondes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rapidité</li> <li>- Réduction considérable du temps d'extraction.</li> <li>- Amélioration du rendement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Détérioration des constituants odorants par les micro-ondes qui possèdent une grande énergie de pénétration.</li> </ul>
<b>Solvants organiques volatils</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Universalité.</li> <li>- Procédés doux, non violent principes actifs olfactivement proche du végétale lui-même.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Danger sur l'homme et l'environnement en cas de manque de prévention.</li> <li>- Impossible de contrôler les paramètres de pression et de température.</li> </ul>
<b>Extraction par CO<sub>2</sub></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Capacité à fournir des extraits de composition très proche de celle des produits naturels.</li> <li>- Absence d'hydrolyse et de réarrangement.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La lourdeur de l'investissement</li> </ul>

(Source : Richard et Multon, 1992 ; Bruneton, 1999).

### 8- Toxicité des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisées sans risque. Elles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles sont des molécules actives et peuvent avoir des graves effets secondaires lors d'une utilisation aléatoire autonome.

La toxicité des huiles essentielles varie selon leur composition, qui varie selon la plante source qui peut varier selon le terrain ou elle est cultivée.

Elle varie aussi selon sa voie d'administration (orale, cutanée ou aérienne), par l'état de l'individu qui y est exposé-là. **(Bardeau, 2009)**

Il est important de connaître que les huiles essentielles ont :

✓ des pouvoir irritant (les huiles a aldéhydes : citral, citronellal, cuminal,...etc) quelques soit leur voie d'administration.

✓ Des effet neurotoxiques (les huiles a cétones :thuyone, menthone, verbinone,...etc) et ne doivent être administrées ni aux femmes enceintes, ni aux sujet épileptiques.

✓ Une action caustique sur la peau(les huiles a phénols : thymol, eugenol, carvacrol,...etc).

✓ Des propriétés néphrotoxiques (les huiles a terpènes : pinène, carène, etc).

### 9- Usage des huiles essentielles :

#### • Utilisation pour leurs propriétés odorantes :

Les huiles essentielles sont employées dans le secteur de la cosmétique, notamment pour la fabrication des parfums ; dans les compositions parfumantes des détergents et des produits de parfumerie fonctionnelle ; mais aussi dans le domaine alimentaire. L'utilisation des huiles essentielles pour l'élaboration des parfums est évidente. Dans le secteur de la parfumerie fonctionnelle, les huiles essentielles sont sélectionnées pour renforcer l'impression de propreté; de même, dans le domaine alimentaire, les huiles essentielles ont pour objectif de développer les arômes, le plus souvent dans des plats préparés **(Besombes, 2008)**.

#### • Utilisation pour leurs propriétés médicinales :

L'utilisation historique des plantes en raison de leurs propriétés thérapeutiques, a avec les avancées techniques et scientifiques, mené à l'isolation de principes actifs. Il faut alors distinguer phytothérapie et aromathérapie :

La phytothérapie est la médecine par les plantes, utilisés en partie ou en totalité, sous différentes formes (teintures mères, extraits fluides ou secs, poudres, infusions, décoctions...)

L'aromathérapie n'utilise que les principes actifs d'une partie de la plante, où ils sont extrêmement concentrés (**Besombes, 2008**).

### 10- Activité antimicrobienne

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduits à chercher de nouveau agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien accepté par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sue la santé humaine) (**García-Ruiz et al., 2008 ; Kempf et Zeitouni, 2009**).

Beaucoup de groupes de chercheurs ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales, ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (**Jürgen et al., 2009**)

#### 10-1- Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques

Face au problème soulevé depuis plusieurs années par la résistance des bactéries aux antibiotiques, la seule alternative fiable à l'usage des antibiotiques semble être celle des H.E. Connue de façon empirique depuis des siècles, leur efficacité anti-infectieuse a été scientifiquement démontrée "*in vitro*" et "*in vivo*" (**Carel, 2006**).

Selon Inoye et Abe (2007), l'efficacité des antibiotiques dépend de la dose et du temps de contact. Des expérimentations sur des animaux de laboratoire a permet de savoir que l'efficacité des antibiotiques reste toujours limitée. Les H.E., contrairement aux antibiotiques, sont constituées de si nombreuses molécules que les bactéries ne peuvent y résister en mutant (**Enrico et al., 2004**).

### 10-2- L'action antimicrobienne :

Le mécanisme d'action de ces huiles est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries à Gram+ et Gram-.

Les travaux de Burt (2004) ont montré qu'une huile essentielle active exercera son pouvoir antimicrobien par son interférence avec la bicouche lipidique de la cellule cible grâce à sa propriété hydrophobe, ce qui entraîne une perturbation de la perméabilité et perte des constituants de la cellule. En plus, cette réaction varie en fonction de la nature de la bicouche lipidique, ce qui explique la résistance des bactéries Gram négatif (**Mahmoud et al., 2004**). En outre, Dabbah et ses collaborateurs (1970) ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram positif par rapport aux Gram négatif et aux champignons. Dans la même démarche d'étude, Gordon et ses collaborateurs (1973) et Mahmoud et ses collaborateurs (2004) ont suggéré que l'effet antimicrobien qu'exercent les huiles essentielles pourrait être expliqué par la destruction de certains systèmes enzymatiques incluant ceux qui participent dans la production d'énergie cellulaire et la production des composés structuraux. Mahmoud et ses collaborateurs (2004), Guesmi et Boudabous (2006) quant à eux, ont avancé l'hypothèse d'inactivation et destruction du matériel génétique et, enfin Caillet et ses collaborateurs (2007) ont signalé que les huiles essentielles empêchent la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines.

Dans une autre étude qui a été réalisée par Freeman et Carel (2006), l'huile essentielle d'arbre à thé (*tea tree*) a provoqué des fuites d'ions potassium (K<sup>+</sup>) au niveau des membranes cellulaires d'*E.coli* et *S. aureus*. Cette fuite de K<sup>+</sup> est la toute première preuve de l'existence de lésions irréversibles au niveau de la membrane de la bactérie. Le thymol, le carvacrol, des composants actifs d'huile essentielle, rendent perméable la membrane des bactéries, un effet précurseur de leur mort. Les huiles essentielles ont donc bien des propriétés bactéricides.

D'après Caillet et ses collaborateurs (2007), l'action antimicrobienne des huiles essentielles se déroule en trois phases:

- ✓ Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaire;
- ✓ acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure;
- ✓ destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.



### • Résistance des bactéries Gram- à certaines huiles essentielles

Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polysidiques (acides lipoteichoïques, acides teichoïques...). Par contre chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines...) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds...) (**Berche, 2003**).

La résistance des bactéries à Gram- aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules de franchir la membrane externe (**Berche, 2003**).

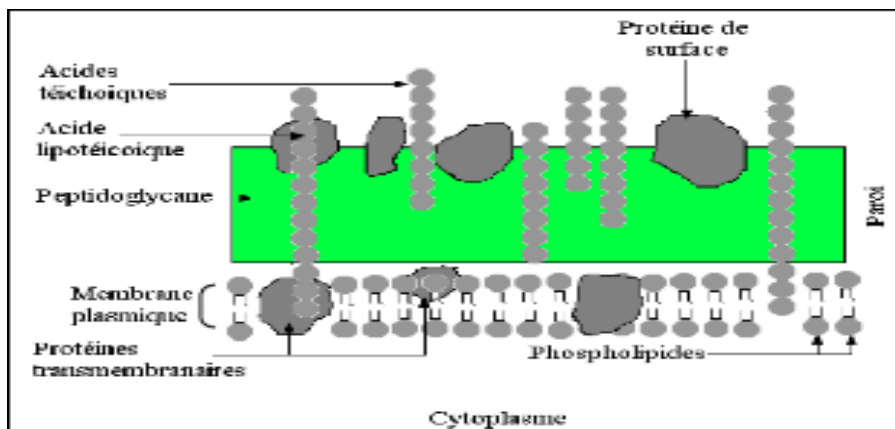


Figure 7: Structure de la paroi bactérienne Gram+ (d'après LAVIGNE, 2007).

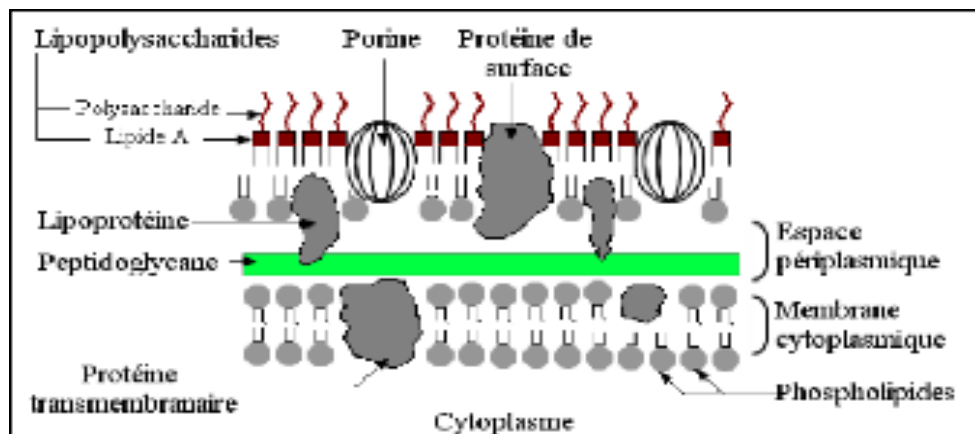


Figure8: Structure de la paroi bactérienne Gram- (d'après LAVIGNE, 2007).

### 10-3- Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles sont nombreuses et donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales adoptées par chaque manipulateur (**Suhr et Nielsen 2003**). Ces différentes techniques sont répertoriées et décrites dans différentes publications.

Les méthodes d'évaluation les plus utilisées sont la méthode de diffusion sur en milieu gélosé (**aromatogramme**) et la méthode de dilution.

#### 10-3-1- Aromatogramme :

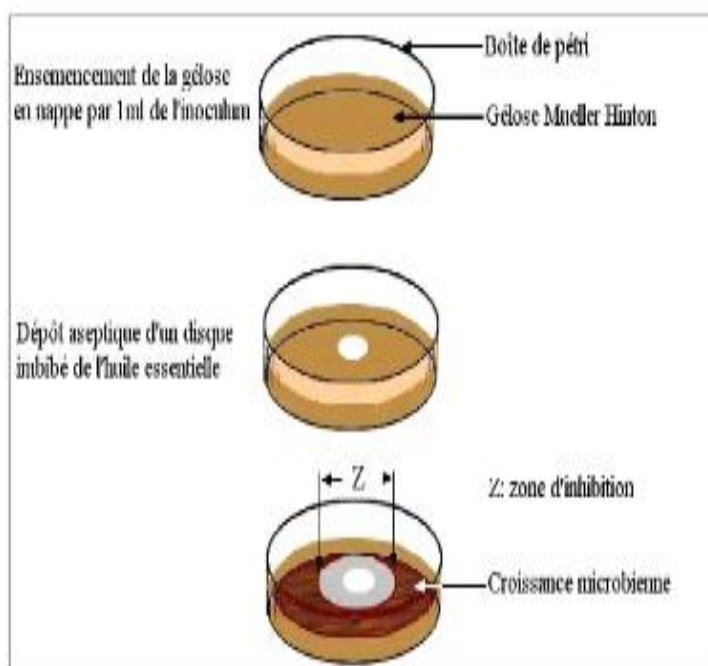
L'aromatogramme est une méthode qui se réalise *in vitro*, basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des huiles essentielles testées, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée.

La méthode des disques consiste en la diffusion des substances à tester de concentration connue, imprégnée sur les disques de papiers filtre en contact avec le milieu de culture solide coulé dans les boîtes de Pétri, préalablementensemencées d'un inoculum bactérien. Les boîtes de pétri sont incubées dans les conditions appropriées au germe en étude. Plus l'agent diffuse, plus sa concentration se réduit, créant ainsi un gradient de concentration autour des disques de papiers filtre. Après incubation, si la substance contenue sur les disques a une activité antibactérienne vis-à-vis du germeensemencé, une zone d'inhibition de croissance sera observée autour de ces derniers (**Cos et al., 2006; Brooks et al., 2004**)(figure 9).

Selon la taille du halo d'inhibition nous distinguons :

- ✓ Des germes résistants à l'huile essentielle (-) : diamètre <8mm;
- ✓ Des germes sensibles à l'huile essentielle (+) : diamètre compris entre 9 à 14mm ;
- ✓ Des germes très sensible à l'huile essentielle (++) : diamètre compris entre 15 à 19mm.
- ✓ Des germes extrêmement sensible (+++) : diamètre >20mm.





