



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence..... / 2018

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté et soutenu par :
BAHAZ Iman

Le: dimanche 17 juin 2018

Etude de l'activité antibactérienne de l'huile Essentielle de *Rosmarinus officinalis*.L

Jury :

Pr.	BELOUCIF	MAA	Université Mohamed Khider de Biskra	Président
Mlle.	CHOUIA Amel	MAA	Université Mohamed Khider de Biskra	Rapporteur
Dr.	DEHIMAT	MAA	Université Mohamed Khider de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2017 - 2018

Remerciement

Avant tout nous remercions Dieu « ALLAH » le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce travail.

Je remercie mon encadreur "CHOUIA AMEL" maitre assistante à l'université de Biskra qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail.

Je remercie tous les équipes de laboratoire pour leur aide précieuse.

Je remercie les membres de jury, chacun a son nom, d'accepter de juger notre travail.

Enfin je veux dire merci à tous les enseignants du département biologie de Biskra pour l'aide pendant ma formation d'étude.

A tous personnes qu'est aidé de proche ou loin.

Table de matière

Sommaire

Remerciement.....	
Table de matière	
Liste des tableaux.....	
Liste des figures.....	
Liste des abréviations.....	
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Généralités sur les huiles essentielles	3
1.1. Définition.....	3
1.2. Répartition et localisation.....	3
1.3. Composition chimique des huiles essentielles	3
1.3.1. Les composés terpéniques.....	3
1.3.2. Les composés aromatiques.....	4
1.3.3. Les composés d'origine diverses.....	4
1.4. Propriétés physico-chimiques	4
1.5. Mode d'action de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles	5
1.6 Conservation des huiles essentielles	5
Chapitre 2 : <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	6
2.1. Définition.....	6
2.2. Caractéristique botanique.....	6
2.3. Systématique de la plante.....	6
2.4. Habitat	7
2.5. Utilisation	7
2.6. Propriétés antibactérienne du Romarin.....	7
2.7. Composition biochimique du Romarin	8
Chapitre 3 : Matériel et Méthodes.....	9
3.1. Matériel	9
3.1.1. Matériel végétal	9
3.1.2. Région d'étude.....	9
3.1.3. Souches bactérienne utilisées	10
• Staphylococcus aureus ATCC25923.....	10

• Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	10
• Escherichia coli ATCC 25922.....	11
3.2. Méthode expérimentale	12
3.2.1. Procédé d'extraction	12
3.2.2. Calcul du rendement	12
3.2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'HE	13
A-Ré-isolément des souches bactériennes	13
B-Préparation du milieu de culture	14
C-Préparation de l'inoculum	14
D-L'ensemencement	14
E-Préparation des dilutions de l'HE	14
F- Préparation des disques	14
G. Application des disques	15
H-Lecture de l'aromatogramme	15
Chapitre 4 : Résultats et discussion.....	17
4.1. Rendement d'extraction.....	17
4.2. Résultats de l'activité antibactérienne	18
Conclusion	22
Bibliographie	23
Annexes	26
Résumés	27

Liste des tableaux

Tableau 1: Diamètre de la zone d'inhibition en mm de l'HE. 18

Liste des figures

Figure 1: Aspects morphologiques du Romarin (QUEZEL. P, SANTA .S, 1963).	7
Figure 2: <i>Rosmarinus officinalis</i> L. identifiée par Docteur Nora Salemkour (CRSTRA.....	9
Figure 3: Extraction de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. par distillation à la vapeur d'eau (Feknous <i>et al</i> , 2014).	12
Figure 4: Méthode de diffusion sur disque.....	13
Figure 5: Aromatogramme (Ponce A.G., et al, 2003).	15
Figure 6: Huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	17
Figure 7: Zones d'inhibition de l'HE de <i>R.Officinalis</i> sur <i>E.coli</i>	19
Figure 8: Zones d'inhibition de l'HE de <i>R.Officinalis</i> sur <i>P.aeruginosa</i>	19
Figure 9: Zones d'inhibition de l'HE de <i>R.Officinalis</i> sur <i>S. aureus</i>	20

Liste des abréviations

AFNOR: Association Française de Normalisation

HE: Huile Essentielle

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ATCC: American Type Culture Collection

% : Pourcentage

°C : degré celcius

S. aureus : Staphylococcus aureus

E.coli: Escherichia coli

P. aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa

Introduction

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

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme l'antibactérienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales folklorique. Ces plantes représentent une nouvelle source des composés actifs (Hamidi, 2013).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique (Meddour *et al.*, 2013).

Rosmarinus officinalis L, qui a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et agro-alimentaire, possède plusieurs activités thérapeutiques: cholagogue, antispasmodique, emménagogue. Grâce à certains composants (carnosol, rosmaridiphénol, rosmanol et acide rosmarinique (Atik bekkara *et al.*, 2007).

Aussi la maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale (Benbrinis, 2012).

C'est pourquoi nous avons voulu contribuer à l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

Notre étude est répartie en quatre chapitres, initiés par une recherche bibliographique ou nous apportons dans le premier chapitre une généralité sur les huiles essentielles, leurs compositions ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques.

Dans le second chapitre nous effectuerons une présentation botanique de la famille Lamiacées et de l'espèce *Rosmarinus officinalis*, sa localisation géographique dans le monde, et son utilisation.

Le troisième chapitre présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir:

- l'extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

- test de sensibilités, des bactéries de notre huile essentielle.

