

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Sâad Dahlab de Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Biotechnologies

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention
Du Diplôme de Master 2 académique

Spécialité : Agroressource et environnement
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Titre du mémoire

L'effet Comparatif des huiles essentielles et des extraits
méthanolique du romarin (*Rosmarinus officinalis*) de deux
régions (Blida-Djelfa)

Présenté par :

BOUKERCH Meriem

BARKI Hanane

Devant le jury composé de :

Mme ALLAL BENFEIKH L.	Professeur	USDB1	Président de jury
Mme BENREBIHA F. Z.	Professeur	USDB1	Promotrice
Mme MOUAS Y.	Doctorante	USDB1	Co-promotrice
M. HADJ SADOK T.	MCA	USDB1	Examineur

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Louange à **DIEU** le tout puissant qui nous a donné la santé, le courage et qui nous a guidés vers le savoir.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à notre promotrice, **M^{me} BENREBIHA F. Z.** pour son aide, sa disponibilité et sa confiance.

M^{me} MOUAS Y. notre Co-promotrice, nous a fait profiter de son expérience, ses conseils ; nous la remercions pour avoir accepté de participer à cette aventure.

Nous tenons à remercier vivement les membres du jury :

- **Mme ALLAL BENFEIKH L.** d'avoir accepté de présider le jury ;
- **M. HADJ SADOK T.** d'avoir aimablement accepté d'examiner ce mémoire.

Nos vifs remerciements s'adressent également à :

- **M. DJAZOULI**, Professeur au Département des biotechnologies à l'USD Blida 1, pour son inestimable aide et sa disponibilité.
- **M. Djemel**, Chef de service du laboratoire d'hygiène de référence de la wilaya de Blida.
- **M. BOUTOMI**, Enseignant au Département de Chimie Industrielle USD Blida 1.
- **Mme GUENNAI G.** et **EL-AICHI Z.**, Ingénieur de laboratoire de physiologie végétale au Département des biotechnologies à l'USD de Blida 1.

Enfin, nous remercions toute personne qui nous a soutenus de près ou de loin pour réaliser ce modeste travail.

Meriem et Hanane

Dédicaces

*Je dédie tout mon travail aussi modeste qu'il soit et à la grande valeur qu'il représente aux deux êtres qui me sont chers : **mes parents** BOUKERCH MOHAMED ET BOUABEDELLEH FATIHA et ; qui ont toujours été disponibles pour moi, qui m'ont tout donné sans rien attendre en retour, qui ont apaisé mes peines et qui ont fait de ma vie un éternel moment de bonheur, d'amour et d'affection.*

A toute ma famille, mes défunts parents HAMDI, mes frères HICHEM, OUSSAMA, ANISSE, mes sœurs RADJAA, ISLEM, mon mari Fayçal, mon fils AKRAM, mes amis (es) et à tous ceux qui ont croisé mon parcours de loin ou de près et qui ont fait que m'apporter d'avantage.....

MERIEM BOUKERCH

Dédicaces

Disposant d'une seule page, il m'est très difficile de dédier ce modeste travail tant sont nombreux les proches, amis ou famille, qui mériterai d'être cités.

Cependant, je tiens à commencer par les êtres qui me sont les plus chers au monde :

Ma mère, qui méritera si cela pouvait suffire- la vie éternelle.

Un être aussi cher à moi, mon père. C'est la personne en qui je n'arrête pas de m'identifier, mais dont la bonté et l'attention me sont impossibles à égaler.

À ma chère grand-mère ;

À Tous mes chers frères, chères sœurs et surtout Sara.

À mes très chères amies qui m'ont soutenues, encouragées et conseillées.

À toutes mes amies de promotion et de la cité résidentielle.

HANANE BARKI

Résumé

Dans le cadre de notre travail, nous avons essayé de déterminer le Rendement et réalisé des tests antimicrobiens des huiles essentielles et l'extrait méthanolique du ***Rosmarinus Officinalis*** de deux régions en Algérie : Blida et Djelfa.

Les huiles essentielles de *Rosmarinus Officinalis* ont été obtenues par entraînement à la vapeur d'eau.

D'après les résultats obtenus, il nous semble que le facteur environnemental, les conditions climatiques et géographiques qui changent d'une région à une autre, et la période de la cueillette, présentent un effet direct sur la production de l'huile essentielle.

Au cours de cette étude, nous avons signalé une différence dans la composition et le rendement en huiles essentielles (le rendement de la région du Blida est de 0.09%, et celui de la région de Djelfa est de 0.08%) entre les deux régions. Cette différence est probablement due à plusieurs facteurs.

Mots clés : Romarin. (*Rosmarinus officinalis*). Extraction, Huiles essentielles.

Summary

As part of our work, we tried to determine the qualitative and quantitative composition and antimicrobial tested essential oils of Rosmarinus officinalis two regions belonging to two (2) different floors: Blida and Djelfa.

Essential oils of Rosmarinus officinalis were obtained by stripping with steam.

From the results obtained, we believe that the environmental factor, climatic and geographical conditions vary from one locality to another, and the time of harvest, have a direct effect on the production of essential oil.

In this study, we reported a difference in the composition and yield of essential oils (the performance of the Blida region is 0.09 %, and the Djelfa region is 0.0 8 %) between the two regions. This difference is probably due to several factors.

Keywords: Rosemary. (Rosmarinus officinalis). Extracting essential oils.

ملخص

كجزء من عملنا ،حاولنا تحديد المردود و اجراء اختبار المضاد للميكروبات الخاص بالزيوت الاساسية ومستخلص الميثانول لاءكليل الجبل لمنطقتين مختلفتين البليدة و الجلفة.

تم استخراج الزيوت الاساسية من إكليل الجبل بتجريد مع بخار الماء .

ووفقا للنتائج التي تم الحصول عليها يبدو ان العوامل البيئية والمناخية، والظروف الجغرافية التي تتغير من منطقة الى اخرى ،ووقت الحصاد يكون لها تاثير مباشر على انتاج الزيت الاساسي.

خلال هذه الدراسة التي تشير لنا ان هناك فرق في تركيب ومردود الزيوت الأساسية

(مردود منطقة البليدة 0.09 % ، وذلك في منطقة الجلفة 0.08 %) بين المنطقتين .هذا الفرق ربما يرجع الى عدة عوامل.

الكلمات الرئيسية إكليل الجبل (روزماري) ، استخراج الزيوت الأساسية

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ATCC : America Type Culture Collection.

°C : degré Celsius.

C : concentration

C1: 62.5mg/1ml DMSO.

C2:120mg/1ml DMSO.

cm : centimètre.

C/N : rapport carbone sur azote est un indicateur qui permet de juger du degré d'évolution de la matière organique.

CO₂ : dioxyde de carbone.

cm : centimètre.

DMSO : Dimethylsulfoxyde.

d : densité.

E.coli : Escherichia coli.

EM : Extrait méthanolique.

EMBC1 : extrait méthanolique de romarin de la région de Blida à concentration(1)
(C1=62.5mg /1ml DMSO).

EMDC1 : extrait méthanolique de romarin de la région de Djelfa concentration(1)
(C1=62.5mg /1ml DMSO).

EMBC2 : extrait méthanolique de romarin de la région de Blida à concentration(2)
(C2=120mg /1ml DMSO).

EMDC2 : extrait méthanolique de romarin de la région de Djelfa à concentration(2)
(C2=120mg /1ml DMSO).

g : gramme.

g / l : gramme par litre.

H.E : Huile Essentielle.

HEB : Huile essentielle BLIDA.

HED : Huile essentielle Djelfa.

ha : hectare.

h : heure.

Kg : kilogramme.

Km² : kilomètre carré.

KOH : hydroxyde de potassium.

meq : milliéquivalent.

M_{HE} : Masse de l'Huile Essentielle.

mn : minute.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

mg : milligramme.

M_{mv} : Masse de la matière végétale.

MV : Matière Végétale.

MF : matière fraîche

MS : matière sèche

mol/l : mole par litre.

Na₂ SO₄: sulfate de sodium.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pH: potentiel d'hydrogène.

P : Pluviométrie.

P.S : Période sèche.

R_{HE} : Rendement en Huiles Essentielles.

R1: Répétition1.

R2: Répétition2.

R3: Répétition3.

V_{HE} : Volume de l'huile Essentielle.

W : Wilaya.

% : pourcentage.

° : degré.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des différents procédés d'extractions...	16
Tableau 2 : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à cinéol et camphre) de l'espèce <u>Rosmarinus officinalis</u>	25
Tableau 3 : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à verbénone) de l'espèce <u>Rosmarinus officinalis</u>	26
Tableau 4 : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à cinéol) de l'espèce <u>Rosmarinus officinalis</u>	26
Tableau 5 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle du romarin.....	27
Tableau 6 : Les normes AFNOR d'HE de <u>Rosmarinus officinalis</u>	28
Tableau 7 : Souches microbiennes et leurs origines.....	38
Tableau 8 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE de Romarin.....	43
Tableau 9 : Rendement en huiles essentielles du Romarin (<u>Rosmarinus officinalis</u>).....	46
Tableau 10 : Résultats des zones d'inhibition.....	48

Liste des Figures

Figure 1 : Glandes capitées sur des feuilles de <i>L. multifida</i> (microscopie optique).....	07
Figure 2 : Trois types de trichomes sur calice de <i>Lavandula angustifolia</i> (MEB x50012kV).....	08
Figure 3 : Schéma du principe de la technique de distillation simple (Lucchesi, 2005).	12
Figure 4 : Schéma du principe de la technique d'hydrodiffusion (Smadja, 2009).....	13
Figure 5 : Photo montrant un système d'extraction assistée par micro-ondes (Smadja, 2009).....	15
Figure 6 : Principe de la méthode d'aromatogramme.....	19
Figure 7 : Méthode de micro atmosphère.....	20
Figure 8 : Sommité fleurie et fleur isolée de <i>Rosmarinus officinalis</i>	23
Figure 9 : <i>Rosmarinus officinalis</i> (photo originale 2016).....	37
Figure 10 : Romarin sèches (photo originale).....	39
Figure 11 : Clevengère (photo originale 2016).....	40
Figure 12 : Huiles essentielles des régions Blida et Djelfa.....	41
Figure 13 : Etuve.....	Annexe 3
Figure 14 : Les étapes de préparation de l'extrait méthanolique.....	42
Figure 15 : Carte de Blida (source : Carte Microsoft 2006).....	37
Figure 16 : Carte de Djelfa (source : carte Microsoft 2004).....	38
Figure 17 : Rendement en huile essentielle du Romarin.....	46
Figure 18 : L'huile essentielle de romarin.....	47
Figure 19 : Photos originale (témoins).....	Annexe 3
Figure 20 : (Photos originale) : Effet antimicrobien de l'huile essentiel Blida.....	49
Figure 21 : Photos originale : Effet antimicrobien de l'extrait méthanolique Blida.....	50
Figure 22 : Photos originale : Effet antimicrobien de l'huile essentielle Djelfa.....	50
Figure 23 : (Photos originale) : Effet antimicrobien de l'extrait méthanolique Djelfa.....	51
Figure 24 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis l'HE.....	Annexe 3
Figure 25 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour <i>Streptococcus aureus</i>	

vis-vis l'HE.....	Annexe 3
Figure26 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis l'HE.....	Annexe 3
Figure27 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour <i>Streptococcus aureus</i> vis-à-vis l'EM.....	Annexe 3
Figure28 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis l'EM.....	Annexe 3
Figure29 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis l'EM(c=120mg/1ml DMSO).....	Annexe 3
Figure 30 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour <i>staphylococcus aureus</i> vis-à-vis l'EM(c=120mg/1ml DMSO).....	Annexe 3
Figure31 : Histogramme présent les zones d'inhibition pour <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis l'EM(c=120mg/1ml DMSO).	Annexe 3
Figure32 : Histogramme présentant les zones d'inhibition avec les deux HE (Blida, Djelfa).	51
Figure33 : Histogramme présentant les zones d'inhibition avec les deux EM (Blida, Djelfa).....	51
Figure34 : Histogramme présent les zones d'inhibition avec les deux EM (Blida, Djelfa).....	52

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : Généralité sur les plantes médicinales et aromatiques.....	3
1. Importance des plantes médicinales et aromatiques.....	3
2. Utilisation des plantes médicinales et aromatiques.....	4
3. Métabolites secondaires et Activité Biologique	4
3-1. Composés phénoliques.....	5
3-2. Alcaloïdes.....	6
3-3. Les huiles essentielles.....	6
Chapitre II : Considérations générales sur le romarin.....	22
1. Romarin : <u>Rosmarinus officinalis</u>	22
2. Huile essentielle du <u>Rosmarinus officinalis. L</u>	24
Chapitre III : Généralités sur le monde microbien.....	32
1-Rôle des microorganismes dans les maladies	32
2-Infection	32
3-Bactériologie médicale.....	32
4-Bactéries Gram négatif.....	33
5-Bactéries à Gram positif.....	34
6- Résistance des bactéries Gram- à certaines huiles essentielles	35
7-L'activité biologique d'huiles essentielle.....	35
8- Mécanismes d'action des huiles essentielles sur les bactéries.....	36
Chapitre IV : Matériels et méthodes.....	37
1. Matériel végétale utilisé.....	37
2. Présentation des régions d'étude	37
3. Matériel biologique.....	38
4. Traitement du matériel végétal.....	38
5- Localisation du lieu d'expérimentation.....	39
6. Extraction de l'huile essentielle de <u>Rosmarinus officinalis</u>	39
7- Préparation de l'extrait méthanolique.....	41
8- Paramètres étudiés.....	43
9. Technique en milieu solide : Méthode des aromatogrammes et méthode de micro atmosphères.....	44
Chapitre V : Résultats et discussion.....	46

1. Rendement en huile essentielle.....	46
2. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de Romarin <u>(Rosmarinus officinalis)</u>	47
3. Résultats des Tests antimicrobien.....	47
Conclusion	55
Références bibliographiques	56
Annexes	67

Introduction

Depuis longtemps, les grandes civilisations (chinoise, égyptienne, babylonienne, grecque, romaine, etc.) ont eu recours aux plantes médicinales pour leurs propriétés thérapeutiques, cosmétiques, chimiques, diététiques, pharmaceutiques, agro-alimentaires et industrielles. Actuellement, la médication, par les plantes, connaît un regain d'intérêt notable (Demoulin, et al. 2009).

Au moins 35 000 espèces végétales sont utilisées dans le monde à des fins médicales. Alors que les médicaments industriels les plus importants sont produits à partir de 90 espèces environ. Les plantes sont donc la source principale de substances actives. Selon des estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé, elles représentent environ 70 % des matériaux de base des produits pharmaceutiques modernes. (Kasperek, et al. 2008).

Le Romarin (*Rosmarinus Officinalis*) est une herbe stimulante, à l'odeur forte et reconnaissable, qui a une vertu antispasmodique et qui est prescrite, encore de nos jours, pour les bronchites. En médecine homéopathique traditionnelle, on l'utilise dans plusieurs diagnostics : asthme, palpitations, vomissements, grippe, fièvre typhoïde. On le donne aussi pour faciliter la digestion et plus particulièrement la sécrétion biliaire. Les agents actifs du romarin résident à la fois dans l'huile volatile de ses feuilles en forme d'aiguilles, dans plusieurs flavonoïdes (apigénine, diosmétine) qu'il contient et dans l'acide rosmarinique (Gagnon, 2005).

Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles peuvent ainsi être mises à profit dans le but d'améliorer la conservation des aliments et d'améliorer des produits pharmaceutiques et cosmétiques. De même, les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et de leur gravité (Basli et al., 2011). La situation est plus préoccupante du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à plusieurs antibiotiques ce qui constitue un problème de santé important à l'échelle mondiale (Benbrinis, 2012).

Bouxid (2012), mentionne que les soins par les médicaments présentent, à des degrés divers, les risques d'effets indésirables, quelque soit la voie d'administration comme : nausées, diarrhée, douleurs épigastriques, ulcère gastroduodéal, hémorragie digestive et réaction d'hypersensibilité.

En effet, ces dernières années, les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les polyphénols, qui ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans le domaine pharmaceutique, cosmétique et alimentaire pour leurs effets bénéfiques pour la santé.

Dans cette optique se situe notre étude dont les objectifs principaux se résument dans les volets suivants :

- Extraction de l'huile essentielle à partir d'une plante aromatique « *Rosmarinus officinalis* » de deux régions Blida, Djelfa et évaluation de rendement (%).
- Faire l'extrait méthanolique de « *Rosmarinus officinalis* » de deux régions Blida, Djelfa.
- Evaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de l'H.E extraite et l'extrait méthanolique à deux concentrations différentes sur un ensemble de bactéries pathogènes.

Chapitre I - Généralités sur les plantes médicinales et aromatiques

1. Importance des plantes médicinales et aromatiques :

- **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 :**

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).

Les plantes ornementales indigènes et cultivées sont de plus en plus utilisées dans les aménagements paysagers. Cette tendance tend à se développer compte tenu de la popularité grandissante du jardinage et la tendance à la création d'espaces verts. A l'opposé des plantes cultivées (fleurs coupées, œillet, chrysanthème, les plantes indigènes disponibles sur le marché ne proviennent pas toutes de culture, plusieurs sont prélevées directement des milieux naturels (Snoussi, et al., 2003).

Les espèces négligées, sous-exploitées ou encore méconnues, peuvent contribuer aussi à la durabilité des systèmes de production agricole et au maintien de la biodiversité. L'Algérie, pays au relief difficile et ayant d'importantes régions naturelles encore peu transformées par les activités humaines, 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).

Les plantes négligées peuvent être divisées, selon (Laoular, 2003) en deux groupes selon qu'elles seraient cultivées ou spontanées :

- Les espèces jadis plus répandues et cultivées, mais dont la production est insuffisante par rapport à la demande du marché et aux potentialités du pays ;
- Les plantes spontanées exploitées pour leurs produits divers à des fins alimentaires, pastorales, condimentaires, aromatiques, médicinales, extraction d'huile, tannage...