**Figure 9:** Principe de la méthode d'aromatogramme.

### 10-3-2- Méthode du puits ou cylindre

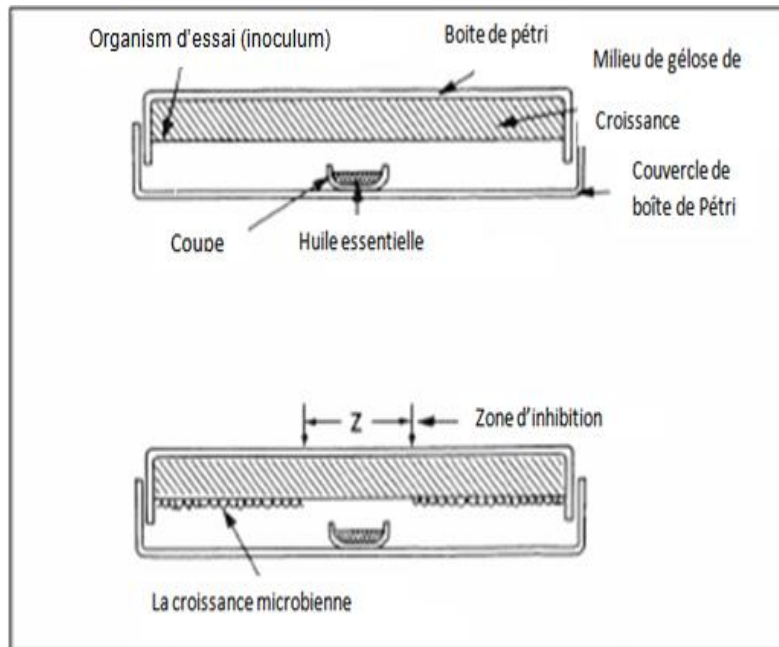
Proposé par Cooper et Woodman en 1946, reprise par Shroder et Messing (1949), elle mesure une diffusion radiale de l'huile essentielle à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. Elle consiste à découper un trou circulaire vertical de 6 à 7 mm de diamètre dans le milieu de culture solide coulé dans les boîtes de pétri préalablementensemencées d'un inoculum microbien et d'y verser une solution d'huiles essentielles de concentration connue. L'huile essentielle diffusant radialement créant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne ou fongique. (**Bousbia, 2004**).

Après incubation de 24 à 48 heures, les diamètres des zones d'inhibition observées autour des puits seront mesurés à l'aide d'un pied à coulisse (**Kareem et al., 2008**).

### 10-3-3- Méthode de microatmosphère

Cette technique consiste à ensemencer le germe sur milieu solide dans une boîte de pétri stérile. Ensuite, un disque stérile (papier Wattman N°1 de 6mm de diamètre) imbibés d'une quantité déterminée (5 ul) d'huile essentielle au milieu des couvercles des boîtes de Pétri et non en contact direct avec la géloseensemencée. Les boîtes sont fermées avec leurs couvercles en bas puis, incubées à 37 °C pendant 24 h. Après incubation, l'absence de la croissance bactérienne se traduit par

une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins nette, à tendance circulaire lorsque le disque est bien centré (figure 10). Les résultats se lisent avec un pied à coulisse et s'expriment par un diamètre en mm. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés (**Pibiri, 2005**)



**Figure 10** : Méthode de micro atmosphère (**Pibiri, 2005**).

### 11- Activité antifongique :

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes (**De Billerbeck et al., 2002 ; Koba et al., 2004 ; Oossou et al., 2004 ; Ouraini et al., 2005**) et contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans* (levure), *Cryptococcus neoformans* et *aspergillus fumigatus* (**Teixeiraduarte, 2005**). Des travaux similaires ont été réalisés par Momammedi, 2006 sur l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* contre sept moisissures : *Rhizopus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Aspergillus* ; Omidbeygi et al (2007) ont démontré que les huiles essentielles de thym, de la sarriette et du clou de girofle présentent une activité antifongique « *in vitro* » contre *Aspergillus flavus*. Les huiles essentielles d'*Eucalyptus saligna* et d'*Eucalyptus camalduensis* ont montré un effet fongistatique vis-à-vis de *Phaeoramularia angolensis* (**Jaset-Dongmo et al., 2008**).

Il a été établi d'après Cox et al (2000) que généralement les champignons sont plus sensibles que les bactéries.

### 12- Activité antivirale :

Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques des huiles essentielles telles que les monoterpénols et les monoterpénals. De nombreuses pathologies virales sévères traitées avec des huiles essentielles ont montrées des améliorations importantes (les huiles essentielles ne sont actives que sur les virus à enveloppe comme celui de la grippe et du VIH (virus de l'immunodéficience humaine)).

### 13- L'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis. L.* :

- **Composition chimique :**

La composition qualitative de cette huile essentielle est relativement fixe, par contre les proportions des composants varient en fonction de l'origine géographiques et des conditions du milieu (**Besombes, 2008**).

Il existe trois variétés de romarin, de provenance différente: le camphré de France, le cinéole d'Afrique du Nord et le verbénone de Corse. Elles ont des vertus différentes et des odeurs différentes. Ainsi, l'huile essentielle de romarin, présente 3 Chémotypes différents. La composition chimique de certaines huiles essentielles de Romarin est présentée dans les tableaux, seuls les composés majoritaires (ayant une teneur supérieure à 5 %) sont mentionnés dans ces tableaux : (**Ouassila, 2010**)

### Chapitre III : les huiles essentielles

**Tableau 4** : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à cinéol et camphre) de l'espèce *Rosmarinus officinalis* (Ouassila, 2010)

Composé	Localité et pourcentage (%) de composé								
	Algérie	Tunisie	France	Serbie	Grec	Chine	Afrique du Sud	Turquie (Mersin)	Iran
$\alpha$ -pinène	4.5	-	20.8	-	-	19.43	18.18	9.4	14.9
Camphène	7.2	5.9	5.1	-	-	11.52	6.08	-	-
1,8-cinéole	12.2	33.1	36.9	52.20	12.89	27.23	31.12	50.7	7.43
Camphre	14.6	18.0	34.2	10.08	22.24	14.26	30.12	5.9	4.94
Terpinen-4-ol	-	6.0	-	-	-	-	-	-	-
Bornéol	10.6	8.0	-	-	7.37	-	-	6.8	-
Pipéritone	-	-	-	6.68	-	-	-	-	23.7
$\alpha$ -terpéniol	5.2	-	-	-	5.67	-	-	6.8	-
Caryophyllène Oxyde	10.9	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -pinène	8.5	-	-	-	-	6.71	-	-	-
Camphrène	-	-	-	-	-	19.43	18.18	-	-
Linalol	-	-	-	-	-	-	-	-	14.9

**Tableau 5** : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à verbénone) de l'espèce *Rosmarinus officinalis* (Ouassila, 2010)

Composé	Localité et pourcentage (%) de composé					
	Maroc	Espagne	Portugal	Italie	Argentine	Turquie
$\alpha$ -pinène	-	-	-	-	-	14.2
1,8-cinéole	11.6	11.09	-	7.26	-	12.1
Camphre	11.6	13.12	5.5	14.6	33.6	16.1
Terpinen-4-ol	-	-	-	-	8.4	-
Bornéol	15.6	14.32	-	10.4	-	7.8
Pipéritone	-	-	-	5.75	-	-
$\alpha$ -terpéniol	-	5.04	7.2	-	8.2	-
Verbénone	11.2	11.75	35.4	21.76	24.9	11.1
Caryophyllène Oxyde	-	-	-	-	-	6.0
E- caryophyllène	-	-	-	-	14.8	-
Linalol	5.4	-	-	-	-	-
3-octanol	-	11.92	-	-	-	-

**Tableau 6** : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à cinéol) de l'espèce *Rosmarinus officinalis* (Ouassila, 2010)

Composé	Localité et pourcentage (%) de composé		
	Tunisie	Brésil	Turquie
$\alpha$ -pinène	13.45	37.22	12.57
Camphène	5.86	3.97	-
1,8-cinéole	43.49	23.76	44.42
Bornéol	60.14	-	8.52
$\beta$ -pinène	8.36	-	5.18
Camphrène	8.95	-	-

- **Caractéristiques physico-chimiques :**

Au niveau des caractéristiques physico-chimiques, nous distinguons aussi deux grands types de romarin. Toutefois ces propriétés sont assez proches, excepté au niveau de la miscibilité à l'éthanol à 80 % (Ouassila, 2010).

**Tableau 7** : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle du romarin (Ouassila, 2010)

Caractéristiques physico-chimiques	Types Maroc et Tunisie	Type Espagne
Aspect	liquide, mobile, limpide, odeur caractéristique, moins camphrée	incolore à jaune pâle, agreste, cinéolée, plus ou
Densité	min. = 0,907 max. = 0,920	min. = 0,895 max. = 0,905
Indice de réfraction à 20°C	min. = 1,464 O max. = 1,470 O	min. = 1,467 O max. = 1,473 O
Pouvoir rotatoire à 20°C	entre -2° et +5°	entre -5° et +5°
Miscibilité à l'éthanol à 20°C	pas plus de 2 volumes d'éthanol à 80° avec 1 volume d'H.E. Pour obtenir une solution limpide.	20 volumes, avec parfois une opalescence
Indice d'acide	maximum = 1	
Indice d'ester	minimum = 2 maximum = 15	
Indice d'ester après acétylation	min. = 30 max. = 72	min. = 30 max. = 55

### Chapitre III : les huiles essentielles

**Tableau 8:** Les normes AFNOR d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

<b>Aspect</b>	Liquide mobile, limpide
<b>Couleur</b>	incoloré à jaune pale ou jaune verdâtre
<b>Odeur</b>	caractéristiques, agreste, cineolée plus ou moins camphrée
<b>densité relative a</b> $d_{20}^{20}$	Minimum : 0.907 Maximum : 0.920
<b>Pouvoir rotatoire à</b> 20°C	compris entre - 2° et + 5° Miscibilité à l'éthanol à 80 %
<b>L'indice d'ester</b>	Minimum : 2 Maximum : 15
<b>L'indice de</b> <b>Réfraction</b>	Minimum:1.4640 Maximum:1.4700
<b>L'indice d'acide</b>	Maximum:1.0

(Source : Anonyme, 2000)

### 1- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est formé par des rameaux des sommités de romarin. Ces rameaux sont constitués entièrement de feuilles et de fleurs.

#### ✓ Récolte

Les échantillons ont été recueillis dans deux régions d'études différentes Blida et Djelfa durant le printemps (6-13 Avril 2014).

Pour chaque région on a pris au hasard des arbustes sains, sur lesquels on a pratiqué l'échantillonnage. Les rameaux coupés sont les jeunes pousses de l'année. Ces rameaux échantillonnés sont garnis de feuilles et de bouquets de fleurs.

Ainsi récoltés, les échantillons sont laissés sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré, au niveau du laboratoire de biologie végétale –département d'agronomie. Ils ont été étendus en une seule couche sur les paillasses et tournés de temps en temps afin d'éviter tout risque de fermentation qui pourrait altérer la qualité des huiles essentielles. Devenues sèches, les parties utilisées sont récupérées dans des sacs propres.



**Figure 11** : images de romarin en plein floraison et des feuilles du romarin.

### 2- Localisation du lieu d'expérimentation

Le travail a été réalisé au niveau du laboratoire de physiologie végétale du département d'agronomie et dans le laboratoire de microbiologie de l'EPH Hadjout.



### 3- Présentation des régions d'études

#### 3-1- Région Blida

- Situation géographique de la région :



**Figure 12:** Carte géologique de la wilaya de Blida (ANRH, 2012).

La zone de prélèvement des échantillons se situe dans la station expérimentale de la faculté des sciences agrovétérinaires et biologie de l'université de Blida 1.

Notre station se situe au bas de piedmont de l'atlas blideen, elle est limitée à l'est par la commune de Soumaa, à l'ouest par la commune d'Ouled Yaich, au nord par la commune de Guerouaou, au sud par le mont de Chrea. Ainsi elle fait partie des plaines de la Mitidja comme étant la plus vaste plaine sublittoral de l'Algérie, elle s'étend sur une longueur de 100Km, et une largeur de 5 a 20Km, sa superficie est de 140 000 hectares.