Le quatrième chapitre abordera les différents résultats et leurs discussions.

Et enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

Partie Bibliographique

CHAPITRE I:
Généralité Sur Huiles
Essentielles

1.1. Définition

Les huiles essentielles végétales sont des métabolites secondaires on été produit par les plantes, se sont des composés volatils, dans la plus part des cas à la senteur aromatique, qui peuvent avoir une action très variée. Certaines possèdent ainsi des vertus anti- inflammation, tandis que d'autres sont antispasmodiques, diurétiques au expectorantes, il existe également des huiles essentielles qui stimulent la circulation sanguine dans la zone traitée (Hans, 2007).

1.2. Répartition et localisation

Les huiles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs bien sûr (*bergamotier, tubéreuse*), mais aughfssi feuilles (*citronnelles, eucalyptus, laurier noble*) et bien que cela soit moins habituel, dans des écorces (*cannelles*), des bois (*bois de rose, santal*), des racines (*vétivers*), des rhizomes (*curcuma, gingembre*), des fruites (*anis, badiane*), des graines (*muscade*) (Bruneton, 1999).

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées ; souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante: cellules a huiles essentielles des lauracées ou zingibéracée; poches sécrétrices des myrtacées ou des rutacées, canaux sécréteurs des apiécée ou des astéracée (Bruneton, 1999).

1.3. Composition chimique des huiles essentielles

Les composants aromatiques sont des molécules chimiquement définies, se sont des éléments chimiques des huiles essentielles qui leur confèrent des caractéristiques thérapeutiques. Le nombre de composés isolés au sein des huiles essentielles est d'environ un millier, il en reste encore beaucoup à découvrir.

Ces composés appartiennent à deux familles chimiques bien distinctes à savoir, les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés de phénylpropane (Aous, 2006).

1.3.1. Les composés terpéniques

Ils sont issus d'une voie métabolique secondaire, ils sont formés du couplage de plusieurs unités isopréniques (C₅H₈), soit deux unités pour les monoterpènes (C₁₀H₁₆) (myrcène, β-pinène, γ-terpinène, etc....) et trois pour les sesquiterpènes (C₁₅H₂₄) (βcaryophyllène, α-humulène, etc...). Exceptionnellement, quelques diterpènes (C₂₀H₃₂)

peuvent se retrouver dans les huiles essentielles. Ces terpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques (Outaleb, 2010).

1.3.2. Les composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C₆-C₃) sont beaucoup moins fréquents que les précédents, très souvent des propényl phénols, parfois des aldéhydes.

On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés (C₆-C₁) comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'antranilate de méthyles, les lactones dérivées des acides cinnamiques, elles seront également présentées dans certaines huiles essentielles (Belyagoubi, 2006).

1.3.3. Les composés d'origine diverses

Les huiles essentielles peuvent aussi renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire entraîné lors de l'hydrodistillation comme des carbures, des acides (C₃ à C₁₀), des alcools, des aldéhydes, des esters acycliques et des lactones (Bruneton, 1999).

1.4. Propriétés physico-chimiques

Selon Bardeau (1976) et Bruneton (1999), les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques :

□ Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organiques, et peu solubles dans l'eau à laquelle, toutefois, elles communiquent leur odeur.

□ Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0,75 à 0,99 (les huiles essentielles de sassafras, de girofle ou de cannelle constituent des exceptions).

□ Elles ont un indice de réfraction élevé.

□ Sont très altérables et sensibles à l'oxydation.

□ Ce sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides, très odorantes volatiles.

□ A température ambiante, elles sont généralement liquides, incolores ou jaunes pâles, il existe, cependant, quelques exceptions, exemple : huile essentielle à azulène de coloration bleue.

1.5. Mode d'action de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles

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.

À la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effets des H.E. sur les microorganismes: une activité létale (bactéricide et fongicide) (Carson et Riley, 1995) et une inhibition de la croissance (bactériostatique) (Freeman et Carel, 2006).

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases:

*Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte de constituants cellulaires.

*Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.

*Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (Elkalamouni, 2010).

*Au cours d'un travail au laboratoire, Abdelouahid D.E. et Bekhechi. C (2004) ont démontré que l'activité bactéricide des H.E. vis-à-vis des cellules bactériennes pourrait être expliquée par une dénaturation des protéines provoquée par le rôle solvant et déshydratant des huiles.

Adzert et Passet (1972) ont souligné que les composés terpéniques des H.E. et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure.

1.6 Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances très délicates et s'altèrent facilement, ce qui rend leur conservation difficile. Les risques de dégradation sont multiples : photoisomérisation, photocyclisation, coupure oxydative de propénylphénols, peroxydation des carbures et décomposition en cétones et alcools (limonène).

Ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des flacons propres et secs en aluminium, en acier inoxydable ou en verre teinté, à l'abri de la lumière et de la chaleur (Bekhechi et Abdelouhid, 2010).

CHAPITRE II:
Rosmarinus officinalis L.

2.1. Définition

Le Romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) est une plante des coteaux arides garrigues et lieux rocheux de la région méditerranéenne et même un peu plus au Sud jusqu'aux confins sahariens depuis l'antiquité, il est employé pour améliorer et stimuler la mémoire encore aujourd'hui en Grèce, les étudiants en font brûler dans leurs chambres en période d'examens (BOULLARD, 2001).

