



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Larbi Tébessi -Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Option: Microbiologie appliquée

Thème:

**Étude de l'activité antibactérienne des huiles
essentielles de *Rosmarinus officinalis*.**

Présenté par:

M^{elle} :Messabhia Amira

M^{elle} :Soualmia Amina

M^{elle} :Guerdi Amina

Devant le jury:

<i>Dr. Mechai Abdelbasset</i>	<i>Professeur</i>	<i>Université de Larbi Tébessi</i>	<i>Président</i>
<i>Dr. Fenghour Hind</i>	<i>MCA</i>	<i>Université de Larbi Tébessi</i>	<i>Rapporteuse</i>
<i>Dr. Benhadj Mabrouka</i>	<i>MCA</i>	<i>Université de Larbi Tébessi</i>	<i>Examinatrice</i>

Date de soutenance: 09-06-2022

Année Universitaire : 2021-2022

Note : /20 .

Mention :



Remerciements

*Nous remercions **Allah**, le Clément, le Miséricordieux qui nous a donné la patience, l'énergie et la volonté afin de finaliser ce travail.*

*D'abord, nous tenons vivement à exprimer notre profonde reconnaissance et gratitude à notre encadreur **Dr.Fenghour hind**, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, ainsi que pour sa grande patience et sa gentillesse jusqu'à la fin de ce mémoire.*

*Nous adressons notre sincère remerciement à **Dr Mechai Abdelbasset** et **Dr Benhadj Mabrouka** qui ont fait l'honneur d'être dans les jurys de notre soutenance.*

*Remerciements particuliers à **Mlle Bourhlah Nour Al-Huda** pour son aide et sa gentillesse Nous vous souhaitons à tous bonheur et générosité.*

*Nous remercions tout le personnel de laboratoires pédagogiques spécialement les techniciennes **Melle Dhyébe Chahrazéde**, **Meme Imene**. Un grand merci également tous les enseignants de département "Biologie appliquée".*

*Nous remercions en fin tous ceux qui n'ont pas été cités dans ces quelques lignes et qui ont contribués de près ou de loin par leur aide au bon déroulement de ce travail spécialement **Bourahla Nour Al-Huda**.*

Et toutes les promotions de microbiologie appliquée.



Dedicas

*Je remercie **Allah** de m'avoir donné la force et le courage pour Pouvoir réaliser ce modeste travail.*

Avec un énorme plaisir

Un cœur ouvert et une immense joie

Que je dédie ce travail

À mes chers parents

*À ma mer **Malika** et à mon père **Lazhari** qui on sacrifié pour que je puisse arriver jusqu'au la et qui m'ont beaucoup soutenu durant mon cursus et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras, J'espère ne jamais vous décevoir et d'être toujours au la hauteur de ce que vous attendrez de mois .Que Dieu vous préserve et vous accorde santé, bonheur et longue vie.*

*À m'adorable frère **Bilel** qui est toujours à mes coutés et n'est jamais cesse é de me soutenir.*

À toute ma famille

*À mon cher grand-père **Abd Arrahmen** et grand-mère **Zohra**, je demande à Dieu de vous accorder une bonne santé et une longue vie.*

Merci pour votre soutien et vos prières.

*À tout oncles et tantes :**Mohamed,Samir,ABD elkarim,Toufik,Faouez ,Hakim,Samira ,Ramdana,Lamia**
Cousins et cousines petit et grand, sans exception.*

*À mon cher Encadreur **Dr.fenghour hind** Merci pour votre patience, Vos efforts intenses, et votre disponibilité permanente.*

*À mes très chers amis : **Douaa,Amna, Amina ,Nassima***

À toute personne que je connais de près ou de loin, a toute la promotion Master 02 Microbiologie Appliquée 2022 Pour tous les bons moments passés et à venir.





Dedicas

*Je remercie **Allah** de m'avoir donné la force et le courage pour Pouvoir réaliser ce modeste travail.*

*Je dédie ce travail à mes parents
Pour leur soutien et leurs encouragements sans faille tout au long de mon parcours scolaire mais aussi personnel. Aucun mot ne serait exprimer tout mon amour et toute ma gratitude, merci pour vos sacrifices le long de ces années merci pour vos présence rassurante, et si j'en suis arrivée là s'est grâce à vous. J'espère que le bon Dieu les garde, les comble de santé et leur une longue vie.*

*À mon père **Ali** pour son patient avec moi et son encouragement.*

*À ma source de bonheur, la prunelle de mes yeux, ma mère **Farida**.
Que le bon ALLAH vous garde en bonne santé.*

*Mes frères que j'adore : **Djamel , laide, Mehemme lamine** sa que je remercie pour leur aide et dévouement, que Dieu nous garde toujours unis.
Mes chères sœurs qui ont toujours été présentes pour moi et qui me complent d amour : **Imene, Touns, Atawse**.*

À toute ma famille, oncles et tantes, cousins et cousines, petit et grand, sans exception.

*À mon cher Encadreur **Dr.Fenghour hind** merci pour votre patience, Vos efforts intenses, et votre disponibilité permanente.*

À mes précieuses amies d'enfance qu'ont toujours avec moi et derrière mon dos et mes amis parcours.

*À mes très chers amis : **Amira , Amina , chahra , Salima ,Sana** .*

À toute personne que je connais de près ou de loin, a toute la promotion Master 02 Microbiologie Appliquée 2022 Pour tous les bons moments passés et à venir.





اهداء

الحمد لله قدر ما حملت الأرض ووسعت السماء، الذي أعانني ووقفني لأكمل دراستي ليكون ثمرة جهدي طوال خمسة سنوات من المشوار الدراسي هذه المذكرة، أهدي هذا العمل أولاً إلى سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم".

أهدي هذا العمل إلى من أدين لهما بوجودي بعد إذن الله عز وجل، إلى أمي الغالية "سعيدة" وإلى أبي العزيز "عبد المجيد" أطال الله عمرهما

إلى أخي الذي كان منبع شجاعتي و نور عيني "أسامة"

إلى أخواتي الأحباء "سارة" "حياة" "هدى"

ولأنه ليس من الضروري إمتلاك أجنحة لنحلق عاليا يكفي ان يكون بجانبنا مشرفة كالدكتورة **بُنغور هند** تمنعنا من السقوط ابداً

إلى أصول امتدادي و ذوي أرحامي "خالتي و أخوالي و أعمامي و عماتي و لكل من تربطني بهم رابطة الدم و الدين الي (ناصر شوقي، إيمان نور اليقين، شهرة، أمينة، أميرة بورحلة نور الهدى)

إلى كل صديقاتي الأوفياء بدون استثناء، أدام الله عشرتنا

إلى كل الدفعة الجامعية لسنة 2021-2022
إلى كل من علمني علماً نافعا



Résumé

Cette étude consiste à évaluer l'activité antibactérienne de l'HE obtenue à partir d'une plante médicinale (*Rosmarinus officinalis*) jugée par la médecine traditionnelle avoir un grand effet anti-infectieux. Ceci afin de rationaliser leur usage pour les appliquer comme remède alternatif aux antibiotiques face à l'émergence de multi-résistance bactérienne et à l'échelle de l'antibiothérapie.

L'huile essentielle de cette plante qui a montré un rendement de 1,63 ml /g a été testée sur 3 souches bactériennes pathogènes : *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*. Des propriétés antibactériennes intéressantes de l'HE ont été constatées sur toutes les bactéries testées avec une CMI 12,5 à 25mg /ml et CMB 12,5 à 25mg/ml ainsi qu'une activité bactéricide importante. Il n'y a pas de différence entre les valeurs de CMI et CMB des souches testées. La comparaison de l'effet de l'HE sur les souches bactériennes et celui de l'ATB (Amoxiciline) a montré une efficacité remarquable de l'HE par rapport à l'ATB. Par conséquent et sur la base de ces résultats prometteurs, on peut proposer l'usage de cette substance naturelle en tant qu'agents antibactériens en industrie pharmaceutique comme alternatif thérapeutique.

Mots Clés : *Rosmarinus officinalis*, Activité antibactérienne, CMI, CMB, Bactéricide.

الملخص :

تتكون هذه الدراسة من تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيت العطري المستخرج من نبات طبي (إكليل الجبل) يعتقد الطب التقليدي أنه له تأثير كبير مضاد للعدوى ، وذلك من أجل ترشيد استخدامها لتطبيقها كعلاج. المضادات الحيوية في مواجهة ظهور البكتيريا المتعددة المقاومة وعلى نطاق العلاج بالمضادات الحيوية. تم اختبار الزيت العطري لهذا النبات ، والذي أظهر إنتاجية 1.63 %، على 3 سلالات بكتيرية ممرضة: *Klebsiella pneumoniae* و *Sreptococcus pneumoniae* و *Staphylococcus aureus* و قد لوحظت الخصائص المضادة للبكتيريا للزيت العطري على جميع البكتيريا التي تم اختبارها باستخدام CMI 12.5 إلى 25 mg / ml و CMB 12.5 إلى 25 mg / ml بالإضافة إلى نشاط مبيد للجراثيم. الفرق بين قيم MIC و CMB للسلالات تم اختبارها. أظهرت مقارنة تأثير الزيت العطري على السلالات البكتيرية مع المضاد الحيوي (أموكسيسيلين) كفاءة ملحوظة لـ الزيت العطري مقارنة بالمضاد الحيوي. لذلك ، وبناءً على هذه النتائج الواعدة ، يمكننا اقتراح استخدام هذه المادة الطبيعية كعوامل مضادة للبكتيريا في صناعة الأدوية كبديل علاجي.

الكلمات المفتاحية: إكليل الجبل، نشاط مضاد للجراثيم ، التركيز الأدنى المثبط، التركيز الأدنى المبيد، مبيد للجراثيم.

Abstract:

This study consists in evaluating the antibacterial activity of HE obtained from a medicinal plant (*Rosmarinus officinalis*) judged by traditional medicine to have a great anti-infectious **anti-infective** effect. This in order to rationalize their use to apply them as an alternative remedy. To antibiotics in the face of the emergence of bacterial multi-resistance and on the scale of antibiotic therapy. The essential oil of this plant, which showed a yield of 1.63 ml / g, was tested on 3 pathogenic bacterial strains: *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. Interesting antibacterial properties of HE were observed on all the bacteria tested with a CMI 12.5 to 25mg / ml and CMB 12.5 to 25mg / ml as well as significant bactericidal activity. There is no deference between the CMI and CMB values of the strains tested. The comparison of the effect of HE on the bacterial strains and that of ATB (Amoxicillin) showed remarkable efficacy of HE compared to ATB. Therefore and on the basis of these promising results, it is possible to propose the use of this natural substance as antibacterial agents in the pharmaceutical industry as a therapeutic alternative.

Key words: *Rosmarinus officinalis*, , antibacterial activity, CMI, CMB, bactericidal.

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
الملخص	
Abstract	
Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction Général	02
CHAPITRE I: La plante <i>Rosmarinus officinalis</i>.	
I.1.Description systématique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	05
I.1.1. Famille des <i>Lamiacées</i>	05
I.1.2. Nomenclature de <i>Rosmarinus officinalis</i>	05
I.1.3. Classification de <i>Rosmarinus officinalis</i>	06
I.1.4. Habitat et culture.....	06
I.1.4.1.Habitat	06
I.1.4.2. Culture.....	06
I.1.5..Récolte.....	06
I.1.6.Description botaniques de <i>Rosmarinus officinalis</i>	07
I.1.6.1. Appareil végétatif de <i>Rosmarinus officinalis</i>	07
I.1.6.1.1.Feuille.....	07
I.1.6.1.2.Fleure.....	08
I.1.6.1.3.Fruit.....	09
I.1.6.1.4.Tige.....	09
I.1.6.1.5.Racine.	10
I.1.7. Répartition géographique de <i>Rosmarinus officinalis</i> en Algérie.....	10
I.1.8.Principe actif de <i>Rosmarinus officinalis</i>	11
I.1.9. Composition chimique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	11
I.1.10.Facteur influençant la composition chimique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	12
I.1.11.Propriétés de <i>Rosmarinus officinalis</i>	12
I.1.12.Utilisation de <i>Rosmarinus officinalis</i>	12
I.1.13 .Effet indésirable de <i>Rosmarinus officinalis</i>	13

Table des matières

Chapitre II : L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

II .1. Définition des huiles essentielles.	15
II .2. Classification des huiles essentielles.....	15
II .3. Les types des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	16
II .4. Techniques d'extraction des huiles essentielles	16
II .4. 1. Extraction par Hydro distillation	16
II .5. Conservation des huiles essentielles	17
II .6. Propriétés physicochimiques des huiles essentielles	18
II .7. Propriétés cliniques des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	19
II .8. Activités antibactériennes des huiles essentielles.....	19
II .9.La toxicité des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	19

Chapitre III : Matériel et Methode.