- **Quotient pluviométrique d'Emberger**

Les conditions climatiques d'une région sont synthétisées par la valeur du quotient pluviométrique d'Emberger. Ce quotient est déterminé par la relation suivante:

$$Q = 3.43 \times P / (M - m)$$



## Chapitre IV : matériel et méthodes

Où : **P**: précipitations annuelles en mm;

**M-m** : amplitude thermique;

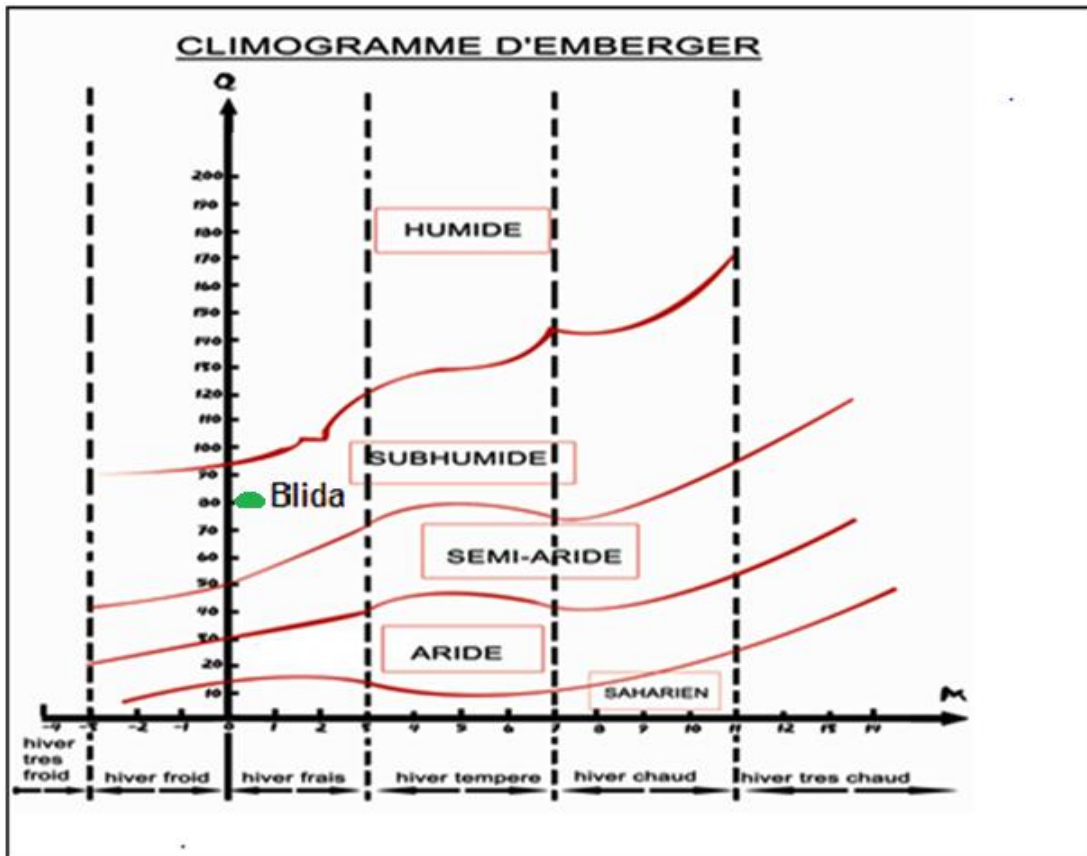
**M**: moyenne des maxima du mois le plus chaud;

**m** : moyenne des minima du mois le plus froid ;

$Q = 3.43 \times P / (M - m)$  ; donc

$Q = 3.43 \times 666.9 / (28.18 - 0)$

$Q = 81.17$



**Figure 13:** climatogramme d'Emberger de Blida pour la campagne (2012-2013).

Selon le climatogramme d'Emberger la région de Blida se situe dans l'étage subhumide à hiver frais

### 3-2- La région Djelfa :

- **Situation géographique de la région :**

La wilaya de Djelfa faisant partie de la région des hauts plateaux, se situe dans la partie centrale de l'Algérie, comprise entre 2° et 5° de longitude Est, et entre 33 ° et 35° de latitude Nord .Elle est limitée par:

- Au Nord : Médéa et Tissemsilt ;
- Au Sud : Ouargla, El Oued et Ghardaïa ;
- à l'Est : M'sila et Biskra et
- à l'Ouest : Laghouat et Tiaret (**Khadraoui et al, 2001**)



Figure 14: carte de Djelfa (source : carte microsoft 2004).

- **Quotient pluviométrique d'Emberger**

$$Q = 3.43 \times P / (M - m)$$

Donc :  $Q = 3.43 \times 284.7 / (35.8 - 0.1)$

$$Q = 27.29$$

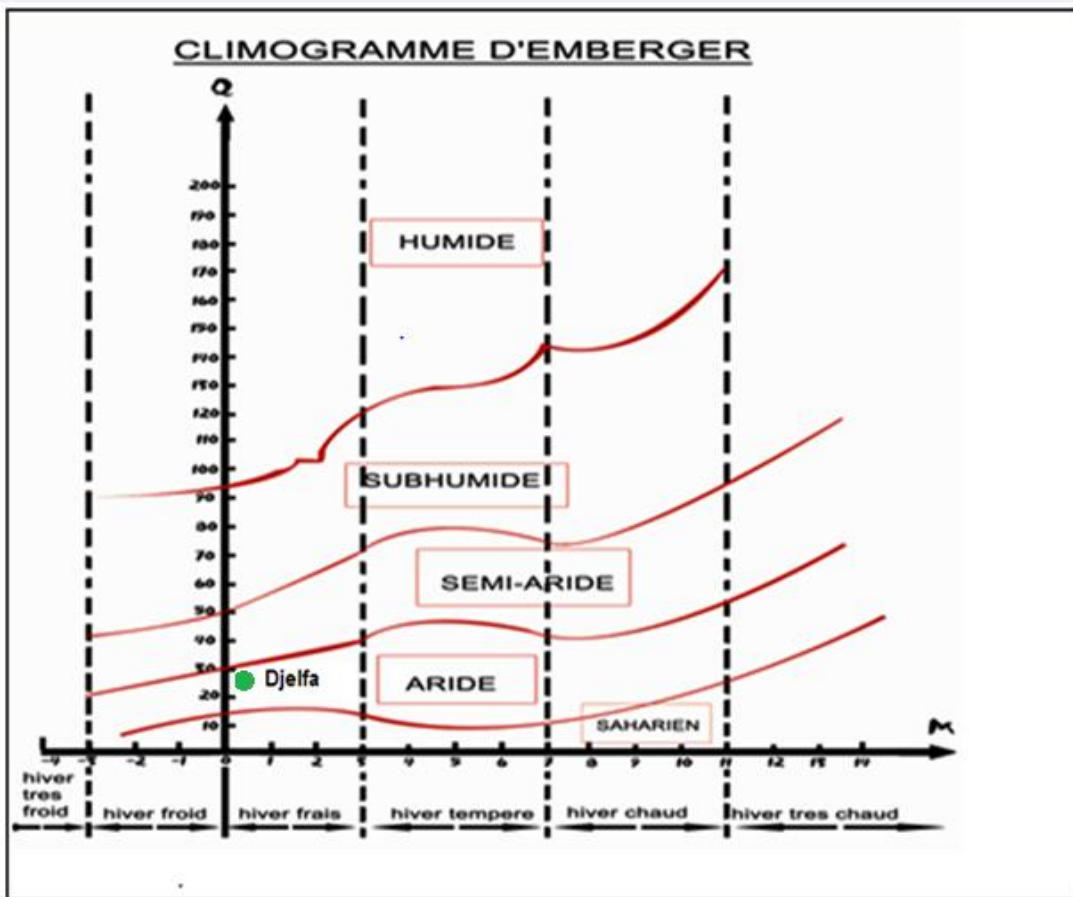


Figure 15: climatogramme d'Emberger de Djelfa pour la campagne (2012-2013).

Selon le climatogramme d'Emberger la région de Djelfa se situe dans l'étage aride à hiver froid

#### 4- L'extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* :

- **Méthode d'extraction**

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par entrainement à la vapeur, c'est une des techniques les plus anciennes.

Cette technique est simple, peu couteuse et n'a pas une influence sur l'environnement puisqu'elle ne requiert aucun produit toxique.

- **Présentation du dispositif**

Le dispositif expérimental comprend principalement :

- ✓ Une chauffe ballon de 1 litre remplie au 2/3 d'eau ;

- ✓ Un ballon contenant la matière végétale ;
- ✓ Un réfrigérant alimenté par un système de refroidissement ;
- ✓ Une ampoule à décanter pour récupérer l'hydrolat (eau+huile essentielle)

### • Mode opératoire

La matière végétale est placée dans le ballon et émergée dans de l'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition. Les vapeurs chargées de substances volatils traversent le réfrigérant se condensent,

✓ La vapeur passant à travers le matériel végétal, transporte l'huile essentielle vers le réfrigérant puis elle est récupérée à la sortie du condensateur.

✓ L'huile essentielle est séparée de l'eau par différence de densité à l'aide d'une ampoule à décanter. (l'huile pure flotte au dessus de l'hydrolat).



**Figure 16** : dispositif de l'entraînement à la vapeur

### 5- Les paramètres étudiés

- **Le rendement en huiles essentielles**

Le rendement en huiles essentielles ( $R_{HE}$ ) selon les normes d'AFNOR (2000) est le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction ( $M_H$ ) et la masse de la matière végétale utilisée ( $M_{mv}$ ) sèche ou fraîche.

Le rendement est exprimé en pourcentage et donné par l'équation suivante :

$$R_{HE}(\%) = M_H / M_{mv}$$

Où :  $M_H$  : la masse d'huile essentielle en gramme

$M_{mv}$  : la masse de la matière végétale (sèche ou fraîche) utilisée en gramme

$R_{HE}$  : rendement en huiles essentielles

- **Les caractéristiques organoleptiques**

Sont : l'aspect, l'odeur, la couleur et la flaveur ; en utilisant les sens.

- **Les caractéristiques physico-chimiques**

- ✓ **Calcul de la densité**

La densité ( $d$ ) est le rapport entre la masse de l'huile essentielle et son volume :

$$d = M_{HE} / V_{HE}$$

Où :  $d$  : densité

$M_{HE}$  : masse de l'huile essentielle (g)

$V_{HE}$  : volume de l'huile essentielle (ml)

- ✓ **Détermination de l'indice de réfraction ( $I_R$ )**

- ❖ **Définition**

L'indice de réfraction est le rapport entre la vitesse de la lumière (à une longueur d'onde définie) dans le vide et sa vitesse dans la substance.

La mesure de l'indice de réfraction d'une huile, se fait à l'aide du réfractomètre à une température constante (**Audigie et al, 1983**)

### ❖ Mode opératoire

- L'instrument est réglé à une température ambiante;
- Verser une goutte d'huile essentielle sur la surface du prisme ;
- Fermer le couvercle du prisme, assurer que le film d'huile essentielle ne contient pas de bulles d'air, puis pointer le réfractomètre en direction d'une source lumineuse;
- Quand il y a du liquide sur le prisme, le champ est divisé en une partie claire et une partie sombre. Le point auquel la ligne de démarcation entre ces deux parties traverse l'échelle verticale, donne la mesure. On peut ajuster la ligne sur l'échelle verticale à l'aide de vis située au-dessus ou au -dessous de la boîte contenant le prisme, et on lie avec précision la valeur affichée

### ✓ Détermination de l'indice d'acide

#### ❖ Définition

L'indice d'acide d'un corps gras est la masse d'hydroxydes de potassium exprimée en milligramme nécessaire pour neutraliser l'acidité libre (acides gras libres), contenue dans un gramme de corps gras ( $I_A$  est sans unité) (**Coutouly et al, 2006**).

#### ❖ Mode opératoire

- Introduire dans un erlenmeyer 0.5 g/l d'huile essentielle, 25 ml d'éthanol ;
- Ajouter 5 gouttes de solution de phénophtaléine, comme indicateur et
- Neutraliser la solution avec l'hydroxyde de potassium contenu dans la burette jusqu'à ce que la coloration rose persiste pendant une dizaine de secondes.

#### ❖ Calcul

L'indice d'acide est donné par la formule suivante:

$$I_A = 5.61 \frac{v}{m}$$

Où:  $v$  : est le volume en millilitre de solution d'hydroxyde de potassium utilisé.

$m$  : est la masse en gramme de la prise d'essai.

### ✓ Détermination de l'indice d'ester

#### ❖ Définition

L'indice d'ester d'un corps gras est la quantité de potasse exprimée en milligramme nécessaire pour saponifier des acides gras combinés présents dans 1g de corps gras (**Gavrilovic et al, 1996**).

#### ❖ Principe

Hydrolyse des esters par chauffage dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium et dosage de l'excès d'alcali par une solution titrée d'acide chlorhydrique

#### ❖ Réactifs

- Ethanol à 95% volumique.
- C (KOH)= 0.5 mol/l
- C (HCl)= 0.5 mol/l

#### ❖ Mode opératoire

- Introduire dans un ballon 0.5 g d'huile essentielle, ajouter à l'aide d'une burette 25ml de la solution d'hydroxyde de potassium KOH ainsi que des fragments de pierre de ponce ;
- Adapter un tube en verre au réfrigérant puis placer le ballon sur le bain d'eau bouillante pendant une heure et
- Laisser le ballon refroidir, démonter le tube, ajouter 20 ml d'eau puis 5 gouttes de solution de phénophtaléine, comme indicateur et enfin titrer l'excès d'hydroxyde de potassium avec une solution d'acide chlorhydrique.

#### ❖ Calcul

L'indice d'ester est donné par la formule suivante:

$$I_E = 28.05/m (V_0 - V) - I_A$$

Où :

$V_0$ : le volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique dans le test blanc.



V : le volume en millilitre de la solution d'acide chlorhydrique utilisée.

m : la masse en gramme de la prise d'essai.

I<sub>A</sub> : la valeur d'indice d'acide, déterminée selon NFT 75-103.