2.2. Caractéristique botanique

Les feuilles sont étroitement lancéolées linéaires, faibles et coriaces, les fleurs d'une bleue pâle, maculées intérieurement de violet sont disposées en courtes grappes denses. S'épanouissent presque tout au long de l'année (ATIK BEKKARA et al., 2007).

2.3. Systématique de la plante

Règne : plantes

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Lamiales (labiales)

Famille : Lamiaceae

Genre : *Rosmarinus*

Espèce: *Rosmarinus officinalis.L* (QUEZEL et SANTA, 1963).

- Appellations régionales en Algérie : en plus souvent

Région de l'Est : Eklil

Région de l'Ouest : Helhal

Région du Centre : Yazir (MED-CHCLIST, 1986).



Figure 1: Aspects morphologiques du Romarin (Quezel et SANTA, 1963).

2.4. Habitat

Originaire des régions méditerranéennes, le Romarin pousse spontanément dans le Sud de l'Europe. On le cultive dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps.

Il apprécie les climats chauds, modérément secs, les branches récoltées pendant l'été sont séchées à l'air et à l'ombre (HENRICH et *al.*, 2006).

2.5. Utilisation

Le Romarin est souvent cultivé pour son huile essentielle. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique.

Il est considérée utile pour contrôler l'érosion du sol (HENRICH et *al.*, 2006).

L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires (Arnold et *al.*, 1997).

2.6. Propriétés antibactérienne du Romarin

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 glucosyl transférase (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).

2.7. Composition biochimique du Romarin

L'huile essentielle du Romarin (1 à 2% dans la plante) contient : de l' α – pinène (7 à 80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 35%), de l'eucalyptol (1 à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène. En plus de l'huile essentielle on trouve dans le Romarin: 2 à 4 % de dérivés triterpéniques tels que : l'acide ursolique , l'acide oléanolique ,l'acétate de germanicol ; des lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide canosolique, romanol,romadial,des acides phénolique, des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque, des acides gras organiques : l'acide citrique, glycolique, et glycérique, des stérols, de la choline , du mucilage (Belakhdar, 1997) et de la résine (Beloued,1998).

CHAPITRE III:

Matériel et méthodes

3.1. Matériel

3.1.1. Matériel végétal

La partie aérienne de la plante utilisée dans cette étude est récoltée de la région d'Ain zaâtout de Biskra en Mars 2017 (**Figure 2**). La plante recueillie a été identifiée comme ; *Rosmarinus officinalis* L. par le Docteur Nora Salemkour du CRSTRA.



Figure 2: *Rosmarinus officinalis* L. identifiée par Docteur Nora Salemkour (CRSTRA)

La partie aérienne (feuilles et fleurs) a été nettoyée, lavée avec de l'eau du robinet et séchées à l'ombre, dans un endroit sec et aéré pendant un mois. Ensuite, elle a été pesée et récupérée dans des flacons en verre et conservées à la température ambiante jusqu'à leur utilisation.

3.1.2. Région d'étude

De tous les soulèvements montagneux qui constituent l'Atlas algérien, l'Aurès est assurément celui dont la situation présente le plus intérêt géographique. L'Aurès, placé à l'extrémité Est de Algérie, se trouve plus voisin de la Méditerranée qu'aucune autre partie de l'Atlas saharien ; entre les Hauts-Plateaux constantinois contre lesquels il s'appuie au Nord et la dépression saharienne dans laquelle il plonge au Sud. Par suite les caractères climatiques de la bordure Nord et de la bordure Sud de l'Aurès diffèrent profondément. La température est beaucoup plus élevée et les pluies sont beaucoup moins abondantes à Biskra qu'à Batna (Busson, 1900).

Cette région était connue dès l'Antiquité sous le nom d'*Aurasius mons*, toponyme berbère signifiant « la montagne fauve ». Les Aurès faisaient partie du territoire de l'ancienne Numidie. Ain Zaatout est le nom administratif du village Beni Ferah en Algérie. Le village est situé à 35,14° Nord et 5,83° Est entre les wilayas de Biskra et Batna au sud du massif montagneux des Aurès. Ain zaatout (Beni Ferah) a une population d'environ 5 000 habitants. Essentiellement peuplé de chaouis, peuple berbère, la langue courante est le Chaoui, dans une variante distinctive. Elle a une superficie totale de 171.19 km² (Anonyme 1).

3.1.3. Souches bactérienne utilisées

Les souches utilisées dans les tests font parties des microorganismes, qui sont des pathogènes et des contaminants. Le support microbien est composé d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* qui ont été isolées des produits pathologiques provenant de laboratoire de bactériologie de l'hôpital « hakim saadan » de Biskra.

- *Escherichia coli* (ATCC25922).

- *Pseudomonas aenuginosa* (ATCC27853).

- *Staphylococcus aureus* (ATCC25923).

• **Staphylococcus aureus ATCC25923**

Les *staphylocoques* sont des cocci à gram positif qui tendent à se grouper en amas (Nauciel, 2000), irrégulier à la façon d'une grappe de raisin. *Staphylococcus aureus* est un germe aérobie - anaérobie facultatif (Avrilet *al.*, 2000), doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales, possède une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de *staphylocoques*. La bactérie est très répandue chez l'homme et dans de nombreuses espèces animales. Chez l'homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses et des zones cutanées humides. Il développe rapidement des résistances aux antibiotiques et les souches hospitalières ne sont souvent sensibles qu'aux glycopeptides (Nauciel, 2000).