III.1.Objectif de travail.....	21
III .2.Preparation des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	21
III.2.1. Matériel	21
III.2.1.1. Matériel végétale.....	21
III.2.1.2. Appareillage et réactifs	23
III.2.2. Méthodes	23
III.2.2.1. Séchage de la plante <i>Rosmarinus officinalis</i>	23
III.2.2.2. Broyage de la plante de <i>Rosmarinus officinalis</i>	23
III.2.2.3.. Extraction d'huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	24
III .2.2.4. Détermination du rendement d'huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	25
III.2.2.5. Caractéristiques Organoleptiques d'huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	25
III .2.3. Etude de l'activité antibactérienne de <i>Rosmarinus officinalis</i>	25
III.2.3.1. Matériels	25
III.2.3.1.1. Matériels biologiques	25
III.2.3.2.Méthodes.....	26
III.2.3.2.1. Confirmations la pureté des souches bactériennes étudiés	26
III .2.4. Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne de <i>Rosmarinus officinalis</i>	26
III.2.4.1. Préparation de l'inoculum et ajustement de la charge bactérienne.....	26
III.2.4.2. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> par la méthode d'Aromatogramme.....	27

Table des matières

III.2. 4.2.1.Préparation des disques	27
III.2.4.2.2.Ensemencement et Dépôt des disques	28
III.2.4.2.2.1.Ensemencement.....	28
III.2.4.2.2.2.Dépôt des disques.....	29
III.2.4.3. Evaluation quantitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> par la méthode de microdilution.....	31
III.2.4.3.1 Détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI).....	31
III.2.4.3.2.Détermination de concentration minimale bactericide (CMB).....	33

Chapitre IV. Résultats et discussion

IV.1.Extraction de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	35
IV.1.1. Caractéristiques organoleptiques	35
IV.1.2 Rendement de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	36
IV.2. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	38
IV.2.1. Confirmations de la pureté des souches bactériennes étudiés	38
IV.2.2 Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> par la Méthode d'Aromatogramme.....	39
IV.2.3. Evaluation quantitative de L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> par la méthode de microdilution	44
IV.2.3.1 Comparaison de l'activité inhibitrice de l'antibiotique <i>Amoxicilline</i> et celle de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	44
IV.2.3.2.Détermination de la concentration minimale bactericide (CMB).....	44
Conclusion et perspective.....	47

Référence Bibliographique

Annexes

Liste des figures

Figures	Titre	pages
Figure01	<i>Rosmarinus officinalis</i>	07
Figure02	Feuille de <i>Rosmarinus officinalis</i>	08
Figure03	Fleur de <i>Rosmarinus officinalis</i>	08
Figure04	Fruit de <i>Rosmarinus officinalis</i>	09
Figure05	Tige principale et rameau feuillé à fleurs du <i>Rosmarinus officinalis</i>	09
Figure06	Racine de <i>Rosmarinus officinalis</i>	10
Figure07	Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation	17
Figure08	Partie aériennes de <i>Rosmarinus officinalis</i>	21
Figure09	Localisation du site de prélèvement des échantillons de <i>Rosmarinus officinalis</i>	22
Figure10	<i>Rosmarinus officinalis</i> pendant les séchage	23
Figure11	Broyage de <i>Rosmarinus officinalis</i> après séchage	23
Figure12	Dispositif d'extraction des huiles essentielles de types Clevenger et flacon de l'huile de <i>Rosmarinus officinalis</i>	24
Figure13	Préparation de l'inoculum	27
Figure14	Etapes de préparation des disques	28
Figure15	Gélose de Mueller Hinton stérile est coulé dans des boites de pétri	28
Figure16	Ensemencement sur milieu MH	29
Figure17	Dépôt des disques sur milieu solide	29
Figure18	Imprégnation des disques et incubation dans l'étuve à 37°C pendant 24h	30
Figure19	Distribution expérimentale de la microplaque pour les trois souches testées pour la détermination de la CMI	32
Figure20	Récupération d'huile de <i>Rosmarinus officinalis</i>	35
Figure21	Effet de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur <i>K .pneumoniae</i>	41
Figure22	Effet de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur <i>S.aureus</i>	41
Figure23	Effet de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur <i>S. pneumoniae</i>	42

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	pages
Tableau01	Noms vernaculaire de <i>Rosmarinus officinalis</i>	05
Tableau02	Classification scientifique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	06
Tableau03	La composition chimiques d'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	11
Tableau04	Différents chimiotype de <i>Rosmarinus officinalis</i>	16
Tableau05	Caractéristiques des souches bactériennes testées	26
Tableau06	Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition	30
Tableau07	Caractéristiques organoliptiques de HEde <i>Rosmarinus officinalis</i>	35
Tableau08	rendement de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i>	36
Tableau09	Aspect microscopique et macroscopique sur milieu chromagar des souches bactériennes tésées	38
Tableau10	Résultat de l'effet antibactériennede HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur les souches bactériennes testés	40
Tableau11	Concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officianilis</i> (mg/ml) suite à l'effet de l'HE et l'Amoxicilline	44
Tableau12	CMI et CMB de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> teste sur les souches bactériennes sélectionnées	45

Liste des abréviations

Abréviation	Détaille
%	Pourcentage
° C	Degré Celsius
±	plus ou moins.
µl	Micro litre
µg	Micro gramme
AFNOR	Association Française de Normalisation (Recueil des Normes Français : Huiles essentielles).
BMH	Bouillon Muler Hinton
cm	Centimètre.
° C	Degré Celsius.
CMI	Concentration Minimal Inhibitrice
CMB	Concentration Minimal Bactéricide
D	Diamètre.
Dr	Docteur
g	Gramme
G	Gram
G-	Gram-
G+	Gram-
h	Heure

HE	Huile essentielle
I%	Pourcentage d'inhibition
<i>K.pneumoniae</i>	<i>Klebsella pneumoniae</i>
min	Minute
ml	Millilitre
M	Mètre
mm	Millimètre
M	masse
MHE	Masse d'huiles essentielles récupérées
MH	Muller Hinton
n°	Numéro
RHE	Rendement en huile essentielle
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S.pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
T	Température
TCC	Triphényl Tétrazolium Chloride
UFC	Unité formant colonie



Introduction



Introduction Générale

La flore Algérienne avec ses plantes médicinales appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15 % endémiques, reste très peu explorée sur le plan photochimique comme sur le plan pharmacologique. La valorisation des plantes médicinales de la flore nationale sera d'un grand apport pour l'industrie pharmaceutique algérienne et aura un impact économique certain.

(Boulezazen,2017).

Les huiles essentielles extraites des plantes par hydrodistillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes. L'aromathérapie, l'art de soigner par les huiles essentielles, est devenue une science méthodique depuis qu'elle repose sur une classification de ces huiles selon leur capacité à lutter contre les bactéries. **(Boulezazen,2017).**

Dans le cadre de la valorisation des espèces végétales algériennes, et compte tenu des vertus thérapeutiques que représentent les *Lamiacées* (Labiées), nous nous sommes intéressés à l'huile essentielle de « *Rosmarinus Officinalis* » provenant de la montagne d'Awled Gdaim de la commune de Bolhaf El-Dair la wilaya de Tébessa; *Rosmarinus officinalis*, plante commune à l'état sauvage, est, sans doute, l'une des plantes les plus populaires en Algérie, puisqu'on le trouve dans tous les jardins et les parcs en bordure odorante. Il fait l'objet des récentes recherches dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires. C'est une herbe aromatique de la famille des *Lamiaceae*, appréciée pour ses propriétés aromatiques, antioxydants, antimicrobiennes, antispasmodiques, emménagogues et anti-tumorales, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle **(Bourita et Boubelli,2017)et (Zidi et Houilia , 2020).**

Il nous semble donc, intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche .En effet l'objectif de notre travail est de mettre en évidence l'activité antibactérienne de cette plante et leur efficacité vis avis des souches bactériennes à Gram+ et à Gram- .

Notre étude sera répartie en quatre chapitres, initiés par une recherche bibliographique où nous apporterons dans le premier chapitre une présentation botanique de la famille Lamiacées et l'espèce *Rosmarinus officinalis*, sa répartition géographique en Algérie et ses propriétés thérapeutiques.

Dans le deuxième chapitre une généralité sur les huiles essentielles, en particulier concernant : leurs caractéristiques, leur composition, leurs techniques d'extraction, et leur propriétés biologiques et pharmacologiques.

Introduction Générale

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

- ✓ L'extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.
- ✓ L'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* par la méthode d'aromatogramme pour déterminer la sensibilité, et la méthode de microdilution pour déterminer la CMI et CMB.

Le quatrième chapitre abordera les différents résultats et leurs discussions. Enfin, une conclusion générale résumera l'ensemble des résultats issus de cette étude et présentera les perspectives de recherche à réaliser dans l'avenir proche, afin de confirmer l'efficacité antibactérienne réelle in vivo de cette huile testée, avant de pouvoir les utiliser comme agents antimicrobiens alternatifs dans le traitement des maladies pulmonaires.



Chapitre 01: La plante *Rosmarinus officinalis*



Chapitre : La plante de *Rosmarinus officinalis*

I.1. Description systématique de *Rosmarinus officinalis*

I.1.1. Famille des *Lamiacées*

La famille des *lamiacées* ou labiées aussi nommée *labiacées*, est Considérée comme l'une des principales familles méditerranéennes à essences (**Labioud, 2016**). Cette famille de plantes angiospermes dicotylédones comprend environ 258 genres et 6970 espèces (**Bottineau, 2010**).

La famille des *lamiacées* est très importante dans la flore d'Algérie, mais certains genres sont de détermination délicate en raison de la variabilité extrême des espèces (**Bousbia et Souaci,2021**). ces espèces Sont souvent des plantes, en général Aromatiques, riches en l'huile essentielle d'où leur intérêt économique et médicinal (**Belloul et Chouiref ,2016**).

I.1.2.Nomenclature de *Rosmarinus officinalis*

Le romarin tire son nom du latin *Rosmarinus*, qui signifie rosée de la mer, cette appellation pourrait s'appliquer au parfum de la plante, à la couleur de sa fleur. le nom rose de mer vient simplement du fait qu'il pousse spontanément au bord de la mer ,on même à sa prédilection pour le littoral. L'épithète spécifique "*officinalis*" rappelle que le Romarin est une plante médicinale (**Lagsier et Nadir,2020**).

Tableau 01: Noms vernaculaire de *Rosmarinus Officinalis* .

Nom vernaculaire en arabe	<i>Eklil, Klil, Hatssalouban, Hassalban, Helhal, Yazir</i>	(Aouad et Belayachi,2019)
Appellations régionales en algérie	Région de l'Est : <i>Eklil</i> Région de l'Ouest : <i>Helhal</i> Région du Centre : <i>Yazir</i>	(Belkhiri,2015)et(Bouadjemi,2018)
Nom vernaculaire en Français	<i>Encensier, herbe aux couronnes, romarin, romarin officinal ,Rose de marine, , enprovençal, Roumanieou</i>	(Chibah et Labandji,2017)et (Bouadjemi,2018)

Chapitre : La plante de *Rosmarinus officinalis*

I.1.3. Classification de *Rosmarinus officinalis*

Le tableau résume la classification scientifique de *Rosmarinus officinalis*.

Tableau02 : Classification scientifique de *Rosmarinus officinalis* (Andrade et al, 2018) .

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous-embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Sous-classe	<i>Gamopétales</i>
Ordre	<i>Tubiflorales</i>
Sous-Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i>

I.1.4. Habitat et culture

I.1.4.1. Habitat

Le romarin pousse spontanément dans les garrigues, forêts claires, maquis, collines arides et calcaires, non loin de la mer, commun jusqu'au Sahara. Commun dans toute L'Algérie et la région méditerranéenne (Bettahar et Chekalil ,2020) .

I.1.4.2. Culture

Le romarin se cultive dans un endroit ensoleillé ,dans un sol calcaire et bien drainé(Aissaoui ,2019) , et les lieux secs et arides , surtout au voisinage du littoral(Ezziat,2013). Il peut croître même sur des terrains non adaptés à une exploitation agricole, il a donc peu d'exigences vis-à-vis du sol. Il a une préférence pour des sols argileux ou sablonneux, étant situés dans des endroits secs, chauds, (c'est ainsi qu'il produit le plus d'huiles essentielles et qu'il dégage les parfums les plus puissants) (Marion, 2017). On le cultive du début du printemps, jusqu'à l'été (Aissaoui ,2019).

I.1.5. Récolte de *Rosmarinus officinalis*

De manière générale, la récolte d'une plante est réalisée quand les principes actifs sont à leur maximum, afin de pouvoir compter sur des effets utiles et constants (Marion, 2017). Le romarin fleurit de Janvier jusqu'à l'automne, c'est presque toute l'année que l'on peut en faire la cueillette,

Chapitre : La plante de *Rosmarinus officinalis*

toutefois la meilleure époque en vue de la distillation s'étend de Mai à Juillet et même jusqu'à Septembre (Boumadjen et Kimouche ,2018).

I.1.6.Description botanique de *Rosmarinus officinalis*

Le romarin se présente à l'état sauvage (Boumadjen et Kimouche , 2018) sous la forme d'un petit arbuste aromatique(Aouad et Belayachi,2019) touffu, xérophyte (Guernit et Rhaim,2019) toujours vert (Chafai,2014) qui délivre une odeur fraîche et typique, qualifiée de « camphrée » (Quintana et al ,2019),le romarin peut atteindre jusqu'à 2m de hauteur (Guernit et Rhaim,2019) , est l'une des plantes les plus populaires en Algérie, puisqu'on la trouve dans tous les jardins et les parcs en bordure odorante (Boumadjen et Kimouche, 2018) .



Figure 01 : *Rosmarinus officinalis*

(Photo personnelle, 2022).

I.1.6.1. Appareil végétatif de *Rosmarinus officinalis*

I.1.6.1.1.Feuille

Les feuilles sont sessiles, opposées et coriaces, enroulées sur les bords (Chafai,2014) .Elles sont beaucoup plus longues que larges, d'une couleur vert sombre, luisant sur leur face supérieure et à la teinte blanchâtre sur le dessous (Guernit et Rhaim,2019).Ces feuilles fines et résistantes dont la forme est dite « lancéolée » puisqu'elles ressemblent à des aiguilles. Les vertus du romarin sont principalement issues de ces dernières. Les feuilles de romarin sont comestibles et sont généralement utilisées en tant que condiment dans les plats cuisinés ou infusées dans de l'eau bouillante, à consommer en boisson chaude (Quintana et al ,2019).



Figure02: Feuille de *Rosmarinus officinalis*

(Photo personnelle 2022).

I.1.6.1.2. Fleure

Les fleurs, le plus souvent d'une teinte bleu violacé (les blanches sont plus rares) s'agrègent en grappes courtes, de février à mai. Leur calice a un aspect duveteux, la corolle est bilabiée et dotée de quatre étamines, dont deux dépassent la lèvre supérieure (**Boucheloukh et Kadja ,2019**). Ces fleurs de couleurs chatoyantes attirent les abeilles grâce au nectar sucré et au pollen contenus dans leurs cœurs. Riche en divers oligo-éléments, le miel de romarin est apprécié et très réputé. De plus, les trois fameuses huiles essentielles de romarin résultent de la distillation de ses boutons floraux (**Quintana et al , 2019**).



Figure03: Fleur de *Rosmarinus officinalis*

(photo personnelle ,2022).

Chapitre : La plante de *Rosmarinus officinalis*

I.1.6.1.3. Fruit

Le fruit du romarin, de forme lisse et globuleuse (Marion,2017),ovoïde(Chafai,2014), est un tétrakène brun de 2,3 mm de long. Chaque akène renferme un embryon sans albumen (Marion,2017) ,cette fruit entouré par un calice brun et persistant. L'inflorescence et le calice ont une pilosité très courte ; l'inflorescence est en épis très courts et les bractées mesurent 1 à 2mm (Chafai,2014) .



Figure 04 : Fruit de *Rosmarinus officinalis* (Valter Jacinto, 2015).

I.1.6.1.4. Tige

Le romarin possède des longues tiges de couleur beige qui arborent robustes (Quintana et al,2019) de 0.5 à 2 mètres cette tige est tortueuse, anguleuse et fragile (Bousbia et al,2021) . L'écorce est grisâtre et se divise en de nombreux rameaux opposés (Chafai,2014).



Figure 05 : Tige principale et rameau Feuillé à fleurs du *Rosmarinus officinalis*

(photo personnelle , 2022).