### 6- Préparation des extraits méthanoliques (Annexe 3)

- Broyer les échantillons déjà sécher à l'aide d'un broyeur
- Mettre 10 g de la poudre végétale dans 100 ml de méthanol
- Porter le mélange à l'agitation pendant 24h (T 25 ± 2° C)
- Filtrer dans une hôte à l'aide d'un papier filtre
- Le filtrat obtenu est l'extrait méthanolique
- Garder dans des tubes opaques, bien fermer et les mettre à une température +4°C.

### 7- Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et de l'extrait méthanolique :

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, on a adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé (aromatogramme). Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques (**Benjelali et al, 1986**)

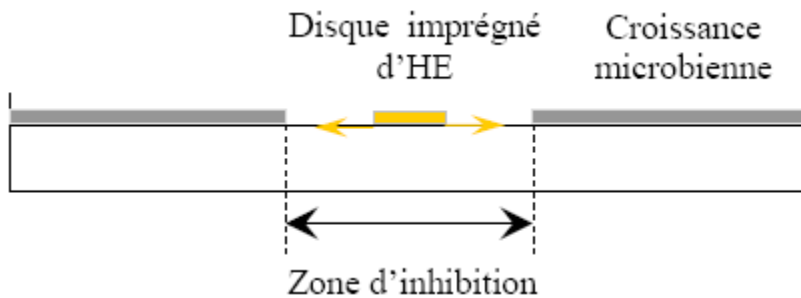
C'est une méthode permet de déterminer l'activité inhibitrice des huiles essentielles et d'extrait méthanolique sur la croissance des germes et des champignons.

Des disques de papier buvard, imprégnés des substances actives à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les substances actives (huiles essentielles, extrait méthanolique) diffusent de manière uniforme.

Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspond à une absence de culture (**Guérin-Faubleé et caret, 1999**)



L'effet du produit antimicrobien sur une souche bactérienne est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche sera qualifiée de : résistante, sensible, très sensible, extrêmement sensible.



**Figure 17:** Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme.

### 8- Les souches testées

Les souches utilisées dans les tests font parties de microorganismes, qui sont des pathogènes et des contaminants.

- **Souches bactériennes**

Cinq souches bactériennes dont deux Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) et trois Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*)

- **Souches fongiques**

Une seule souche fongique est utilisée : *Candida albicans*.

Les souches bactériennes et la souche fongique ont été fournies par le Laboratoire de Microbiologie et mycologie de l'EPH de Hadjout.

### 9- Test de confirmation des souches

Les souches bactériennes et fongiques qu'on a utilisées ont été déjà confirmées par le laboratoire de l'EPH Hadjout.

On a tenu de vérifier leur pureté et leur identification par les caractères morphologiques et biochimiques.

- **Les caractères morphologiques**

Pour les bactéries : sont recherchés par l'aspect des colonies et par la coloration de Gram qui permet d'observer le mode de regroupement, la forme des

bactéries et le type de Gram. Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif (Annexe 1).

Pour les levures : l'aspect de colonies en plus un examen microscopique est effectué à partir d'une culture sur sabouraud + chloramphénicol.

- **Test biochimiques**

Utilisation de galerie classique pour l'identification d'*Escherichia coli* (TSI, manitol mobilité, citrate de Simmons, acides aminés, bouillon de nitrate, bouillon de Klarc et lubs), king A et king B pour le *Bacillus*, et le catalase, coagulase, esculine pour compléter la confirmation des *staphylococcus* et *Enterococcus*.

Pour les levures on a fait un test de blastèse (Annexe 1)

### 10- Conservation des souches

Les souches bactériennes ont été conservées à +4°C sur gélose nutritive inclinée.

Les levures quant-à-elles ont été conservées à +4°C sur milieu Sabouraud+chloramphénicol

### 11- Renouvellement des souches microbiennes

- A l'aide d'une anse de platine, une colonie pure de microorganismes est prélevé et ensemencé par stries sur milieu gélose nutritive coulé dans les boites de Pétri. (Annexe 3)
- Les boites ainsi ensemencées sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures
- Pour les levures, une colonie est ensemencée sur milieu Sabouraud+chloramphénicol (incliné), le tube est ensuite incubé à l'étuve à 28°C pendant 48 heures.

### 12- Préparation de l'inoculum

- **Préparation de pré culture**

- Après renouvellement des souches, on prélève trois à cinq colonies bien isolées et parfaitement identiques à l'aide d'une anse de platine (ou pipette pasteur).

- Décharger l'anse dans 5ml d'eau distillée stérile, on agite bien pendant quelques secondes.

- L'inoculum est ajusté à 0.5 Mc Farland (Annexe 1) correspond à une densité optique de (0.08 à 0.10) à 625 nm. la concentration finale de l'inoculum est de  $10^7$  UFC/ml. **(Bendahou et al, 2007)**

- La même opération est effectuée pour les levures mais l'inoculum est ajusté à  $10^4$  UFC/ml

- **Ensemencement** (Annexe 3)

- Couler aseptiquement le milieu Mueller Hinton et le Sabouraud + chloramphénicol dans des boîtes de Pétri à raison de 15ml par boîte. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse.

- Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne,

- puis l'essorer en pressant fermement (en tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

- L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface de Mueller Hinton de haut en bas en stries serrées.

- L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de  $60^\circ$  à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- Recharger l'écouvillon chaque fois qu'une nouvelle boîte est ensemencée.

- La même opération est effectuée sur un milieu de sabouraud + chloramphénicol pour les levures.

- **Dépôt de disques**

- Des disques (patches) de 6mm de diamètre ont été découpés sur du papier wattman n°1 puis enrobés dans du papier aluminium et stérilisés à l'autoclave à  $121^\circ\text{C}$  pendant 15minutes.

- Ces disques ont été ensuite imprégnés par 5 $\mu\text{l}$  de l'huile essentielle de chaque région Blida et Djelfa et 15 $\mu\text{l}$  d'extrait méthanolique.

- A l'aide d'une pince stérile, on dépose deux disques : un de Blida et l'autre de Djelfa sur la surface des Mueller Hinton et des Sabouraud+chloramphénicol.

## Chapitre IV : matériel et méthodes

---

- Les boîtes sont ensuite fermées et laissées diffuser à la température ambiante pendant 30min et mise à l'étuve à une température de 37°C pendant 24 heures pour les M.H, et à une température de 28°C pendant 48 heures pour les sabouraud.

L'expérience est répétée quatre fois pour chaque huile essentielle et pour chaque espèce, et elle est répétée huit fois pour les extraits méthanoliques.

- **Lecture**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle (exprime en mm).

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis les huiles essentielles et les extraits méthanoliques étudiées est classée selon le diamètre d'inhibition selon les critères suivants (**Ponce et al, 2003**) :

Diamètre d'inhibition	Sensibilité
<8mm	Non sensible ou résistante (-)
entre 9 à 14 mm	Sensible (+)
entre 15 à 19mm	Très sensible (++)
>20mm	Extrêmement sensible (+++)

### 1- Rendement en huiles essentielles

Le tableau 9 présente les résultats du rendement en huiles essentielles de Romarin.

Ces résultats sont en histogramme, figure 18

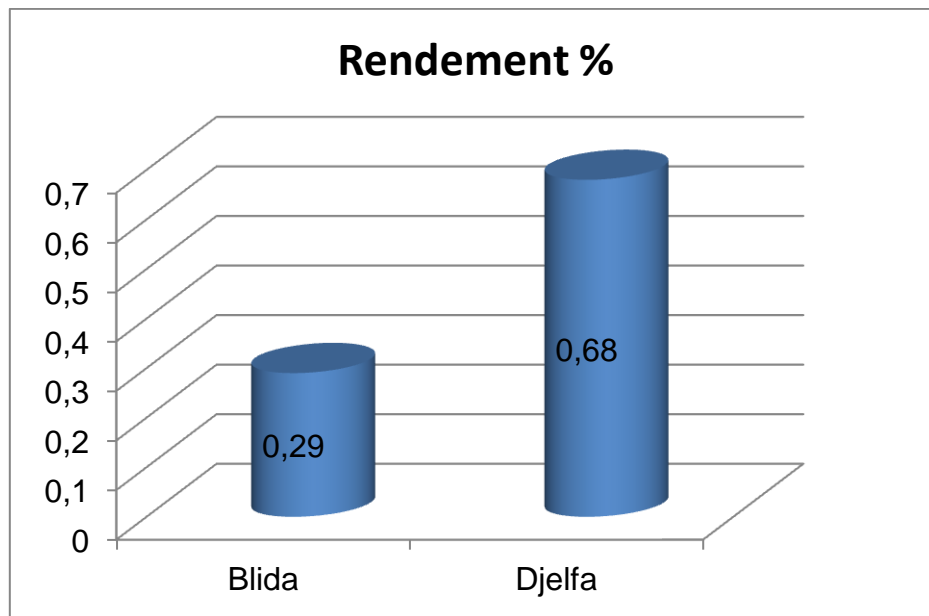


Figure18 : *Rendement en huiles essentielle du Romarin.*

Tableau 9 : Rendement en huiles essentielles du Romarin (*Rosmarinus officinalis*)

Région	Rendement
Blida	0,29
Djelfa	0,68

D'après le tableau, le rendement en huiles essentielles de la région de Blida est de 0,29 et celui de Djelfa est de 0,68.

**Okoh et al (2010), Paniza et al (1996)**, qui ont travaillé sur des feuilles fraîches, ont trouvés un taux de l'ordre de 0.31% et 0.45% respectivement.

Les résultats qu'on a obtenus sont représentatifs par rapport à ces résultats.

### 2- Densité

Les résultats de la densité obtenue sont présentés dans le tableau 10

**Tableau 10** : la densité en huiles essentielle de Romarin (*Rosmarinus officinalis*)

Région	Densité (g/l)	Normes selon AFNOR
Blida	0.957	0.972 – 0.992
Djelfa	0.928	

La densité d'huiles essentielles du Blida et même celle du Djelfa est inférieure aux normes d'AFNOR.

### 3- Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de Romarin (*Rosmarinus officinalis*)

Les échantillons de l'huile essentielle de Romarin obtenus par entraînement à la vapeur d'eau, sont représentés par la figure 19.



**Figure 19** : l'huile essentielle de romarin

Les caractéristiques organoleptiques de l'huile de romarin obtenue, sont résumées dans le tableau 11.

**Tableau 11** : caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de Romarin

Origine	Aspect	couleur	Odeur et saveur
Huile essentielle de Romarin (région de Blida)	Liquide visqueuse	Jaune claire	Odeur caractéristique de l'espèce
Huile essentielle de Romarin (région de Djelfa)	Liquide moins visqueuse	Rouge brique	Odeur caractéristique de l'espèce
Huile essentielle de romarin norme d'AFNOR	Liquide mobile, limpide	Jaune pale vert	Odeur caractéristique fraîche, plus ou moins camphrée selon l'origine

#### 4- Analyse physico-chimique :

Les résultats des constantes physico-chimiques de l'huile essentielle de romarin sont regroupés dans le tableau 12.

**Tableau 12:** Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de romarin des deux régions étudiées.

Paramètres physico-chimiques	l'HE de Romarin	Normes selon AFNOR (2000)
Densité	Blida: 0.957	Minimum=0.907
	Djelfa : 0.928	Maximum=0.920
Indice de réfraction	Blida: 1.476	Minimum=1.464 O
	Djelfa : 1.478	Maximum=1.470 O
Indice d'acide	Blida : 2.03	Maximum=1.0
	Djelfa : 1.34	
Indice d'ester	Blida : 1.95	Minimum=2
	Djelfa : 1.207	Maximum=15

L'indice de réfraction de la région de Djelfa est de **1.478**, et celui de la région de Blida est de **1.476**, ces deux indices sont Supérieure aux normes d'**AFNOR (2000)**.

On a trouvé des indice d'acide élevé. L'indice d'acide de la région du Djelfa est **1.34** et celui de la région du Blida est de **2.03** alors que selon les normes d'**AFNOR (2000)** cet indice est au maximum 1.0.

Par contre les résultats obtenus pur l'indice d'ester sont Inférieure aux normes d'**AFNOR (2000)**. L'indice d'ester de la région du Djelfa est de **1.207**, est celui de la région du Blida est de **1.95**.

La différence en rendements entre les deux régions confirme les travaux **D'OTSMANE** et **BENTAMER (2009)**, qui signalent que la région de la plante influence le rendement en huile essentielle.

Le rendement en huile essentielle du romarin *Rosmarinus officinalis* obtenu dans la région de Djelfa est supérieur à celui de la région de Blida.

Donc, on peut constater que la différence dans la composition et le rendement en huiles essentielles entre les deux régions, peut être due à plusieurs facteurs, tels que la variation des conditions climatiques et édaphiques, et les conditions de conservation des échantillons.

D'après les résultats obtenus, l'huile essentielle de Djelfa présente des caractéristiques organoleptiques différentes aux normes **AFNOR (2000)**.