• **Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853**

Le genre *pseudomonas* est fait de bacilles mobiles aérobies stricts, se cultive facilement sur les milieux usuels. *Pseudomona aeruginosa* (ou bacille pyocyanique) se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ses colonies (Nauciel, 2000). C'est une bactérie ubiquiste qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Cette

bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et des divers animaux. Considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales.

- **Escherichia coli ATCC 25922**

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. *Escherichia coli* est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers (Nauciel, 2000).

3.2. Méthode expérimentale

3.2.1. Procédé d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par Entraînement à la vapeur d'eau en utilisant l'appareil de Clévenger.

400g de plante sèche (*romarin*) est introduite dans une ampoule de 2 L au-dessus d'un ballon imprégné de l'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile ; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité. Les huiles essentielles récupérées dans de petits flacons opaques et stockée à 4°C (Feknous *et al.*, 2014).



Figure 3: Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. par distillation à la vapeur d'eau (Feknous *et al.*, 2014).

3.2.2. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, il est exprimé par la formule suivante :

$$\text{RHE}(\%) = \frac{M'}{M} \times 100$$

RHE : Rendement en huile essentielle en.

M' : Masse d'huile essentielle en gramme.

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme (Feknous *et al.*, 2014).

3.2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'HE

L'activité antibactérienne de l'HE a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque (l'aromatogramme). Une suspension bactérienne de 18 à 24 heures de chaque souche antibactérienne est préparée avec l'eau physiologique. Des boîtes de Pétri contenant la gélose de Mueller Hinton sont inoculées. A la surface de chaque boîte on dépose six disques de papier filtre (Whatman n° 5) stériles de 6 mm de diamètre imbibés par 10 µl de différentes concentration d'huile essentielle supplémentée de DMSO (HE, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et DMSO). L'ensemble est incubé pendant 24 heures à 37°C. Cette méthode est dite l'aromatogramme. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole avec des disques standard de 10µg. Cette méthode est dite l'antibiogramme. Après 24 heures d'incubation, une zone ou un halo clair est présent autour du disque si l'huile essentielle inhibe le développement microbien. Dans la technique de diffusion il y a une compétition entre la croissance de la bactérie et la diffusion du produit à tester (Guinoiseau, 2010).

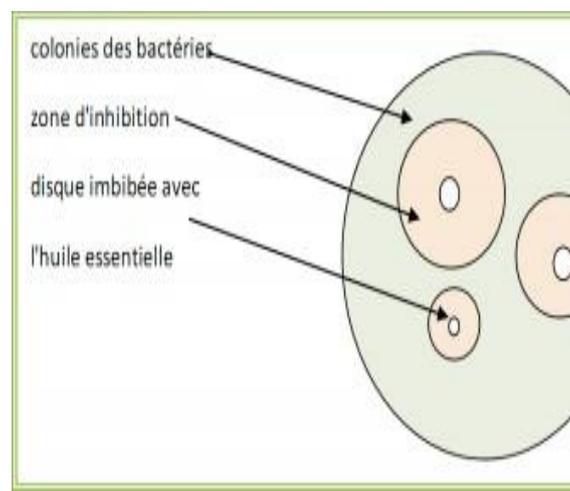


Figure 4: Méthode de diffusion sur disque

A-Ré-isolément des souches bactériennes

On a fait un prélèvement des souches bactériennes qui sont testés par anse et ensemencés selon la méthode de stries sur une boîte de Pétri coulée par gélose nutritive puis incubé 18 à 24 heures à 37 °C, pour l'obtention des souches pures et jeunes.

B-Préparation du milieu de culture

La gélose milieu Mueller –Hinton .est préparée en dissolvant 21g de poudre de gélose dans un 1000 ml d'eau distillé dans un erlene placées sur un agitateur plaque- chauffante.la gélose dissolue est versée dans des flacons puis stérilisées dans l'autoclave à 120C° pendant 20mn, et en fin conservée dans le réfrigérateur à 4°C avant utilisation milieu Mueller –Hinton .est fondu dans un bain marie à 95C° et coulée en boîte de pétrie sur un épaisseur de 3 mm (environ 10 ml par boîte),les géloses sont pré-séchées avant l'emploi (Annexe 1).

C-Préparation de l'inoculum

A partir des boites contenant les germes pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) à partir des pré-cultures congelées, on racle 3 colonies à l'aide d'une pipette pasteur, puis on la décharge dans un tube de l'eau physiologique stérile.

On dépose une goutte de suspension bactérienne, préparer sur la gélose coulée dans un boîte de pétrie, puis on l'ensemence à l'aide de pipette pasteur.

Les boites préparées sont incubées à 37°C pendant 18 à 24h.

D-L'ensemencement

Cette opération se fait après la préparation de l'inoculum, avec un écouvillon on prend des colonies bactérienne et on met dans 2ml d'eau physiologique, on trempe l'écouvillon stérile dans la suspension bactérienne. Puis on flotte l'écouvillon sur la totalité de la surface de MH, en haut et bas, en strie serrées, un étalement uniforme en nappe.

E-Préparation des dilutions de l'HE

On prépare 4 tubes en verre stériles (1/2,1/4,1/8,1/16) ; le premier contient 500µl de solution et 500 µl de diluant (DMSO) .On ajoute dans le deuxième tube (1/4) 500 µl du premier tube (1/2) et 500 µl DMSO, agité bien. On répète le procédé jusqu'on terminé.