Parmi les espèces fourragères et/ou pastorales, les plus utilisées en élevage, nous pouvons citer les espèces de : *Medicago*, *Hedysarum*, *Trifolium*, *Scorpiurus*, *Vicia*, *Lathyrus* parmi beaucoup d'autres. Certaines Poacées comme celles des genres suivants : *Festuca*, *Dactylis*, *Lolium*, *Aristida*, *Agropyrum*, *Oryzopsis* sont aussi d'un intérêt certain, mais leur conservation est encore peu organisée au plan national. Les espèces aromatiques utilisées en Algérie sont très variées mais ne font pas encore l'objet de conservation de leur patrimoine génétique.

En Algérie, bien que l'utilisation des plantes médicinales soit beaucoup plus répandue du fait d'une longue tradition d'herboristerie, aucune étude estimative n'a pu mettre en évidence quantitativement et économiquement leurs utilisations dans la pharmacopée bien qu'une grande partie des plantes médicinales d'Algérie soient inventoriées avec leurs effets (armoise blanche, thym, sauge à feuilles de verveine, etc.) (Snoussi, et al., 2003).

2. Utilisation des plantes médicinales et aromatiques :

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, depuis le XVIIIème 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 extraits 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 quinine qui est employée contre la malaria ou sans la diogoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes. La phytothérapie à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi "totum" plutôt que des extraits obtenus en laboratoire. Une plante entière est plus efficace que la somme de ses composants, les plantes contiennent des centaines voire des milliers de substances chimiques actives (Iserin, et al., 2001).

3-Métabolites secondaires et Activité Biologique :

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides. Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et huiles essentielles et les composés azotés, dont les alcaloïdes. Chacune de

ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques.

3-1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'un cycle aromatique portant au moins un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées, la structure de ces composés naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (Macheix et al, 2005). On peut citer :

3-1.1. Phénols simples et acides-phénols

Les phénols simples sont constitués d'un seul cycle phénolique substitué et les acides phénols sont des dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. Ils se sont révélés toxiques vis-à-vis des microorganismes et la toxicité relative de chaque dérivé est fonction du site et du nombre de groupements hydroxyles sur le cycle aromatique, ils sont aussi antiinflammatoires, antiseptiques urinaires, anti-radicalaires, hépatoprotecteurs, (Bruneton, 1999; Cowan, 1999).

3-1.2. Coumarines

Les coumarines sont des composés dont le squelette de base est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone. Ce sont des molécules biologiquement actives ; elles manifestent diverses activités : antimicrobienne, anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, diurétiques, antivirale et analgésique.

3-1.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Tous possèdent le même élément structural de base : le noyau flavane constitué de deux noyaux aromatique A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C (Bruneton, 1999 ; Reynaud et Lussignol, 2005). Ils se sont révélés être des substances antimicrobiennes actives in vitro contre un large spectre de microorganismes. Cette activité serait due à leur capacité à se complexer

avec les protéines extracellulaires solubles et à la paroi bactérienne (Cowan, 1999). Ils sont aussi connus pour leur activité antioxydante (Bruneton, 1999).

3-1.4. Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau et caractérisés par leur astringence. On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs deux groupes basés sur des différences structurales: les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables ou tanins condensés (Ghestem, 2001). Ils ont un effet anti diarrhéique; ils sont vasoconstricteurs et limitent la perte en fluides. Ces propriétés, ajoutées par ailleurs à leur effet antiseptique, en font des molécules intéressantes pour la régénération des tissus en cas de blessures superficielles et les rendent utilisables dans le traitement des diarrhées infectieuses (Bruneton, 1999). Certains sont aussi antioxydants.

3-1.5. Quinones

Les quinones sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou oranges et possédant deux fonctions cétones. On les trouve chez les végétaux et les bactéries (Bruneton, 1999). En plus d'être une source de radicaux libres stables, les quinones sont capables de se complexer de façon irréversible aux aminoacides des protéines et pour cette raison, ils possèdent un potentiel antimicrobien élevé.

3-2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés hétérocycliques. Certains alcaloïdes comme les alcaloïdes diterpénoïdes isolés des plantes de la famille des Ranunculaceae possèdent des propriétés microbicides.

3-3. Les huiles essentielles

3-3.1. Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés lipophiles, volatiles et souvent liquides qui sont stockés dans des tissus végétaux spécialisés et extraits des plantes grâce à des procédés physiques (Bruneton, 1993).

Les huiles essentielles ne sont pas présentes dans toutes les plantes, parmi les 800 000 espèces recensées, seules 10% sont capables de synthétiser une essence. Ces plantes sont alors dites « aromatiques ».

Bien qu'on les appelle huiles, ces substances ne contiennent aucun corps gras, contrairement à une huile végétale, une goutte déposée sur un papier s'évaporerait sans laisser de trace (Degryse et *al.*, 2008).

3-3.2. Localisation

Les huiles essentielles sont sécrétées dans différentes parties, variant selon la plante aromatique. Elles peuvent être de minuscules cellules épidermiques dans les pétales de la rose ou des poils sécréteurs disposés à la périphérie des calices floraux, des feuilles et des tiges chez les labiées (thym, sauge) ou de grosses cellules disposées au sein même des tissus végétaux : tiges, écorces, racines, feuilles et semences. Mais elles peuvent être aussi, et cela est beaucoup plus particulier, des cellules végétales en poches sécrétrices (Scimeca et Tetau, 2005)

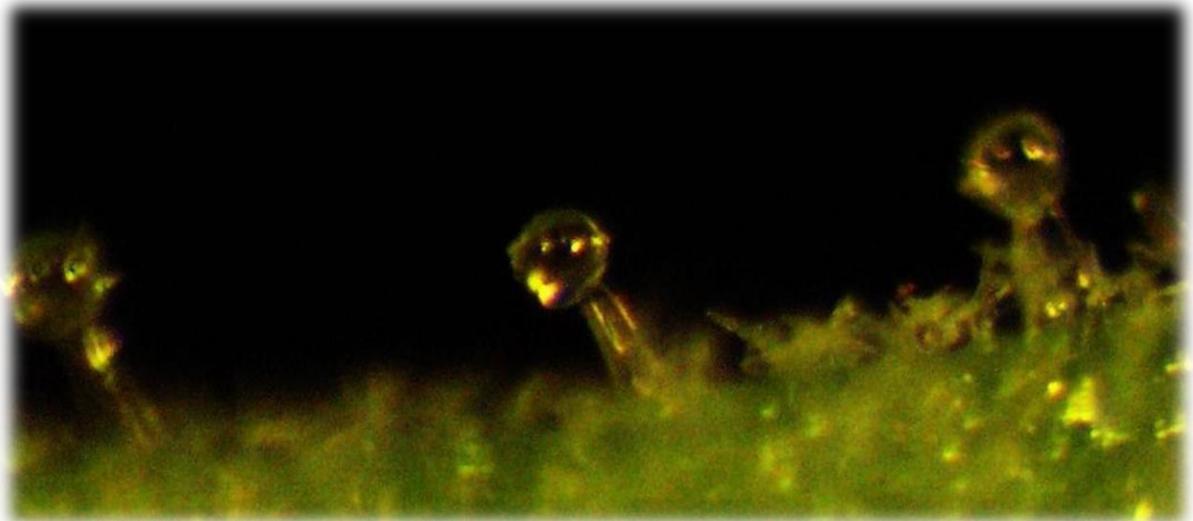


Figure 1 : Glandes capitées sur des feuilles de *L. multifida* (microscopie optique)
(Perrine et *al.*, 1986) .

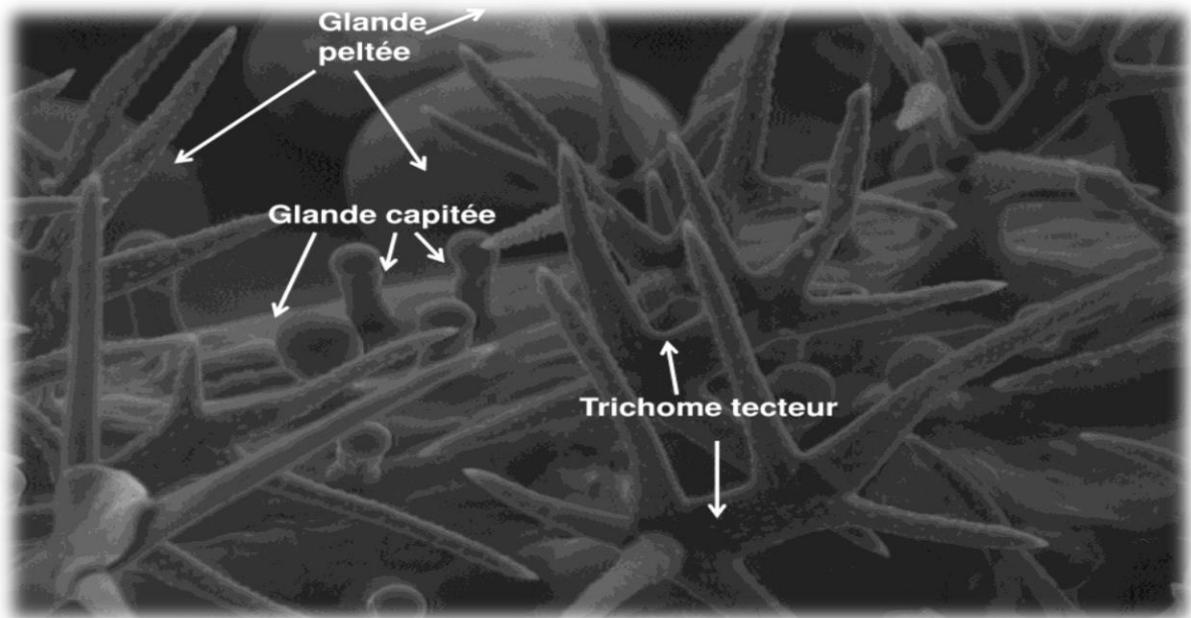


Figure 2 : Trois types de trichomes sur calice de *Lavandula angustifolia* (MEB x50012kV) (Perrin et *al.*, 1986).

3-3.3 Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles :

- ✓ Les huiles essentielles et essences possèdent des propriétés physiques proches les unes des autres avec quelques légères variantes en fonction de leur composition : A température ambiante, elles sont liquides, mais à plus faible température, bon nombre d'entre elles cristalliseront. D'une manière générale, une huile essentielle qui s'organise en réseau cristallin indique clairement une superbe qualité.
- ✓ Contrairement aux huiles végétales grasses avec lesquelles il ne faut pas les confondre, les huiles essentielles sont volatiles, ce qui explique leur caractère odorant et leur entraînement à la vapeur d'eau lors de distillation.
- ✓ Elles sont plus légères que l'eau (densité < 1), ce qui permet leur séparation dans l'essencier lors de leur extraction. Elles ne se mélangent pas à l'eau, se mélangent bien à l'alcool absolu et se diluent en toutes parts dans les huiles végétales grasses.
- ✓ Le pouvoir rotatoire marquant leur activité sur la lumière polarisée est une constante physique qui définit chaque huile essentielle. L'indice de réfraction souvent élevé est une autre constante physique mesurée par le réfractomètre.
- ✓ Elles sont diversement colorées (Baudry et *al.*, 2004).

3-3.4 Composition chimique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent à deux groupes : les terpènes et les composés aromatiques (Bruneton, 1999).

3-3.4.1. Les terpènes

Ils ont pour formule générale $(C_5H_8)_n$, généralement cyclique. Ils sont constitués du polymère de l'isoprène. Parmi lesquels on distingue les monoterpènes et les sesquiterpènes.

D'après Bellakhdar (1997), les monoterpènes sont des composés plus volatiles, ils sont les principaux composés rencontrés dans les huiles essentielles. Ils sont composés essentiellement de α -pinène, β -pinène, δ -terpinène, γ -caryophyllène, camphène, α -phéllandrène, β -phéllandrène, limonène et myrcène.

Les sesquiterpènes sont des composés caractéristiques des arômes produits par les plantes et donnent à celles-ci leur goût amer. Ce sont des composés généralement d'hydrocarbures: l'aromadendrène, allo-aromadendrène, β -caryophyllène et α -gurjunène (Azoudj, 1999).

Guignard (1985) et Bellakhdar (1997) signalent qu'à côté des hydrocarbures terpéniques se trouvent des dérivés oxygénés :

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

Il existe d'autres dérivés : les phénols et les dérivés phénoliques, avec les composés azotés et les composés soufrés.

3-3.4.2. Les composés aromatiques :

Les dérivés du phényle propane (Ce-Cs) sont beaucoup moins fréquents que les précédents, ce sont très souvent des allyles et des propénylphénols, parfois des aldéhydes caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiaceae telle que : « Anéthol, Anisaldéhyde, Apiol » mais aussi celle de girofle, de la muscade et de l'estragon (Bruneton, 1999).

Les huiles essentielles renferment aussi des composés odorants de Type « phenylpropanoïde » qui emprunte une voie biosynthétique dite de l'acide schikimique conduisant essentiellement à la synthèse de la « tyrosine » (Nazli, 2003).

3-3.4.3. Composés divers :

Lors de la distillation, certains composés aliphatiques (carbures, acides, alcools, aldéhydes, esters) sont entraînés.

Dans des composés non souhaitables, pesticides ou autres ayant été utilisés lors de la culture, peuvent également se retrouver dans l'huile essentielle (Bordeaux, 2009).

3-3.5 Facteurs de variabilité de la composition chimique des huiles essentielles :

Etant formées de mélanges généralement complexes, 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 différents facteurs, que nous pouvons regrouper en deux catégories :

- Facteurs intrinsèques, 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.
- Facteurs extrinsèques, en lien avec la méthode d'extraction.

3-3.5.1. Facteurs intrinsèques :

Les cellules productrices d'huile essentielle peuvent se situer dans différents organes, il est 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 nothomorph *spallescens*

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).

D'autres travaux ont mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première. Verzele et al, en 1981, ont constaté une composition différente des huiles essentielles de Jasmin, selon l'origine de la matière première (France, Italie et Algérie). En 1995, Bayrak et al, sont arrivés à une conclusion similaire dans le cas du Romarin, récolté dans 3 régions distinctes de la Turquie (Besombes, 2008).

3-3.5.2. Facteurs extrinsèques :

En 1987, Huang et al, ont montré l'influence des méthodes d'extraction sur la composition des huiles essentielles obtenues dans le cas de 4 méthodes appliquées au bergamote de Chine ; la composition est relativement variable, malgré une présence majoritaire de limonène. Des conclusions similaires sont obtenues par d'autres auteurs : Surburg et al, en 1993 à partir d'*Origanum majorana* ; Weinreich et Nitz en 1992 et Brieux et al, en 1997, à partir de *Lavandula angustifolia* (Besombes, 2008).

3-3.6. Méthodes d'extractions des huiles essentielles

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction des substances aromatiques. Cette opération est des plus difficiles et des plus délicates puisqu'elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborés par le végétal et cela, sans altérer la qualité (Lardry et Haberkorn, 2007).

Les huiles essentielles sont définies par leur mode de préparation, deux méthodes figurent la pharmacopée française : l'entraînement à la vapeur d'eau en suspension, la turbo distillation (procédé de distillation utilisant du matériel végétal broyé). L'hydro distillation par micro-ondes et l'extraction à froid au dioxyde de carbone, ou gaz carbonique. Toutefois ces procédés modifient quelque peu leur structure et ne sont pas admis par la pharmacopée (Arnal- Schnebelenib et al., 2004).

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

3-6.1. Distillation :

La distillation à la vapeur d'eau est une méthode ancienne et très répandue, pour l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques, elle est simple dans son principe et utilise un équipement peu coûteux. Elle se présente sous trois variantes : l'entraînement à la vapeur, l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion (Silou, 2004).

3-6.2. Distillation simple : (l'hydrodistillation)

C'est le procédé le plus ancien. La plante aromatique (entière ou broyée) placée dans un alambic est immergée dans l'eau, portée à ébullition, l'eau à l'état vapeur en passant à travers le matériel végétal entraîne l'huile essentielle ; elle est refroidie et condensée dans un serpentín. L'huile essentielle est séparée de l'eau par différence de densité dans un vase florentin. L'huile obtenue est une florale ou hydrolat aromatique, elle renferme des molécules aromatiques (moins de 5 %) (Raynaud, 2006)(figure3)

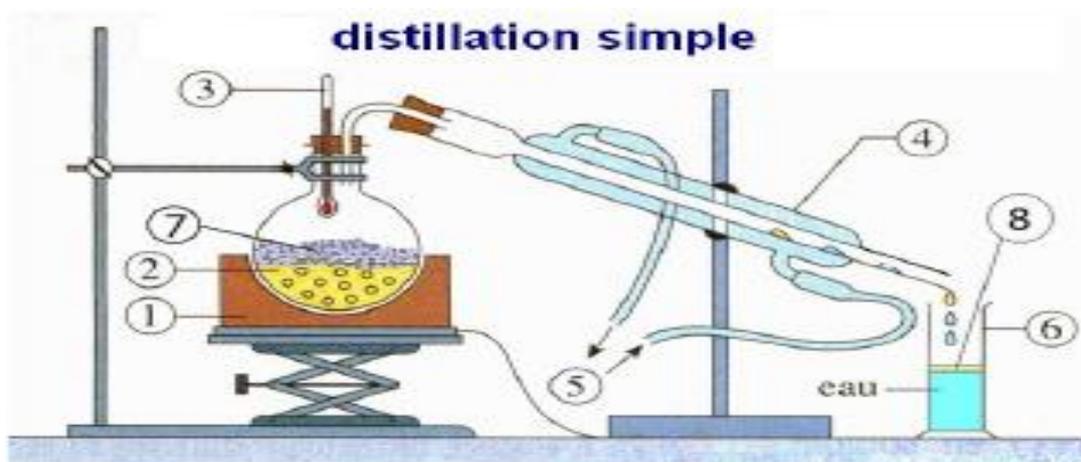


Figure 3 : Schéma du principe de la technique de distillation simple (Lucchesi, 2005).