L'indice de réfraction est inversement lié au degré d'instauration de l'huile essentielle (**GACEM ET AL., 1995**). L'indice de réfraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est supérieur à celui de l'eau (**1.335**), ceci montre la richesse de ces huiles en composés qui dévient la lumière polarisé. La valeur de l'indice de réfraction obtenue à la région de Djelfa est de **1.478** et celui de la région de Blida est de **1.476** ; les deux valeurs sont Supérieure aux normes établies par **AFNOR (2000)**.

Concernent l'indice d'acide de la région de Djelfa il est de l'ordre de **1.34**, et celui de la région de Blida est de **2.03**.

L'indice d'ester de la région de Djelfa est de **1.207**, et celui de la région de Blida est de **1.952**.

D'après les résultats obtenus, on constate que les taux de ces composants sont presque comparables à ceux trouvés en référence du romarin. «Type Maroc et Tunisie» (**AFNOR, NF T 75-214, 1996**).



Cette variation dépend en grande partie des phénomènes climatiques et elle est étroitement liée à l'activité physiologique de la plante telle que le développement, la croissance et la reproduction.

Cette variabilité entre l'huile essentielle de Blida et Djelfa s'explique par : l'interaction avec l'environnement (type de sol ; climat) comme la couleur de l'huile de Djelfa change a cause d'un stress hydrique ou salin.

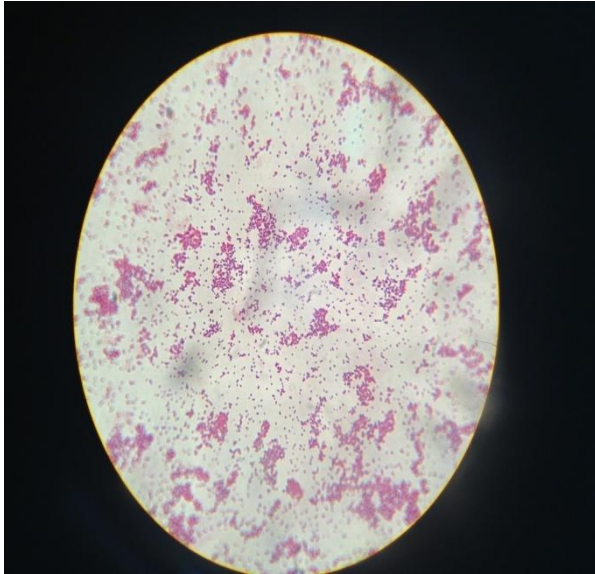
### 5- Les résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et d'extraits méthanoliques des deux régions

- **Identification des souches bactériennes** (Annexe 3)

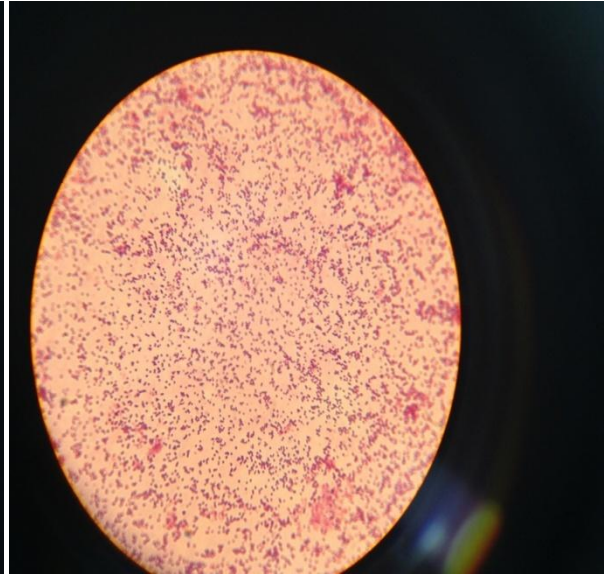
Les caractères morphologiques sont mentionnés dans le tableau 13

**Tableau 13:** caractères morphologiques des souches testées

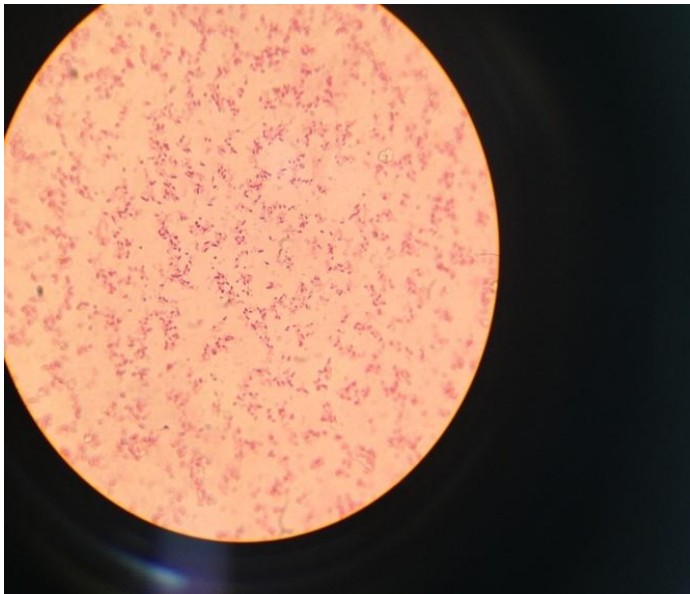
<b>Espèces bactériennes</b>	<b>Milieu de culture</b>	<b>Gram</b>	<b>Aspect microscopique</b>
<i>E.coli</i>	Gélose Hecktoen	Négatif	Coccobacille
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gélose nutritive	Négatif	Bacilles
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gélose chapman	Positif	Coccus en grappe de raisin
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gélose nutritive	positif	Coccus
<i>Bacillus cereus</i>	Gélose nutritive	positif	Gros Bacilles



**Figure 20** : coloration de Gram,  
Vue au microscope x100 de *S.aureus*



**Figure 21** : coloration de Gram,  
vue au microscope x100 d'*E.faecalis*



**Figure 22**: Coloration de Gram,  
Vue au microscope x100 de *P. aeruginosa*.

- **Identifications des levures**

Les colonies poussent rapidement en 24 à 48 heures à 30°C sur milieu de Sabouraud-chloramphénicol. Elles sont blanches, crémeuses, lisses et peuvent se plisser en vieillissant.

L'examen direct à l'aide d'un microscope montre des levures.

Après un blastèse on a observé de tube de germination c'est une *Candida albicans*.

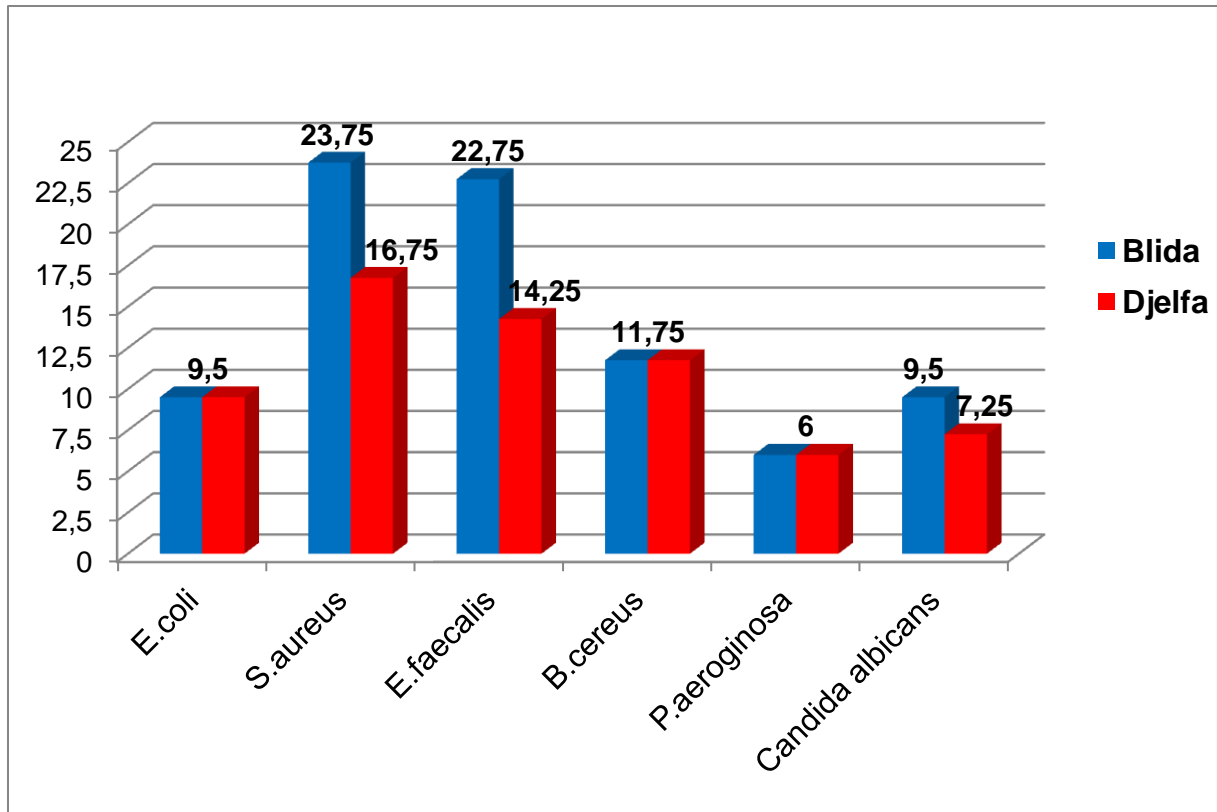
### 6- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de la région de Blida et de Djelfa

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien et antifongique d'huile essentielle. (Annexe 3)

Les observations effectuées sur l'effet d'huile essentielle de Romarin de la région de Blida et Djelfa sur la croissance des souches testées : *E.coli* ; *Pseudomonas aeroginosa* ; *Bacillus cereus* ; *Enterococcus faecalis* ; *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, Ont représentées dans le tableau 14.

**Tableau 14:** Résultats des zones d'inhibition des huiles essentielles de Blida et Djelfa

La souche	Région de Blida		Région de Djelfa	
	Moyen de Diamètre de zone d'inhibition	Degré de sensibilité	Moyen de Diamètre de zone d'inhibition	Degré de sensibilité
<i>E.coli</i>	9,5	Sensible (+)	9,5	Sensible (+)
<i>Staphylococcus aureus</i>	23,75	Extremement sensible (+++)	16,75	Très sensible (++)
<i>Enterococcus faecalis</i>	22,75	Extremement sensible (+++)	14,25	Sensible (+)
<i>Bacillus cereus</i>	11,75	Sensible (+)	11,75	Sensible (+)
<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	6	résistante (-)	6	Résistante (-)
<i>Candida albicans</i>	9,5	Sensible (+)	7,25	Résistante (-)



**Figure 23 :** histogramme représente l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Blida et Djelfa



**Figure 24:** Evaluation de l'effet antibactérien d'huile essentielle de Romarin sur *S aureus*



**Figure 25 :** Evaluation de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de Romarin sur *e.faecalis*



**Figure 26:** Evaluation de l'activité antibactérienne d'huile essentielle de Romarin sur *Escherichia coli*



### 7- Discussion

Généralement, les huiles essentielles sont médiocrement soluble dans l'eau, ce qui pose beaucoup de problèmes pour étudier leur activité antibactérienne, ceci a été déjà rapporté par **Southwelle et al, 1993**.

La méthode de diffusion des disques a permis de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien d'huile essentielle et d'extrait méthanolique du *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis des bactéries et levure testées.

Les résultats indiquent que l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* de deux régions Blida et Djelfa représente une forte activité contre les bactéries testées sauf pour *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*.

Le mécanisme de résistance des bactéries est par leur pompe à efflux. Certaines molécules des huiles essentielles inhibent l'activité de ces pompes, mais *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie très résistante.

Un fait saillant pourrait être dégagé de ces résultats et qui concernent *Staphylococcus aureus*. En effet cette bactérie a manifesté une certaine sensibilité variable à ces huiles essentielles. L'huiles essentielles de la région de Djelfa a montré une activité antibactérienne plus faible par rapport à celles de la région de Blida, avec un diamètre moyen de 16,75mm. Quant à l'huile essentielle de Blida le diamètre est 23,75.

Les données indiquent que les deux souches les plus sensibles aux huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* de Blida sont *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 22,75mm et 23,75mm respectivement.

Les mêmes résultats sont obtenus par l'huile essentielle de Djelfa

Ces deux souches : *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* sont aussi les plus sensibles à cet huile mais avec des diamètres de 16,75 et 14,25 respectivement, qui sont des diamètres plus faibles que celles de Blida.

Par contre à ces deux souches, on a trouvé les mêmes diamètres pour les deux huiles utilisés Blida et Djelfa, pour *Escherichia coli* et *Bacillus cereus* qui sont respectivement 9,5mm et 11,75mm. ces résultats montre une activité faible de cet huile envers ces deux souches.

Pour la seul souche fongique utilisé *Candida albicans* les résultats sont un peu différentes, cette souche est sensible à l'huile essentielle de Blida avec un diamètre

de 9,5mm alors qu'elle est résistante à l'huile essentielle de Djelfa et le diamètre égal 7,25mm.