F- Préparation des disques

On a coupé le papier de whatman en disque de 6mm, ces disque doivent posséder un contour régulier pour donner une zone d'inhibition que l'on peut mesurer facilement .Ces disque sont stérilisés dans un autoclave pendant 20 minutes à120°C.

G. Application des disques

On utilise une pince pour mettre 7 disques dans le boîte, à l'aide d'une micropipette on imbibe chaque disque par 10 μ l d'extrait : les quatre disques contiennent les dilutions (1/2,1/4,1/8,1/16) et le cinquième disque pour l'huile pure, et le sixième pour DMSO, et le dernier représente le témoin positif (Gentamicine).

H-Lecture de l'aromatogramme

L'activité antibactérienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibitions de la croissance microbienne autour des disques contenant l'extrait à tester. Donc L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques.

Tous les résultats sont présentés par la moyenne \pm l'écart type (3 répétition pour chaque essai).

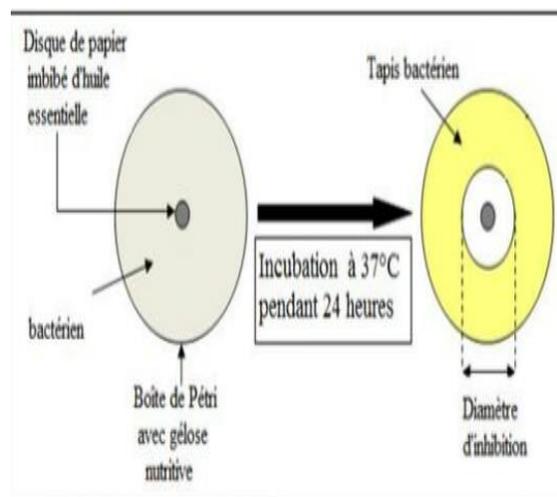


Figure 5: Aromatogramme (Ponce et al., 2003).

Selon Ponce et al., (2003), les diamètres des zones d'inhibitions de l'activité antibactérienne sont rangés en 4 classes à savoir :

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8 mm
- Sensible (+): diamètre compris entre 8 à 14 mm
- Très sensible (++) : diamètre entre 15 à 20 mm
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm

CHAPITRE IV:

Résultats et discussion

4.1. Rendement d'extraction

Dans cette étude, nous avons procédé à l'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis L.* par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau. Et cela afin d'évaluer ses propriétés antibactérienne. Cette technique a permis d'obtenir une huile essentielle (**Figure 6**) d'une coloration jaune claire presque blanche, avec un rendement de 0.62%.

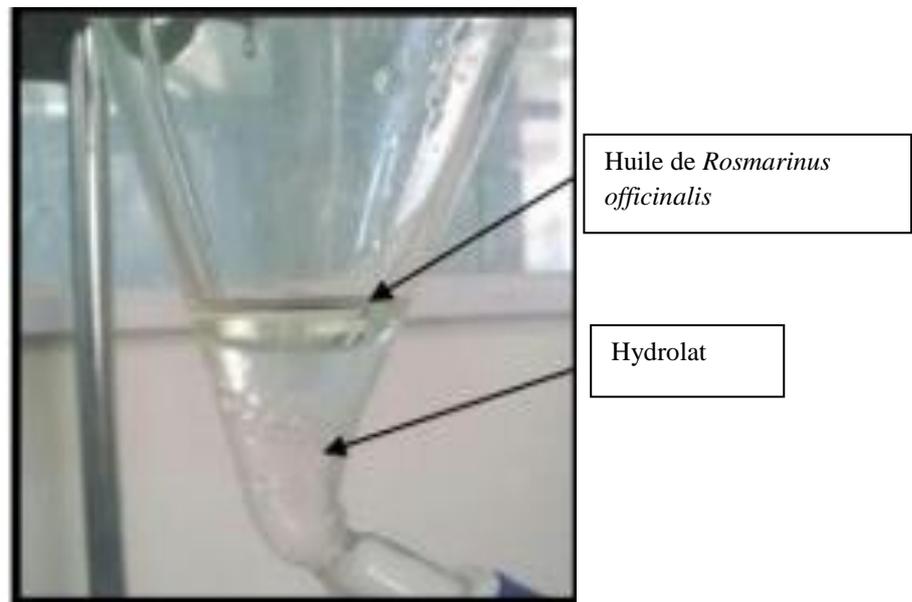


Figure 6: Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis L.*

Ce résultat est conforme avec les normes AFNOR. (0,5-2%), cette variation peut être due aux différents facteurs qui rentrent en jeu, parmi eux ; origine de la plante, la nature du sol, la période de la récolte, le régime d'irrigation, la durée de séchage, le mode d'extraction, les propriétés génétique, les changements climatiques, et la variété d'espèce (Zabeirou et Hachimou, 2005).

Bardeau .F (1976), a montré que l'irrigation a un effet positif sur la croissance végétative. Ainsi que l'insuffisance ou l'excès de l'eau a un effet négatif sur le rendement en HE.

4.2. Résultats de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *R.officinalis* L. A été évaluée dans cette étude par la technique de diffusion en milieu gélosé par l'antibiogramme (méthode de disques) vis-à-vis trois germes pathogènes ; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, et *Pseudomonas aeruginosa*.

La méthode de disque a permis de déterminer l'action de l'HE de la plante dissout dans le DMSO sur les différentes souches, celle-ci se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné de l'HE comme témoin de l'absence de la croissance bactérienne dans cette zone.