- | | |
|-------------------|---------------------------------|
| 1- Chauffe ballon | 5- Entrée et sortie d'eau |
| 2- Ballon | 6- Erlenmeyer |
| 3- Thermomètre | 7- Matière à extraire l'essence |
| 4- Réfrigérant | 8- La couche d'H.E |

Procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: « essence de percolation » (Bruneton, 1999).

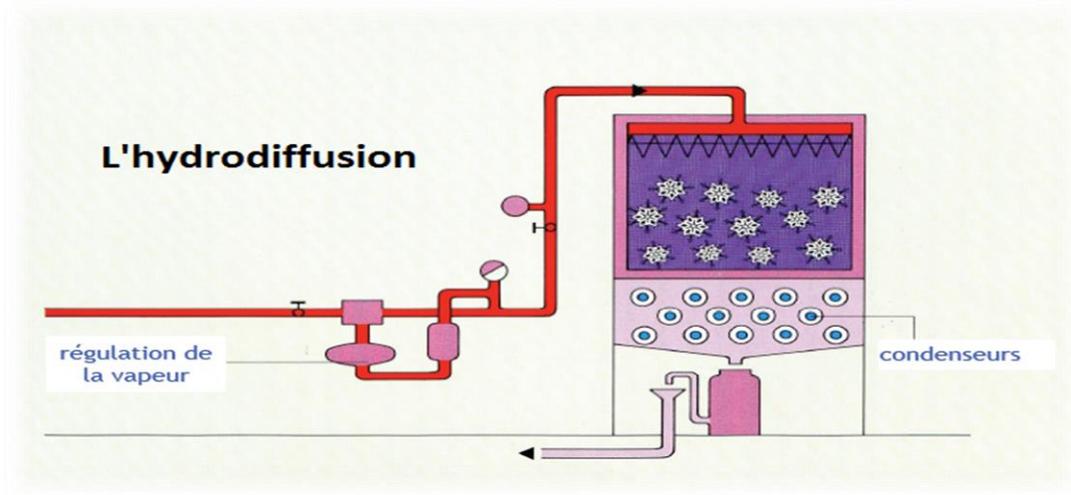


Figure 4: Schéma du principe de la technique d'hydrodiffusion (Smadja, 2009).

3-6.3. Enfleurage :

Cette méthode n'est presque plus utilisée, car elle est très coûteuse. Elle représente environ 3 % des cas. Ce sont des clayettes où l'on met un corps gras (graisse animale, type saindoux) on étale une couche de ces saindoux puis une couche de pétales de fleurs. Puis on recommence cette opération plusieurs fois.

On chauffe la clayette légèrement aux environs de 30 %. Le saindoux devient mou et se sature d'essence. Quand le saindoux se dissout, on met de l'alcool qui sert de vecteur à l'HE. On effectue ensuite la séparation par évaporation sous vide (Sallé, 1991).

3-6.4. Expression à froid :

Il s'agit de la méthode la plus simple mais malheureusement la plus limitée puisqu'elle ne peut être pratiquée que pour les fruits de tous les citrus (*Rutaceae*) : citron, bergamote, limette, pamplemousse, orange douce, bigardier, hythrix.....etc. La méthode artisanale consiste à faire éclater les poches à essences contenues dans le zeste frais du fruit à l'aide d'un genre de cuillère en bois puis d'en récolter l'essence.

Ainsi libérée mécaniquement avec une éponge qui, à son tour, comprimée rendra l'essence du végétal. Dans cette situation, et uniquement celle-là, le terme correctement utilisé est l'essence car il n'y a pas eu de modification de sa structure biochimique lors du procédé d'extraction (Baudry et al., 2004).

3-6.5. 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 la plus pratiquée avec l'hydrodistillation. Elle consiste à épuiser la matière première de ses constituants odorants au moyen d'un solvant, puis à chasser celui-ci de l'extrait par évaporation sous vide. Il existe deux cas particuliers, les hydrolats (extraction par solvant en présence d'eau) et les alcoolats (extraction avec de l'éthanol dilué) pour lesquels on récupère les composés odorants conjointement avec le solvant lors de la distillation pratiquée pour éliminer l'eau présente dans les isolats. Le choix du solvant dépend de nombreux paramètres techniques et économiques, notamment :

- La sélectivité (pouvoir solvant),
- La température d'ébullition (stabilité thermique des constituants),
- La miscibilité dans l'eau,
- La facilité de recyclage,
- La sécurité de manipulation : les solvants choisis seront, dans la mesure du possible, non toxiques tant pour le manipulateur que pour le consommateur.

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).

3-6.6. Extraction assistée par micro-ondes :

Depuis quelques années, on assiste au développement de nouvelles technologies. C'est le cas de l'hydro distillation par micro-ondes sous vide. Elle implique une interaction directe entre un rayonnement électromagnétique et la matière.

La plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle : l'huile essentielle est

Entrainée dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée.

Les durées des procédés d'extraction assistée par micro-ondes sont en effet de l'ordre de quelques minutes. Les rendements, dans la plupart des cas, sont comparables à ceux obtenus par les procédés traditionnels d'extraction. Lorsqu'ils sont inférieurs, il

s'agit le plus souvent d'une manifestation de la sélectivité du procédé (Anizon et *al.*, 2003)



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

3-6.7. Extraction par CO₂ supercritique :

La solubilité des matières premières naturelles dans le CO₂ est liée à son état. Par exemple, la solubilité du naphthalène qui est pratiquement nulle à l'état gazeuse, et seulement de quelques grammes par litre à l'état liquide, dépasse 50 g /L à l'état supercritique. Nous utilisons cette propriété pour réaliser l'extraction d'une part, dans le domaine supercritique gazeux, état où le soluté n'est plus soluble dans le CO₂ et se dépose dans l'extracteur. En jouant sur les conditions de température et de pression, débit et utilisation ou non d'un Co-solvant, nous pouvons extraire plus ou moins sélectivement certaines molécules et enrichir l'extrait en principes actifs ou l'appauvrir en constituants indésirables (Richard, 1992).

Selon Bruneton (1995), Le gaz supercritique est caractérisé par :

- Produit naturel
- Inerte chimiquement
- Inflammable
- Strictement atoxique
- Facile à éliminer totalement
- Sélectif
- Aisément disponible
- Peu réactif chimiquement
- Peu coûteux.

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

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des différents procédés d'extractions.

Procédés d'obtention	Avantages	Inconvénients
Hydrodistillation	<ul style="list-style-type: none"> - Rendement élevé en huiles essentielles. - Essences de bonnes qualités, très concentrés. 	<ul style="list-style-type: none"> - Altération de certaines substances odorantes à la température d'ébullition de l'eau. - Perte d'une partie d'essences par évaporation, oxydation dissolution et cyclisation.
Entrainement à la vapeur d'eau	<ul style="list-style-type: none"> - Réduire l'altération des constituants d'huiles essentielles. - Economie d'énergie et de temps d'extraction. - Efficacité d'extraction 	<ul style="list-style-type: none"> - Agglutination de la charge végétale sous l'effet de la vapeur d'eau. - Réaction secondaire hydrolyse.
Micro-ondes	<ul style="list-style-type: none"> - Rapidité - Réduction considérable du temps d'extraction. - Amélioration du rendement 	<ul style="list-style-type: none"> - Détérioration des constituants odorants par les micro-ondes qui possèdent une grande énergie de pénétration.
Solvants organiques volatils	<ul style="list-style-type: none"> - Universalité. - Procédés doux, non violent principes actifs olfactivement proche du végétale lui-même. 	<ul style="list-style-type: none"> - Danger sur l'homme et l'environnement en cas de manque de prévention. - Impossible de contrôler les paramètres de pression et de température.
Extraction par CO₂	<ul style="list-style-type: none"> - Capacité à fournir des extraits de composition très proche de celle des produits naturels. - Absence d'hydrolyse et de réarrangement. 	<ul style="list-style-type: none"> - La lourdeur de l'investissement

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

3-7. Toxicité des huiles essentielles :

Il convient de ne pas confondre « plantes à huiles essentielles » et « huiles essentielles » (Raynaud, 2006). Les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une

utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe, en ignorant que certaines sont plus rapidement dangereuses que les autres: absinthe, armoise, chénopode, sauge officinale, hysope, thuya, tanaïsie, aneth, rue, anis, carvi, romarin (Bernadet, 2000).

La toxicité des huiles essentielles varie selon leur composition qui elle-même, varie selon la plante source qui, elle-même peut varier selon le terrain où elle est cultivé (chimiotype) la composition peut être précisément connue par C.G. par exemple, l'huile essentielle de feuille de *Salvia officinalis* L. est plus riche en thujone toxique en Estonie que celle du reste de l'Europe, elle varie selon la période de l'année ou la plante est récoltée. Elle varie selon sa voie d'administration (orale, cutanée ou aérienne), par l'état de l'individu qui y est exposé-là (Bardeau, 2009). Il est donc très important de connaître :

- Les huiles essentielles a aldéhydes (citral, citronellal, cuminal,...etc.) sont irritantes, quelques soit leur voie d'administration ;
- Les huiles essentielles a cétones (thuyone, menthone, verbenone, ...etc.) sont neurotoxiques et ne doivent être administrées ni aux femmes enceintes, ni aux sujets épileptiques ;
- Les huiles essentielles a phénols (thymol, eugenol, gaïacol, carvacrol, ...etc.) ont une action caustique sur la peau et sont diluées au 1 /5 ou au 1/10 ;
- Les huiles essentielles à terpènes (pinène, carène, ...etc.) sont irritantes (Bordeaux, 2009).

3-8. Usage des huiles essentielles :

a) 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).

b) 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).

3-9. Activité antimicrobienne des huiles essentielles :

Les effets antimicrobiens des différentes espèces de végétaux et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction d'huile essentielle contenue dans les plantes. Ces huiles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et levures.

3.9.1. Action antimicrobienne :

Plusieurs études ont ainsi montré l'apparition de fuites d'ions potassium dans des cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec de l'huile essentielle d'arbre à thé (*teatree*). Cette fuite de potassium 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'huiles essentielles, rendent perméable la membrane des bactéries, un effet précurseur de leur mort. Les huiles essentielles ont donc bien des propriétés bactéricides. L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (Zihiri, 2006).

3.9.2. Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne :

Les premiers travaux scientifiques entrepris en 1887 par Chamberland, suivis par ceux de Cadeac et Meunier, Bouchard, Forné, Bertrand, Guégen, Cavel, Gattefossé et tant d'autre depuis lors, on permis de mettre en évidence le remarquable pouvoir antiseptique des huiles essentielles (Bardeau, 2009).

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HE a une grande influence sur les résultats. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des

constituants des HE dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester à faibles concentrations. A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques.

3.9.2.1 Aromatogramme :

Cette méthode est identique à celle de l'antibiogramme utilisée pour tester les antibiotiques. Elle consiste la mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles chémotypées. Différents types d'aromatogramme, en milieu solide, liquide ou gazeux, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible (Zihiri, 2006).

L'aromatogramme s'appelle aussi (méthode des disques) consiste à l'ensemencement d'un milieu de gélose solide avec une solution bactérienne pure dont le nombre de germes est connu, et l'on place à la surface de cette gélose un disque de papier imprégné d'essence. Par diffusion la substance aromatique se propage dans le milieu et, après 24 heures, on mesure l'effet bactéricide dans la zone ainsi délimitée (Bardeau, 2009).

Selon Raynaud (2006) En cas d'activité d'HE, une zone circulaire d'inhibition (halo d'inhibition) apparaît. Selon la taille du halo d'inhibition nous distinguons :

- Des germes résistants à l'huile essentielle : halo de 0 cm ;
- Des germes assez sensibles à l'huile essentielle : ++ halo de 2 à 3 cm ;
- Des germes très sensible à l'huile essentielle : +++ halo de plus de 3 cm.

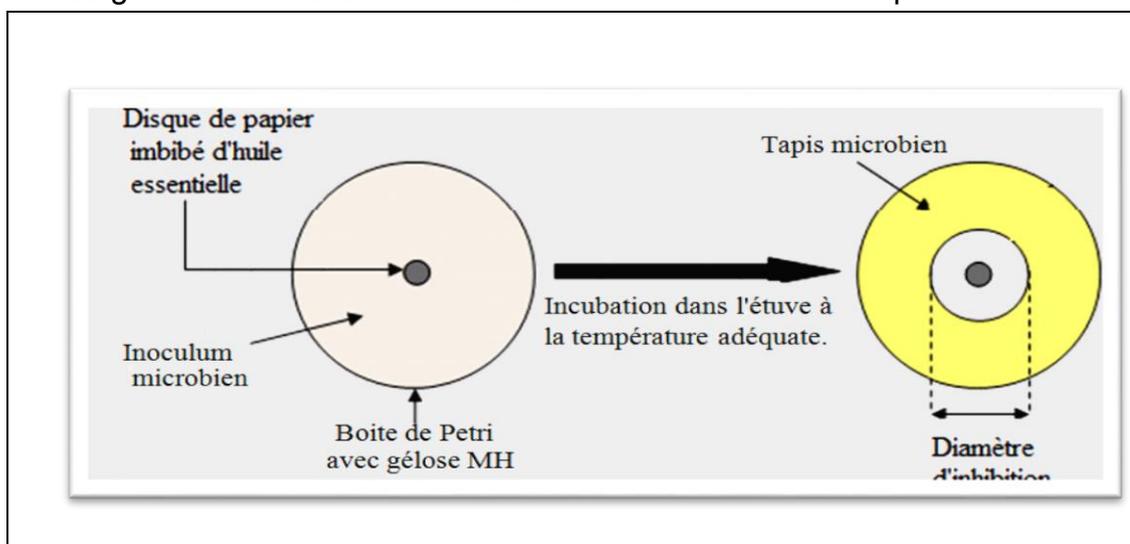


Figure 6 : Principe de la méthode d'aromatogramme.

3.9.2.2 Méthode de Micro atmosphères :

Dérivé de la méthode précédente le protocole du micro atmosphères est techniquement proche de celle des aromagrammes. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné.

Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri (figure 7), renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé.

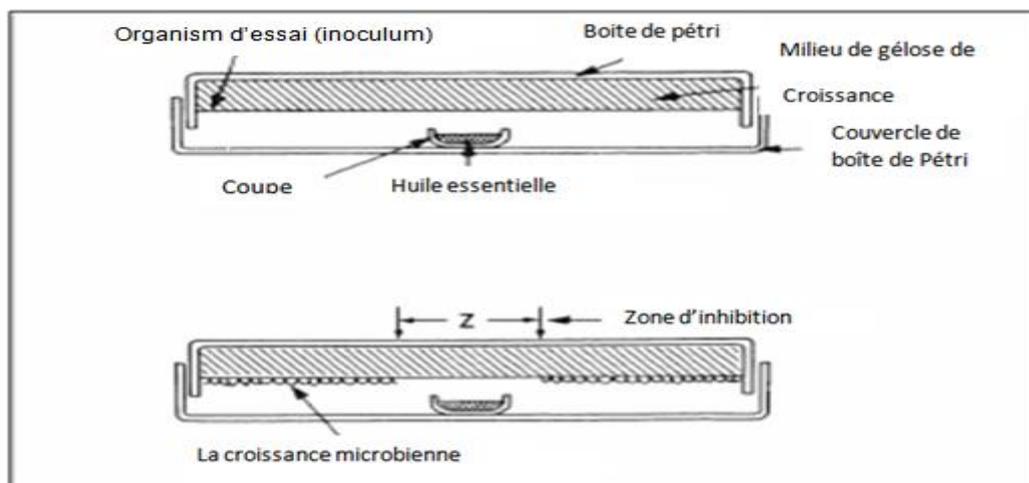


Figure 7 : Méthode de micro atmosphère (Pibiri, 2005).

3.9.2.3 Méthode de puits :

Méthode proposée par Cooper et Woodman (1946), repris par Schroder et Messing (1949), elle assure une diffusion radiale de l'huile essentielle à partir d'un puit en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable (Bennett et *al.*, 1966). La méthode consistait à découper un trou circulaire vertical dans la gélose et à y verser une solution d'huile essentielle de concentration connue. L'HE diffusant radialement créait une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (Deans et Ritchie, 1987; Dorman et Deans, 2000).

3.9.2.3 Méthode de dilution :

Grace à la méthode de dilution, on peut déterminer les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactériostatique (CMB) ou létale (CML). Ces méthodes peuvent être appliquées en gélose et en bouillon, on prépare une série de tubes de bouillon (habituellement du milieu Mueller-Hinton) contenant des concentrations d'antibiotiques variantes de 0,1 à 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, et on

inocule avec une population standard de l'organisme testé. La méthode de dilution en gélose est très semblable à la méthode de dilution en bouillon. Les boîtes de pétri contenant de la gélose Muller Hinton et des quantités différentes d'antibiotiques sont inoculées et examinées pour vérifier la croissance.

Pour appliquer à la détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles les dilutions en série, l'expérimentateur se voit contraint leur « solubilisation » ou l'émulsion. C'est ainsi que les solvants (éthanol, acétone, DMSO...), et divers tensioactifs, les non ioniques ont été proposés (Fleurentin et *al.*, 1990).

Chapitre II : Considérations générales sur le romarin

1. Romarin : *Rosmarinis officinalis*

1.1 -Origine et histoire :

Le romarin sauvage très répandu sur les côtes de la méditerranée. Il a toujours joué un grand rôle dans l'histoire des peuples de ces régions. Au moyen âge, c'était une plante sacrée pour les grecs, les romains, les égyptiens. Cette réputation demeura lorsque les romains l'introduisirent dans le reste de l'Europe.

Dans l'arsenal arabe (De Najm, Cohen et Attar, Gerber, Mesue, Avicenne), figurait l'encensier (percheron et Leroux, 1955), ce sont les arabes qui, les premiers extraient l'essence d'encensier, mais c'est Arnaud De Villeneuve qui, en 1330, trouva le moyen de la conserver en solution alcoolique (Saury, 1977)(griffe, 1970), c'est en 1330 également qu'un alchimiste catalan, Raymond Lulle, dit l'illuminé ; aurait isolé pour la première fois l'essence de romarin (Lamendin, 2004).