A partir de ces comparaisons on peut dire que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* de Blida présente une activité antimicrobienne plus élevée que celle de Djelfa, ainsi qu'on peut constater que l'activité antimicrobienne dépend de la qualité d'huile essentielle d'une part et dans une autre part de la souche bactérienne elle-même. Plusieurs études testant l'activité inhibitrice d'huile essentielle confirment ce résultat telle que **Kalemba et Kunicka (2003)**, que la sensibilité d'un microorganisme à l'huile essentielle dépend des propriétés de l'huile essentielle et le microorganisme elle-même.

Il est bien connu que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'huile essentielle que les bactéries à Gram négatif (**Pool,2001**)

A l'inverse, **Celikel et Kavas (2008)** ont souligné, que l'action d'huile essentielle volatiles a peu d'influence sur l'inhibition de la croissance de bactéries à Gram négatif peu d'influence sur l'inhibition de la croissance de bactéries à Gram positif cependant, quelque huile essentielle semblent être spécifiques, et exercent une importante activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif.

D'après ces deux points de vue les résultats obtenus dans cette étude est comparable avec la première lorsqu'on compare les souches *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* à Gram positif avec les autres souches à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Selon **Burt (2004)** la grande résistance des bactéries Gram négatif à l'huile essentielle liée à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries Gram positif.

Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polysidiques (acides lipoteichoïques, acides teichoïques). Par contre chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines...) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane

cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds...) La résistance des bactéries à Gram- aux glycopeptides et aux macrolides est due à l'incapacité de ces molécules de franchir la membrane externe (**Berche, 2003**).

Selon **Oussalah et al., (2006)**, l'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, aldéhydes) et les effets synergiques entre les composants.

Les propriétés antibactériennes de ces composés sont en partie liées à leurs caractères lipophiles menant à l'accumulation au niveau des parois bactériennes, perturbant ainsi le fonctionnement et la perméabilité des membranes cellulaires, dégradation de la paroi cellulaire (**Helander et al., 1998**), dommages de la membrane cytoplasmique, dommages des protéines membranaires, fuites du contenu des cellules (**Hellal, 2011**).

La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières: la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote (**Chami, 2005**) et d'autre part, les molécules antifongiques elles-mêmes qui peuvent engendrer des résistances (**Prasad et Kapoor, 2004**).

### **8- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques de la région de Blida et de Djelfa**

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien et antifongique des extraits méthanoliques.(Annexe 3)

Les observations effectuées sur l'effet de l'extrait méthanolique de Romarin de la région de Blida sur la croissance des souches testées : *E.coli* ; *Pseudomonas aeruginosa*; *Bacillus cereus* ; *Enterococcus faecalis*; *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, Ont représentées dans le tableau 15.



## Chapitre V : Résultats et discussions

**Tableau 15** : Résultats des zones d'inhibition des extraits méthanoliques

La souche	Région de Blida		Région de Djelfa	
	Diamètre de zone d'inhibition	Degré de sensibilité	Diamètre de zone d'inhibition	Degré de sensibilité
<i>E.coli</i>	6,5	Résistante (-)	6,5	Résistante (-)
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,5	Très sensible (++)	13,75	sensible (+)
<i>Enterococcus faecalis</i>	14,25	Très sensible (++)	13,75	Sensible (+)
<i>Bacillus cereus</i>	17,25	Très Sensible (++)	14,25	Sensible (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	résistante (-)	6	Résistante (-)
<i>Candida albicans</i>	10,75	Sensible (+)	10,5	Sensible (+)

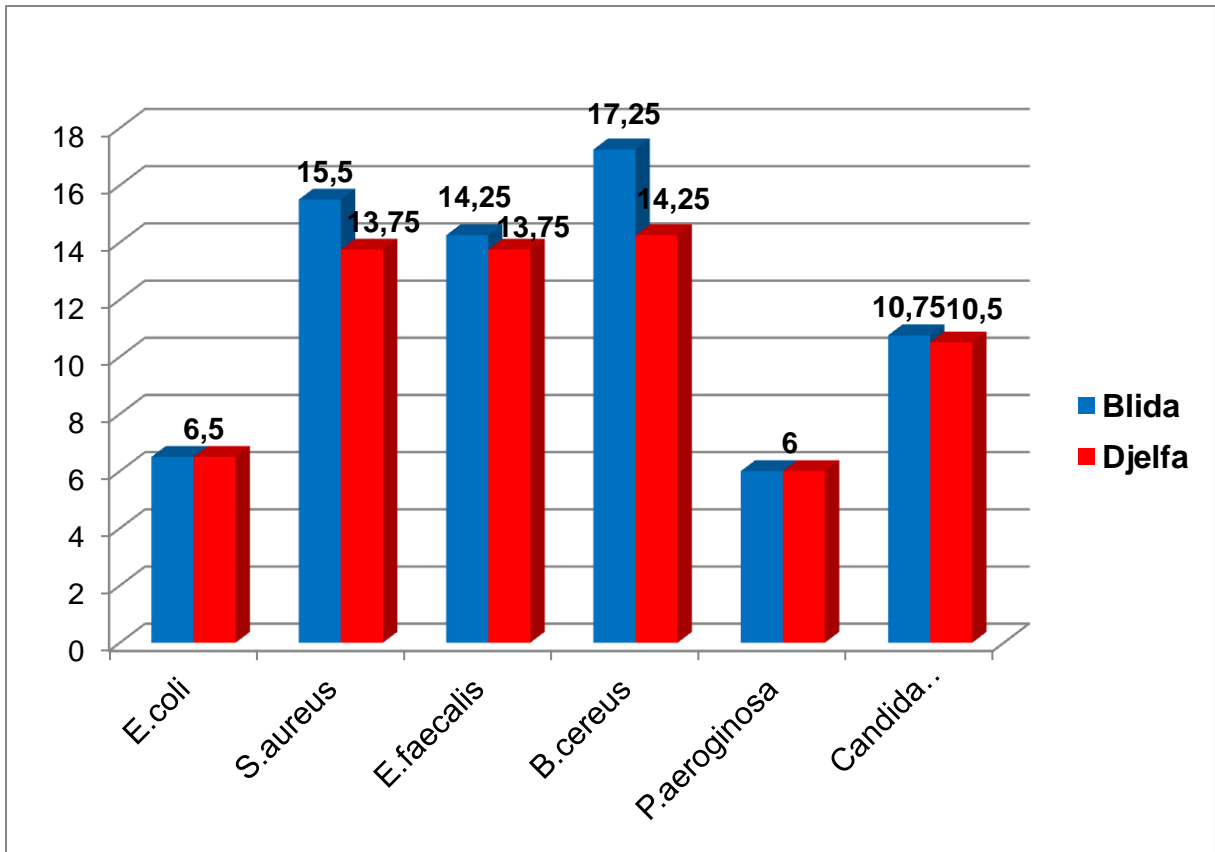


Figure 27 : histogramme représente l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de Blida et Djelfa



Figure 28 : Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* sur *Enterococcus faecalis*



**Figure 29 :** Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* sur *Staphylococcus aureus*



**Figure 30 :** Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* sur *Bacillus cereus*



**Figure 31 :** Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* sur *Escherichia coli*



**Figure 32:** Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* sur *Pseudomonas aeruginosa*





**Figure 33 :** Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* sur *Candida albicans*

### 9- Discussion :

Les extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* à inhiber la croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus cereus* alors que pour *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* aucune zone d'inhibition n'a été observée.

Pour les deux extraits méthanoliques utilisés de Blida et Djelfa l'effet le plus élevé est celui appliqué sur *Bacillus cereus* qui est traduit par un diamètre de 17,25mm et 14,25mm respectivement.

Un diamètre de 15,5mm obtenu par l'extrait méthanolique de Blida avec *Staphylococcus aureus* et 14,25mm avec *Enterococcus faecalis*, alors que pour l'extrait méthanolique de Djelfa on a trouvé le même diamètre pour les deux souches (13,75mm)

Les diamètres obtenus par l'extrait méthanolique de Blida sont un peu élevés de ceux de Djelfa.

*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont résistantes à l'extrait méthanolique de Djelfa et Blida avec les diamètres 6,5mm et 6mm respectivement.

## Chapitre V : Résultats et discussions

---

Les diamètres obtenus par les huiles essentielles sont plus élevés que ceux des extrait méthanoliques pour les deux régions c'est-à-dire l'huile essentielle à un effet antibactérien mieux que l'extrait méthanolique.

Pour *Candida albicans* on a presque le même diamètre d'inhibition par les deux extraits, 10,75mm pour l'extrait de Blida et 10,5mm pour celui de Djelfa.

## Conclusion

Un grand nombre des plantes aromatiques contiennent des composés chimiques ayant des propriétés antibactériennes et antifongiques, la majorité des travaux de recherche ont été focalisés sur les huiles essentielles extraites de ces plantes aromatiques, alors que certaines d'entre elles ont étudié les extraits méthanoliques.

L'utilisation des formulaires volatiles à base des plantes aromatiques et médicinales peut présenter de nombreux avantages par rapport aux produits de synthèses actuels.

La méthode de l'aromatogramme a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du Romarin (Blida et Djelfa), vis-à-vis cinq souches bactériennes et une seule souche fongique.

Pour l'huile essentielle, ce pouvoir est fort (puissant) sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* avec un diamètre d'inhibition de 23,75mm et 22,75mm respectivement pour celui de Blida et de 16,75mm et 14,25mm pour celui de Djelfa, alors qu'il est moyen sur *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* avec un diamètre 11,75mm et 9,5mm pour l'huile de Blida et Djelfa, la seule souche résistante est *Pseudomonas aeruginosa* aucune zone d'inhibition est observée pour les deux huiles.

Pour l'extrait méthanolique, *Bacillus cereus* est la souche la plus sensible avec un diamètre 17,25mm et 14,25mm pour l'huile de Blida et de Djelfa respectivement. *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* sont aussi des souches sensibles avec des diamètres 15,5mm et 13,75mm pour Blida 14,24mm et 13,75mm pour Djelfa, les deux autres souches *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* aucun diamètre d'inhibition est obtenu.

Pour les levures l'effet de l'extrait méthanoliques est mieux que l'effet des huiles essentielles.

Ces résultats indiquent que l'huile essentielle et même l'extrait methanolique de *Rosmarinus officinalis* ont montré une activité importante sur les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus foecalis*, *Bacillus cereus*) que les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*).

A l'issu de ce travail, et en vue de le poursuivre et l'approfondir, il serait nécessaire de recommander de perspective suivantes :

- ✓ Menu une étude détaillée sur la composition qualitatives et quantative de cette huile par le couplage de la CG-MS.
- ✓ Tester cette huile essentielle ainsi que l'extrait methanolique sur d'autres agents microbien afin de confirmer leurs efficacités.
- ✓ Etudier l'activité antioxydante et les aptitudes technologiques de cette huile essentielle ainsi que l'extrait methanolique de la même espèce
- ✓ Faire des essais afin de mettre en lumière l'effet thérapeutique de cette espèce médicinale.



## Références bibliographique

- **Afnor 2000-** Les huiles essentielles.Tome 2. Vol 2. Paris : tour Europe.
- **Amjad Hossain M, 2005.** Neem seed oil, Bangladesh. Examples of the Development of Pharmaceutical Products from Medicinal Plants. Bangladesh Council of Scientific and Industrial Research (BCSIR). 10, 59-63.
- **Atik bekkara F, Bousmaha L, Taleb bendiab S.A., Boti J.B., Casanova J, (2007).** Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. J Biologie & Santé vol. 7, n° 1,
- **ANONYME 3., 2003.** Principales propriétés des huiles essentielles.
- **Audigie CL, Dupont G et Zonszain F, 1983.** Principe des méthodes d'analyse biochimique Tome1.
- **Bardeau F, 2009.** Les huiles essentielles : Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Editions Lanore, 315.
- **Bassereau M., Chainteau A, Duperrex S, Joulain D, Leijs H, Loesing G, Owen N, Sherlock A, Schippa C, Thorel PJ, Vey M., 2007.** GC-MS Quantification of suspected volatile allergens in fragrances. Data treatment strategies and method performances. J Agric Food Chem ; 55 :25-31.
- **Beguine .,1977 :**Herbes médicinales ,Ed DELachaux et Niestlé, Paris ,140P.
- **Belitz H. D. et Grosch W., 1999.** Food chemistry. Second edition. Spriger-Verlag. Berlin Heidelberg. 992 p.
- **Bendahou M., Nenyouchef M.,Benkhada D., Elissa Costa J., 2007.** Influence of the processus extraction on essential oil of *Origanum glandulosum*. Journal o applied sciences. Vol 8 p1152-1157
- **Benjelali B, Tantaoui-Elaraki A,Ismaili-Alaoui M, Ayadi A.,1986.** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plantes Méd Phytother, 155-167
- **Berche P. (2003).** Bactériologie générale. PCE M 2. Faculté de médecine Necker-Enfants malades (France). 89p.
- **Besombes C, 2008.** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de Doctorat de l'Université de la Rochelle.* France.