Les résultats obtenus (diamètre d'inhibition en mm) sont regroupés dans le (**tableau 1**). Les valeurs 1(SM), 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16 correspondent aux différentes dilutions de la concentration initiale de l'HE dans le DMSO qui est 1mg/ml.

Tableau 1: Diamètre de la zone d'inhibition en mm de l'HE.

	Témoin (+)	Témoin (-)	1(SM)	1/2	1/4	1/8	1/16
<i>E. coli</i>	33	6	17,3±2,30	12±0	10±0	9,7±0,57	6,3±0,57
<i>S. aureus</i>	33	6	13±0	11±0	8±0,57	8±0	7±0
<i>P. aeruginosa</i>	30	6	9,7±0,57	8±1	6,7±1,15	6,66±0,57	6±0

L'HE de la partie aérienne de *R.officinalis* L. a présenté un effet antibactérien vis-vis les trois souches testées, mais il reste faible en se référant à la gentamycine. Absence d'une activité pour les disques témoins négatifs, ce qui indique que le DMSO n'a aucun effet sur les souches bactériennes testées, les zones d'inhibition sont illustrées dans le (**tableau 1**).

A partir des diamètres des zones d'inhibition représentés dans le tableau, on peut interpréter qu'il ya un effet inhibiteur de l'HE de romarin sur *E. coli* et *S. aureus* avec une meilleur inhibition par rapport *P. aeruginosa*. Les dimètres d'inhibition sont en fonction de la dose déposée sur le disque.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Ayadi et al. (2011), ils ont montré que les huiles essentielles de *R.Officinalis* possèdent une activité antibactérienne surtout contre le *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (ATCC7625).

Et aussi selon les resultats botenus par Mouas et al. (2017), ils montré que le huiles essentielles de *R.officinalis* ont inhibe la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia*

coli. Mais aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée concernant *Pseudomonas aeruginosa*.

D'après Ponce et al. (2003), et selon les résultats obtenus dans cette étude, on peut classer la sensibilité des bactéries testées comme suit ; *S.aureus* et *P.aeruginosa* (diamètre d'inhibition est entre 8 et 14) sont sensible alors qu'*E.coli* (diamètre d'inhibition est entre 15 et 20) est très sensible.

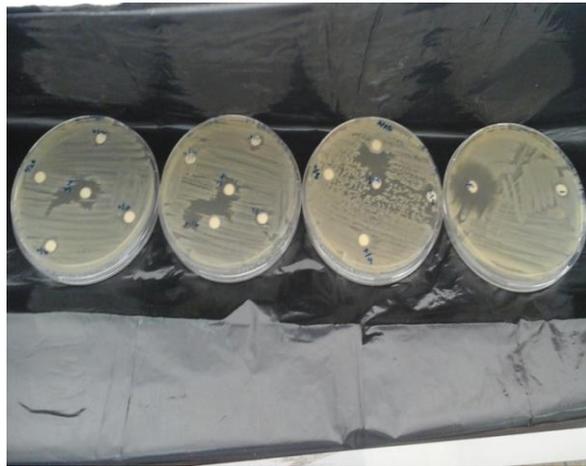


Figure 7: Zones d'inhibition de l'HE de *R.Officinalis* sur *E.coli*.



Figure 8: Zones d'inhibition de l'HE de *R.Officinalis* sur *P.aeruginosa*.

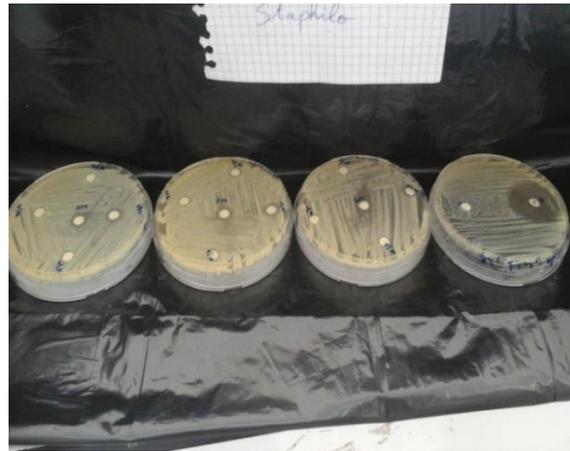


Figure 9: Zones d'inhibition de l'HE de *R. Officinalis* sur *S. aureus*.

Il en ressort de l'étude de la sensibilité des souches testées que l'HE agit différemment sur ces microorganismes. C'est-à-dire, qu'un composé peut avoir une action très importante sur un germe (la sensibilité d'*E. coli*) ou une action moindre (*S. aureus* et *P. aeruginosa*).

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (Essawi et Srour, 2000).

D'après Turkmen et *al.* (2007), les bactéries Gram (+) sont plus sensibles que les bactéries Gram (-) cette sensibilité peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Ces résultats sont en d'accord avec nos résultats pour le cas de *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram (-) a été rapportée, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent déranger l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane (le cas d'*E. coli*).

La résistance de la souche peut être attribuée à la capacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans l'agar (Hayouni et *al.*, 2007). Il peut aussi lier à la méthode de diffusion en milieu gélosés (Fazeli et *al.*, 2007).

Comme il a été rapporté auparavant, le mode d'action principale des huiles essentielles consiste en la lyse de la paroi bactérienne du fait de leurs propriétés lipophiles (Souza et *al.*, 2005).