1-2. Description botanique :

Le romarin ou encensier (*Rosmarinus officinalis*) est aussi dit « romarin des troubadours ». « Rose marine » « herbe aux couronnes », il dégage une odeur d'encens Camphrée (Lamendin, 2004).

Dans sa région d'origine, le romarin atteint 2 m de hauteur. Mais, plus au nord, il reste beaucoup plus petit, et n'atteint que rarement 1 m.

Ce sous arbrisseau (Boullard, 2001), de 1 m à 1.50 m de haut, possédant de nombreux rameaux, des feuilles persistantes, vert sombres sur la face supérieure, blanchâtres sur la face inférieure (figure 8). Le bord du limbe est enroulé vers la face inférieure. 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).



- **Figure 8** : Sommité fleurie et fleur isolée de *Rosmarinus officinalis* (Boullard, 2001)
- **Classification de plante**

La classification de plante (Quezel et Santa, 1962) est répartie comme suit :

Romarin	
Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaire
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Gamopétales
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae (ou labiées)
Genre	Rosmarinus
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.

1.3. Utilisation de romarin :

1.3.1. Usage culinaire :

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

Il est très estimé dans le sud de la France et en Italie où on l'incorpore à 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 signalé aussi que le romarin était également efficace pour retarder l'oxydation des lipides pendant le stockage des viandes (Ricke et al., 2012)

1.3.2. Usage médicinal :

Le romarin est utilisé pour soulager les méfaits liés aux excès de boisson, stimule également l'appétit, bénéfique en cas de lourdeurs d'estomac et autres troubles digestifs. Ainsi son essence est un stimulant aromatique comme beaucoup de labiées, aussi un cholagogue, un cholérétique et un diurétique. Les flavonoïdes et l'acide rosmarinique jouent un rôle important dans son action. Lallement-Guilbert et Bezanger-Beauquesne (1970), ont mis en évidence les propriétés spasmolytiques de l'extrait flavonique (Lahsissen, 2009).

1.3.3. Autres usages :

Le romarin est utilisé aussi en parfumerie. Il sert d'élément de base dans la composition d'onguents, de savons et de champings. Leur huile essentielle utilisée pour éloigner les moustiques frottée sur les champs.

1.4. Exigences écologiques et pédologiques 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 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.

2. Huile essentielle du Rosmarinus officinalis. L :

a. Composition chimique :

La composition qualitative de cette huile essentielle est relativement fixe, par contre les proportions des composants varient en fonction de l'origine géographique 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).

Tableau 2 : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à cinéol et camphre) de l'espèce *Rosmarinus officinalis*

Composé	Localité et pourcentage (%) de composé								
	Algérie	Tunisie	France	Serbie	Grec	Chine	Afrique du Sud	Turquie (Mersin)	Iran
α -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
α -terpéniol	5.2	-	-	-	5.67	-	-	6.8	-
Caryophyllene Oxyde	10.9	-	-	-	-	-	-	-	-
β -pinène	8.5	-	-	-	-	6.71	-	-	-
Camphrène	-	-	-	-	-	19.43	18.18	-	-
Linalol	-	-	-	-	-	-	-	-	14.9

Source : Ouassila, 2010

Tableau 3 : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à verbénone) de l'espèce *Rosmarinus officinalis*.

Composé	Localité et pourcentage (%) de composé					
	Maroc	Espagne	Portugal	Italie	Argentine	Turquie
α -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	-	-
α -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	-	-	-	-

Source : Ouassila, 2010

Tableau 4 : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à cinéol) de l'espèce *Rosmarinus officinalis*.

Composé	Localité et pourcentage (%) de composé		
	Tunisie	Brésil	Turquie
α -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
β -pinène	8.36	-	5.18
Camphrène	8.95	-	-

Source : Ouassila, 2010

b. 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 5 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle du romarin

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
Indice de réfraction	min. = 0,895	Max=0.905
20°C	min. = 1,464 O	max. = 1,470 O
Pouvoir rotatoire à 20°C	min.=1.467O	max=1.473O
Miscibilité à l'éthanol à	Entre-2°et+5°	Entre-5°et+5°
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
Indice d'acide	une opalescence	maximum = 1

Source : Ouassila, 2010

Tableau 6: Les normes AFNOR d'HE de *Rosmarinus officinalis*

Aspect	Liquide mobile, limpide
Couleur	incolore à jaune pâle ou jaune verdâtre
Odeur	caractéristiques, agreste, cineolée plus ou moins camphrée
densité relative a 20°C, d_{20}^{20}	Minimum : 0.907 Maximum : 0.920
Pouvoir rotatoire à 20°C	compris entre - 2° et + 5° Miscibilité à l'éthanol à 80 %
L'indice d'ester	Minimum : 2 Maximum : 15
L'indice de Réfraction	Minimum:1.464o Maximum:1.470o
L'indice d'acide	Maximum:1.0

c-Propriétés du Romarin :

c-1/Activité antibactérienne :

Les effets des extraits aqueux et méthanoliques du Romarin, sur la croissance du *Streptococcus sobrinus* et sur l'activité extracellulaire de l'enzyme glucosyltransferase ont été étudiés par les résultats ont suggéré que les extraits du Romarin peuvent empêcher la lésion de la carie en inhibant la croissance du *Streptococcus sobrinus* et peuvent aussi éliminer les plaques dentaires par suppression de l'activité de la glucosyltransférase. (Tsai et al., 2007).

Afin de chercher de nouveaux antibiotiques et des agents antimicrobiens, une autre étude a été élaborée par examiner les effets antimicrobiens des extraits des composés isolés de certaines plantes, sur l'ensemble de 29 bactéries et levures avec pertinence dermatologiques. L'extrait obtenu par le dioxyde de carbone (CO₂) supercritique du Romarin, a présenté un large spectre antimicrobien. La croissance de 28 sur 29 germes a été empêchée par cet extrait d'acide carnosique. (WECKESSER et al., 2007).

c-2/Activité antifongique :

La biosynthèse de l'aflatoxine a été inhibée totalement par l'huile essentielle du Romarin à une concentration de 450 ppm. Selon les résultats indiqués, le potentiel de cette huile essentielle en tant que préservatif naturel contre *Aspergillus parasiticus*. (RASOOLI et al., 2008).

En utilisant la technique standard de diffusion sur gélose, ont évalué l'activité biologique de 11 huiles essentielles y compris celle du Romarin, les résultats ont montré que de ces huiles ont une activité inhibitrice modérée sur les cinq levures (*Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*) examinées. (SACCHETTI et al., 2005).

c-3 /Activité antivirale :

L'évaluation de l'activité antivirale de l'extrait commercial du Romarin a indiqué qu'il y a une inhibition de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) à la concentration très basses. Cependant, le carnosol a montré une activité (anti-HIV) à une concentration modérée qui n'était pas cytotoxique. (Aruoma et al., Spencer et al., Ross et al., Aeschbacher et al., Khana et al., Mahmood et al., Munoz et al., Murcia et al., Butler et al., Halliwell et al., 1996).

c-4/ Activité ovicide :

L'huile essentielle du Romarin s'est avérée un agent ovicide contre trois espèces de moustique (*Anopheles stephensi*, *Aedesa egypti* et *Culexquin quefasciatus*). (Gui J et al., 2007).

Cette huile présente une activité répulsive contre les moustiques (*Aedesa egypti*). (PRAJAPATI et al, 2005).

c-5 /Activité anti-oxydante :

L'activité anti-oxydante du Romarin est connue depuis environ 30 années. (NASSU et al., 2003).

En raison de ses propriétés anti-oxydantes, le Romarin est largement accepté en tant qu'épices dont l'activité anti-oxydante la plus élevée. Plusieurs auteurs ont étudié l'utilisation des extraits du Romarin comme antioxydant pour conserver les produits à base de viande. (WANG et al, 2008).

c-6/Effet anti-cancérogène :

Grace à certains composants (Carnosol, Rosmaridiphénol, Rosmanol et l'acide rosmarinique), le Romarin est considéré comme une thérapie contre le cancer. (QUEZEL P., SANTA S., 1963) .

C-7/Effet anti-acétylcholinestérase :

Des extraits aqueux et méthanoliques de 11 plantes utilisés dans la médecine traditionnelles chinoise pour l'amélioration de la mémoire ont été examinées pour évaluer leurs activités inhibitrices d'acétylcholinestérase en utilisant la méthode colorimétrique d'Ellman. L'extrait méthanolique du Romarin a montré une inhibition modérée (17%) de l'enzyme à une concentration de 0.1%. (ADSERSEN et al, 2006).

c-8/ Effet hypoglycémiant :

Les observation après l'administration oral de différentes dose de l'extrait éthanolique du Romarin à 3groupes de lapins (lapins ayant une glycémie normal, lapins ayant une hyperglycémie provoquée par l'administration oral du glucose, lapins diabétiques d'alloxane ont clairement montré que cet extrait exerce une activité hypoglycémiant remarquable à une dose de 200 mg /kg. (BAKIREL et al, 2008).

c-9/ Effet anti-hépatotoxique :

De nombreuses études ont été réalisées pour étudier l'effet anti hépatotoxique du Romarin, le travail a été concentré pour l'évaluation de l'efficacité de l'extrait méthanolique du Romarin pour normaliser certains paramètres histologiques et biochimiques du foie, après l'ingestion d'un hépatotoxine le tétrachlorure de carbone(CCL4). les résultats ont indiqué que cet extrait a empêché la peroxydation lipidique, (l'information, l'apoptose, normalisé les taux de la bilirubine, le glycogène et l'activité de l'alanine aminotransférase) et enfin il a augmenté l'activité de la glutathion-S-transférase (GST).(MARIE et al.,2004).

Chapitre III : Généralités sur le monde microbien

Plusieurs chercheurs suspectaient l'existence des être vivants invisibles provoquant les maladies. Les premières observations au microscope furent sans doute réalisées entre 1625 et 1630 sur des abeilles et des charançons par l'Italien Francesco Stelluti à l'aide d'un microscope probablement fabriqué par Galilée. Cependant la première personne qui réellement observa et décrit des microorganismes est un Hollandais, amateur de microscope. (ESCOTT, HARLEIN, KLEIN, 2006).

1- Rôle des microorganismes dans les maladies :

Ces organismes engendrent des maladies chez les êtres humains, les animaux et les végétaux en attaquant les cellules vivantes et en les divisant et en produisant des substances toxiques appelées toxines. Les organismes responsables peuvent mourir, mais la toxine peut rester et engendrer la maladie (P.BERCHE et al ., 2002) Citons par exemple le *Staphylocoque*, la *Salmonelle* et le *Clostridium*, qui empoisonnent la nourriture, le *Salmonella typhi* (provoque la fièvre typhoïde), le *Clostridium letani* (provoque le tétanos), et le *Corynebacterium diphtheriae* (provoque la diphtérie) (ESCOTT, HARLEIN, KLEIN ,2006).

2- Infection :

Les bactéries pathogènes sont transmises à l'hôte de diverses façons :

- 1- ingestion d'eau ou d'aliments contaminées (vois digestive).
- 2- inhalations d'aérosols ou des particules associés à des bactéries (vois respirations).
- 3- inoculation cutanées par contacte direct ou indirecte (vois cutanés).
- 4-inoculation muqueuse direct par la salive ou la sécrétion sexuelle.
- 5- inoculation transcutanées par les insectes (*Yersinia pestis*, *Rickettsia*, *Borrelia* ...) par traumatismes ou manipulation iatrogènes (ESCOTT, HARLEIN, KLEIN ,2006).

3- Bactériologie médicale :

Ce nous savons du rôle se la flore normale dans le domaine de la santé et de la pathologie provient surtout de travaux dont on ne peut tirer que des arguments indirects :études avec des animaux stériles, observation de patients sous antibiotique, etc. on pense que, du point de vue immunologique et microbiologique, la flore normale

contribuerait à préserver notre santé, surtout en éloignant les germes qui pourraient nous infecter ,et peut – être aussi en entretenant un niveau de stimulation immunologique permanent dans l'organisme (ESCOTT, HARLEIN, KLEIN, 2006).

4- Bactéries Gram négatif :

Les bactéries Gram négatifs ont adopté une solution différente pour protéger leur membrane cytoplasmique, il fabriquent une structure particulière, la membrane externe, située à l'extérieur de la muréine la membrane externe est chimiquement distincte des autres membranes biologique ,ce qui lui confère la capacité de résister aux agent chimiques nocifs, c'est une structure à deux feuillets mais le feuillet externe contient un composant unique en plus des phospholipides; il s'agit du lipopolysaccharide bactérien ou LPS, molécule complexe rencontrée uniquement chez les bactéries Gram - (ESCOTT, HARLEIN, KLEIN, 2006).

4-1- Genre *Pseudomonas* :

Bacilles à Gram négatif, mobiles par une ciliature polaire, rarement immobiles, non sporulés. Bactéries chimio-organotrophes avec un métabolisme strictement respiratoire avec comme accepteur terminal d'électrons l'oxygène en aérobiose et pour certaines espèces le nitrate en anaérobiose avec synthèse d'une nitrate-réductase (respiration des nitrates). Oxydatifs ou inactifs dans l'épreuve de Hugh et Leifson. Presque toujours oxydase (+) c'est-à-dire possédant pour la plupart une chaîne cytochromique complète comprenant le cytochrome C et un cytochrome C oxydase. (FAUCHERE et AVRIL, 2002) et (JUDD et al., 2002).

4-2- *Actinobacter* :

Il s'agit de coccobacilles, courts, souvent en diplocobacilles, immobiles, à Gram négatif. Ce sont des aérobies stricts, souvent encapsulés, ne réduisant pas les nitrates, catalase (+), oxydase (-). Prototrophes, ils peuvent croître sur un milieu minéral avec une source de carbone simple. GC 39 à 47 moles %.(JEAN-PIERRE, 2006). Bactérie ubiquitaire, *Atinobacterse* trouve principalement dans le sol et l'eau (douée, marine), les eaux d'égouts, isolée parfois dans le lait et les produits laitiers, dans les aliments. Elle est très fréquemment isolée chez l'homme : peau, salive, urine, conjonctive. Elle figure parmi les bactéries de la flore résidente normale du revêtement cutané. (ESCOTT, HARLEIN, KLEIN, 2006).

4-3- *Salmonella* :

Les *Salmonella* autres sont avant tout des parasites du tube digestif de l'homme et des animaux. Les sérotypes qui, contrairement aux précédents n'ont pas de spécificité d'hôte, sont dits ubiquitaires. Après la maladie, certains sujets restent porteurs sains et éliminent pendant plusieurs mois des *Salmonella* dans leurs selles. Les *Salmonella* sont retrouvées dans le milieu extérieur, dans les eaux d'égout en particulier. Des *Salmonella* sont aussi fréquemment retrouvées dans les farines de poisson ou poudres d'os utilisées pour l'alimentation des animaux. (SCHAECHTER et al ,1999).

La contamination de l'homme se fait par voie buccale. La fréquence des infections à *Salmonella* est en augmentation. Elle est favorisée par le développement des repas pris en collectivité où les aliments sont préparés bien avant d'être consommés et dans lesquels les bactéries peuvent se multiplier. (SCHAECHTER et al., 1999).

4-4- L'espèce *E. coli* :

E. coli est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. Dans l'intestin, *E. coli* est l'espèce aérobie quantitativement la plus importante, présente à raison de 10⁹ corps bactériens par gramme de selles. Cette population bactérienne ne représente qu'environ 1 %o de celle des anaérobies (voir encadré sur la flore du tube digestif).(NAUCILIEL C et VILDE J.L ,2005). La recherche d'*E. Coli* dans l'eau d'alimentation (colimétrie) est fait pour apprécier sa potabilité. La présence d'*E. Coli* dans l'eau est le témoin d'une contamination fécale récente et la rend impropre à la consommation (JEAN-PIERRE, 2006).

5- Bactéries à Gram positif :

Les bactéries Gram positif protègent leur membrane avec une paroi épaisse, le composant majeur de la paroi est polymère complexe de sucres et d'acides aminés, appel muréine ou peptidoglycane. La muréine est un composant essentiel qui donne à la bactérie sa forme et sa rigidité que ce soit chez les bactéries Gram positif ou chez la bactérie Gram négatif. (ESCOTT, HARLEIN, KLEIN, 2006).

5-1- *Staphylococcus aureus*

Cocci à Gram positif, appartient à famille des micrococaceae, ubitquitaire qui retrouve dans le sol, l'air et l'eau, c'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme,

on le trouve à l'état normal dans l'oropharynx, les fosses nasales, dans les selles et au niveau du périnée ou des aisselles (BASSOU et CHAKOU, 2006).

S.aureus résistante à plusieurs antibiotiques difficiles à traiter aux médicaments (DOUH, KHALIFA, 2006). Les *staphylococcus aureus* produisent des toxines comme hémolysine (DOUH, 2006). et les entérotoxines qui provoquent habituellement de vomissement et souvent la diarrhée peu de temps après l'ingestion de nourriture contaminée (LAVERGNE et BURDIN, 1973).

5-2- Streptococcus :

Le genre *Streptococcus* rassemble des espèces bactériennes qui ont en commun un certain nombre de caractères. Ce sont des cocci à Gram positif, sphériques ou ovoïdes, disposés en paire pour former des diplocoques et pouvant se présenter sous forme de chaînettes parfois longues, ils ne sporulent pas. Ils ne possèdent ni catalase (à la différence des staphylocoques), ni oxydase (à la différence des *Neisséria*). - Ils peuvent se développer en aérobiose, ont un métabolisme fermentatif et sont à considérer comme des anaérobies tolérant l'oxygène. Des bactéries anaérobies strictes ont la même morphologie et appartiennent au genre *Peptostreptococcus*. (ESCOTT, HARLEIN, KLEIN, 2006).

6- 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 polyosidiques (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...) (FOUZIA DJENADI, 2011).