Chapitre : La plante de *Rosmarinus officinalis*

I.1.6.5. Racine

Rosmarinus officinalis possède un système racinaire dense et profond ce qui lui permet de puiser l'eau en profondeur pendant les épisodes de sécheresse (Margot, 2017), le racine du *Rosmarinis officinalis* est profonde et pivotante (Bousbia et Souaci,2021).



Figure 06: Racine de *Rosmarinus officinalis*
(Photo personnelle, 2022).

I.1.7. Répartition géographiques de *Rosmarinus officinalis* en Algerie

L'Algérie fait partie des pays méditerranéens, par sa diversité climatiques (climat méditerranéen humide, semi aride, et aride) et richesses en couvert végétale, le Romarin fait partie des espèces végétales qui se présentent a l'état sauvage dans les zones littorales pas trop loin de la mer, les lieux sec et arides (Aurès) même au Sahara (Benzineb, 2019).

En Algérie cette plante est bien apparente en différente région. En Oranie elle est souvent cultivée comme plante d'ornement, cette plante est retrouvée dans la steppe a Sid Djilali dans la région de Sid El Makhfi, ainsi on peut la voir dans le littoral à Béni Saf dans la zone de Sid Safi (Belloul et Chouiref,2016).

Chapitre : La plante de *Rosmarinus officinalis*

I.1.8. Principes actifs de *Rosmarinus officinalis*

Les principaux constituants du *Rosmarinus officinalis* responsables des différentes propriétés sont:

- ❖ Les acides phénoliques : acide vanillique , acide caféique, acide p-coumarique.
- ❖ Les flavonoïdes : genkwanine, cirsimarine ériocitrine, hespéridine, diosmine, lutéoline ,apigénine (Bouadjemi,2018) .

I.1.9. Composition chimique de *Rosmarinus officinalis*

Les compositions chimiques de chaque élément actif de la plante *Rosmarinus officinalis* sont mentionnées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 03 : Variations de la composition chimique de la plante étudiée (Zoghbi et Boughera ,2021) ,(Souane et Kechroud ,2020) et (Boumadjen et Kimouche ,2018),(Fadi ,2011).

Eléments actifs de la plantes	Substances chimiques
L'huile essentielle : Les feuilles de <i>Rosmarinus officinalis</i> contiennent environ 50% d'une essence spéciale à odeur aromatique	Pinène, camphène, bornéol, d'acétate, bornyle, cinéole et de camphre ordinaire
Les di-terpènes phénoliques : Les principaux antioxydants dans <i>Rosmarinus officinalis</i> sont les di-terpènes phénoliques.	Acide carnosique, carnosol, rosmarol, isorosmanol
Flavonoïdes : Les lamiacées sont des dicotylédones produisant surtout des Flavones.	Lutéoline, apigénine, diosmetine, dimetoxi-flavone
Acide phénolique : Ce sont des composés organiques possèdent une fonction hydroxyle et un carboxyle.	Acide caféique, chlorogénique et acide rosmarinique
acides organiques	dont l'acide glycolique, l'acide citrique et l'acide glycérique.
Minéraux	Na +, K+

Chapitre : La plante de *Rosmarinus officinalis*

Lipides	n-alkanes, isolalkanes, alkènes
Constituants divers	Polysaccharides acides (environ 6%) ; traces de salicylates.

I.1.10. Facteurs influençant la composition chimique de *Rosmarinus officinalis*

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, la méthode de séchage, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites, les virus et les mauvaises herbes. C'est ainsi que l'action des huiles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (Lassal,2020).

I.1.11. Propriété du *Rosmarinus officinalis*

Plante très connue et très appréciée, utilisée depuis l'Antiquité dans la cuisine et en médecine populaire traditionnelle, le romarin est considéré comme une plante tonique, revigorante et stimulante qui reflète sa saveur aromatique bien particulière (Laouici,2020). Le romarin est un régulateur du système nerveux (Casanova et Tomi, 2018), romarin aide à la digestion recommande dans les asthénies, les troubles du foie, contre les dyspepsies atoniques, ainsi que ,contre les céphalées et les migraines d'origine nerveuse, les vertiges et les troubles de mémoire. (Madjour ,2014) traite.Dû à sa teneur en huile essentielle, le romarin est une plante très utile contre l'asthme, la toux (Khia et al 2014), le traitement des bronchites chroniques (Casanova et Tomi, 2018), en cas de rhume, comme carminatif et stomachique en cas des troubles digestifs et pour stimuler l'appétit et les sécrétions gastriques (Laouici ,2020). il est employé principalement comme remède de post-partum et traite également les problèmes respiratoires et les infections de la peau (Madjour ,2014).

I.1.12. Utilisation du *Rosmarinus officinalis*

Le romarin est à la fois une plante ornementale, aromatique et médicinale. Les feuilles séchées de *Rosmarinus officinalis* sont utilisées en tant que condiment et rentrent dans la composition des thés et infusions. *Il est* sous forme de feuille séchées ou d'huile essentielle, trouve sa principale utilisation pour la fabrication de produits cosmétiques (parfums, savons, crèmes, tonifiants de

Chapitre : La plante de *Rosmarinus officinalis*

cheveux, shampooings et autres préparations). *Il* sert aussi pour produire les antioxydants naturels qui ont plusieurs utilisations dans les industries agroalimentaires, cosmétiques et en pharmaceutiques (**Brahimi et al ,2018**).

I.1.13. Effets indésirables de *Rosmarinus officinalis*

A dose normale, les seuls risques peuvent être des nausées. Des personnes travaillant avec du romarin ont pu développer un eczéma de contact. Un surdosage important peut provoquer vomissements, convulsions, spasmes, saignements de l'utérus, voire coma mortel (**Marion,2017**). L'huile de romarin augmente la pression sanguine dans le cas d'une pression artérielle élevée, il peut être irritant pour la peau sensible. L'huile de romarin peut déclencher des crises d'épilepsie chez les personnes sensibles (**Boumadjen et Kimouche ,2018**).



Chapitre 02: Les huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis*



Chapitre II : Les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

II.1. Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles, essences ou huiles volatiles, sont un extrait pur et naturel provenant de plantes aromatiques. Elles sont le produit de la distillation d'une plante ou d'une partie de plante. Il s'agit de substances odorantes, volatiles, résinoïdes, de consistance huileuse mais sans corps gras, plus ou moins fluides, très concentrées, souvent colorées, offrant une forte concentration en principes actifs. Elles peuvent être stockées dans divers structures de la plante telles que les poils sécréteurs ou les trichomes, les cellules épidermiques, les cellules sécrétrices internes, les poches sécrétrices et les canaux sécréteurs. On les retrouve dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable. Ils jouent un rôle de protection des plantes contre un excès de lumière, attirer les insectes pollinisateurs, soigner des maladies inflammatoires telles que les allergies, eczéma et favorise l'expulsion des gaz intestinales. Les huiles essentielles, constituées des mélanges complexes des composés organiques, possèdent des structures et des fonctions chimiques très diverses (Boucheloukh et Kadja, 2019).

II.2. Classification des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

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

- ❖ Les huiles majeures
- ❖ Les huiles médiums
- ❖ Les huiles terrains (Abdessultane, 2017).

II.3. Les types des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

Il existe 3 types d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* qui varient selon l'origine géographique et la composition chimique. Elles sont nommées selon le principe actif qui prédomine (Boudjebir, 2017).

Chapitre II : Les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

Tableau 04: Différentes chémotypes de *Rosmarinus officinalis* (Boudjebir ,2017).

	<i>Rosmarinus officinalis</i> à cinéol	<i>Rosmarinus officinalis</i> à verbenone	<i>Rosmarinus officinalis</i> à camphre
origine	Maroc, organe distillé : rameaux.	France, organe distillé : rameaux.	France(Midi) organe distillé : rameaux.
Principes actifs	Oxydes : 1,8cinéole (60%) cétones : Camphre (10%).	Cétones : Verbénone (30%) Camphre (7%) Oxydes : 1,8 cinéole (20%) /esters acétate de bronyle.	Cétones : Camphre (30%) Oxydes : 1,8 cinéole (30%) Monoterpène (40%) : α et β - pinène.
propriétés	Mucolytique, expectorante, anticatarrhale Anti-infectieuse respiratoire et fongicide	Régulatrice hépatique, cholérétique, cholagogue Mucolytique, expectorante Tonique générale	Décontractant musculaire Cardiotonique (à faible dose) Emménagogue Cholérétique et cholagogue Mucolytique

II.4. Technique d'extraction des huiles essentielles

Divers procédés sont actuellement utilisés pour l'extraction des produits aromatiques des végétaux. Selon la technique utilisée, l'extraction des produits permet d'obtenir des huiles essentielles, des pommades, des concrètes, des absolues, des rétinoides ou des infusions (Mehani, 2015).

II.4.1 . Extraction par hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus couramment employé pour l'extraction des HEs. Elle est considérée comme étant la plus simple et la plus anciennement utilisée (Naab et Hadibi,2018).

Le procédé consiste à immerger le matériel végétal dans un récipient rempli d'une quantité adéquate d'eau. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. L'HE forme avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Puis, les vapeurs sont condensées au moyen d'un réfrigérant. Dans

Chapitre II : Les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

un autre récipient de collecte, l'huile essentielle se sépare de l'eau par différence de densité. L'HE étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysât. Cependant, l'hydro distillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques .Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe généralement utiliser pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger(**Yaacoub etTlidjane ,2018**).

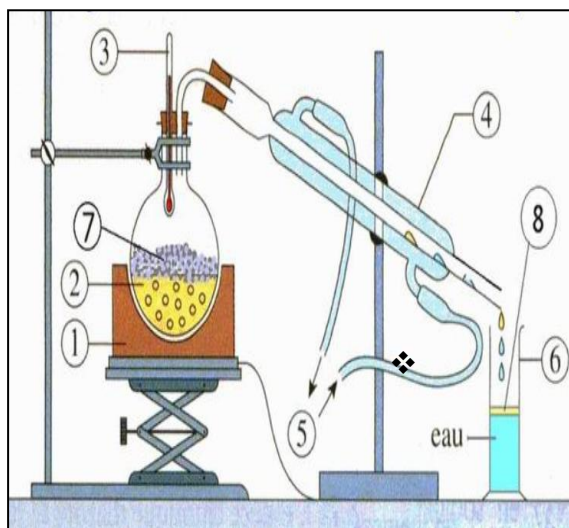


Figure 07 :Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation(**Naab et hadibi,2018**).

1-Chauffe ballon . 2-Ballon. 3-Thermomètre. 4- Réfrigérant . 5-Entrée et sortie de l'eau .
6-Erlenmeyer .7-Matière à extraire l'essence. 8-Couche d'huile essentielle.

II.5. Conservation des huiles essentielles

Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles (norme AFNOR NF T 75-001,2006) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des HEs (norme NF 75-002,2006).

La conservation des huiles essentielles nécessite un respect obligatoire de certaines règles (**Echchaou, 2018**) et (**Bourahla et al 2020**) à savoir :

- ❖ Les huiles essentielles se conservent bien à condition de ne pas les exposer à la lumière, c'est pourquoi il est recommandé de les stocker dans des flacons en aluminium ou en verre teinté (brun, vert, ou bleu) et de les garder à l'abri de la lumière à une température ambiante jusqu'à vingt degrés.
- ❖ IL faut les tenir loin des sources de chaleur.

Chapitre II : Les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

L'espace d'air dans un bocal favorise leur oxydation, c'est pour cela qu'on préfère plusieurs petits contenants lors de l'embouteillage et l'achat.

- ❖ IL faut bien refermer les flacons après usage, car les huiles essentielles sont volatiles, par conséquent elles s'évaporent dans l'atmosphère et perdent progressivement leurs propriétés et leur arôme.
- ❖ Les flacons doivent être stockés en position verticale, car en position horizontale il y a un risque que le bouchon soit attaqué par l'huile (les huiles essentielles ont une action corrosive sur le plastique).

II.6. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Selon (**Berramdani et Baghdadi,2021**) et (**Bourita et Bouballi,2017**) on peut résumer les propriétés physicochimiques des HE comme suit :

- ❖ Elles sont généralement liquides à température ambiante.
- ❖ Elles sont volatiles et très rarement colorées.
- ❖ Elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- ❖ Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau.
- ❖ L'indice de réfraction dépend essentiellement de la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse
- ❖ Elles sont solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé, dans la plupart des solvants organique et les lipides, mais peu soluble dans l'eau.
- ❖ Elles sont douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques.
- ❖ Les HE sont stables à température ambiante si elles sont conservées de manière adéquate à l'abri de l'oxydation et de la polymérisation provoquée par l'air, par la lumière et par les variations de température.
- ❖ Leur point d'ébullition varie de 160 à 240°C.

Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité.

Chapitre II : Les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

II.7. Propriétés cliniques des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

L'huile essentielle de romarin est reconnue pour ses vertus :

- ❖ Antibactériennes et antifongiques, elle diminue la résistance de *Escherichia coli* aux antibiotiques et de *Candida albicans* aux antifongiques .
- ❖ Antivirales contre le virus de l'herpès simplex .
- ❖ Antioxydantes et photoprotectrices contre le photovieillessement cutané.
 - ❖ Stimulantes de la croissance des cheveux chez les personnes souffrant de pelade localisée (Ennomayry,2022).

II.8. Activité antibactérienne des huiles essentielles

La première mise en évidence de l'action antibactérienne des HEs a été réalisée par Delacroix en 1881. Depuis, de nombreuses huiles ont été déterminées comme antibactériennes. Avec un spectre d'action très étendu, car elles agissent contre un grand nombre de bactéries .Cette activité variable d'une souche bactérienne à l'autre et d'une huile essentielle à l'autre, elle peut être bactéricide ou bactériostatique (L'activité bactériostatique est souvent plus assimilable aux huiles essentielles que l'activité bactéricide).Les HEs agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif qui reconnue comme la moins sensible grâce a la nature de la paroi cellulaire. Ce paroi contient une membrane externe supplémentaire qui confère une protection, au contraire les bactéries Gram positif possèdent que le peptidoglycane malgré que ce dernier est plus épais (Djebbari et Barki,2021).

L'action antibactérienne des H.E. se déroule en trois phases la perte des constituants cellulaires.

- ❖ Attaque de la paroi bactérienne par l'H.E, provoquant une augmentation de la perméabilité
- ❖ 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 (Tayeb-Cherif et Menacer ,2016).

II.9. La toxicité des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

« Ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme ». Selon la dose administrée ainsi que la voie d'exposition, par ingestion (souvent d'une grande quantité, et avec utilisation aléatoire), par contact (exposition à d'importantes concentrations), Les huiles essentielles peuvent être toxiques (Naab et Hadibi , 2018).

A dose très élevée l'huile essentielle du romarin peut déclencher des convulsions et des crises d'épilepsie. Les feuilles ont une faible toxicité mais cependant non négligeable. Elles ont une action très tonique presque excitante, empêchant le sommeil. Il est préférable d'éviter l'usage du Romarin de la fin de la journée au coucher (Zidi et Houilia ,2020).