- **Bousbia N. (2004).** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antibactériennes. Thèse de Magistère. Option *Sciences Alimentaires*, INA. Algérie.
- **Boullard B, 2001.** Plantes médicinales du monde. Réalités et croyances. Edition Estem. Paris. P 177-178
- **Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A., Jawetz, Melnick, Adelberg's, 2004.** *Medical Microbiology*. 23rd Ed. International Edition, Singapore. P167-168.
- **Bruneton J, 1999.** Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> Ed Dunod Paris. 274p
- **Bruneton J, 1999.** Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, 3<sup>ème</sup> Edition Lavoisier, Paris.1120.
- **Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4<sup>ème</sup> éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, p 1288.
- **Bruneton, J., 2008.** Pharmacognosie – phytochimie, plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> éd., Paris, Tec&Doc-Éditions médicales internationales, p1188.
- **Burt S.A, 2004.** Essential oils : their antibacterial properties and potentiel applications in foods. *International journal of Food Microbiolog*, **94(3)**, 22-25.
- **Caillet S., Lacroix M. (2007).** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alime ntaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appl iquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).
- **Celikel N., and Kavas G. 2008.** Antimicrobial pooperies of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food science* , pp26-174-181.
- **Chaintreau A., Joulain D, Marin C, Schmidt CO, Vey M. GC-MS, 2003.**Quantitation of fragrance compounds suspected to cause skin reactions. *J Agric Food Chem*, vol 51 p398-403.
- **Chakou M., Bassou K., 2007.** Efficacités antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha Spicata* L issue de la région de Ouargla sur quelques germes pathogènes: *Echerichia coli*,

*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Etude supérieures, Université de Kasdi Merbah Ouargla, p69.

- **Chami F., 2005.** Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires in vivo application dans la prophylaxie et le traitement de la Candidose Vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, p266.
- **Cos P., Vlietinck A. J., Berghe D. V. , Maes L.,2006.** *Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof-of-concept.* Journal of Ethnopharmacology.106 p 290–302.
- **Coutouly G, Klein E, Barbieri E et Kriat M, 2006** – Travaux dirigés de biochimie, biologie moléculaire et bioinformatique, Biosciences et techniques. Ed. Doin. 346p.
- **Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., & Wyllie S.G. (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 170–175.
- **Cuvelier M.E, Berset C, et Richard H, 1990.** Use of a new test for determining comparative antioxidant activity of BHA, BHT,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols and extracts from rosemary and sage. *Sci. Aliments*. 10, 797-806
- **Cuvelier M-E., Richard H. et Berset C., 1992.** Comparaison of antioxidant activity of some acid phenols: structure-activity relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 324-325.
- **Cuvelier M-E., Richard H. et Berset C., 1996.** Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J.am.oil Chem.Soc.* 73, 645-652.
- **Dastidar S. G., Manna A., Kumar K A., Mazumdar K., Dutta N.K., Chakrabartary A.N., Motohashi N. et Shirataki Y., 2004.** Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 23, 99-102.
- **De Billerbeck V.G., Roques C., Vaniere P. & Marquier P., 2002.** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huile essentielle. *Hygiène* (Revue officielle de la société française d'hygiène hospitalière), **10**, 248-251.

- **Delarras C., 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. *Technique et Documentation. Lavoisier, Paris.*
- **Delaveau P., 1987.** Les Epices. Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments. Albin Michel Editeur. 372 p.
- **Dweck A C, 2002.** Herbal Medicine for the Skin. Their Chemistry and Effects on Skin and Mucous Membranes. *Personal Care Magazine.* 3(2), 19-21.
- **El Abed D, Kambouche N , 2003 :** les huiles essentielles , Edit DAR EL Gharb , Oran , 120 P.
- **Endrias A, 2006.** Bio – raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à l'Hibiscus sabdarfja L, et à l'Artemisia annua. Thèse de doctorat. Toulouse
- **Enrico V., Papini A., Baldo F., Zhan J. M., 2004.** Étude expérimentale du renfort de l'immunité par le sirop du père Michel (POE 20). Institut de Sciences Naturopathiques(ISN).C.R.A.O.
- **Euzeby J.P., 2008.** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. <http://www.bacdico.net>
- **Farooki A, 2005.** Cultivation of Spice Crops.3pp.
- **F. Bakkali A,B., Averbeck A.D., Averbeck A.M., Idaomar B., 2008,** Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, vol 46. P446-475
- **Fery-Hue F , 2005.** Le « romarin » : un traité manuscrit anonyme à travers l'Europe médiévale. Besançon : s.n., p.1, Colloque.
- **Fouché J.G., Marquet A et Hambuckers A., 2000.** Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament. *Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman*
- **Freeman L., Carel Y., 2006.** Aromathérapie. *NUTRA NEWS Science, Nutrition, Prévention et Santé.* <http://www.nutranews.org>
- **Gerhard K. H. Przemeck, Jim Mattsson, Christian S. Hardtke, Z. Renee Sung and Thomas Berleth, 1993.** Studies on the role of the *Arabidopsis gene* monopteros in vascular development and plant cell axialization .journal of physiological plant .vol 11p165-170.
- **Gildo P, 2006.** Précis de phytothérapie, Larousse Encyclopedie Memo, Edition Alpen, p 3-4.
- **Gordon R. E., Haynes W. C., Pang C.H.N., 1973.** The genus Bacillus. Agriculture Handbook. N° 427, ARS-USDA, Washington (USA).

- **Guerin-Faubleee V. & CARRET G., 1999.** L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées Nationales GTV- INRA, 5-12.
- **Guesmi a. et Boudabous A., 2006.** Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie- les Plantes à Parfum, aromatiques et médicinales. Faculté des Sciences de Tunis, Université Tunis - El Manar, 2002, Tunis.
- **Guy-gilly T, 2005.** Les plantes aromatiques et huiles essentielles à grasse. Harmattan, 2005. Pp.85-93.
- **Hart T. Et Shears P., 2002-** Atlas de poche de Microbiologie Flammarion Médecine Sciences. Paris, p213.
- **Hart K.J., Yáñez-Ruiz D.R., Duval S.M., McEwan N.R., Newbold C.J., 2008.** Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 147 : 8–35.
- **Helander I.M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M. & Vonwright A. (1998).** Characterisation of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46 (9)**, 3590-3595.
- **Hellal Z., 2011.** Des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des Citrus Application sur la sardine (*Sardina Pilchardus*). Magistère, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. pp1-8-45-78.
- **Hemwimon S, Pavasant P & Shotiprux A, 2007.** Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Séparation and Purification Technology*, **54**, 44-50.
- **Hernandez-Ochoa L.R, 2005.** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif ». D'origine végétale. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France
- **Inouye S, S .Abe, repot, 2003.** Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts *International Journal of Aromatherapy*, vol13 p33-41
- **Inouye S. et Abe S., 2007.** Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie*. **1**, 2-4.

- **Iserin P, Masson M et Restellini J P, 2007.** Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins .Ed Larousse, pp14
- **Jaset-Dongmo P.M., Tatsadjieu N.L., Tchinda Sonwa E., Kuate J., Amvam Zollo P.H. & Menut C., 2008.** Antiradical potentiel and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Eucalyptus saligna* and *E. camaldulensis* against *Phaeoramularia angolensis*. *African Journal of Biotechnology*, **7**, 4045-4050.
- **Jean-Claude Rameau et al., Flore forestière française: Région méditerranéenne, 2008**
- **Joly B. et Reynaud A., 2002.** Entérobactéries : Systématique et Méthode de diagnostic. Tec & Doc, Lavoisier.
- **KALEMBA ET KUNICKA., 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oil. *current Medicinal chemistry*, **10**: pp813-892.
- **Kareem S. O., Akpan I., Ojo O. P., 2008.** *Antimicrobial activities of Calotropis procera on Selected Pathogenic Microorganisms.* *African Journal of Biomedical Research.* **11** p 105-110.
- **Khadraoui Z et Ouanouki Y, 2001.** Contribution à l'étude bio écologique des peuplements d'Acridien (Orthoptera-caelifera) dans trois stations de la région Moudjbara W.Djelfa.
- **Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y.A., Millet J. & Chaumont J.P, 2004.** Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon sp.* Vis-vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **148**, 202-206.
- **Kunle, O., J. Okogun, 2003.** Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract *Phytomedicine* .Vol 10. p59-61.
- **Laoular M, 2003.** Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. Cas des espèces négligées et sous utilisées.p 25. Projet ALG/97/G31 PNUD. Alger. Hotel Hilton, 22 -23/01/2003
- **Lavigne J.P., 2007.** Effet des antibiotiques, mécanismes de résistance. 1er cycle - PCEM 2 - MB7 - Bactériologie- Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes, France.

- **Lee K.W, Kim Y.J, Lee H.J et Lee C.Y, 2003.** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7292-7295.
- **Lucchesi M.E, 2005.** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline : chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.
- **Lyons L. et Nambiar D., 2005.** Un guide pratique des plantes médicinales pour les personnes vivant avec le VIH. CATIE. 60p.
- **Mahmoud B. S. M., Yamazaki K., Miyashita K., Il-shik S., Dong-suk C., Suzuki T. , 2004.** Bacterial microflora of carp ( *Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology.* 21, 657-666.
- **Merens A. (2008).** Facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*. Saint-Mandé, Lyon. pp
- **Naik V, 2006.** Taxonomy of angiosperms.Ed. Tata MC Graw-Hill.105p
- **Narayana K R, Reddy M S, Chaluvadi M R et Krishna D R, 2001.** Bioflavonoids Classification, pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. *Indian Journal of Pharmacology.* 33, 2-16.
- **Nazli N.B.,2003 :** « Etude des huiles essentielles de quelques plantes Algérienne Caractéristiques chimiques et valorisation agronomique ».Thèse Magister en Science agronomique INA, 128P.
- **Nostro A., Germanò M. p., D'Angelo V., Marino A. et Cannatelli M.a. (2000)** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliquée.* 30 (5), p379.
- **Okoh O.O, Sadimenko A.P, Afolayan A.J, 2010.** Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis L.* obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods *Food chemistry* 120, 308-312.
- **Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z. & Naghdibadi H., 2007.** Antifungal activity of tyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus xavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control,* 18, 1518-1523.
- **OUASSILA T, 2010-** Etude phytochimique de plantes medicinales du nord et du sud algeriens. Thèse doctorat université mentouri-constantine. 248p

- **Ouraini D., Agoumil A., Ismaili-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y., Amrani M. & Bellabas M.A. (2005).** Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*, **4**, 147-157.
- **Oussalah M., Caillet S., Saucier L. & Lacroix M., 2006.** Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **69 (5)**, 1046-1055.
- **Oussou K.R., Coffi K., Nathalie G., Seriyolou, Gerard K., Mireille D., Yao T.N., Gilles F. & Jean-Claude C.H. (2004).** Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus de Chimie*, **7**, 1081-1086.
- **Panda H, 2009.** Aromatic Plants Cultivation, Processing And Uses. Azhar Ali.
- **Pednault K, Léonhart S, Angers P, Gosselin A, Ramputh A, Arnason J.T et Dorais M, 2001)** Influence de la culture Hydroponique de Quelques Plantes Médicinales sur la Croissance et la Concentration en Composés Secondaires des Organes Végétaux. Texte de conférence-5<sup>ème</sup> Colloque sur les produits naturels d'origine végétale. Université Laval, Qc, Canada. 2p.
- **Peiffer B., 2000.** Intoxications causées par *bacillus cereus*. file <http://www.bacillus cereus.htm>
- **Pellerin, P. 1991.** Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour and perfume industry. *Perfum. Flavor*. **16,4**, 37-39.
- **Péron J, 2006.** Références productions légumières. 2.S.I : Lavoisier.pp.
- 560-563.
- **Pibiri M.C,2005.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctorat. Polytechniques Fédérale de Lausanne, 47-50.
- **Polese, 2006.** La culture des plantes aromatiques.5pp.
- **Ponce A.G., Fritz R., De Lvalle C. et Roura S.I., 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol*, **36** :pp679-684.
- **Pool E, K. 2001.** Multidrug resistance in Gram-negative bacteria-current opinion in Microbiology, **4**:pp500-508.