7- L'activité biologique d'huiles essentielles :

Les H.E. possèdent de nombreuses activités biologiques. Selon les travaux (E. VAGI,B. SIMANDI, A. 2005), ces activités sont liées essentiellement à la composition

chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires de ces extraits et à leurs effets synergiques. Empiriquement reconnue depuis des siècles, la confirmation scientifique de l'activité antimicrobienne des H.E. est récente. Elle ne date que du début du siècle dernier avec les travaux du Dr GATTFOSSÉ, le père de l'aromathérapie en France. Beaucoup d'études ont été réalisées au sujet de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes et de leurs H.E. qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès d'aromathérapie scientifique. Cette activité a été utilisée dernièrement pour la conservation du patrimoine bibliographique des musées évitant ainsi l'altération des ouvrages par des petits animaux nuisibles, et elle est naissante pour traiter la qualité de l'air dans les bâtiments (FOUZIA DJENADI, 2011).

On attribue aux extraits de plantes aromatiques et notamment aux H.E. un certain nombre d'activités biologiques potentielles susceptibles de trouver des applications en agroalimentaire (A. ZAMBONELLI, 2004).

8- Mécanismes d'action des huiles essentielles sur les bactéries :

Les mécanismes d'action des H.E. et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés, Selon ces auteurs, cette sélectivité est le résultat de la composition variée des fractions actives des huiles, qui présentent souvent des actions synergiques. Il semble que 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 -. (AGNIHOTRI, S. et al., 2003).

BOUDJEMAA et al., 2010a examiné le mécanisme d'action des H.E. des Clous de girofle et d'origan (*Origanum vulgare*) simultanément avec ceux de deux de leurs composants, le thymol et l'eugénol, sur des bactéries: *E. coli* et *Bacillus subtilis* qui ont été utilisées respectivement comme modèles de bactérie Gram+ et Gram-. Les deux H.E. tout comme leurs deux composants ont été capables d'induire une lyse cellulaire. Cette action a été démontrée par la libération de substances absorbantes à 260 nm. Cette libération de substances associée à la rapide mortalité bactérienne pourrait être la conséquence de lésions sur les enveloppes induites par les agents antibactériens. L'utilisation d'un microscope électronique a permis de montrer que les H.E. attaquaient en même temps les membranes et les parois cellulaires.

Chapitre IV : Matériel et méthodes

- **Matériel :**

1. Matériel végétal :

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



Figure 9 : *Rosmarinus officinalis* (photo originale 2016).

2. Présentation des régions d'étude :

2-1. Région de Blida :

La zone de prélèvement des échantillons se situe dans la station expérimentale de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université de SAAD DAHLAB de Blida 1. Notre station fait partie des plaines de la Mitidja comme étant la plus vaste plaine sublittoral de l'Algérie.

Situation géographique de la région :

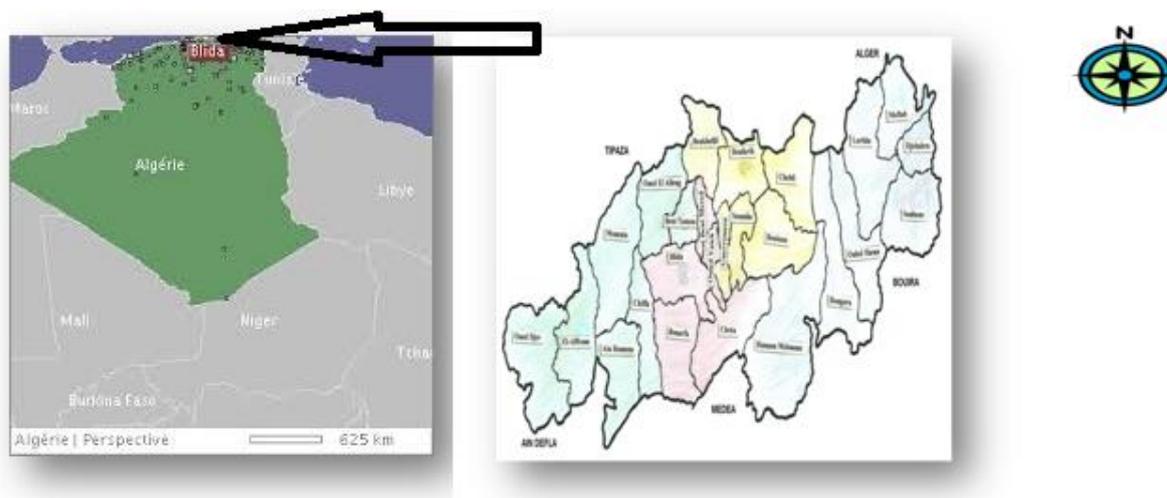


Figure 15 : Carte de Blida (source : Carte Microsoft 2006)

2.2- Région Djelfa :

La zone de prélèvement des échantillons se situe dans La wilaya de Djelfa faisant partie de la région des hauts plateaux, se situe dans la partie centrale de l'Algérie

Situation géographique de la région :

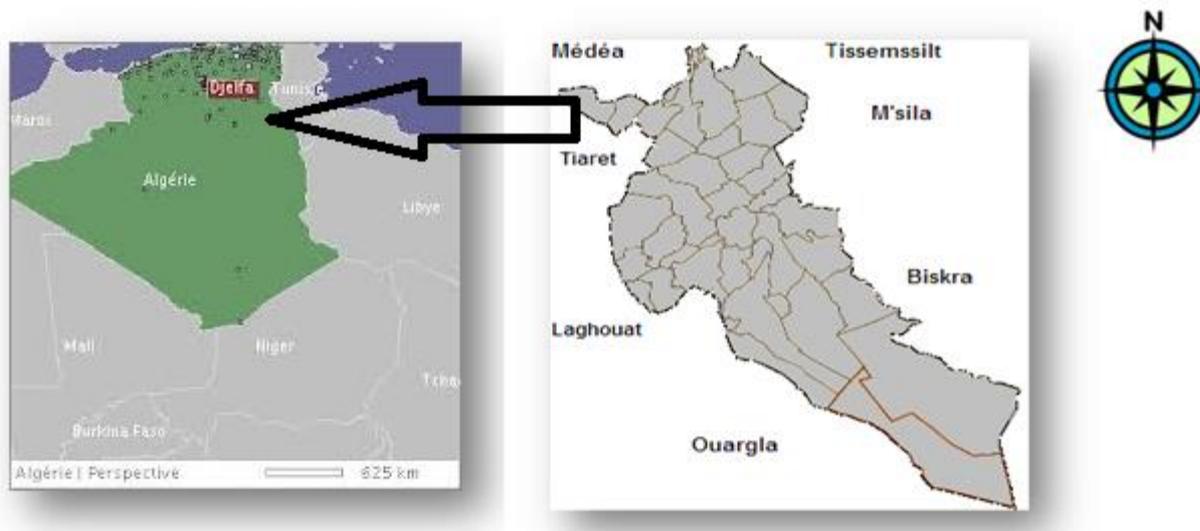


Figure 16 : Carte de Djelfa (source : carte Microsoft 2004)

3. Matériel biologique :

Les souches microbiennes utilisées (tableau 7), consistent en des souches isolées à partir des malades et des souches de référence obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC) fournis par Laboratoire d'hygiène.

Tableau 7. Souches microbiennes et leurs origines

Souches microbiennes	Origine	
	ATCC	Isolats à partir des malades
<i>Escherichia coli</i> (Gram-)	(ATCC25922)	Urine
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram+)	(ATCC25923)	Urine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram-)	(ATCC27853)	Pus
<i>Candida albicans</i>		Urine

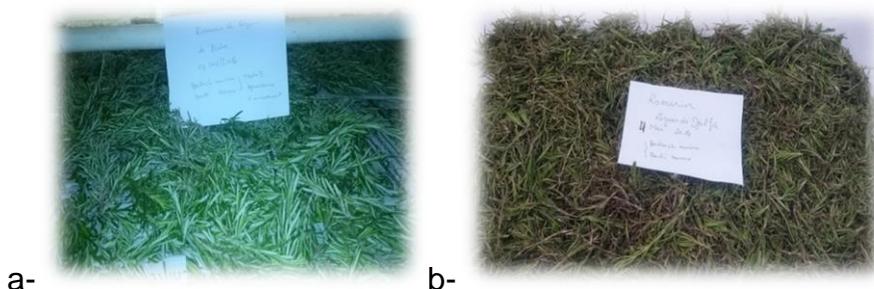
4. Traitement du matériel végétal

Les échantillons ont été cueillis durant le mois d'Avril, ensuite ils ont été séchés à l'air libre et déposés à l'ombre. 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.

4-1. Méthode d'échantillonnage :

Pour chaque région d'étude on a pris au hasard des arbustes sains, sur lesquels on a pratiqué l'échantillonnage qui a été effectué durant le printemps (4-11 Avril).

Les rameaux coupés sont les jeunes pousses de l'année. Ces rameaux échantillonnés sont garnis de feuilles et de bouquets de fleurs. Ainsi récoltés, une partie est séchée sous l'ombre.



a- Feuilles de Romarin de Région de Blida ;

b- Feuilles de Romarin de Région de Djelfa ;

Figure10 : Feuilles séchées (photo originale)

5- Localisation du lieu d'expérimentation :

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Physiologie végétale du département de biotechnologie et de Laboratoire d'hygiène à Ferroudja, dans laboratoire de microbiologie.

6- Extraction de l'huile essentielle de Rosmarinus officinalis :

✓ Méthode d'extraction

Parmi les différentes techniques d'exploitation des plantes aromatiques, on a opté pour l'extraction des huiles essentielles par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau. Les principales raisons de cette extraction sont liées à la facilité de la mise en œuvre du procédé et pour la qualité des huiles essentielles obtenues lors de cette méthode.

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

✓ Présentation du dispositif

Le dispositif expérimental comprend principalement :

- Un chauffe Ballon ; (Ballon de 1 litre remplie au 2/3 d'eau) ;
- Un ballon contenant la matière végétale (Ballon de 1 litre remplie au 2/3 d'eau);
- Clevenger relié au ballon et relié a un système de refroidissement
- Une ampoule à décanter pour récupérer l'hydrolat (eau+ huile essentielle).



Figure 11 : clevengère (photo originale2016).

✓ Mode opératoire

1^{ère} étape : extraction

La matière végétale est placée dans le ballon pour être émergée dans l'eau distillée est portée à l'échantillon.

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

2^{ème} étape : séparation liquide-liquide

L'huile essentielle est séparée de l'eau par différence de densité à l'aide d'une ampoule à décanter.

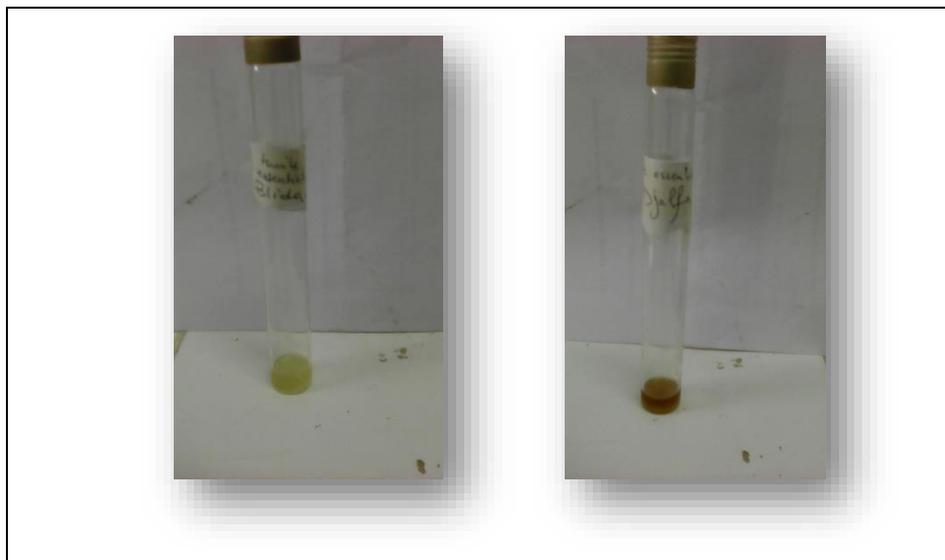


Figure12 : Huiles essentielle de Romarin région Blida et Djelfa

7- Préparation de l'extrait méthanolique :

- 1ère Etape

La partie fraîche du végétale doit être lavée à l'eau de robinet puis deux fois par l'eau distillé. Sécher a l'air libre pendant une semaine a l'ombre en faire rincer la matière végétale et laissé sécher toute au long d'une semaine entre ($26^{\circ}\pm 2^{\circ}$), Broyer très finement.

- 2ème Etape :

- Mettre 10g de la poudre de végétal (Romarin de deux Région Blida Djelfa) ;
- Dans 100ml de méthanol : porter le mélange à l'agitateur pendant 24h (T : $25\pm 2^{\circ}$), filtrer et garder le filtrat obtenu après récupère l'extrait avec Rotavapeur selon les étapes suivantes :

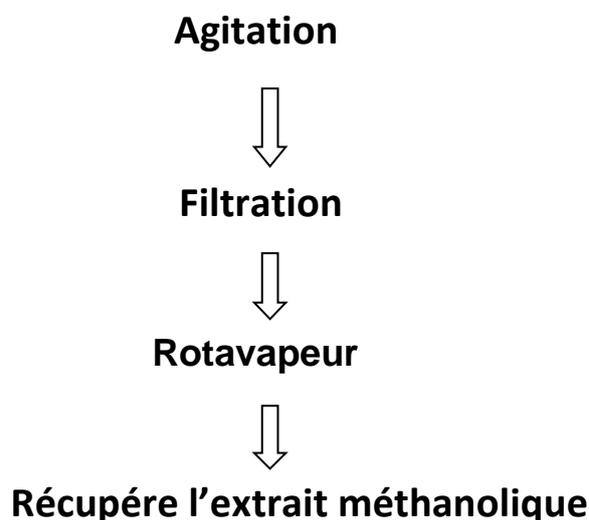


Figure14 : les étapes de préparation de l'extrait méthanolique.

➤ **Préparation des solutions :**

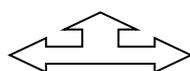
Les extraits ont été repris avec le Dimethylsulfoxyde (DMSO). Des dilutions en série de 1/2 à 1/16 ont été ensuite réalisées pour obtenir des concentrations de 500 à 62.5mg/ ml.

Les concentrations travaillées :

- 62.5mg /ml (62.5mg de l'extrait méthanolique de deux région Blida ; Djelfa dans 1ml de DMSO.
- 120mg /ml (120mg de l'extrait méthanolique de deux région Blida ; Djelfa dans 1ml de DMSO.

Préparation des solutions de l'extrait méthanolique à différentes concentrations

EM. Blida



EM. Djelfa

- {
- C1=62.5mg/1ml DMSO
 - C2=120mg/1ml DMSO

8- Paramètres étudiés :

8-1. Rendement en huiles essentielles

Selon les normes d'AFNOR (2000), le Rendement en Huiles Essentielles (R_{HE}) est défini comme étant 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'expression 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

$$R_{HE}(\text{Blida})=0,09\%$$

$$R_{HE}(\text{Djelfa})=0,08\%$$

8-2. Caractéristiques organoleptiques

L'appréciation des caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles consiste à évaluer l'aspect, l'odeur, la couleur et la saveur ; en utilisant les sens.

Tableau 8 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE de Romarin

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

9. Technique en milieu solide : Méthode des aromatogrammes et méthode de micro atmosphères :

Les deux méthodes sont décrites par Bolou (2011) et elles consistent à même principe :

➤ Préparation des suspensions microbiennes

- A partir de colonies jeunes de 18 à 24 h, une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau distillée stérile pour chaque souche.
- La turbidité de cette suspension est ajustée à 0,5 Mc Farland puis diluée au 1/100. On obtient alors un inoculum estimé à 10^6 unités formant colonie par millilitre (ufc/ml).

➤ Mise en test

- L'inoculum préparé précédemment est ensemencé par écouvillonnages sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton et sabouraud pour levures.
- A l'aide d'une pince stérile, on prélève un disque de cellulose (disque de référence (diamètre : 6mm) et l'imbiber avec l'H.E jusqu'à l'imprégnation totale du disque (40ul), par micropipette.
- Ces disques sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose.
 - Les boîtes de Pétri sont d'abord laissées pendant 1h à la température ambiante pour une pré-diffusion des substances, avant d'être incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 h pour les Bactéries et 25°C pendant 48h pour levures .
 - L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque.
 - L'expérience est répétée trois fois pour chaque H.E et pour chaque extrait méthanolique de chaque organisme pathogène.

➤ Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolise par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des H.E (Ponce et al, 2003)

- Non sensible(-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15mm.

Extrêmement sensible (+++) : diamètre 20mm.

➤ **Techniques d'aromatogramme :**

Préparation des solutions des souches



Ecouvillonné les boites de pétri préparées avec les solutions des souches microbiens



Imbibée les disques et mettre 3 répétitions dans une seule boite de pétri



Les boites sont préparée a étuvées



Lecture

Chapitre V : Résultats et discussions

1. Rendement en huiles essentielles

Les résultats du rendement en huiles essentielles de Romarin sont présentés dans le tableau(9) et traduits en histogramme, figure(17).

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

Régions	Rendement en %
Blida	0.09
Djelfa	0.08

D'après le tableau, le rendement en huiles essentielles de la région de Blida est de 0.09% et celui de Djelfa est de 0.08%.

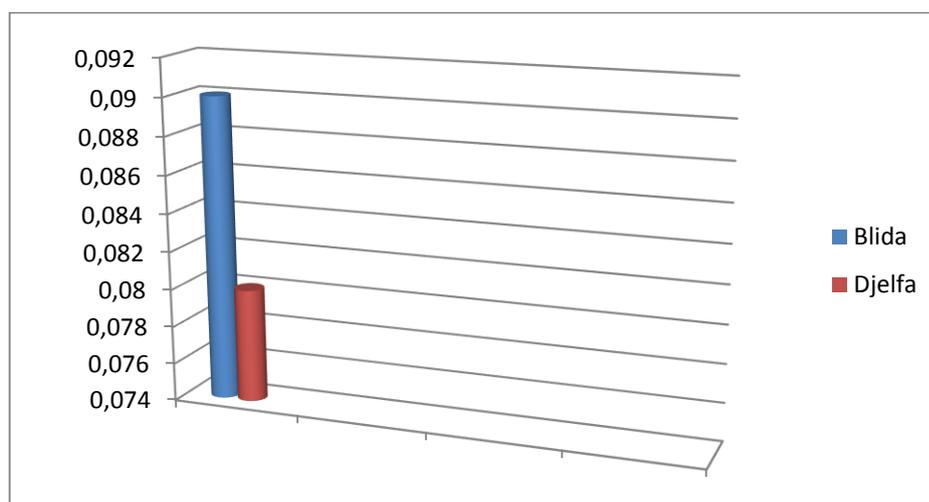


Figure17 : Rendement en huiles essentielle du Romarin.