Chapitre 03: Matériels et Méthodes



Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.1. Objectif de travail

L'ensemble de ce travail a été effectué au sein du laboratoire de microbiologie du département de Biologie appliquée de la faculté des sciences exacte et science de la nature et de la vie, de l'Université Laarbi Tébessi de Tébessa du mois de Novembre 2021 jusqu'au début de Mars de l'année universitaire 2022. Le but de ce travail consiste à l'étude «In vitro» de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur différents souches bactériennes provenant d'infection pulmonaire : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et *Klebsiella pneumoniae* ainsi que la Comparaison entre l'effet d'un antibiotique (Amoxicilline) utilisé dans le traitement des infection pulmonaire et l'effet de l'HE de *Rosmarinus officinalis* sur les souches bactériennes et enfin déterminer le pouvoir bactéricide ou bactériostatique de l'HE après évaluation des CMI et CMB. Les souches bactériennes testés sont des souches pathogènes clinique proviennent du laboratoire d'analyse médicale privé d'Hannibal et le laboratoire d'analyses médical privé Elit L'abm de Tébessa.

III.2. Préparation de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

III.2.1. Matériel

III.2.1.1. Matériel végétale

Le matériel végétal est *Rosmarinus officinalis*. Les échantillons ont été récoltés manuellement à partir de la montagne de la région d'Awlad Gdaiem de la commune de Bolhaf Al-Dair (Tébessa) en mois de Novembre 2021. La récolte a été réalisée tôt le matin et au moment de débourrement de la plante, elle concerne seulement la partie aérienne de l'arbre adultes ; choisis au hasard.



Figure 08 : Partie aérienne de *Rosmarinus officinalis*

(Photo personnelle ,2022).

Chapitre III : Matériels et Méthodes

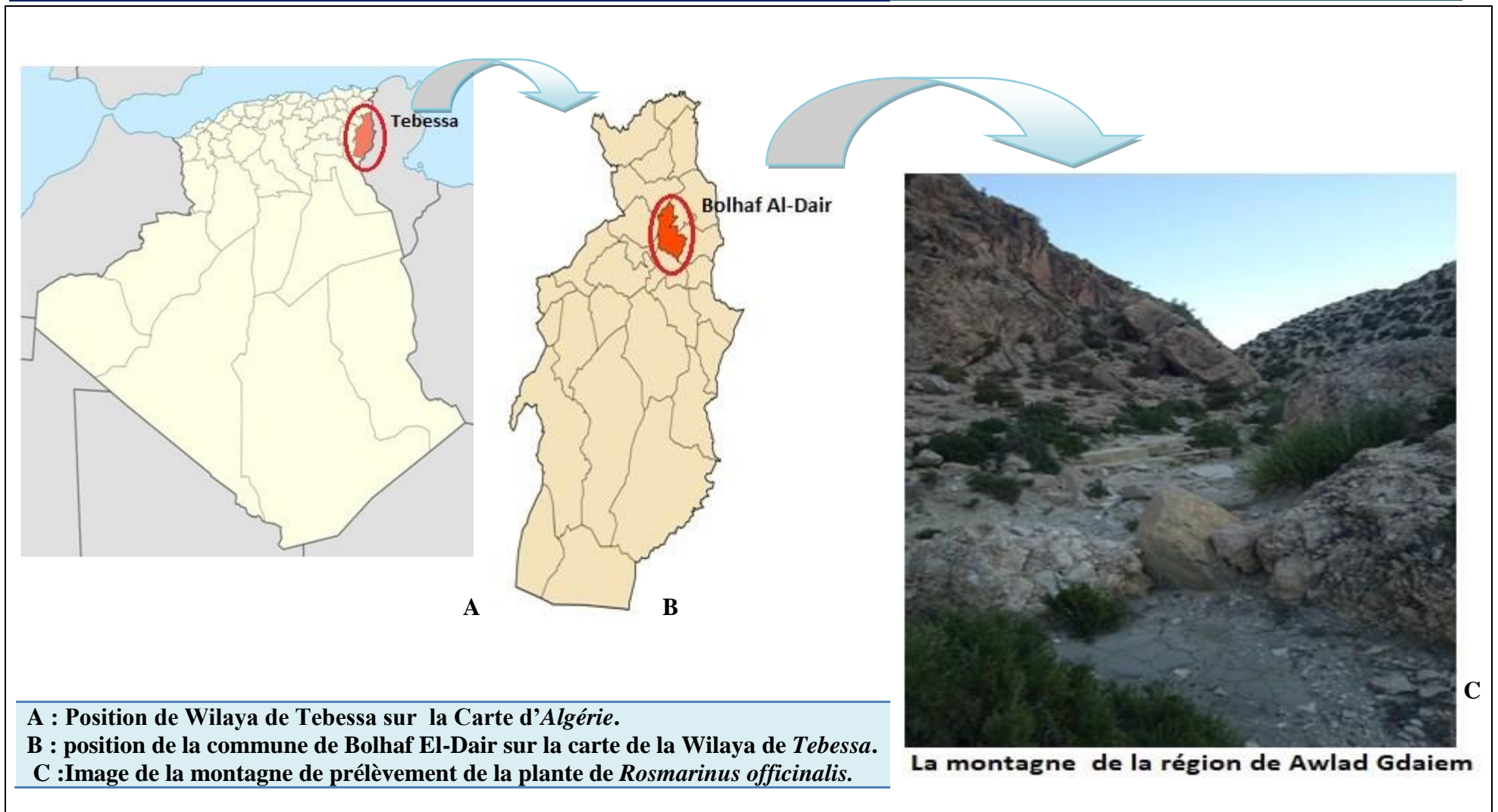


Figure 09 : Localisation du site de prélèvement des échantillons de *Rosmarinus officinalis*(photo personnelle,2022) .

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.2.1.2. Appareillage et réactifs

Appareillage, milieux de culture, réactifs et produit chimiques utilisés dans notre recherche sont mentionnés dans l'annexe 01 .

III.2.2. Méthodes

III.2.2.1. Séchage de la plante *Rosmarinus officinalis*

La matière végétale, cueillie, a été bien séchée à une température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant une période de 10 jours et enfin transportées au laboratoire de microbiologie du département des êtres vivants afin de commencer les procédés d'extraction.



Figure 10: *Rosmarinus officinalis* pendant le séchage

(Photo personnelle, 2022).

III.2.2.2. Broyage de la plante *Rosmarinus officinalis*

Les feuilles séchées de *Rosmarinus officinalis* ont été broyées à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention de très petits morceaux, puis tamisée pour éliminer la poussière et tous les impuretés . Ces dernières ont été orientées directement vers l'extraction.



Figure 11: Broyage de *Rosmarinus officinalis* après séchage (Photo personnelle ,2022).

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.2.2.3. Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* :

❖ Mode opératoire

L'extraction de l'huile essentielle est réalisée par hydrodistillation dans un distillateur de type Clevenger. Avant l'emploi, l'appareil a été rincé avec l'acétone et l'eau distillée pour éliminer les poussières et les graisses probablement présentes dans l'appareil pour éviter toute contamination de l'huile au cours de l'extraction.

Cette méthode consiste à introduire Un mélange de 100 g de feuilles sèches de *Rosmarinus officinalis* et 1L d'eau distillée dans un chauffe ballon de 2L et laisser bouillir, après ébullition de l'eau, la vapeur entraîne les constituants volatiles dans le tube principal pour ensuite se condenser dans le système de refroidissement et récupérés dans une ampoule à décanter. Quelques minutes après on remarque de fines gouttelettes constituant, après un certain temps une couche d'huiles de couleur jaunâtre qui flotte à la surface de l'eau.

Le procédé dure 2h30min pour avoir la totalité de l'huile essentielle. On arrête le dispositif et on laisse uniquement l'eau couler dans le réfrigérant. L'huile et L'eau se séparent par différence de densité, l'huile surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée dans un flacon en verre bien scellé pour éviter qu'il ne s'évapore, et bien emballer dans un papier aluminium afin de les préserver de la lumière et de la chaleur, et conservé dans un réfrigérateur à une température 4-5 C° jusqu'à son utilisation pour les tests microbiologiques ultérieurs.

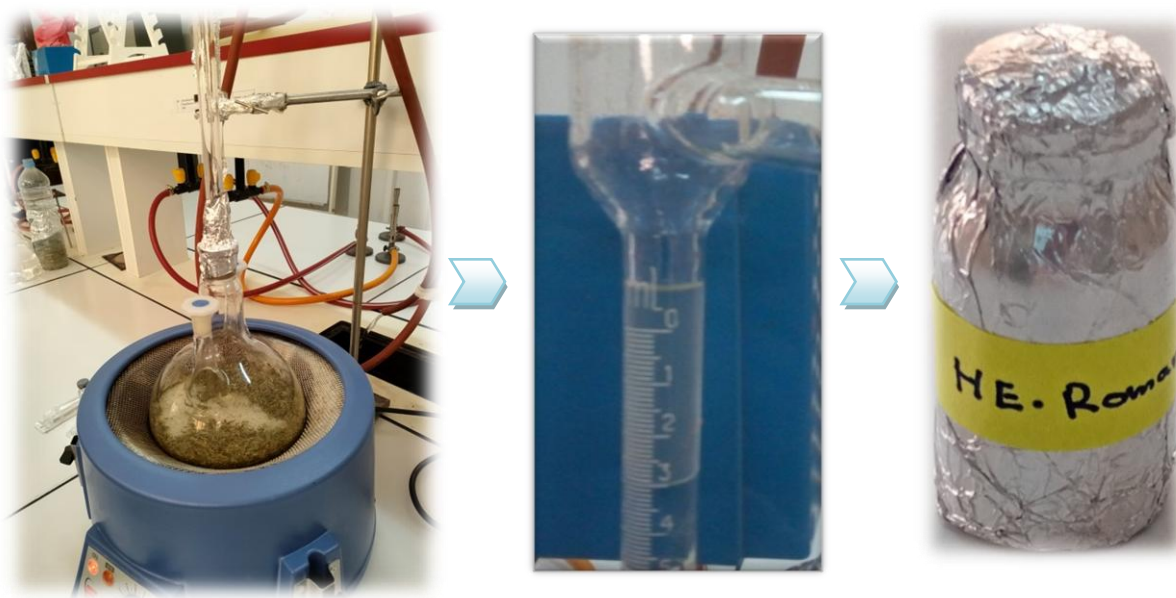


Figure 12 : Dispositif d'extraction des huiles essentielles de type Clevenger et flacon de l'huile de *Rosmarinus officinalis* (Photo personnelle ,2022).

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.2.2.4. Détermination du rendement de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* :

Selon la norme AFNOR(2006), 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.

III.2.2.5. Caractéristiques organoleptiques d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

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

III.2.3. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*:

III.2.3.1. Matériels

III.2.3.1.1. Matériels biologiques

❖ Critères de sélection des souches bactériennes testée

Le choix des souches est basé sur l'effet phytothérapeutique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur les maladies pulmonaires.

❖ Souches bactérienne

Le matériel bactériologique ayant fait l'objet de cette étude est constitué de trois souches bactériennes pathogènes pour l'homme, responsables des infections respiratoires plus ou moins graves. Des bactéries à Gram positif (G+): *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*, et un bactérie à Gram négatif (G-): *Klebsiella pneumoniae*.

Les souches bactériennes ont été conservées à une température 4°C dans des tubes contenant 3 ml de milieu incliné (géloses nutritifs)(Annexe02).

Chapitre III : Matériels et Méthodes

Tableau 05: Caractéristiques de souches bactériennes testées.

Souches microbiennes	Famille	Gram	Nature des prélèvements	Provenance
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	Gram+	Pulmonaire	Laboratoire d'analyses d'Hôpital khaldi Abdelaziz
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcaceae</i>	Gram+	Pulmonaire	laboratoire d'analyses médical privé Elit L'abm
<i>Klebseilla pneumoniae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Gram-	Pulmonaire	laboratoire d'analyses médicale privé Hannibal

III.2.3.2. Méthodes

III.2.3.2.1 .Confirmation la pureté des souches bactériennes étudiées

Pour chacune des souches un pré-enrichissement a été effectué sur le milieu d'isolement sélectif puis une coloration de Gram (Annexe03).

III.2.4. Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne de *Rosmarinus officinalis*

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est réalisée par les méthodes suivantes :

- ❖ D'abord par la méthode de diffusion sur des disques (Aromatogramme), en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries vis-à-vis des huiles essentielles.
- ❖ la méthode de micro dilution pour estimées les concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB). Cette méthode nous permet également de savoir la nature de l'activité antibactérienne d'huile essentielle (bactériostatique ou bactéricide).

III.2.4.1.Préparation de l'inoculum et ajustement de la charge bactérienne

A partir d'une culture bactérienne jeune âgée de 24h (le repiquage de souches bactériennes est mentionné dans l'annexe), à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées et mises dans 10ml d'eau physiologique stérile.

La suspension bactérienne est bien homogénéisée à l'aide du vortex, pour standardisation, de telle sorte que l'inoculum sera ajusté à une turbidité standard de 0,5 McFarland (Annexe04), ce qui correspond à une densité optique de 0,08 à une longueur d'onde de 625 nm. La concentration finale de l'inoculum sera approximativement de l'ordre de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.



Figure 13: Préparation de l'inoculum
(photos personnelles,2022).

III.2.4.2.Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* par la méthode d'aromatogramme

❖ Principe

Le principe de Cette méthode consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antibactérienne de l'huile de *Rosmarinus officinalis* en présence des germes testés. Des disques absorbants stériles, imprégnés d'une quantité de l'huile essentielle et disposés sur une gélose inoculée avec les souches bactériennes. Après un temps d'incubation de 24h à 37 °C, le diamètre du halo d'inhibition entourant les disques est alors mesuré.

III.2.4.2.1.Préparation des disques

Le papier de whatman N°01 est coupé en disque de 6mm diamètre. Les disques préparés sont placés dans un flacon en verre, et autoclavé a une température de 120°C pendant 20 minute ; pour éviter tous risques de contamination au germe exogène.