- **Porter N. 2001.** Essential oils and their production. Crop & Food Research. Number 39.
- **Pourmortazavi S.M. & Hajimirsadeghi S.S., 2007.** “Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis” *Journal of Chromatography A*, **1162**,
- 2-24.
- **Prasad R. et Kapoor K., 2004.** Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol*, 242 :pp215-248.
- **Rai M. K., Acharya D. et Wadegaonkar P., 2003.** Plant derived-antimycotics: Potential of Asteraceous plants, In: *Plant-derived antimycotics: Current Trends and Future prospects*, Haworth press, N-York, London, Oxford. 165-185.
- **Richard H. et Multon J.L., 1992.** Les arômes alimentaires. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 438 p.
- **Ricke SC, Ellen J, Loo V, Johnson M.G, 2012.** Organic Meat Production and Processing . EDITION Aptara . India. P367
- **Salle J-L et Pelletier J .,1991 :** Les huiles essentielles :synthèse d’aromathérapie et introduction a la sympathicothérapie. ; édition FRISON-ROCHE .PARIS (France) ; 24-25pp ;167P.
- **Scimeca D et Tetau M, 2005-** Votre santé par les huiles essentielles :
- **Schnaubelt K. (1998)** Advanced Aromatherapy. Vermont:Healing Arts Press.
- **Scientific Correspondence, 2003.** Broad spectrum antimycotic drug for the treatment of ringworm infection in human beings. 85(1), 30-34
- **Sell Y, Benazra C, Guerin B, 2002.** Plantes et réactions cutanées. Edition John Libbey Eurotext. France. P 126.
- **Shellie R, Marriott P, Chaintreau A, 2004.** Quantitation of suspected allergens in fragrances : evaluation of comprehensive two-dimensional GC for quality control, *Flavour and fragrance journal* – Wiley Online Library, vol 19 p 91-8.
- **Southwell I.A., Hayes A.J., Markham J. and Leach D.N. 1993. Acta Horticult., 344, 256–265.** In **Ahmad I., Aqil F. and Owais M., 2006.** Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into drugs. Ed. Wiley-Vch Verlag GmbH et Co. KGaA, Weinheim, p405.
- **Silberfeld T,2012.** Plantes mellifères (le romarin).2p.
- **Sleigh Douglas J., Timbury Morag C (1998).SMADJA J , 2009.** Les Huiles Essentielles Colloque GP3A – Tananarive 2-3 juillet 2009

- **Smadja J, 2009.** Les huiles Essentielles colloque GP3A – Tananarive 2-3 juillet 2009.
- **Smallfield B., 2001.** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crop & Food Research. Number 45, 4p.
- **Snoussi S A et al, 2003** – Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. Cas des plantes maraichères, industrielles, condimentaires, aromatiques, médicinales, 2003, 79p. Projet ALG/97/G31 PNUD, Alger, Hotel Hilton, 22-23/01/2003.
- **Stefanovits-Banyai E, Tulok M.H, Hegedus A, Renner C, Szollosi Varga I, 2003** : Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) clones +.Acta Biologica Szegediensis.47 :111-113.
- **Suhr K.I. et Nielson P.V. (2003).** Antifungal activity of essential oil evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi . *Journal of Applied Microbiology*. **94**: 665-674.
- **Svoboda K.P and Hampson J.B, 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants : antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related. Pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auuchincruiven Ayr, Scotland, UK, KA6 5HW 4, p202-208.
- **Takeoka G., 1998.** Flavor chemistry of vegetables. In Flavor chemistry. Thirty years of progress. Teranishi R. et al. (Ed.). Cluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 287-304.
- **Teixeira-Duarte M.C., Mara Figueira G. & Sartoratto A., 2005.** Anticandida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **97**, 305-311.
- **Wilson C. L., Solar J. M., El Ghaouth A. et Wisniewski M. E., 1997.** Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Dis.81, 204-210.

## Annexe 1

### 1- Coloration de Gram

Cette méthode permet de différencier les bactéries en Gram + (positif) dotées d'une simple paroi avec une grande quantité de peptidoglycane à celles Gram – (négatif) composées de moins de peptidoglycane mais pourvues d'une membrane externe supplémentaire

- **Mode opératoire :**

- ✓ **Réactifs**

- Violet de Gentiane ;
- Solution de Lugol ;
- Alcool ;
- Solution de la Fushine

- ✓ **Réalisation des frottis**

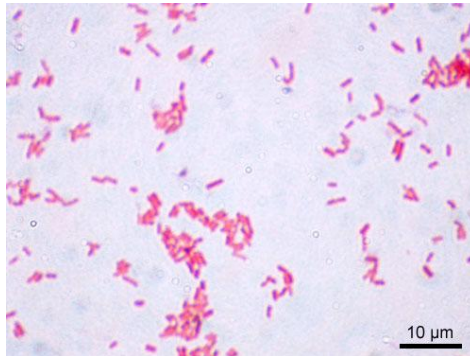
- Prendre une goutte de l'échantillon à analyser sur une lame parfaitement dégraisser ;
- Etaler l'échantillon en couche mince ;
- Sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme de bec Bunsen.

- ✓ **Réalisation de la coloration**

- Colorer au violet de Gentiane, laisser agir 3 minutes. Jeter le colorant après ;
- Rincer à l'eau de robinet ;
- Remettre la solution de Lugol, laisser agir 1 minute 30 secondes ;
- Décolorer a l'alcool jusqu'a décoloration totale ;
- Laver à l'eau de robinet ;
- Recolorer à la solution de Fushine fraîchement diluée à 1/10, laisser agir 1 minute ;
- Laver à l'eau de robinet ;
- Laisser sécher,
- lire avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 Résultats

## ✓ Résultats

- Les bactéries Gram+ : ne décolore pas par l'alcool, colore en violet
- Les bactéries Gram – : décolore par l'alcool , colore en rose



## 2- Test de Blatèse

### Identification de *Candida albicans*: le test de BLASTESE (test de TASCHDJIAN ou test de filamentation).

Microscopiquement il est impossible d'identifier les levures en bourgeonnement. Pour l'identification de *Candida albicans* on procède de la manière suivante:

Une suspension homogène d'une colonie de levures obtenues sur milieu de SABOURAUD + chlaramphénicol est réalisée dans 0,5 ml de sérum humain ou animal. Après 3 heures d'incubation à 37° C, une goutte de cette suspension est examinée au microscope. Le test est positif si environ 50% des levures présentent un "tube de germination" (et non un bourgeonnement) flexueux dont la longueur atteint au moins trois fois celle du diamètre de la levure.

## 3- Méthode Mc Ferland

Normes Mc Farland sont utilisées comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes de telle sorte que le nombre de bactéries sera dans une plage donnée.

Original normes Mc Farland ont été mélangeant des quantités spécifiées de chlorure de baryum et d'acide sulfurique ensemble. Mélange des deux composés forme un précipité de sulfure de baryum, ce qui provoque la turbidité dans la solution. A 0,5 standard Mc Farland est préparé en mélangeant 0,05ml de chlorure de baryum dihydrate 1,175% ( $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), avec 9,95ml d'acide sulfurique à 1% ( $H_2SO_4$ ).

## Annexe 2

### Généralité sur les espèces bactériennes utilisées

#### 1- *Staphylococcus aureus* :

- **Caractères bactériologiques :**

*Staphylococcus aureus* ou le staphylocoque doré est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Il se présente comme une coque, Gram positif, groupé en amas (grappe de raisin), catalase positive, immobile. Leur taille varie entre 0,5 à 1,5µm. Leur culture est plus facile sur milieu aérobie qu'anaérobie. Leur température optimale de croissance est de 37°C.

- **Habitat, pouvoir pathogène :**

*Staphylococcus aureus* est retrouvé chez 15 à 30% des individus sains au niveau des fosses nasales et de la gorge. Il est retrouvé en faible quantité dans le tube digestif, la bactérie est disséminée sur la peau du visage et des mains par aérosols.

Cette bactérie partage avec le *P.aeruginosa* le premier rôle dans les infections hospitalières, elle est responsable des abcès, des plaies, des septicémies, des pneumonies et de l'intoxication alimentaire (**Sleigh et Timbury, 1998**). Elle est responsable de 95% des cas des contaminations alimentaires à cause d'un manque d'hygiène. (**Dellaras, 2007**)

#### 2- *Enterococcus faecalis*

- **Caractères bactériologiques**

Sont des cocci en courtes chaînes à Gram positifs de la famille des Enterococcaceae, fermentent le glucose sans production de gaz et ne produit pas de réaction catalase Anaérobies facultatifs aérobies tolérants, Culture facile sur géloses au sang, sont larges (0,5-1µm)

- **Pouvoir pathogène, habitat**

Elle se trouve dans le tube digestif humains et d'autres mammifères, causer des infections mortelles chez l'homme et le singe, particulièrement dans un environnement hospitalier. Le haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques de la bactérie contribue à sa pathogénicité et au risque nosocomial.

Elle peut aussi déclencher des inflammations chroniques de l'intestin, ainsi que des infections de la vessie, de la prostate, Les infections du système nerveux sont plus rares.

### 3- *Bacillus cereus*

- **Caractère bactériologiques**

Les *Bacillus cereus* sont des bacilles à Gram positif, aux extrémités arrondies, généralement mobile grâce à une ciliature péritriche, de 1 à 1,2 µm de large sur 3 à 7µm de long, catalase +

Les colonies ont un diamètre compris entre 2 et 7 mm, elles sont soit circulaire soit de forme irrégulière avec des bords ondulés, leur aspect est crémeux et lisse ou mat ou granuleux **(Euzeby, 2008)** .

- **Pouvoir pathogène, habitat**

*Bcillus cerus* est un germe ubiquiste. Bactérie vivant dans les sols et dans les eaux, peut survivre dans l'environnement sous forme de spores. Elle peut contaminer surtout des aliments d'origine végétale ( riz, épice) et de nombreux plats cuisinés. *B.cereus* se comporte comme un pathogène opportuniste et cette espèce est également responsable de toxi-infections alimentaires **(Peiffer, 2000)**. Il est également un contaminant des drogues (héroïne) et de médicaments qui peuvent contaminer des plaies **(Euzeby, 2008)**

### 4- *Escherichia coli* :

- **Caractère bactériologiques**

*Escherichia coli* est l'espèce type du genre *Escherichia* des entérobactéries. Appelée communément « colibacille » c'est-à-dire « bacille à colon », cette espèce qui a fait l'objet d'un très grand nombre d'études constitue le modèle des bacilles à Gram – aérobies. La plupart des *E.coli* se multiplient rapidement (18 à 24h) sur les milieux habituels. Les colonies ont en moyenne 2mm de diamètre, elles sont rondes, plates et à bords réguliers **( Joly et Reynaud, 2002)**

- **Pouvoir pathogène, habitat**

C'est l'une des espèces bactériennes le plus souvent rencontrées en pathologie humaine, hôte de tube digestif de l'homme et des animaux **(Chakou et al, 2007)**, responsables des infections urinaires, septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastro-entérites **(Hart et Shears, 2002)**. Elle cause de violentes douleurs abdominales et des diarrhées sanglantes **(Joly et Reynaud, 2002)**.

### 5- *Pseudomonas aeruginosa*

- **Caractère bactériologiques**

Bâtonnets droits ou incurvés à Gram-, mobiles, les flagelles sont polaires, aérobies stricts. En général catalase+, oxydase+, incapable de fermenter le glucose. La température optimale de culture est de 37°C, mais se cultive à 41°C.

Les souches de cette espèce sont constituées de bacilles de 0,5 à 0,8 µm de diamètre sur 1,5 à 3,0 µm de longueur, se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou en courtes chaînes, mobile. *P.aeruginosa* exprime un pigment vert nommé pyocyanine.

- **Pouvoir pathogène, habitat**

Selon Palleroni, 1984, *P.aeruginosa* est une espèce bactérienne ubiquitaire. Elle vit à l'état saprophyte dans l'eau et les sols humides ou à la surface des végétaux. Elle vit également à l'état commensal dans l'intestin de l'homme et des animaux (**Merens, 2008**). Elle est caractéristique des milieux hospitaliers et colonise souvent les tube digestif humain.

*P.aeruginosa* constitue une cause majeure d'infections nosocomiales diverses chez les personnes fragilisées ou immunodéprimées comme les personnes âgées ou les nouveau-nés ainsi que les cancéreux (**Dellarras, 2007**)

Il peut engendrer des infections urinaires, oculaires ou pulmonaires et infecter des plaies profondes en entraînant un choc septique.

### Annexe 3



**Agitateur**



**La hôte**



**Filtration et préparation de l'extrait methanolique sous l'hôte**





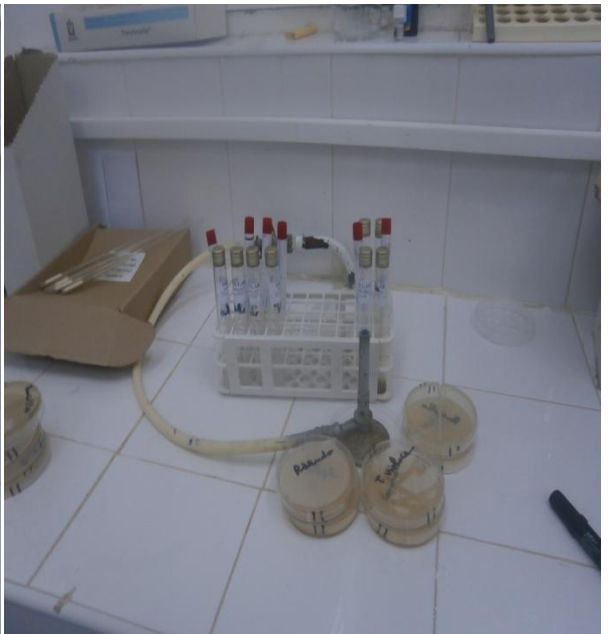
**Etuve**



**Renouvellement des souches microbiennes : Ensemencement par stries**



**Préparation de pré culture**



**Ensemencement de l'écouvillon (chargé de suspension bactérienne) sur M.H**