Les résultats obtenus par Okoh et al (2010), Panizi et al. (1996), qui ont travaillé sur des feuilles fraîches, a révélé un taux de l'ordre de 0.31%, 0.45% respectivement ; donc nos résultats sont très faibles par rapport à ceux obtenu par à celui trouvé par Okoh et al (2010), Panizi et al. (1996).

2. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de Romarin (*Rosmarinus officinalis*)

Les échantillons de l'huile essentielle de romarin obtenu par entrainement à la vapeur d'eau, sont représentés par la figure(18)



A-

A-l'huile essentielle de Blida.



B-

B-l'huile essentielle de Djelfa.

Figure 18 : L'huile essentielle de romarin

3- Résultats de Tests antimicrobiens

Aromatogramme

Les observations effectuées sur l'effet d'HE et l'extrait méthanolique de Romarin de deux régions sur la croissance des souches testées :

- *Esherichia.coli* (Gram-).
- *Staphylococcus aureus* (Gram+).
- *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-).
- *Candida albicans*.

Sont représentées dans le tableau10.

- **EMBC1** : extrait méthanolique de romarin de la région de Blida à concentration(1) (C1=62.5mg /1ml DMSO).
- **EMDC1** : extrait méthanolique de romarin de la région de Djelfa à concentration(1) (C1=62.5mg /1ml DMSO).
- **EMBC2** : extrait méthanolique de romarin de la région de Blida à concentration(2) (C2=120mg /1ml DMSO).
- **EMDC2** : extrait méthanolique de romarin de la région de Djelfa à concentration(2) (C2=120mg /1ml DMSO).

Tableau 10 : Résultats des zones d'inhibition

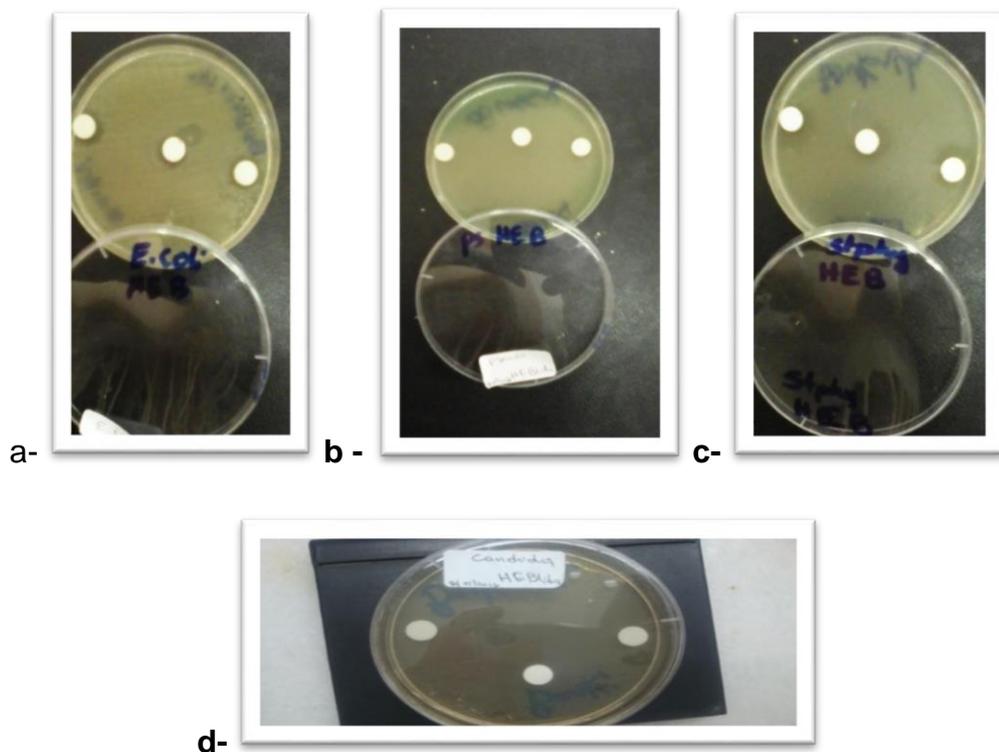
Souches	Diamètre des zones d'inhibition (mm)					
	HEB	HED	EMBC1	EMBC2	EMDC1	EMDC2
<i>Escherichia .coli</i>	15(++)	19(++)	0(-)	0(-)	0(-)	8(-)
<i>Staphylococcus aureus</i>	17(++)	24(+++)	15(++)	16(++)	14(+)	16(++)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0(-)	0(-)	20(+++)	10(+)	0(-)	14(+)
<i>Candida albicans</i>	0(-)	0(-)	0(-)	0(-)	0(-)	0(-)

l'Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* des deux régions (Blida et Djelfa) a montré une activité antimicrobienne inhibitrice vis-à-vis *Escherichia .coli* ($15 \pm 0.01\text{mm}$), *Staphylococcus aureus* ($17 \pm 0.01\text{mm}$), *Pseudomonas aeruginosa* ($0 \pm 0.01\text{mm}$), *candida albicans* ($0 \pm 0.01\text{mm}$) concernant l'huile de Blida et l'huile essentiel de Djelfa *Escherichia .coli* ($19 \pm 0.01\text{mm}$) et *Staphylococcus aureus* ($24 \pm 0.01\text{mm}$) et *Pseudomonas aeruginosa* ($0 \pm 0.01\text{mm}$) et *candida albicans* ($0 \pm 0.01\text{mm}$) On trouve que il ya une activité antimicrobienne modérément inhibitrice chez *Escherichia .coli* pour les 2 huiles (Blida ,Djelfa) et fortement inhibitrice chez *Staphylococcus aureus* dans l'HE de Djelfa et modérément inhibitrice dans l'HE de Blida et une activité non inhibitrice chez *Pseudomonas aeruginosa* et *candida albicans* dans les deux HE (Blida, Djelfa).

l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* dont la concentration ($62.5\text{mg}/1\text{mlDMSO}$) dans les deux régions (Blida et Djelfa) a montré une activité antimicrobienne inhibitrice vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ($15 \pm 0.01\text{mm}$) et *Pseudomonas aeruginosa* ($20 \pm 0.01\text{mm}$) et non inhibitrice chez *candida albicans* ($0 \pm 0.01\text{mm}$) et *Escherichia .coli* ($0 \pm 0.01\text{mm}$) concernant l'extrait méthanolique de Blida et l'extrait méthanolique de Djelfa : *Staphylococcus aureus* ($14 \pm 0.01\text{mm}$) et *Pseudomonas aeruginosa* ($0 \pm 0.01\text{mm}$) et *candida albicans* ($0 \pm 0.01\text{mm}$) et *Escherichia .coli* ($0 \pm 0.01\text{mm}$), On trouve que il ya une activité antimicrobienne légèrement inhibitrice chez *Staphylococcus aureus* et une activité non inhibitrice chez *Escherichia .coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et *candida albicans* dans l'extrait méthanolique de Djelfa .

l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* dont la concentration (120mg/1mlDMSO) des deux régions (Blida et Djelfa) a montré une activité antimicrobienne : inhibitrice vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ($16 \pm 0.01\text{mm}$) et *Pseudomonas aeruginosa* ($10 \pm 0.01\text{mm}$) et non inhibitrice chez *candida albicans* ($0 \pm 0.01\text{mm}$) et *Escherichia .coli* ($0 \pm 0.01\text{mm}$) concernant l'extrait méthanolique de Blida et dans l'extrait méthanolique de Djelfa : *Staphylococcus aureus* ($16 \pm 0.01\text{mm}$) et *Pseudomonas aeruginosa* ($14 \pm 0.01\text{mm}$) et *candida albicans* ($0 \pm 0.01\text{mm}$) et *Escherichia .coli* ($8 \pm 0.01\text{mm}$), On trouve qu' il ya une activité antimicrobienne légèrement inhibitrice chez *Pseudomonas aeruginosa* et une activité modérément inhibitrice chez *Staphylococcus aureus* et une activité non inhibitrice chez *candida albicans* concernant les deux EM et une activité non inhibitrice chez *Escherichia .coli* dans EM de Blida et une activité légèrement inhibitrice dans l'EM de Djelfa.

La photographie suivante montre les diamètres d'inhibition de chaque souche :



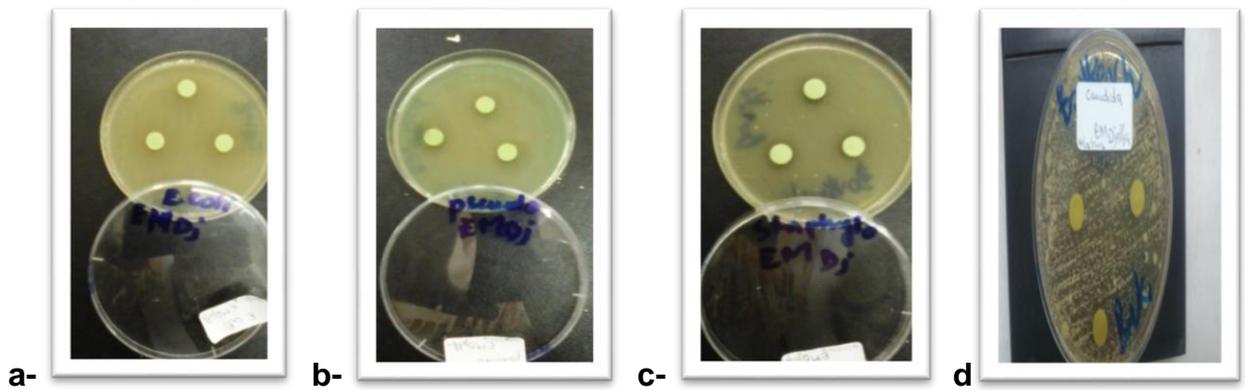
a- *Escherichia .coli* .

c- *Staphylococcus aureus*.

b- *Pseudomonas aeruginosa*.

d- *candida albicans*

Figure 20 : Effet antimicrobien de l'huile essentielle de Romarin région de Blida vis -à – vis des souches microbiennes.



a- *Escherichia .coli.*

c- *Staphylococcus aureus.*

b- *Pseudomonas aeruginosa.*

d- *Candida albicans*

Figure 23 : Effet antimicrobien de l'extrait méthanolique de Romarin région de Djelfa.

✓ Les Histogramme des zones d'inhibitions avec toutes des souches microbiennes :

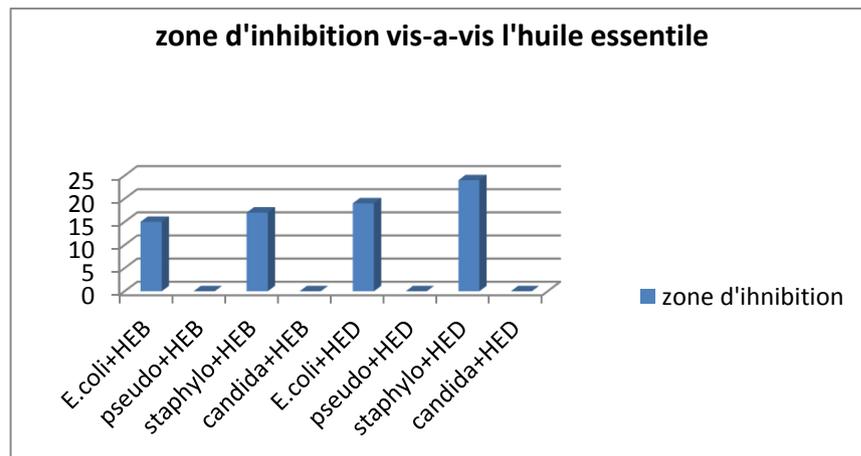


Figure32 : Histogramme présentant les zones d'inhibition avec les deux HE (Blida et Djelfa).

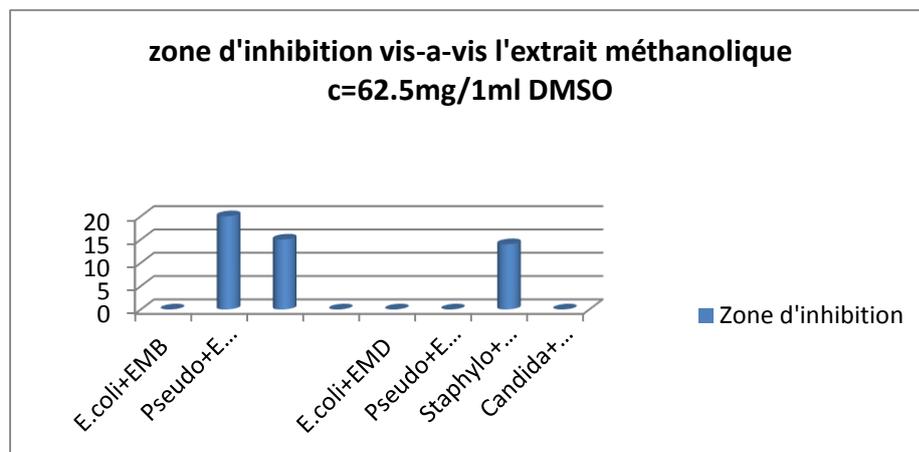


Figure33: Histogramme présentant les zones d'inhibition avec les deux EM (Blida et Djelfa).

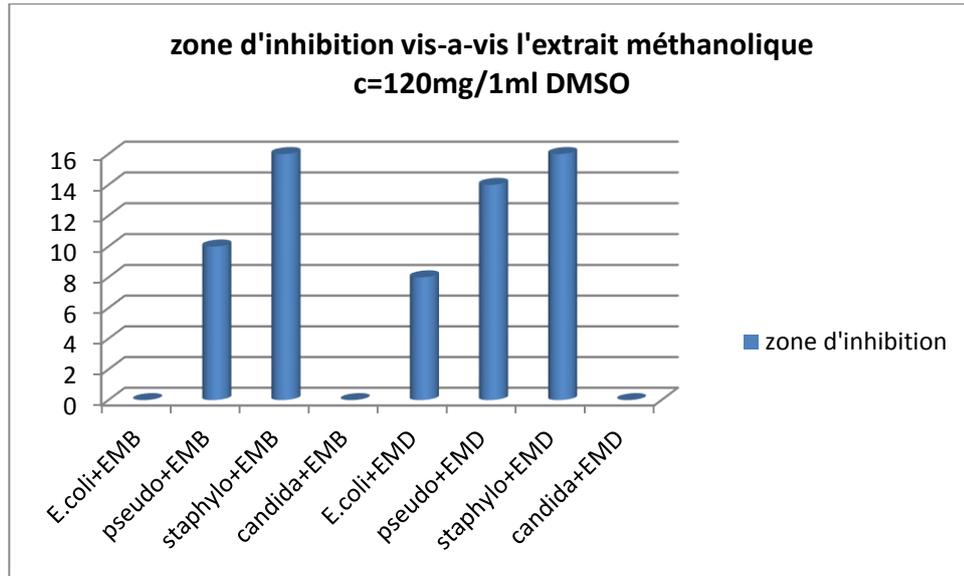


Figure34 : Histogramme présentant les zones d'inhibition avec les deux EM (Blida et Djelfa).

Discussion :

D'après les représentations graphiques de sensibilité des souches on trouve que :

Pour les huiles essentielles :

Escherichia coli (Gram-) et *Staphylococcus aureus* (Gram+) ont montré une sensibilité à Djelfa. L'huile essentielle de Blida et Djelfa mais elles sont beaucoup plus sensibles à l'HE de des Bateriaes sensibles dans l'HE de Blida et Djelfa. mais elles sont beaucoup plus sensibles dans l'HE de Djelfa que celui de Blida.

Pour *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-) et *Candida albicans* (levure) ne sont pas sensibles à l'HE Blida, Djelfa.

Concernant les extraits méthanoliques : *Escherichia coli* (Gram-) : est pas sensible à l'EM de Blida les deux concentrations et Djelfa à concentration=62.5mg /1ml DMSO. Mais elle est sensible à l'EM de Djelfa à concentration=120mg /1ml DMSO.

Pseudomonas aeruginosa (Gram-) et *Staphylococcus aureus* (Gram+) : elles sont très sensibles à l'EM de Blida dans les deux concentrations mais *Pseudomonas aeruginosa* est n'est pas sensible à l'EM de Djelfa dans la concentration=62.5mg /1ml DMSO

Mais pour les concentrations=120mg /1ml DMSO elles sont sensibles aux deux EM Blida, Djelfa.

Candida albicans (levure) n'est pas sensible à l'HE et l'EM pour les différentes concentrations.

D'autre part par rapport HE et EM on trouve que la Bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-) est sensible vis-à-vis de l'extrait méthanolique que l'HE et la Bactérie *Escherichia coli* (Gram-) est sensible vis-à-vis de l'HE que l'EM de Basse concentration (62.5mg/1ml DMSO) mais dans la haute concentration=120mg/1ml DMSO de EM elle est sensible.

Les huiles essentielles attaquent les cellules par divers mécanismes antimicrobiens, y compris la membrane ce qui perturbe les systèmes d'enzymes et puis le matériel génétique et la formation d'hyper oxydase causée par l'oxygénation des acides gras insaturés.