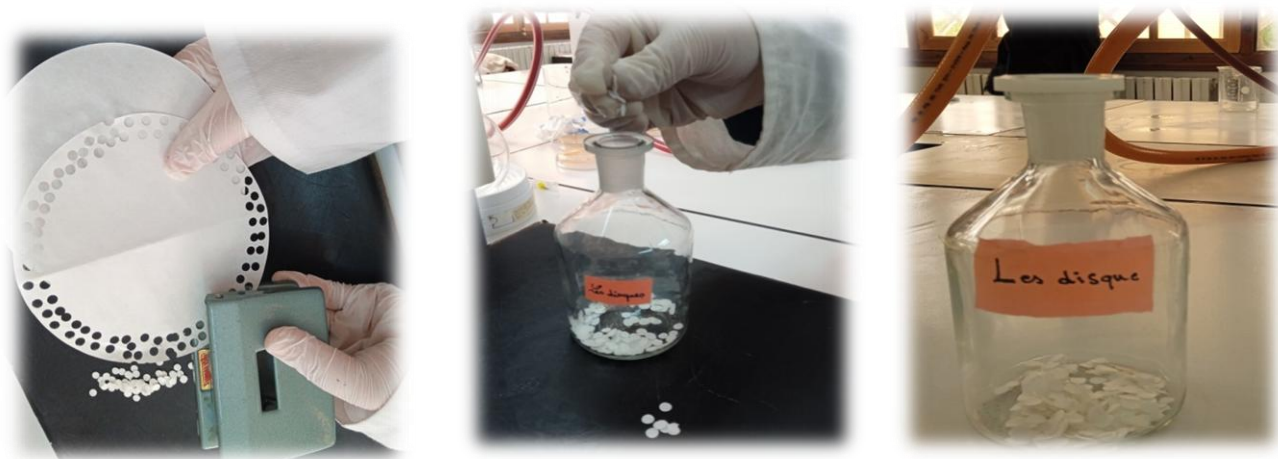


Figure14: Etapes de préparations des disques

(Photos personnelles ,2022).

III.2.4.2.2. Ensemencement et Dépôt des disques

III.2.4.2.2.1. Ensemencement

La gélose Muller Hinton stérile a été coulée dans des boites de pétrie stériles. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm répartie uniformément dans les boites, puis laissées refroidir à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.



Figure15 : Gélose Mueller Hinton stérile coulée dans des boites de pétri

(Photo personnelle ,2022)

Chapitre III : Matériels et Méthodes

- ❖ Nous avons ensemencé les boîtes contenant la gélose solidifiée (MH) par stries serrées avec un volume de l'inoculum standardisé à l'aide d'un écouvillon stérile. Puis on l'essorer sur les bords, et on fait froter l'écouvillon sur la surface de haut en bas. L'opération doit se faire deux fois en tournant la boîte de Pétri d'un angle de 60° à chaque fois. Les boîtes ainsi ont été mises à sécher à température ambiante.

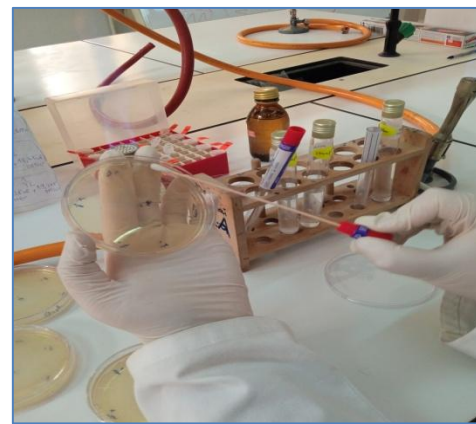
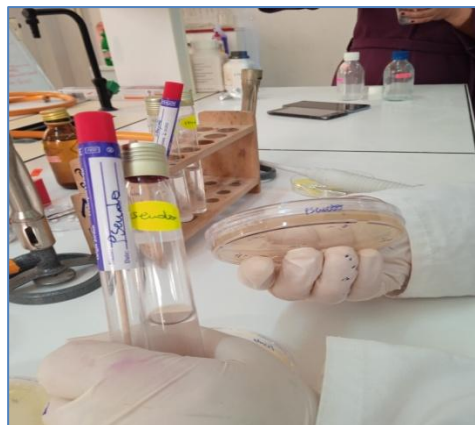


Figure16 : Ensemencement sur milieu MH
(Photo personnelle, 2022).

III.2.4.2.2. Dépôt des disques

Des disques de papier whatman (6mm) sont disposés à égale distance les uns des autres de telle façon à éviter le chevauchement des zones d'inhibitions sur Muller Hinton préalablement ensemencée par écouvillonnage avec les souches testées (*Klebsella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*). Une légère pression sera exercée sur chaque disque afin d'obtenir une bonne adhérence.

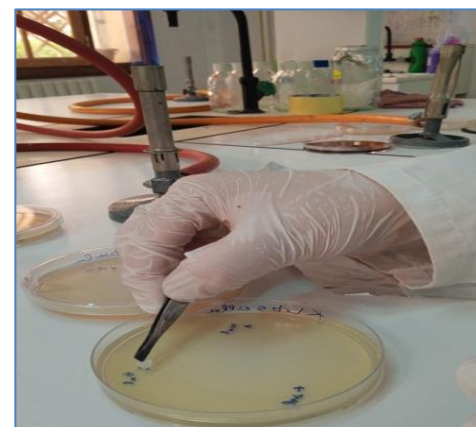


Figure 17 : Dépôt des disques sur milieu solide
(Photo personnelle, 2022).

Chapitre III : Matériels et Méthodes

A l'aide d'une micropipette on imbibe le premier disque par 5 μ l et le deuxième disque par 10 μ l et le troisième par 20 μ l de HE pure de *Rosmarinus officinalis* . Les boîtes sont refermées pour éviter la contamination. Elles sont laissées pendant 15 min à température ambiante sur la paillasse, pour une pré-incubation, ensuite elles sont incubées dans une étuve à 37°C pour une durée de 24 heures. Le test d'aromatogramme a été répété 2 fois pour chaque souches testés.



Figure 18 : Imprégnation des disques et incubation dans l'étuve à 37°C pendant 24h
(Photo personnelle, 2022).

❖ Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis l'huile essentielle de *Rosmarunis officinalis* .

Tableau 06 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition (Mouas et al,2017).

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

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.2.4.3. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* par la méthode de la microdilution

Nous avons fait face à de nombreuses difficultés, en raison des moyens très limité au laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie (Explosion de l'hydro distillateur manque du milieu MH ,twin80,boites de pétri ,écouvillon...,etc). Pour ces raisons, tous les essais in vitro de recherche de l'activité antimicrobienne par Méthode de microdilution de huile essentielle testées ont été réalisés au laboratoire de recherche Biologie Eau et Environnement de l'université de *Guelma* par notre encadreur Dr *Fenghour Hind* .

L'activité antibactérienne de huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur les souches bactériennes *S.aureus* ,*K. Pneumoniae* et *S.pneumoniae* a est réalisée par la méthode de microdilution sur microplaque de 96 puits selon une modification de la méthode décrite par **Shapiro et al** et **Carson et al (Lakhder L ,2015)** afin de déterminer la CMI et la CMB.

III.2.4.3.1. Détermination des Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

A partir des colonies bactériennes âgées de 24h, on inocule 3 tubes contenant BMH (Bouillon Muller Hinton) stérile. Après 24h d'incubation à 37°C dans une étuve, la densité est ajustée à 0.5 Mc Ferland.

Les puits de la première rangée horizontale sont remplis par 200 µl de l'inoculum seul comme contrôle de croissance. Les tests ont été effectués en triplicata sur la même microplaque pour chaque souche. Le schéma de la distribution expérimentale au niveau des microplaques est illustré ci-après (Figure19).

Les puits de la deuxième rangée sont remplis par 200 µl d'un mélange contenant du Tween 80 dilué à 10% dans la suspension microbienne standardisée afin de vérifier l'effet du Tween 80 sur les souches testées comme témoin négatif.

Les puits de la troisième rangée sont remplis par 200µl d'un mélange de l'Amoxicilline et l'inoculum comme témoin positive.

Une suspension bactérienne en bouillon équivalente au standard Mc Farland 0,5 a été préparée et ajoutée aux solutions antibiotiques à différentes concentrations. Ainsi, la concentration de la solution qui reste claire (non trouble) est prise comme CMI de l'Amoxicilline qui sera utilisée comme contrôle positif dans notre essai sur l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Le reste des cinq rangées est rempli par les différentes concentrations de l'huile essentielle. Pour cela, une série de dilutions au 1/2 a été préparée à partir d'une solution mère contenant 400 mg/ml d'huile essentielle et 10 % de Tween 80 dilués. Les autres solutions filles contenaient déjà un mélange de Tween 80 dilue à 10 % dans le MH (dans la même concentration que la solution mère),

Chapitre III : Matériels et Méthodes

dans un volume total égale à la moitié du volume total de la solution mère, pour garder la concentration de Tween 80 constante à 10 %. Les 12 puits dans chaque rangée sont remplis par 100 µl de chaque dilution préparée d'huile testée ont été ajoutées dans chaque puits de microplaque, à 100 µl d'inoculum préparé, et ce concernant les 3 souches.

	<i>K.pneumoniae</i>				<i>S.pneumoniae</i>				<i>S.aureus</i>			
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	Cc				Cc				Cc			
B	T-				T-				T-			
C	T+				T+				T+			
D	C1	C1	C1		C1	C1	C1		C1	C1	C1	
E	C2	C2	C2		C2	C2	C2		C2	C2	C2	
F	C3	C3	C3		C3	C3	C3		C3	C3	C3	
G	C4	C4	C4		C4	C4	C4		C4	C4	C4	
H	C5	C5	C5		C5	C5	C5		C5	C5	C5	

Figure 19: Distribution expérimentale de la microplaque pour les trois souches testées pour la détermination de la CMI.

C1 → C5 : différentes concentrations de l'huile testée + inoculum (*K.pneumoniae* en rouge et *S.pneumoniae* en vert et *S.aureus* en noire).

Cc : contrôle de croissance (inoculum seul).

C- : contrôle négatif (tween 80 à 10 % + inoculum),

C+ : contrôle positif (Amoxiciline+inoculum).

Les microplaques, recouvertes de leurs couvercles, sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 h. Après la période d'incubation, une solution à 2 mg / mL de Triphényl Tétrazolium Chloride(TTC) (indicateur de croissance bactérienne) est ajoutée dans chaque puits et la plaque est incubée pendant 10 min à 37°C. La solution d'indicateur TTC change du clair au pourpre en présence d'activité bactérienne, tandis qu'elle reste claire lorsque la croissance microbienne est inhibée.

La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est définie comme la plus faible concentration de l'huile essentielle qui ne montre aucune croissance bactérienne visible après la période d'incubation (pas de changement de couleur (claire) de TTC).

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.2.4.3.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01% de survivants). La plus petite concentration qui ne laisse que 0,01% des souches bactériennes survivantes après un 24h d'exposition à l'huile correspond à la CMB (**Lakhder,2015**) .

Pour déterminer la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), 100µl d'inoculum prélevée à partir de cultures au niveau des puits ne présentant pas de turbidité visible, et ensemencée en stries sur des milieux de gélose Mueller-Hinton , puis incubée pendant 24h à 37 ° C.



Résultats et Discussion



Chapitre IV: Résultats et Discussions

IV.1.Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

IV.1. 1Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

Nous avons effectué trois hydrodistillations afin d'obtenir une quantité suffisante de l'huile. Selon (AFNOR,2006). L'HE de *Rosmarinis officinalis* extraite est liquide mobile, d'une coloration jaune pâle et à odeur fraîche camphrée, les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau ci-dessous.

Tableau07 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE de *Rosmarunis officinalis*.

Origine	Aspect	Couleur	Odeur et saveur
Huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i>	Liquide mobile	jaune pal	Fraiche Camphrée
Norme AFNOR 2006	Liquide mobile	presque incolore à jaune pal	Odeur caractéristique fraîche plus ou moins camphré

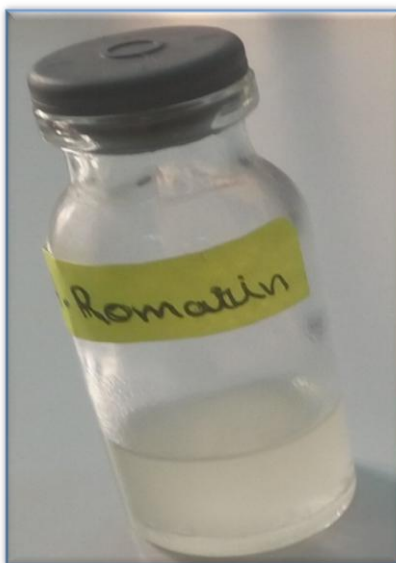


Figure20:Récupération de l'huile de *Rosmarinus officinalis*

(Photo personnelle, 2022)

Chapitre IV: Résultats et Discussions

IV.1.2. Rendement en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

Les valeurs du rendement d' HE de *Rosmarinus officinalis* sont rapportée dans le tableau suivant:

Tableau 08: Rendement en HE de *Rosmarinus officinalis* .

Le plante médicinale	Nombres d'extractions	Durée de distillation (h)	Matière Végétal (g)	Eau distillée (ml)	Poids d'H.E (g)	Rendement (%)	Moyenne± l'écart type
<i>Rosmarinus officinalis</i>	01	2h30min	100g	1000ml	1,72g	1,61%	1,63±0,02
	02				1,98g	1,65%	
	03				1,50g	1,63%	

L'extraction des HEs de *Rosmarinus officinalis* a été effectuée par hydro-distillation dans un appareil de type Clvenger . Le rendement moyen a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante de romarin. L'échantillon de *Rosmarinus officinalis* est fourni un taux relativement moyen d'environ **1,63%** est conforme avec les normes **AFNOR**.

En comparaison nos résultats avec d'autre travaux sur la même espèce et qui ont utilisé la même méthode d'extraction, nous a amené à dire que notre résultat est presque similaire à celui de(Djebbari et Barki,2021) ; (1,66%)et (Boutabia et al, 2016) (1,60%) ; notre rendement est supérieure à celui rapporté par (Bousbia et Souaci ,2021) ;(1,412%), (Bourita et Boubelli ,2017) ; (0.6%), et (Ayadi et al,2011) ; en Tunisie (1.35%),notre rendement est inférieure à celle trouvée par(Khia et al,2014) ;(2,21%)Au Maroc .

Le rendement en HE peut varier selon la méthode d'extraction, Une étude réalisée par (Henniche ,2018)sur les feuilles de *Rosmarinus officinalis* qui soumises à l'extraction par les trois techniques de distillation, l'étude est révélé des différentes rendements en HE **1,13%,0,81%,0,98%**.

Aussi, le rendement en HE varier selon la région d'étude ; (Lagsier et Nadir ,2020) ;sont réalisés une étude dans trois régions(Constantine, Tébessa et Oued souf) qui est permis d'avoir un rendement comprise entre (0,4%.et 1,5%)et notre rendement obtenu est supérieure de ce intervalle.