Selon Belaiche (1979), qui a montré que la perte des composés volatils d'huile essentielle durant l'extraction a une influence sur son efficacité sur les bactéries. Donc, il serait rentable d'essayer un autre procédé d'extraction pour obtenir d'huile essentielle efficaces du point de vue activité antibactérienne. La faible efficacité pourrait être aussi due au fait qu'au cours de la période d'incubation quelques composants volatils de l'huile peuvent s'évaporer des milieux de culture, ce qui diminuerait sa concentration, et par la suite son activité antibactérienne.

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Le présent travail est consacré à l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle extraite de la plante *Rosmarinus officinalis* L., qui appartient à la famille des lamiacées, et utilisée en Algérie pour son intérêt thérapeutiques.

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* a permis d'obtenir une valeur de 0.62%. Cette valeur est similaire avec celles obtenues aux résultats d'autres études sur la même espèce, est surtout conformes à la norme AFNOR.

L'activité antibactérienne a été évaluée sur trois souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, et *Pseudomonas aeruginosa*, selon la méthode de diffusion sur disque, les résultats obtenus indique que l'huile essentielle du romarin est actif et donne une activité antibactérienne sur toutes les souches avec un effet très important sur *Escherichia coli*. A la base de ces résultats, on peut prédire que ces huiles essentielles peuvent servir comme une base de lutte biologique.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constituent qu'une première étape de la recherche de substances de source naturelle biologiquement active. Cependant des études complémentaires seront nécessaires pour confirmer les performances mises en évidence.

Il s'avéra indispensable de pouvoir approfondir les études sur les composants biochimiques et leur structure ainsi que la détermination des différentes activités biologiques afin d'envisager la formulation d'un médicament traditionnel amélioré dans le futur.

- Abdelouahid D.E. ; Bekhechi C. : Pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Anthémis nobilis* Biologie et Santé, Vol n° 4, (10), 91-100,2004.
- Adzert T. ; Passet J. : Exposé communiqué à la journée de l'aromatique, chimiotaxonomie du genre *Satureja calamita*, EPPOS (Luglio), p 1-5, 1972.
- AFNORNF T 75-006, huile essentielle. Association française de normalisation. Paris. pp559-563.
- Anonyme 1. https://fr.wikipedia.org/wiki/Ain_Zaatout
- Aous W. 2006. Extraction des huiles essentielles du *Laurus nobilis* L. et d'*Organum glandulosum* Desf. Et Evaluation de leur bioactivité sur *Rhyzopertha dominica*(F.)(Coleoptera : Bostrychidae). Thèse de magister, Institut National Agronomique El-Harrach –Alger, 102p.
- Arnold, et al., (1997). Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. from Algeria and *R. officinalis* L. from other countries. *J.essent.OilRes.* 9:167-175.
- Atik bekkara, F., Bousmaha, L., Taleb bendiab, S.A., Boti, J.B., Casanova J. (2007). Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé.* 7: 6-11.
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H.2000. *Bactériologie clinique : 3ème édition* Ellipses (Ed) Paris, 602 p.
- Bardeau F.1976 : *La médecine par les fleurs.* Ed. Robert Laffont.
- Bekhechi C., Abdelouahid D. 2010. *Les huiles essentielles.* Office de publications universitaires .Algérie, p.47.
- Belaiche.1979. Etude phytochimique de quelques extraits obtenus de la plante *Matricaria pubescens* (Asteraceae) et l'évaluation de l'activité antioxydante. Thèse de Magister. Université d'Ouargla, p 30.
- Beloued A. 1998. *Plantes médicinales d'Algérie:2ème Edition* .Office des publications.
- Belyagoubi L. 2006.Effet de quelque essence végétale sur les croissances des moisissures de détérioration de céréales .Thèse de Magistère, Université de Tlemcen, 35p.
- Benbrinis S. 2012. Evaluation des activités antioxydantes et antibactériennes des extraits de *Santolina chamaecyparissus*. Thèse de Magister en biochimie. Université Ferhat Abbas-Sétif. Algérie. P.84.
- Boullard B. *Dictionnaire des plantes médicinales du monde.*Paris : Estem. P174(2001).
- Bruneton J. 1999. *Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3ème édition,* Techniques et documentations, Paris, P. 227-310-312-313-314.494.
- EL KALAMOUNI C. 2010 : *Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées.* Thèse de doctorat, université de Toulouse, 375p.