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles de plusieurs plantes aromatiques et médicinales ont été attribuées à leur profil chimique et surtout aux

alcools terpéniques (Kurita *et al.*, 1982 ., Bouchikhi, 1994., Tantaoui-Elarki *et al.*, 1994 ., Faid *et al.*, 1996 ; Chang *et al.*, 2001 , Karaman *et al.*, 2001 , Baydat *et al.*, 2004 , Pibiri, 2005 , Satrani *et al.*, 2006). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba *et kunicka*, 2003). Selon Dormans en 2000, le principal facteur modifiant l'activité antimicrobienne d'HE est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans cette HE.

Selon Bouaoun et ses collaborateurs (2007), la plupart des composés chimiques des H.E. sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols, les alcools et les aldéhydes.

Selon plusieurs études (Thomson *et al.*, 2003 ,Burt, 2004 , Zhiri *et al.*, 2005 , Viuda-Martos *et al.*, 2008), les interactions synergiques entre les différents composés peuvent être l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires.

Le type des bactéries aussi a une influence sur l'effet des huiles essentielles ou il était observé que les bactéries de gram – sont moins sensibles à l'action des huiles essentielles que la bactérie de gram+ ; Les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antimicrobiennes sont également fongiques efficaces mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes.

Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants et les entérocoques (May *et al.*, 2000 Tohidpour *et al.*, 2010)

Il est établi que le traitement de telles bactéries nécessite des concentrations considérables d'agents antimicrobiens (Fleurette *et al.*, 1995).

On peut dire que les souches qui attaquent l'être humain sont très sensibles à l'huile essentielle que les souches végétales. (D'après notre travail d'ingénieur de 2013/2014).

Conclusion

D'après les résultats nous avons obtenu un rendement de (0,09-0,08) % Blida-Djelfa en l'huile essentielle de Romarin par l'entraînement à vapeur pendant une heure. L'étude de ses caractéristiques organoleptiques, a montré qu'elle est presque conforme aux normes AFNOR.

Le pouvoir antimicrobien a été évalué qualitativement et quantitativement de ces huiles et des extraits méthanoliques vis-à-vis de certaines souches microbiennes connues comme des souches pathogènes. Nous avons remarqué une activité élevée vis-à-vis des souches Bactériennes, et sur levure; non inhibitrice dans les deux cas (HE ; EM). De même que l'activité biologique de huiles et des extraits méthanolique du Romarin a un pouvoir antibactériens très important surtout sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* à la base de résultats trouvés on peut conclure prédire que nos huiles essentielles et nos extraits méthanolique peuvent servir comme base de lutte biologique.

Il est à noter que le pouvoir antimicrobien dépend de la composition chimique des huiles essentielles et l'extrait méthanolique non seulement pour les composés majoritaires mais la synergie de ces derniers et les composés mineurs.

Des études ultérieures plus approfondies doivent être effectuées afin de cerner l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extrait, il serait intéressant de :

- Vérifier leur innocuité par des tests de toxicité et des tests d'allergénicité semble d'une grande importance.
- Mener une étude détaillée sur la composition qualitative et quantitative de ces huiles par le couplage de la CPG/SM car l'identification de la composition exacte d'une huile essentielle constitue la première étape dans la quête de la compréhension du fonctionnement de ces molécules.
- Tester l'extrait de l'HE et l'EM sur d'autres agents microbiens afin de confirmer son efficacité à différentes concentrations de dilution.
- D'étudier l'activité antioxydant et les aptitudes technologiques de cette HE.
- Poursuivre l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, notamment l'action isolée de chacun de ses constituants et la détermination de la concentration minimale bactériostatique (CMB).
- Et enfin l'application de ses résultats dans le domaine agro-alimentaire et agronomique.

Références bibliographiques

ADSERSEN et al., 2006 - Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol.* 104:418-422.

Anonyme., 2000 -Les huiles essentielles. Tome 2. Vol 2. Paris : tour Europe. Paris. Avril,

J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H., 2000 - Bactériologie clinique. 3ème édition Ellipses (Ed) Paris, 602.

Aruoma OI, Spencer JPE, Rossi R, Aeschbach R, Khan A, Mahmood N, Munoz A, Murcia A, Butler J, Halliwell B., 1996 - An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provencal herbs. *FoodChemToxicol*34:449–456

ARNAL-SCHNEBELENI B., HADJI -MINIAGLOU-MINIAGLOU F., PEREROTEAU J.F., RIBEY F., RIBEYRE F., BILLERBECK V.G., 2004. Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. *Int. J. Aromather.* 14, 192–197.

AUDIGIE CL., DUPONT G. et ZONSZAIN F., 1983 - Principe des méthodes d'analyse biochimique Tome1.

AGNIHOTRI, S. KHATOON. M. SHANTA., 2003 – Pharmacognostic evaluation of an antioxidant plantacoruscalamuslinn. *Nat. Prod. Sci.* 9(4), 264-269.

AZOU DJ S., 1999 - Valorisation des huiles essentielles de quelques espèces d'*Origanum* et *thymus* spontanées en Algérie. P.F.E département d'agronomie Blida. 61p.

BAKIREL et al., 2008 - In vivo assessment of antidiabetic and antioxidantactivities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan- diabeticrabbits. *JEthnopharmacol.* 116:64-73.

BALENTINE et al., 2006 - The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipidoxidation and duringstorage of groundbeef. *Meat Science.* 73, p.413-421.

BAYDAT H., SAGDIC O., OZKAN G., KARADOGAN T., 2004 - Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymus* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* 15, 169-72.

BAUDRY F., DEBAUCHE P., BAUDOIX D., 2004- Les cahiers pratiques d'aromathérapie selon l'école française. Edition inspir S.A. Belgique. P314.

BARDEAU F., 2009 - Les huiles essentielles : Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Ed. Fernand Lenore. 315 p.

BOUCHIKHI T., 1994 -Activité antimicrobienne de quelques huiles essentielles. Thèse de doctorat d'État : Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand (France).

BELLAKHDAR J., 1997 - La pharmacopée marocaine traditionnelle : médecine arabe et savoir populaire. Ed. Al Biruniya, Rabat. pp.337-340.

-Benbrini S., 2012 -Evaluation des activités antioxydantes et antibactérienne des extraits de *Santolnachamaecyparissu*. Thèse de magistère en biochimie 84 P.

BESOMBES, Colette., 2008 - Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Thèse doctorat université de la rochelle.

BILLERBEK V.G., ROQUES C., VANIERE P., MARQUIER P., 2002-Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles HYGIENES - 2002 - VOLUME X - N°3 ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE ET ANTIFONGIQUE DE PRODUITS À BASE D'HUILES ESSENTIELLES.

BOUBRIT S., BOUSSAD N., 2007-Détermination "in vitro " du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée. Mémoire d'Ingénieur, Tizi-Ouzou.

BOLOU G. E. K., ATTIOUA B., N'GUESSAN A. C., COULIBALY A., N'GUESSAN J.D., DJAMAN A.J., 2011- Évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. Sur *Salmonella typhimurium* *Salmonella typhi* *Salmonella typhimurium* *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 80, 2011, p. 772 - 790 Côte d'Ivoire

- BOULLARD B., 2001-** Plantes médicinales du monde, Réalités et croyances. Edition Estem, Paris. P177-178.
- BOUCHABKE O., TARDIEU F. et SIMONNEAU T., 2006** - Leaf growth and turgor in growing cells of maize (*Zea mays L.*) Respond to evaporative demand in well-watered but not in water saturated soil. 29 *Plant, Cell and Environment*. pp. 1138-1148.
- BOUAOUN D., HILAN C., GARABETH F., SFEIR R., 2007-** Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boiss. *Phytothérapie* 5, 129-134.
- Bouxi H., 2012.** Les plantes médicinales et diabète de type 2 (A propos de 199 cas). Thèse de Doctorat, Faculté de médecine et de pharmacie FES. Université de Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc. 107p.
- BRUNETON J., 1993** - Pharmacognosie, Plantes médicinales 2^{ème} éd. Paris, 464p.
- BRUNETON J., 1995-** Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Edition Lavoisier. France.
- BRUNETON J., 1999** - Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 2^{ème} Ed Dunod Paris. 274 p.
- BURT S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- CAILLET S., LACROIX M., 2007-** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier, Québec.
- CHANG S.T., CHEN P.F., CHANG S.C., 2001-** Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloem*. *J. Ethnopharmacol* 77, 123-127.
- CORNIC G. et FRESNEAU C., 2002** - Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Annals of Botany*. 2002, Vol. 89, sp, pp. 887-894.
- COSGROVE D. J., 2005** - Growth of the cell wall. Vol. 6. pp. 850-861.

COUTOULY G., KLEIN E., BARBIERI E. et KRIAT M., 2006 - Travaux dirigés de biochimie, biologie moléculaire et bioinformatique, Biosciences et techniques. Ed. Doin. 346 p.

CUVELIER M.E., RICHARD H. et BERSET C., 1996 - J. Am. Of Chem. Soc. Vol. 73 pp. 645-665.

Cowan M. M., 1999 - Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol. Rev. 12: 564-582.

DEANS S.G., RITCHIE G., 1987- Antimicrobial Properties of Plant Essential oils. IntERNAT J. Food Microbiol 5, 165-180.

DEGRYSE A.C., DELPLA I. et VOINIER M.A., 2008 -Atelier santé environnement risques et bénéfiques possibles des huiles essentielles. 94 p.

DEMOULIN, VINCENT, COPPEJANS, ERIC, DEST et Philippe., 2009 - CATALOGUE DES PLANTES MEDICINALES UTILISEES DANS LA REGION DE ZAËR -maroc occidental.

DENDEN M., et al.,2005 - Effet de la salinité sur la fluorescence chlorophyllienne, la teneur en proline et la production florale de trois espèces ornementales Tropicultura. Vol. 2,3,4. pp. 200-225.

DURAND J.L., SHEEHY J.E. et MINCHIN F.,1987 - Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential of soybean plants experiencing water deprivation. 38 Journal of Experimental Botany. pp. 311-321. Ed.Alpens. a.m; 2005. 95 p.

DORMAN H.J., DEANS S.G., 2000- Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. of AppliedMicrobiology 88(2), 308-316.

ENDRIAS A., 2006- Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à *Hibiscus sabdarif* Ja L. et à *Artemisiaannua*. Thèse de doctorat. Toulouse.**ESCOTT, HARLEIN, KIEIN (2006)**. Microbiologie 2eédition française, de boek, P : 2.

E. Vagi, B. SIMANDI, A. SUHAJDA, E (2005).,Hethelyi. Essential oil composition and antimicrobialactivity of *Origanummarjorana* L. Extract sbtained with ethylalcohol and super critical carbondioxide. J., 38, 51-57

FAID M., CHARAL M. MOSADDAK M., 1996. Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. *J. Essent. Oil Res* 8, 657-664.

FONSECA A.E. et WESTGATE M.E., 2005 - Relationship between desiccation and viability of maize pollen. *94 Field Crops Research*. pp. 114-125.

FOUZIA DJENADI., 2011- Memoire Online, Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne du genévrier (*Juniperus phoenicea*): essai des huiles essentielles et composés phénoliques Université A Mira de Béjaia Algérie - Master en biologie option biochimie appliquée .

FERNANDEZ-LOPEZ et al ., 2005 - Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat science*.p.69:371-380.

FLEURETTE, J., FRENEY J., 1995- "Antiseptie et désinfection". gas chromatography and enantioselective gas chromatography–mass spectrometry analyses. *Journal of Chromatography A* 1212, 114–123.

FLEURENTIN J., CABALION P., MAZARS G., SANTOS JD., YOUNOUS C., 1990. Edition Orstom, France. P234.

FRANÇOIS T., PIERRE C. et EUGENE T., 2007 - Perception de la sécheresse par la plante. Conséquences sur la productivité et sur la qualité des produits récoltés. *Esco "Sécheresse et agriculture"*.

GAGNON C., 2005 - Le patriarche des optimiseurs : le romarin. pp. 1-2.

Gui J et ai.,2007 -Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants.

GRANIER C., INZI D. et TARDIEU F., 2000 - *Plant Physiology*. pp. 34,124.

Ghestem A., Seguin E., Paris M., and Orecchioni A.M., 2001- Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris. pp275. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008).

GUY-GILLY.,2005 - Les plantes aromatiques et huiles essentielles à grasse. S.I. : Harmattan. pp. 85-93

IFTENE .B et BOUMCHEDA. A.,2013- Extraction et analyses physico-chimique des huiles essentielles du romarin (*Rosmarinus officinalis*) de deux régions (Djelfa-M'sila)

- ISERIN P. et al., 2001** - Larousse des plantes medicinales : identification, préparation, soins. S.l. : Larousse, 2001. pp. 10-12.
- JUDD et al ., 2002**- Botanique systématique une perspective phylogénétique .pp84-87
- JEAN-PIERRE DEDET., 2006**-la microbiologie de ses origines aux maladies émergents.ISBN978-26106-B, P 213 -245.
- JAMES J.J. et RICHARD J.H., 2005** - Plant capture from pulses: effects of pulse size, growth rate, and other soilresources. 145 *Oecologia*. 2005. pp. 113-122.
- KARAMAN S., DIGRAK M., RAVID U. & IICIM A., 2001**.Antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. Ethnopharmacol* 76, 183-186.
- KALEMBA D., KUNICKA A .2003**. Antibacterial and antifungal properties of essential oils.*Curr. Med. Chem* 10, 813-829.
- KHADRAOUI Z. et OUANOUKI Y., 2001** - Contribution à l'étude bio écologique des peuplements d'Acridien (Orthoptera-caelifera) dans trois station de la région de Moudjbara W. Djelfa.
- KASPAREK, MAX, JANABI et SUHEL, 2008** - Plantes médicinales La diversité biologique au service de la santé.
- KURITA N., KOIKE S., 1982**. Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. *Agric. Biol. Chem* 46, 159-165.
- QUEZEL P. et SANTA S., 1962**. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed, CNRS, Paris. P86.
- 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, Hôtel Hilton, 22-23/01/2003.
- LAHSSISSENE H., KAHOUADJI A., TIJANE M., HSEINI S., 2009**- catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental) *Les Editions de LEJEUNIA (Belgique) p13*.

LAMENDIN H., TOSCAN G., REQUIRAND P., 2004. Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires Buccodental phytotherapy and aromatherapy EMC-Dentisterie1, 179–192, France.

LARDRY J., HABERKORN V., 2007. Les huiles essentielles : principes d'utilisation Kinesither Rev 61,18-23

LECOEUR J., et al., 1995 - Expansion of pea leaves subjected to short water deficit: cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. 46 Journal of Experimental Botany. 1995. pp. 1093-1101.

LEINONEN I., JONES H.G., 2004 - Combining thermal and visible imagery for estimating canopy temperature and identifying plant stress. *J. Exp. Bot.* 2004, Vol. 55. pp. 1423 - 1431.

LEMAIRE G., DURAND J. L. et LILA M., 1989 - Effet de la sécheresse sur la valeur énergétique et azotée de la luzerne. 9 *Agronomie*. 1989. pp. 841-848.

LUCCHI M.E., 2005-Extraction sans solvant assistée par micro-onde 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.

Macheix J.J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P., (2006). Les Polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, 1-28.

MARIE et al. Flavour And Fragrance Journal FlavourFragr. J.; 19: 134– 138(2004)

MAY J., CHAN CH., KING A., WILLIAMS L, FRENCH G.L., 2000-Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother* 45, 639-643.

MONNEVEUX P., et NEMMAR M. 1986 - Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum L.*) Et chez le blé dur (*Triticum durum desf.*) : étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. . *Agronomie*. 6. pp. 583-590.

NAUCIEL C et VILDEJ.L., 2005 -Bactériologie médicale.2ème Ed .Masson . Paris .ISBN : 2-294-018583.257p.

NASSU et al, Oxidativestability of ferment edgo at meats a usage with different levels of naturalantioxidant. Meat Science. 63:43-49(2003).

NAZLI N.B., 2003 - Etude des huiles essentielles de quelques plantes Algériennes caractéristiques chimiques et valorisation agronomique. Thèse Magistère en sciences agronomiques INA. 128 p.

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.

OUASSILA T., 2010 - Etude phytochimique de plantes medicinales du nord et du sud algeriens. Thèse doctorat universite mentouri-constantine. 248 p.

PERRIN A., COLSON M., 1986. L'appareil sécréteur des lavandes et des lavandins. Parfums, cosmétiques, arômes: 61-63.

PERON J.Y., 2006 - Références productions légumières. 2. S.I. : Lavoisier, 2006. pp. 560-563.

PIBIRI M.C., 2005. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Suisse.P161

PRAJAPATI et al.Insecticidal, repellent and oviposition-deterrentactivity of selected essential oils against *Anophelesstephensi*, *Aedesaegypti* and *Culex quinquefasciatus*. BioresourceTechnol. 96: 1749-1757(2005).

RASOOLI et al (2008) ;Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermumcopticum L.* essential oils. International Journal of Food Microbiology, Grugliasco, v.122, p.135-139, 2008.

RAYNAUD J., 2006. Prescription et conseils en aromathérapie. Edition Tec et Doc, Paris. P247.

RIBAUT J.M., BANZIGER M. et HOISINGTON D., 2002 - Genetic dissection and plant improvement under abiotic stress conditions: drought tolerance in maize as an example. *JIRCAS Working Report*. 2002. pp. 85-92.

- RICHARDH., MULTON J I., 1992.** Les arômes alimentaires. Edition Tec & Doc-Lavoisier. P438.
- RICKE S.C., ELLEN J., LOO V., JOHNSON M.G., 2012.** Organic Meat Production and Processing. Edition Aptara, India. P367.
- SAAB I.N., SHARP R.E. et PRITCHARD J. 1990** - Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. 93 *Plant Physiology*. 1990. pp. 1329-1336.
- SADRAS V.O., 2005** - A quantitative top-down view of interactions between stresses: theory and analysis of nitrogen-water co-limitation in Mediterranean agro-ecosystems. 56 *Australian Journal of Agricultural Research*. 2005. pp. 1151-1157.
- SATRANI B., FARAH A. & TALBI M., 2006.** Effet de la distillation sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de Myrte (*Myrtus communis* L.) du Maroc. *Acta Bot. Gallica* 153(2), 235-242.
- SALLE J., 1991.** Les huiles essentielles synthèse de l'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie .Edition Frison – Roche, Pris. p16, 18, 19,23..
- SACCHETTI,et ses Collaborateurs** : Growing in Argentina. BioresourceTechnology. (In press) (2005).
- SCIMECA D. et TETAU M., 2005** -Votre santé par les huiles essentielles ;
- SELL Y., BENAZRA C., GUERIN B., 2002.**Plantes et réactions cutanées. Edition John libbery Erotext, France. P 126.
- SEBROTYNEK et al.** Comparison of natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat science* .69:289-296(2005).
- SHERWOOD L N., WILLEY J M., WOOLVERTON C J., 2010.** Microbiologie. Edition De Boeck. France. P840.
- SMADJA J., 2009.**Les Huiles Essentielles *Colloque GP3A - Tananarive 2-3 juillet 2009*.
- 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 maraîchères, industrielles,

condimentaires, aromatiques, médicinales. 2003. 79p. Projet ALG/97/G31 PNUD, Alger, Hôtel Hilton, 22-23/01/2003,...