De plus, le rendement en HE peut varier selon les facteurs pédoclimatiques ;un etude de(Khia et al,2014) ; dans trois régions différent selon le climats(région de Rchida : se caractérise par un climat aride froid à tempéré, d es sols rouges fersialitiques moyennement profonds à profonds sur

Chapitre IV: Résultats et Discussions

un substrat calcaire, **région de Berkine** : se caractérise par un bioclimat semi-aride à aride froid, des sols très érodés et squelettiques sur substrat calcaire et **région d'Aknoul** : se caractérise par un climat subhumide frais, des substrats tendres schisteux et marneux) qui ont donné un rendement en huile essentielle avec respectivement des teneurs de **2,21%**, **1,87%** et **1,29%** . et notre rendement obtenu fait parti de ce intervalle.

En générale ,les différences rendements obtenu peut être lié à la méthode et les conditions d'extraction au laboratoire et sont dues à plusieurs facteurs : l'origine géographique, les facteurs écologiques notamment climatiques (la température et l'humidité), l'espèce végétal elle-même, l'organe végétal, le stade de la croissance, la période de cueillette, la conservation du matériel végétal et la méthode d'extraction(**Lagseier et Nadir ,2020**)et (**Toure,2015**),le temps , la température de séchage et la présence des mauvaises herbes (**Ghasemian, 2019**). sont des facteurs parmi d'autres qui peuvent aussi avoir un impact direct sur les rendements en huile essentielle (**Fadil, 2015**).



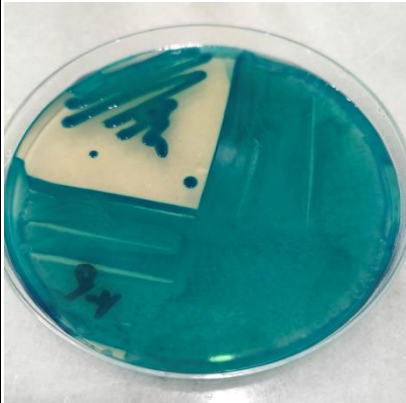
Chapitre IV: Résultats et Discussions

IV.2. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

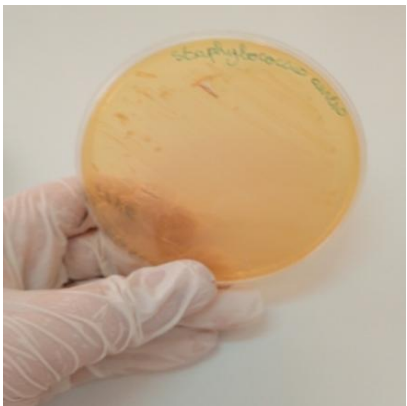
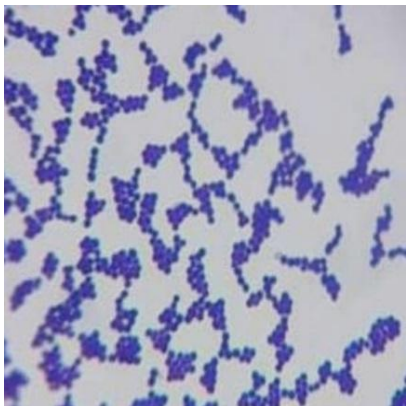
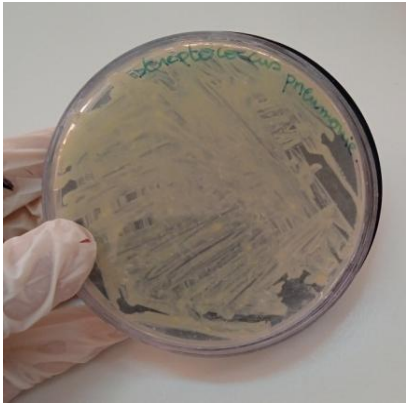
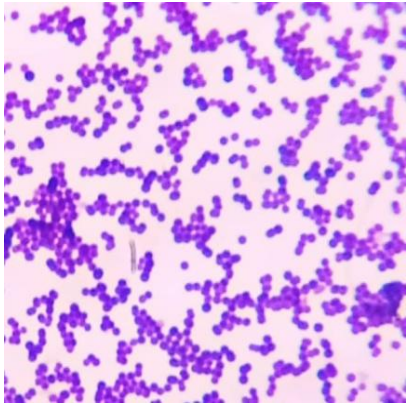
IV.2. 1. Confirmation de la pureté des souches bactériennes étudiées

Les résultats de la vérification de la pureté des souches bactériennes sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 09 : Aspect microscopique et macroscopique sur milieux sélectif des souches bactériennes testées (photo personnelle ,2022).

Les souches bactériennes	Aspect macroscopiques sur milieu sélectif.	Aspect microscopique après coloration de Gram
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	 Lac+	
	 Lac-	

Chapitre IV: Résultats et Discussions

<p><i>Staphylococcus aureus</i></p>		
<p><i>Streptococcus pneumoniae</i></p>		

IV.2.2. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* par la méthode d'Aromatogramme

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antibactérien d'HE *Rosmarinus officinalis* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton) .

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'huile à tester vis-à-vis de trois germes pathogènes responsable des infections pulmonaires (*K.pneumoniae*, *S. aureus*, *S.pneumoniae*) après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C. Le pouvoir antibactérien de ce huile essentielle est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition en (mm) a l'aide d'un pied à coulisse (annexe 03).

Chapitre IV: Résultats et Discussions

Tableau 10 : Résultat de l'effet antibactérien d'HE de *Rosmarinus officinalis* sur les souches bactériennes testées.

Les souches bactériennes		HE de <i>Rosmarinus officinalis</i>						moyenne D(mm)	S
		5µl		10µl		20µl			
		D(mm)	S	D(mm)	S	D(mm)	S		
G+	<i>S. aureus</i>	16,5	++	23,5	+++	31	+++	23,66	+++
	<i>S.pneumoniae</i>	16,5	++	20,5	+++	24,16	+++	20,38	+++
G-	<i>K. pneumoniae</i>	6,5	-	10	+	17,5	++	11,33	+

S.pneumoniae : *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus* : *Staphylococcus aureus*,

K.,pneumoniae : *Klebseilla pneumoniae*, G+ :Gram+, G- :Gram-, D :Diamètres :sensibilité :non sensibles(résistantes)(-),sensibles(+),très sensibles(++),extrêmement sensibles(+++) .

Chapitre IV: Résultats et Discussions

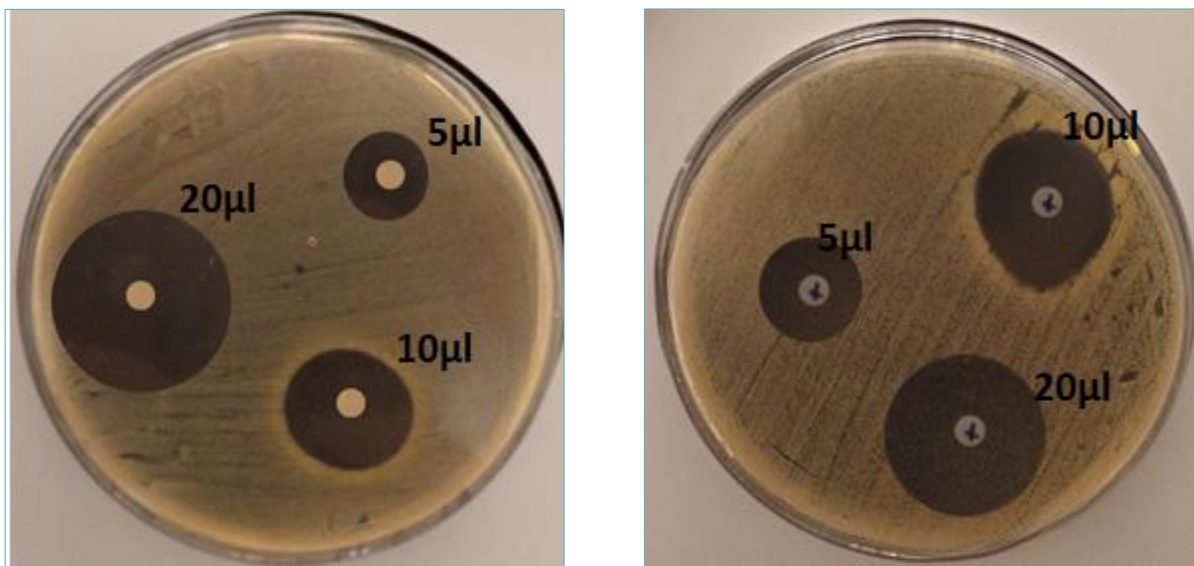


Figure 21: Effet de l'HE de *Rosmarinus officinalis* sur *S.aureus*
(photo personnelle ,2022).

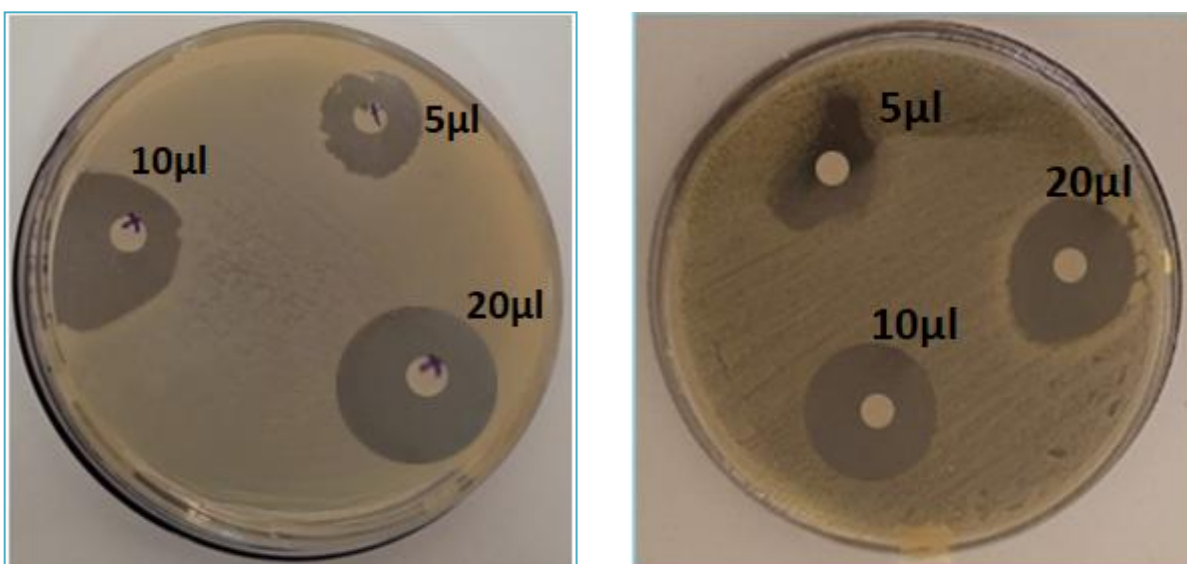


Figure22: Effet de l'HE de *Rosmarinus officinalis* sur *S.pneumoniae*
(Photo personnelle ,2022).

Chapitre IV: Résultats et Discussions

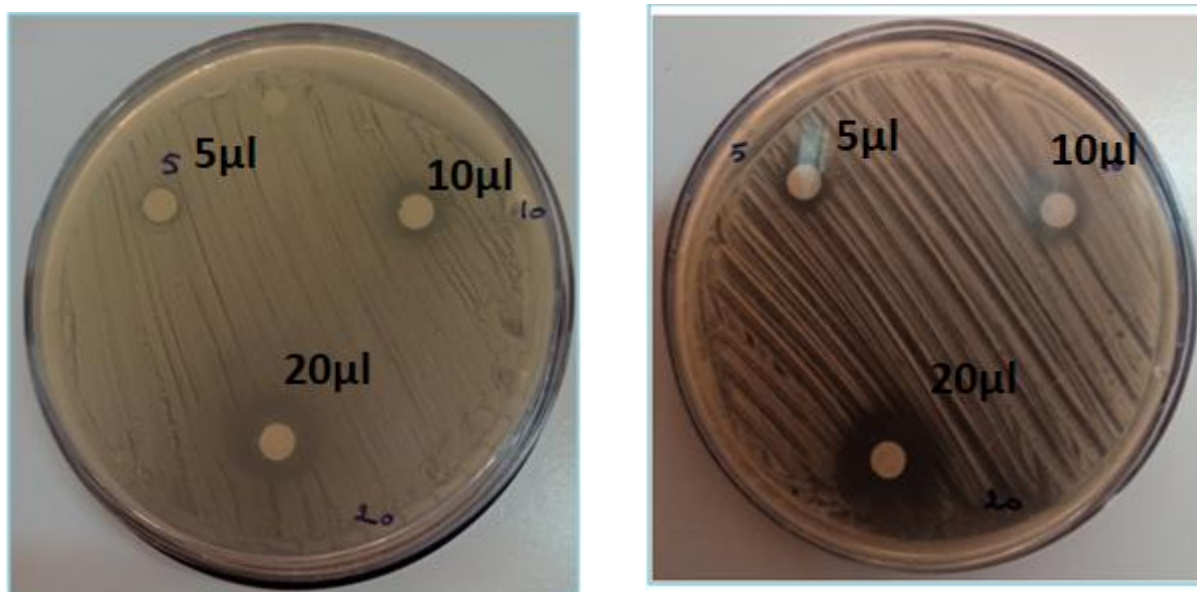


Figure23: Effet de l'HE de *Rosmarinus officinalis* sur *K. pneumoniae*
(Photos personnelles ,2022).

Les volumes d'huile essentielle utilisées dans notre étude sont respectivement 5 et 10 et 20 μ l :

A partir des résultats des diamètres des zones d'inhibition dans le (Tableau 08) et (Figures 13,14,15).

❖ **Le volume de 5 μ l d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis***

L'HE de *Rosmarinus officinalis* a exercé une activité antibactérienne égale sur *S. aureus* et *S. pneumoniae* avec un diamètre d'inhibition de 16,5 mm, contrairement à *K. pneumoniae* il n'a aucun effet antibactérien.

❖ **Le volume de 10 μ l d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis***

L'HE de *Rosmarinus officinalis* a montré un effet inhibiteur sur toutes les souches bactériennes testées. Il a exercé une activité antibactérienne élevée sur *S. pneumoniae* et *S. aureus* avec des zones d'inhibition variant de 20,5 à 23,5 mm. Concernant *K. pneumoniae*, l'huile essentielle a montré un effet faible avec un diamètre d'inhibition de 10 mm.

❖ **Le volume de 20 μ l d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis***

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a exercé une activité antibactérienne élevée sur toutes les bactéries testées à Gram positives et à Gram négatives. D'abord, pour les Gram positifs notamment, *S. aureus* et *S. pneumoniae* avec des zones d'inhibition variant de 24,16 mm à 31 mm. Concernant les Gram négatifs, l'huile essentielle a montré un effet remarquable sur *K. pneumoniae*

Chapitre IV: Résultats et Discussions

avec un diamètre d'inhibition de 17,5 mm .