- Essawi T., and Srour M. 2000. Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol* ; 70 :343-349.
- Fazeli M, Amin G, Ahmadin-Attari M, Ashtiani H, Jamalifar H, Samadi N. 2007. Antimicrobial activities of Iranian sumuc and avishane shirazi (*Zotaria multiflora*) against some food-borne bacteria, *Food Control Ethnopharmacol*, 18, 2007, 123-126.
- Guinoiseau E. 2010. Molécules, antibactérienne issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, option : Biochimie- Biologie moléculaire, France. 50p.
- Hamidi Abdelrazeg, these présenté pour obtenir le diplôme de magister en chimie organique, .Université kasdi Merbah-Ourgla. promotion 2013.
- Hans. 2007 .1000 Plantes aromatiques et médicinales. Terres éditions, Toulouse, p.
- Hayouni E, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M. 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, *Food Chemistry*, 105, 2007, 1126-1134.
- HENRICH, et al., (2006). Ethnobotany and Flavonoids-potent and versatile.
- <http://nature.jardin.free.fr/>
- MED-CHCLIST. Edition W. Greuter. H.M. Burdet- volume : 3; P2316(1986)
- Meddour A., Yahia M., Benkiki N., Ayachi A. 2013. Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *Capparis Spinosa* L. *Lebanese Science Journal*. Vol. (14) :49-60.
- Mouas Y, Benrebiha F Z, Chaouia CH. 2017. évaluation de l'activité Antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *Rosmarinus Officinalis* L. université de Blida. Faculté de sciences de la nature et de la vie. Département de la biotechnologie. Laboratoire en biotechnologie des productions végétales, B.P.270, route de soumaa, Blida 09000, Algérie :(1)363-370.
- Nauciel C. 2000. Bactériologie médicale. Masson (Ed). Paris, 276p.
- Outaleb T. 2010. Huiles essentielles et extraits de romarin : composition chimique et activités antioxydant et antimicrobienne. Thèse de Magister, Ecole National Supérieure d'Agronomie –El Harrach d'Alger, 112 p.
- Ponce A.G., Fritz R., del Valle C.E., Roura S.I. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microfora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie* 36: 679–684.
- QUEZEL P., SANTA S: Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, CNRS, Paris, (1963) : pp 600(1963).

- Souad FEKNOUS (*), Fairouz SAIDI (*), Ramdhane MOHAMED SAID (*), (*) Unité de recherche en Biotechnologies Végétales, Département de Biologie, Université Saad Dahlab de Blida, Algérie. Revue « Nature & Technologie ». A- Sciences fondamentales et Engineering, n° 11/Juin 2014. Pages 07 à 13.
- Souzaet *al.*, 2005. Biologie vegetale : l'organisation végétative.Nouvelle édition (Ed) DOIN Editeur Groupe liaison SA, France, p. 319.
- Tsai et al., (2007). In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of streptococcus sodrinus .Food chem. (in press).
- Turkmen N., Velioglu Y., Sari F., Polat G. 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of Black tea. *Molecules*. 12: 484-496.
- Weckesser et al., 2007 : Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. *Phytomedicine*. (In press).
- Zabeirou ; Hachimou.2005 .Étude comparative entre les Huiles essentielles de la Menthe Verte (*Mentha Spicta L*) et de la Poivree (*Mentha Piperita L*) dans la région d'Ouargla .Mémoire de DES Biochimie –Université de Kasdi Merbbah Ouargla .p16.

Annexe 1**Principaux milieux de culture utilisée****Milieux solides**

BN..... 0.8g /100ml l'eau distillé

GN.....5.75g/250ml l'eau distillé

MH.....21g/1000ml l'eau distillé

Milieux liquides**Composition d'eau physiologie**

Chlorure de sodium Na Cl.....0.9g

Eau distillé100 ml

Résumés

Rosmarinus officinalis L. هي شجيرة تنتمي إلى عائلة *lamiaceae* إنه نبات طبي يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي في الجزائر . بالإضافة إلى زيوتها الأساسية لها أنشطة بيولوجية مهمة ويمكنها أن تحل بنجاح محل المضادات الحيوية التي تظهر عدم كفايتها ضد الكائنات الدقيقة المقاومة.

هذا العمل الذي أدركناه كان مخصصًا لدراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيت العطري للجزء الجوي من *Rosmarinus officinalis* L. تم استخراج سلالاته من خلال التقطير بالبخار ، وهو ما يمثل عائدًا بنسبة 0.62 ٪. تم تحديد النشاط المضاد للبكتيريا باستخدام طريقة نشر الأجار على ثلاث سلالات مسببة للأمراض ؛ *Escherichia coli* ، *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* ، التي تظهر نتائجها أن HE له تأثير إيجابي على البكتيريا الثلاثة مع نشاط أفضل على *E. coli*. الكلمات الرئيسية: *Rosmarinus officinalis* L.؛ من الضروري النفط ، والنشاط المضاد للبكتيريا.

Résumé

Rosmarinus officinalis L. est un arbuste qui appartient à la famille des lamiacées. C'est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. Ainsi que ses huiles essentielles possèdent des activités biologiques importantes et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants.

Ce travail que nous avons réalisé a été consacré à l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* L.

L'extraction de l'HE a été réalisée par l'entraînement à la vapeur d'eau, représente un rendement de l'ordre de 0.62%.

L'activité antibactérienne a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé sur trois souches pathogène ; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, et *Pseudomonas aeruginosa*, dont les résultats obtenus montrent que cet HE présente un effet positif sur les trois bactéries avec une meilleure activité sur *E.coli*.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis* L., Huile essentielle, activité antibactérienne.

Abstract:

Rosmarinus officinalis L. is a shrub that belongs to the *lamiaceae* family. It is a medicinal plant widely used in traditional medicine in Algeria. As well as its essential oils have important biological activities and can successfully replace antibiotics that show their inefficiencies against resistant microorganisms.

This work that we realized was devoted to the study of the antibacterial activity of the essential oil of the aerial part of *Rosmarinus officinalis* L.

The extraction of the HE was carried out by steam distillation, representing a yield of the order of 0.62%. Antibacterial activity was determined using the agar diffusion method on three pathogenic strains; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*, whose results show that this HE has a positive effect on the three bacteria with a better activity on *E. coli*.

Key words: *Rosmarinus officinalis* L., Essential oil, antibacterial activity.