SCHAECHTER et al (1999). Microbiologie et pathologie infectieuse 2eme édition Decock, P ; 1, ISBN-8041-1592-5.).

TANTAOUI-ELARAKI A., BERAOU D., 1994. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oils of selected plant materials. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol **13**, 67-72

TEUSCHER E., AUTON R., LOBSTEIN A., 2005. Les plantes aromatiques, Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition Tec et Doc, Paris. P6, 195-197,301. ,

Tunguy, Martin. 1977. condensed tanins in horse beans seeds.chemical structure and apparent effects on poultry. *Food and agriculture*. 1977. 20, pp. 257-260.

THOMSON J.D. 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes.J. Chem.

TOHIDPOUR A., SATTARI M., OMIDBAIGI R., YADEGAR A., NAZEMI J 2010.Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine* 17, 142-145.

TOUDERT.a.2013. Extraction. Identification d'huiles essentielles de *Lavandula officinalis* et étude de ses activités antimicrobiennes 40-43.

TURNER N.C., 1986 - Adaptation to water deficits: A changing perspective. *Aust J Plant Physiol*. 1986. Vol. 13, pp. 90-175.

Tsai et al . In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sodrinus* .*Food chem.* (in press) (2007)

VIUDA-MARTOS M., RUIZ-NAVAJAS Y., FERNANDEZ-LOPEZ J., PEREZ-ALVAREZ J., 2008- Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata*), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.), essential oils. *Food control* 19, 1130-1138.

VAUBOURDOLLE M. , 2007. Infectiologie. Edition Wolters Kluwer , France. P377.

VAN KEULEN H., 1981 - Modelling the interaction of water and nitrogen. 58 *Plant and Soil*. pp. 205-229.

WANG et al., 2008-Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chem.*108:1019-1022.

WANG Y. et NILE N., 2000 - Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase–oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 2000. Vol. 75, pp. 623-627.

WECKESSER et al., 2007- Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. *Phytomedicine*. (In press) (2007).

ZHIRI A., 2006. Aromathérapie, un peu d'histoire. Edition NUTRA NEWS, France. P 6,8.

ZINSEMEIER C., JEONG B.R. et BOYER J.S., 1999 - Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. *Plant Physiology*. 1999, Vol. 121. pp. 25-36.

ANNEXE 1

1- Le matériel utilisé lors de l'expérimentation

- Balance de précision.
- Etuve
- Chauffe ballon
- Plaques chauffantes
- Hôte à flux laminaire.

2- Verrerie

- Papier aluminium.
- Pipettes graduées.
- Tubes à essai en verre.
- Spatule.
- Réfrigérant à reflux.
- Ampoule à décanter.
- Flacons.
- Burette
- Béchers.
- Pipette pasteur.
- Ballon.
- Boîtes de pétrie.
- Milieu de culture : MH ; sabouraud
- Fioles.
- Portoir pour tubes.
- Entonnoir.
- Etiquettes.
- Erlenmeyer.
- pince
- disques de watterman
-

3-Réactifs et préparations

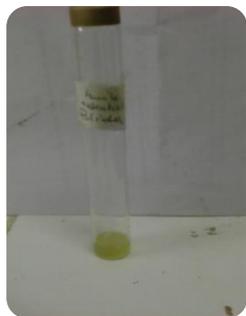
- Eau distillée.
- Méthanol

ANNEXE 2

Les appareils utilisés



Le montage de l'entraînement à la vapeur d'eau.



L'huile essentielle obtenue (Blida –Djelfa)

Agitation



Filtration



Rotavapeur



Récupère l'extrait méthanolique

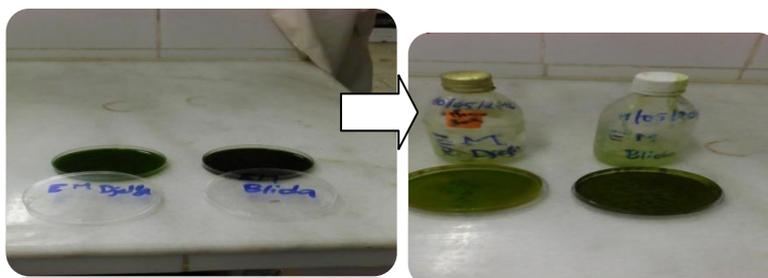
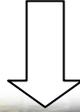


Figure14 : les étapes de préparation de l'extrait méthanolique

➤ **Techniques d'aromatogramme :**



Préparation des solutions des souches



Ecouvillonné les boites de pétri préparées avec les solutions des souches microbiens



Imbibée les disques et mettre 3 répétitions dans une seule boite de pétri

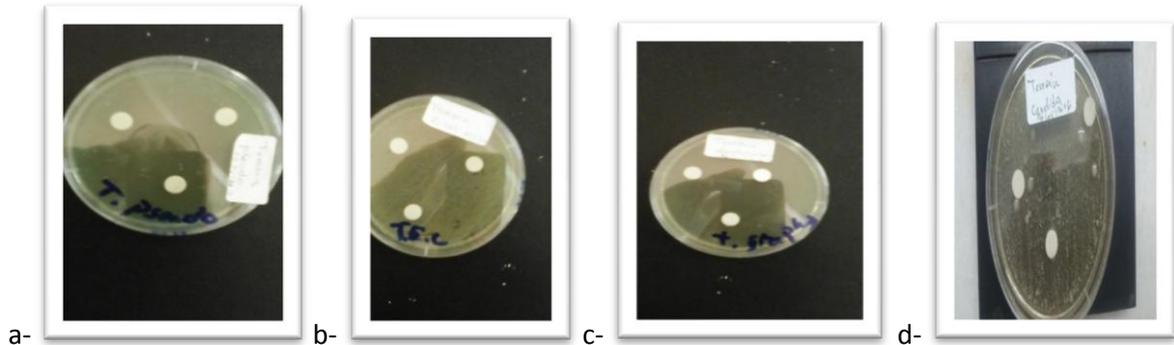


Les boites sont préparée a étuvées



Lecture

ANNEXE 3



a- *P. aeruginosa* (ATCC 49616). c-Témoin *S. aureus* (ATCC 25923)

b- Témoin *E. coli* . d- Témoin *C. albicans* (ATCC 10231)

Figure19 : Effet antimicrobien (témoins)

✓ Les Histogramme des zones d'inhibitions avec les répétitions:

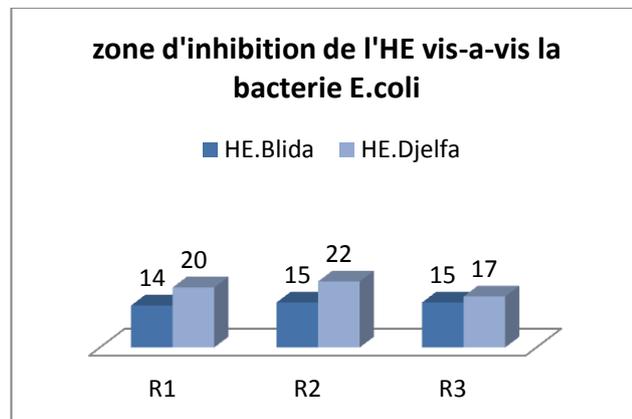


Figure24 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour *Escherichia coli* vis-à-vis l'HE de Romarin région de Blida et Djelfa.

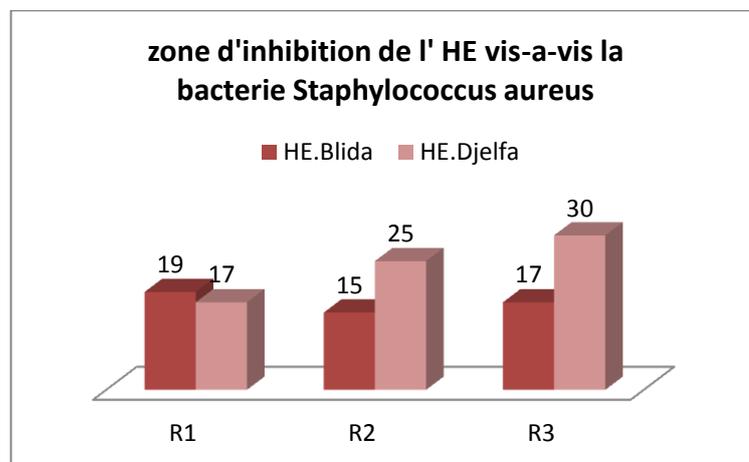


Figure25 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour *Streptococcus aureus* vis-à vis l'HE de Romarin région de Blida et Djelfa .

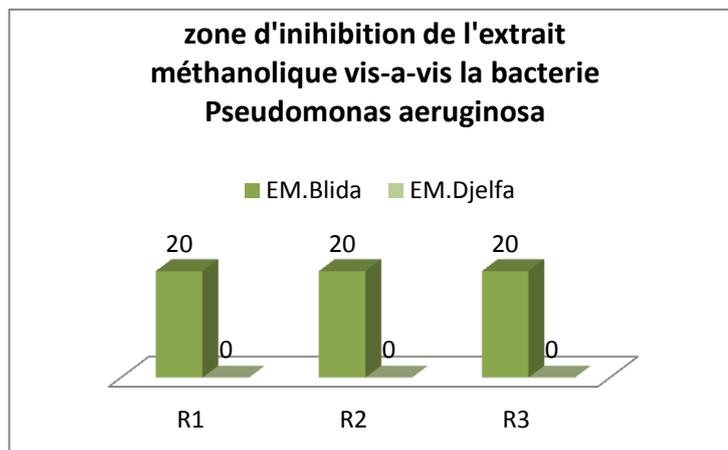


Figure26 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour Pseudomonas aeruginosa vis-à-vis l'HE de Romarin région de Blida et Djelfa .

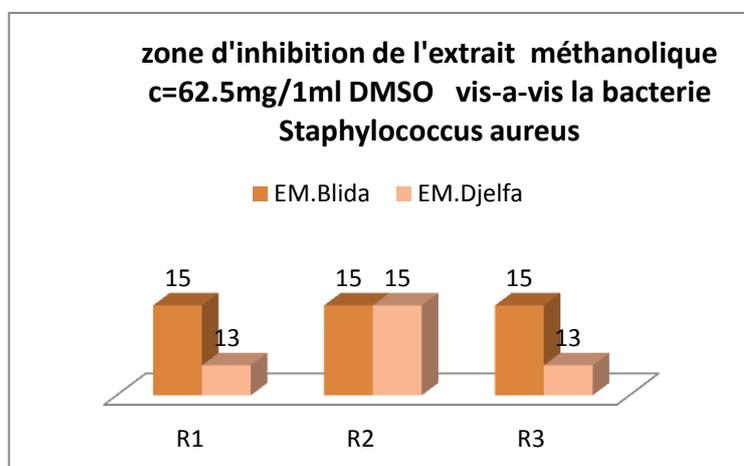


Figure27 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour Streptococcus aureus vis-à-vis l'EM de Romarin région de Blida et Djelfa aC=62.5mg/1mlDMSO.

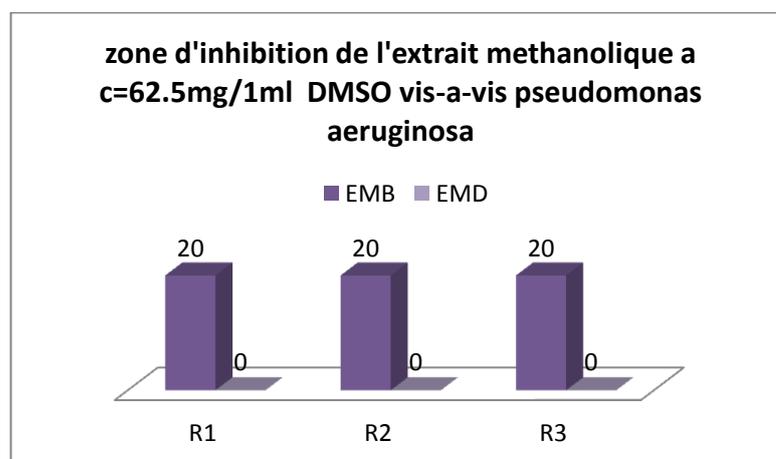


Figure28 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour Pseudomonas aeruginosa vis-à-vis l'EM de Romarin région de Blida et Djelfa à C=62.5mg/1mlDMSO.

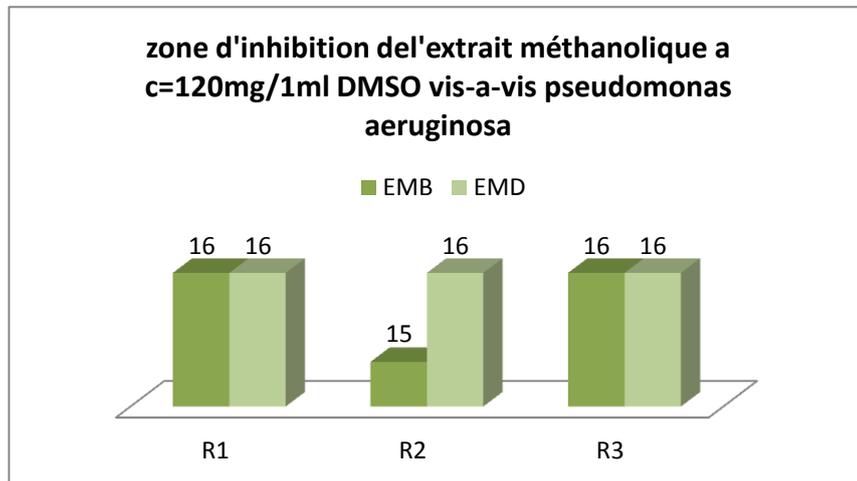


Figure 29 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour *Pseudomonas aureuginosa* vis-à-vis l'EM vis-à-vis l'EM de Romarin région de Blida et Djelfa à C=120mg/1ml DMSO.

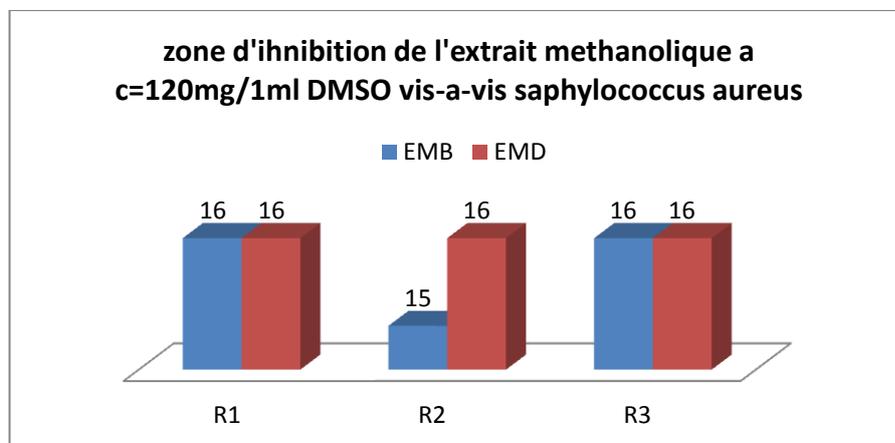


Figure 30 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour *staphylococcus aureus* vis-à-vis l'EM vis-à-vis l'EM de Romarin région de Blida et Djelfa à C=120mg/1ml DMSO.

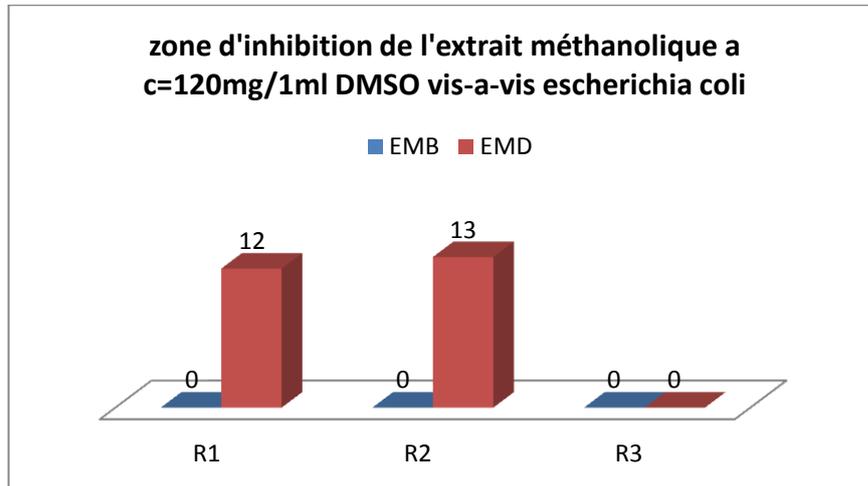


Figure31 : Histogramme présentant les zones d'inhibition pour Escherichia coli vis-à-vis l'EM vis-à-vis l'EM de Romarin région de Blida et Djelfa à C=120mg/1mlDMSO.



Figure 13 : Etuve

INTRODUCTION

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

MATERIELS ET METHODES

RESULTATS ET DISCUSSION

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Chapitre I

Généralités sur les plantes médicinales et aromatiques

Chapitre II

Considérations générales sur le romarin

Chapitre III

Généralités sur le monde microbien