Sur la base de ces résultats , nous concluons que les bactéries *S. aureus* et *S.pneumoniae* sont extrêmement sensibles à l'HE de *Rosmarinus officinalis* par rapport à *K. pneumoniae*, qui était sensible.

Ces résultats nous permettent de conclure que l'accroissement du volume d'HE induit l'amélioration de son pouvoir inhibiteur. Nous constatons également que l'activité est proportionnelle au volume des HEs, plus le volume d'extraits est élevé plus leur activité antibactérienne est meilleure.

Ceci peut être expliqué par l'augmentation du pourcentage des molécules bioactives responsable de son effet antibactérien (**Kheyar et al., 2014**).

Des résultats similaires ont été rapportés par (**Djebbari et al ,2021**) qui ont réalisés leurs travaux dans le laboratoire de microbiologie de départements de biologie appliquée de l'université de Laarbi Tébessi et ils montrent que l'HE de *Rosmarinus officinalis* de la région de Tébessa possède un large spectre d'activité antibactérienne sur le *S. aureus* et *K. pneumoniae*.

Les résultats de notre présente étude ont mis en évidence une forte activité antimicrobienne des huiles essentielles testées. contre des souches virulentes (*K.pneumoniae*, *S.pneumoniae*, *S.aureus*) on peut dire alors que la sensibilité des micro-organismes dépend de la composition chimique et la concentration en huiles essentielles utilisées et le type des microorganismes testés (**Abdellah, 2013**).

Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des HE confirment que les bactéries Gram (+) sont plus sensibles aux HEs que les bactéries Gram (-) . Cette résistance est liée à la complexité de leur enveloppe cellulaire qui contient une double membrane (**Busatta et al,2008**) qui présente une perméabilité sélective, Par contre (**Moreira et al.,2005**) ont montrés que les bactéries Gram (-) peuvent être sensibles à l'action des HEs. En effet, cette sensibilité dépend aussi des propriétés de l'HE, par ce que l'action inhibitrice et bactéricide des HE est due à leur richesse en molécules actives (**Satrani et al,2001**).

Chapitre IV: Résultats et Discussions

IV.2.3. Evaluation quantitative de L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* par la méthode de microdilution

IV.2.3.1. Comparaison de l'activité inhibitrice de l'antibiotique Amoxicilline et celle de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

Cette étude nous avons effectué une comparaison intéressante entre l'activité inhibitrice d'un antibiotique (Amoxicilline) impliqué dans le traitement des infections pulmonaires et l'effet antibactérien de l'HE de *Rosmarinus officinalis* (tableau 12) .

Les résultats obtenus ont montré une efficacité très remarquable puisque toutes les souches ont montré une sensibilité à l'HE plus importante que celle de l'ATB. Cette constatation est en faveur de l'hypothèse que nous avons soutenue au préalable et selon laquelle les HEs peuvent être utilisés comme alternatif antibactérien.

Tableau 11: Concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* (mg/ml) suite à l'effet de l'HE et l'Amoxicilline.

Souches bactériennes	MOYENNE CMI d'HE	Amoxicilline CMI
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15±00	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25±00	27
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5±00	14

Il nous semble donc, dans une deuxième étape de ce travail de déterminer les CMB pour évaluer le pouvoir bactéricide.

IV.2.3.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Le rapport CMI/CMB permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur à 4 l'huile est considérée comme bactéricide (Eberlin,1994) . Dans notre étude, les rapports CMB/CMI de l'HE de *Rosmarinus officinalis* sont égaux à 1 pour toutes les souches bactériennes testées (tableau 13). Cette huile essentielle semble donc exercer une action bactéricide contre toutes les souches bactériennes testées.

Chapitre IV: Résultats et Discussions

Tableau12 : CMI et CMB des huiles essentielles de *Rosmarinus officinailis* testées sur les souches bactériennes sélectionnées.

Souches	CMI et CMB de HE du <i>Rosmarinus officinailis</i>		RAPPORT CMI/CMB
	CMI	CMB	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15	15	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25	25	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.5	12.5	1



Conclusion et Perspective



Conclusion et perspective

Le présent travail est consacré à la détermination du rendement et les propriétés antibactériennes des huiles essentielles extraites du *Rosmarinus officinalis* récolté dans la région d'Awled Gdaim de la wilaya de Tébessa en Novembre 2021, par la méthode de diffusion sur milieu solide et la méthode de microdilution .En effet le rendement en huile essentielle est de 1,63%.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielle de *Rosmarinus officinalis* a montré une efficacité contre toutes les souches bactériennes testées à Gram+ et à Gram- (*Klebsella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*) .La comparaison de l'effet antibactérien de l'HE avec l'effet de l'Amoxicilline sur les souches bactériennes a montré que l'HE a une activité antibactérienne plus importante que l'Antibiotique .En effet, Les concentrations minimales inhibitrice ont montrée des valeurs variable de 12,5 mg/ml à 25 mg/ml avec l'HE et 14 mg/ml à 27mg /ml avec l'Amoxicilline , témoignant ainsi une forte activité bactéricide de l'HE. Les rapports CMI /CMB sont égaux à 1 pour toutes les souches bactériennes testées. l'HE de *Rosmarinus officinalis* est considérée donc, comme bactéricide.

En perspectives, il serait intéressant détendre les tests antibactériens sur d'autres souches bactériennes et autres agents microbiens afin de confirmer l'efficacité de L'HE de *Rosmarinus officinalis* . L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active. Une analyse chimique est souhaitable pour obtenir une vue plus approfondie sur la composition quantitative et qualitative des HE étudiés afin de mettre la lumière sur l'effet thérapeutique de cette plante médicinale



Références Bibliographiques



Références Bibliographiques

A

Abdellah F , Satrani B, Fechtal M et al, 2013. Composition chimique et activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles extraites des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* et de son hybride naturel (clone 583). (en ligne).JournalActa Botanica Gallica, 148(3) ,183-190. Disponible sur : <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/12538078.2001.10515886>. (page consulter le 20/11/2021).

Abdessultane M,2017.Effet du Romarin (*Rosmarinus officinalis*) sur la conservation traditionnelle des dattes dans la région d'Adrar . (en ligne).Mémoires de Master : Chimie d'environnement. Adrar :Université Ahmed Draia p47.Disponible sur : <http://www.univ-adrar.dz/:8080/xmlui/handle/123456789/933>(page consulter le 20/11/2021).

AFNORN F T 75-006, huile essentielle. association française de normalisation. Paris. pp559-563

Aissaoui I ,2019. Effet de l'utilisation d'un mélange d'huiles essentielles de romarin et de thym sur l'amélioration de la conservation d'un fromage à caillé lactique . (en ligne).Memoire de Master :Production et transformation laitières .Mostaganem :Université Abdelhamid IBn Badis - p118 <http://e-biblio.univ-mosta.dz/handle/123456789/12754>(page consulter le 20/12/2021).

Andrade J,Faustino C, Garcia1 Cet al,2018. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its photochemistry and biological activity. Future science group. 4(4). 18p. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0124>(pages consulter le 09/10/2021).

Aouad A et Belayachi,2019. Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait hydro-méthanolique de *Rosmarinus officinalis* L. récolté à la région de Naama vis-à-vis de certains germes responsables de toxi-infections alimentaires . (en ligne).Memoire de Master, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem- 97p. Disponible sur <http://e-biblio.univ-mosta.dz/bitstream/handle/123456789/13092/memoire%20final%202019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>(page consulter le 20/01/2022).

B

Belkhiri F ,2015 .Etude de l'activités antibactérienne des huile essentielles de *Rosmarinus officinalis* L.(en ligne) Mémoire de Master : Génie des Procédés. Biskra . Université Mohamed Khider -51pDisponible sur <http://archives.univ-biskra.dz/bitstream/123456789/6601/1/BELKHIRI.pdf>(page consulter le 20/12/2021).

Belloul K et Chouiref M,2016 . Etude de l'activité antioxydante d'une plante médicinale (le romarin). (en ligne).Mémoire de Master: Génie chimique .Universite Echahid Hamma Lakhdar - El oued -666 p. Disponible sur <http://e-biblio.univ-mosta.dz/handle/123456789/13092> (pages consulter le 8/11/2021).

Benzineb Z,2019. Effets antimicrobiens des extraits de Romarin (*Rosmarinus officinalis*) sur les qualités physico-chimiques et microbiologiques d'un lait fermenté type yaourt. (en ligne). Mémoire de Master :Contrôle de qualité des aliments. Mostaganem :Université Abdelhamid bn Badis- p51. Disponible sur : <http://e-biblio.univ-mosta.dz/handle/123456789/12559>(page consulter le 20/12/2021).

Références Bibliographiques

Berramdani A et Baghdadi M , 2021 . Évaluation de L'effet anti-inflammatoire et antidépresseurs des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*.(en ligne) Mémoire de Master: Biochimie Appliquée. Biskra. Université Mohamed khlder de Biskra-p36 .Disponible sur :<http://archives.univ-biskra.dz> > ...PDF 36,p(page consulter le 20/03/2022).

Bettahar C et Chekalil S, 2020. Etude biologique de huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* de la wilaya de Ain defla .Mémoire de Master: Microbiologie appliquée. Khemis Miliana : Université Djillali Bounaâma -p35 Disponible sur : <http://hdl.handle.net/123456789/3726>(page consulter le 20/10/2021).

Bottineau M, 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed TEC&DOC, Lavoisier, Paris. P : 1021-1043.

Brahimi H,Merzouk A et Guenouna H, 2018. Effets antimicrobiens des extraits de romarin (*Rosmarinus officinalis*) chez *Staphylococcus aureus* (en ligne).Mémoire de Master :Microbiologie Fondamentale . Mostaganem : Université Abdelhamid Ibn Badis -p59Disponible sur : <http://e-biblio.univ-mosta.dz/bitstream/handle/123456789/3908/MEMOIRE%20FINAL%202021018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>(page consulter le 20/12/2021).

Bouadjmi K,2018 .Etude comparative des différents parties de la plante romarin «*Rosmarinus officinalis*» par rapport aux pouvoirs antibiotiques sur le yaourt(en ligne) .Mémoire de Master :Biotechnologie Alimentaire. Mostaganem :Université Abdelhamid Ibn Badis-68p Disponible sur mosta.dz/handle/123456789/4263-biblio.univ-http://e (pages consulter le 7/10/2021).

Bouchelouk N et Kadja T,2019 . Etude botanique et phytochimique de la plante medicinale *Rosmarinus officinalis* (en ligne.) .Memoire de Master : BioTechnologie Végétale . Mila. Universitaire Ab-delahfid Boussouf -65p Disponible sur : <http://dSPACE.centre-univ-mila.dz/jspui/handle/123456789/591>(pages consulter le 7/10/2021) .

Boudgebir K,2017,Evaluation de l'activité antimicrobienne de deux huiles essentielles *Rosmarinus officinalis* et *Cymbopogon citratus* en perspective de leurs utilisation comme conservateur de denrées alimentaires(en ligne).Mémoire de Master : Microbiologie et Toxicologie Alimentaire.Blida -:Université Blida - 150 p Disponible sur <https://www.theses-algerie.com> > ev... (page consulter le 20/12/2021).

Boulezazen A ,2017 .Évaluation de L'activité Antioxydant et antimicrobienne d'une plante aromatique,(*Rosmarinus officinalis*.L.) de la forêt BéniMelloul - kenchela (en ligne) .Mémoire de Master : Biologie et Valorisation des Plantes.El oude . Université Echahid Hammam Lakhder 42pDisponible sur <https://www.theses-algerie.com> > ev... (page consulter le 20/12/2021).

Boumadjen R et Kimouche S ,2018. Etude phytochimique et evaluation de l'activité antioxydante de Romarin (*Rosmarinus officinalis*) (en ligne) .Mémoire de Master: Biochimie Appliquée . Constantine. Université des Frères Mentouri-65p .Disponible sur :[https://fac.umc.edu.dz/snv/bibliotheque/biblio/mm/2018/Etude%20phytochimique%20et%20evaluation%20de%20l%27E%20activit%C3%A9%20antioxydante%20de%20Romarin%20\(Rosmarinus%20officinalis\).pdf](https://fac.umc.edu.dz/snv/bibliotheque/biblio/mm/2018/Etude%20phytochimique%20et%20evaluation%20de%20l%27E%20activit%C3%A9%20antioxydante%20de%20Romarin%20(Rosmarinus%20officinalis).pdf) (pages consulter le 3/05/2022).

Références Bibliographiques

Bourahlla N ,Halfaya A et Khelif O ,2020.Étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle d'une plante médicinale (*Euca-lyptus camaldulensis*) .(en ligne)Memoire de Master: Microbiologie appliquée .Tébessa :Université de Larbi Tébessi. Disponible sur <http://dSPACE.univ-tebessa.dz> > ...PDFMEMOIRE de fin d'étude (pages consulter le 3/05/2022).

Bourita A et Boubelli K ,2017. Étude de l'activité antibactérienne d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* cultivée à Jijel .(en ligne) Mémoire de Master: Microorganismes et pathogénécité.Jijel:Université Mohamed Seddik Ben Yahia-p42 .Disponible sur <http://dSPACE.univ-jijel.dz> > [handle](#)(page consulter le 20/12/2021).

Bousbia B et Souaci W ,2021.Enquête ethnobotanique et étude photochimique de deux plantes médicinales (*Rosmarinus officinalis* et *Juniperus phoenicea*) dans la région d'Oued Souf(en ligne) . Mémoire de Master : Biodiversité et environnement.El oued :Université Echahid Hamma Lakdhar-151p. Disponible sur : <http://dSPACE.univ-eloued.dz/handle/123456789/10032> (pages consulter le 7/10/2021).

Boutabia L et al ,2016 . Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L* de la région de Hammamet (Tébessa - Algérie . tebessa.(Vol . 85 , 2016 , .174 p - 189) .Disponible sur :<https://popups.uliege.be> > ...PDF 189 174 - Composition chimique et activité antibactérienne des huiles (page consulter le 20/12/2021).

Busatta C ,Vidalal R,Popiolski A,2008 .Food Microbiology Volume 25, Issue 1, Pages 207-211 Application of *Origanum majorana L.* essential oil as an antimicrobial agent in sausage <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.07.003>(page consulter le 20/12/2021).

C

Casanova, J, Tomi F, 2018. Spécificité de l'huile essentielle de romarin spontané (*Rosmarinus officinalis L*) de Corse et de Sardaigne. Disponible sur <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02125066/>(page consulter le 20/12/2021).

Chafai, A, Boukil A, Bachar M, et al,2014.Manuel des bonnes pratiques de collecte du romarin «*Rosmarinus officinalis*». Centre de Recherche Forestière, HCEFLCD p12.disponible sur <https://docplayer.fr/47755806-Manuel-des-bonnes-pratiques-de-collecte-du-romarin-rosmarinus-officinalis.html>(page consulter le 20/09/2021).

Chibah R et Labandji A , 2017.Extraction et caractérisation des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis et l'étude de quelques activités biologiques(en ligne) .Memoire de Master : Analyses biologiques et biochimiques. Boira :Universite Akli Mohand Oulhadi -53p .Disponible sur : <https://www.theses-algerie.com/2712527695654372/memoire-de-master/universite-akli-mohand-oulhadj-boira/extraction-et-caracterisation-des-huiles-essentiellees-de-rosmarinus-officinalis-et-letude-de-quelques-activites-biologiques>(page consulter le 20/09/2021).

Djebbari H ,Barki D ,Boumaagouda S ,2021.Étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de deux plantes médicinales (*Rosmarinus officinalis* et *Eucalyptus camaldulensis*(en ligne) .Memoire de Master : Microbiologie appliquée. Tébessa :Université de Larbi Tébessi -64p .Disponible sur : <http://localhost:8080/jspui/handle/123456789/807> (consulter le 07/10/2021).

Références Bibliographiques

E

Eberlin Net al, 1994 Gas - Phase CI + Affinities of Pyridines Determined by the Kinetic Method Using Multiple - Stage (MS³) Mass Spectrometry .Marcos.p 2457-2465 .JACS JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 0:47 QE 2457 J. Am . Chem (page consulter le 20/09/2021).

Echchaou M , 2018. Pouvoir antibactérienne des huiles essentielles(en ligne).Thèse de Doctorat : Pharmacie. Rabat : Université de Mohammed V ,138P .Disponible sur :<http://hdl.handle.net/123456789/16429>(page consulter le 20/12/2021).

Ennoumayry I ,2022. Drainage en Phytothérapie Clinique(en ligne)..Thèses de Doctorat .Pharmacie: -RABAT :Faculté de Médecine et de Pharmacie -p216 .Disponible sur :<http://hdl.handle.net/123456789/19445>(page consulter le 20/09/2021).

Ezziat H,2013 . Etude comparative des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L.* de deux provenances (Blida et Djelfa) (en ligne) .Mémoire de Master: Biotechnologie Vegetale .Blida 1.Universite Saad Dahleb de Blida.Disponible sur : <http://di.univ-blida.dz:8080/jspui/handle/123456789/10413>(page consulter le 20/09/2021).

F

Fadi Z, 2011.*Rosmarinus officinalis* Le bon procédé d'extraction pour un effet thérapeutique optimal(en ligne)..These Doctorat : pharmacie . Rabat : Université Mohammed –V faculté de Médecine et de pharmacie.-210p. <http://ao.um5.ac.ma/xmlui/handle/123456789/1901>(page consulter le 20/09/2021).

Fadil M, FarahA, Bouchaib I, 2015 . Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis L.* par la méthodologie de surface de réponse Optimization of parameters influencing the hydrod... J. Mater. Environ. Sci. 6 (8) (2015) 2346-2357 al. ISSN : 2028-2508 <https://www.researchgate.net/publication/281749067>(page consulter le 20/09/2021).

G

Ghasemian A , Eslami M ,Hasanvand et al,2019. *Eucalyptus camaldulensis* properties for use in the eradication of infections. p4:<https://www.researchgate.net/publication/334173326>

Guernit A et Rhaim f, 2019 .Contribution à l'étude de la toxicité de deux plantes médicinales (*Rosmarinus officinalis* et *Artemisia herba alba*) sur les larves de culicidées dans la région de Oued souf (en ligne) Mémoire de Master :Biodiversité et Environnement . EL oude . Université Echahid Hamma Lakhdar El - 124p <https://www.researchgate.net/publication/281749067>

H

Henniche H,2018 .Extraction et valorisation des huiles essentielles du Romarin (Algérie) obtenues par différents procédés(en ligne) .Mémoire de Magister :Technologie pharmaceutique .Algérie:Universite des Sciences et de la technologie Houari Boumediene -97 p .Disponible sur : <https://repository.usthb.dz/handle/123456789/13092> (pages consulter le 7/10/2021).

K

Khia A et al ,2014.Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essen-tielles de *Rosmarinus officinalis L* du Maroc . Disponible sur :<https://link.springer.com/article/10.1007/s10298-014-0895-x>(page consulter le 20/09/2021).

Références Bibliographiques

Kheyar N, Meridja D et Belhamel K,2014. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia .Algerian Journal of Natural Products. Volume 2, Numéro 1, p18-26 Disponible sur : <https://doi.org/10.5281/zenodo.264353> (pages consulter le 7/10/2021).

L

Labiod R ,2016. Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide.(en ligne).These doctorat : Biochimie appliquée. Annaba :Universite Badji Mokhtar-128P.Disponible sur : <https://www.univ-soukahrass.dz/eprints/2016-9175-fa163.pdf>(pages consulter le 7/10/2021).

Lagsier O et Nadir N ,2020.Evaluation du potentiel aphicide de " *Rosmarinus officinalis*" sur les pu-eron des céréales *Rhopalosiphum Maidis* (en ligne) Mémoire de Master :Biodiversité et Environnement.El-Oued : Université Echahid Hamma Lakhdar -90p .Disponible sur :<http://dSPACE.univ-eloued.dz/bitstream/123456789/7615/1/574.01.096.pdf> (pages consulter le 7/10/2021).

Lakhdar L,2015 .Evaluation de l'activité antibacterienne d'huiles essentielles Marocaines sur *Aggregatibacter Actinomycete Mcomitans* : Etude in vitro(en ligne). Thèse Doctorat :Sciences Odontologiques.Rabat :Université Mohammed V Professeur El khanchoufi Abdessalam -164p Disponible sur :<http://dSPACE.univ-km.dz/bitstream/123456789/7615/1/574.01.096.pdf> [Etude de l'effet antibactérien et prébiotique des extraits de ...](#)

Lassal F ,2020 . Etude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de l'ail (*Allium sativum*. L) (en ligne). Memoire de Master :Biotechnologie et Valorisation des plantes. Mostaganem :Université Abdelhamid Ibn Badis -p35 . Disponible sur : <http://e-biblio.univ-mosta.dz/bitstream/handle/123456789/15939/LASSAL%20Fatima%20M2.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Laouici N,2020.Activité antimicrobienne et composition chimique de l'huile essentielle et de l'extrait brut de l'espèce *Rosmarinus officinalis L.*(en ligne) .Mémoire de Master:Phytopharmacie appliquée .jijel :Université Mohammed - Seddik Benyahia - 127p Disponible sur : <http://dSPACE.univ-jijel.dz:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7697/M-Ph.A.%2009-20.pdf?sequence=1>

M

Madjour S, 2014 .Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée *Rosmarinus officinalis* .(en ligne) .Mémoire de Master:Chimie Pharmaceutique .Biskra : Université Med Khider -p54.Disponible sur : [http://archives.univ-biskra.dz/handle](http://archives.univ-biskra.dz/handle/123456789/7697/M-Ph.A.%2009-20.pdf?sequence=1)

Margot L,2017 .L'acide Carnosique et le Carnosol , Deux super - antioxydants du romarin (*Rosmarinus officinalis*) (en ligne) .Thèse Doctorat :Biologie Vegetale.Marseille . Universite Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Sante (ED SVS 62) -170p .Disponible sur :[http://www.theses.fr/2017AIXM02...L'acide carnosique et le carnosol, deux super-antioxydants du ...](http://www.theses.fr/2017AIXM02...L'acide%20carnosique%20et%20le%20carnosol,%20deux%20super-antioxydants%20du%20romarin)

Marion L,2017.Le Romarin , *Rosmarinus officinalis L.* , une Lamiacée médicinale de la garrigue provençale (en ligne) . Thèse Doctorat . : Pharmacie. Marseille : Faculté de Pharmacie Aix - p229Disponible sur : [https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-0...](https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01511111) (page consulter le 20/09/2021).

Références Bibliographiques

Mehani M ,2015. Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Eucalyptus camaldulensis dans la région d'Ouargla. (En ligne). Thèse de Doctorat: Microbiologie. Ouargla : Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie -170 p..Disponible sur : <https://dspace.univ-ouargla.dz/jspui/handle/123456789/8995>(page consulté le 22/01/2022)

Mouas Y , Benrebaha F et al ,2017 .Évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanoliqueU Romarin *Rosmarinus officinalis L* . Article. Biotechnologie des Productions Végétales , -p 270 , route de Soumaa , Blida 09000 , Algérie Reçu le 21/05/2017 , Révisé le 21/06/2017 ,363-370p <http://agrobiologia.net/online/evaluation-de-lactivite-antibacterienne-de-lhuile-essentielle-et-de-l'extrait-methanolique-du-romarin-rosmarinus-officinalis-1/>

Moreira M, Ponce A, del Valle C et al ,2005.LWT - Food Science and Technology Volume 38, Issue 5, August, Pages 565-570
Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen
:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.012>

N

Naab D et Hadibi S,2018 .Evaluation de l'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles Zingiber officinale et *Rosmarinus officinalis* en combinaison avec la nisine -101p. (en ligne) .Mémoire de Master:Biotechnologie microbienne.Tlizi - Ouzou .Universite Mouloud Mammeri .Disponible sur : <http://agrobiologia.net/online/performances-de-croissance-en-pre-sevrage-des-chevreaux-de-la-race-alpine-elevés-dans-les-conditions-arides-du-sud-est-algerien/aissaoui>

Q

Quintana S , David V, Guillermo R et al,2019.Supercritical antisolvent particle precipitation and fractionation of rosemary (*Rosmarinus officinalis L* .) .Journal of CO2 Utilization Volume 34 , 2019 , Pages 479-489 . Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.07.032> [Get rights and content Under a Creative Commons license Highlights Open access](#)

S

Satrani B Abdellah F Mohamed F et al, 2001.Composition chimique et activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles extraites des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* et de son hybride naturel (clone 583) Pages 183-190, Acta Botanica Gallica , Botany Letters , Vololume 148, Issue 3 Disponible sur : <https://doi.org/10.1080/12538078.2001.10515886>

T

Tayeb Cherif et Menacer ,2016 .L'activité antibactérienne des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* et de *Origanum vulgare* sur la bactérie E.coli (en ligne) .Mémoire de Master:Génétique moléculaire universitaire -34p Disponible sur : <https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/biblio/mm/2017/L%E2%80%99activit%C3%A9%20antibact%C3%A9rienne%20des%20huiles%20essentielles%20du%20Rosmarinus%20officinalis%20et%20de%20Origanum%20vulgare%20sur%20la%20bact%C3%A9rie%20E.coli.pdf>

Toure D ,2015.Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales des cote d'ivoire.(en ligne) .Thèse Doctora :Biochimie Boigny:Universite Felix Houphouet - 116 p .Disponible sur <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01222964/document>

V

Références Bibliographiques

Valter Jacinto, 2015 .<http://www.prota4u.org/protav8.asp?h=M4&p=Rosmarinus+officinalis+L.> -(
<http://paprikaet.chocolat.wordpress.com>)

Y

Yaacoub R et Tlidjane I, 2018 . Caractérisation physico - chimiques et analyses biologiques de l'huile essentielle des grains de *Cuminum cyminum L* et de *Foeniculum vulgare Mill* extraite par hydrodistillation et CO₂ supercritique : Etude comparative .(en ligne) .Mémoire de Master: Genie Chimique, Oum El Bouachi .Université Larbi Ben M'hidi -48p
Disponible sur <http://bib.univ-ueb.dz:8080/jspui/handle/123456789/7401> (pages consulter le 7/10/2021).

Z

Zidi M et Houilila S, 2020. Contribution à l'étude de L'activité biologique de la plante *Rosmarinus offi-cinalis L.*(en ligne) mémoire de Master :Biochimie appliquée.Oum El Bouaghi :Université L'Arbi Ben Mhidi Oum El Bouaghi -57p Disponible
sur :<https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://dspace.univ-tebessa.dz:8080/jspui/bitstream/123456789/650/1/m%25C3%25A9m.final2021.pdf&ved=2ahUKEwiO9Kmp534AhWTM8AKHc7qBxoQFnoECAMQAQ&usg=AOvVaw1Oq5IHdi35qFCe88jCPVy5>(pages consulter le 19/05/2022).

Zoghbi A et Bougherara Z, 2021. Effet protecteur d'un extrait d'une plante médicinale (*Rosmarinus Officinalis*) sur l'hépatotoxicité du Chlorure de Nickel chez les rats Wistar (en ligne) Mémoire de Master.Pharmaco- Toxicologie . Tébessa : Université de Larbi Tebessi -p62.Disponible sur :<http://dspace.univ-tebessa.dz:8080/jspui/bitstream/123456789/650/1/m%C3%A9m.final2021.pdf> (pages consulter le 3/05/2022),.62(pages consulter le 19/05/2022).



Annexes



Annexes01

Le tableau ci dessous illustre tous les matériels non biologiques utilisés au cours de la réalisation de ce travail :

Tableau 4: matériels non biologiques utilisé

Verreries	Milieux de culture	Appareillage	Petit matériels	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"> -Eprouvette de 1000ml. -Pipettes gradué de 1ml et de 2ml et de 10ml -Flacons en verre. -tubes a essais. -Béchers gradués. - Boites de pétrie. -Pipettes Pasteurs. -Lames et lamelles. 	<ul style="list-style-type: none"> -Gélose nutritif (GN). -Milieux Muller-Hinton(MH). - Hecktoén . -Bouillon nutritif. -Chapman. -Bouillon Muller Hinton. 	<ul style="list-style-type: none"> -Balance électronique. -Chauffe ballon. -Appareil d'hydrodistilation de type « Clevenger ». -Réfrigérateur. -étuve de 37°C. - four pasteur. -spectrophotomètre. -Agitateur. -Bain marie. -Microscope optique. 	<ul style="list-style-type: none"> -mortier avec pilon. -tamis. -Seringue de5ml. - Micropipette. -Papier aluminium. -Ance de platine. -bec benzène. -disque de papier Whatman.n°1 de 6mm de diamètre. Autoclave. -Pince. - Plaque chauffante. -Ecouvillons stériles. -Fond noire. -Embouts. -Pied a coulisse. -Barreaux magnétique. -Spatule. - Portoir. -microplaquede96puits. -papier filtre . 	<ul style="list-style-type: none"> -Acétone. - eau distillée. -eau physiologique. -tween 80. -Les colorantes de Gram. -BaCl2. -H2SO4. -TCC. -ATBAmoxicilline .

Conservation des souches bactériennes étudiés



Repiquage des espèces bactériennes :

les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées et jeune qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

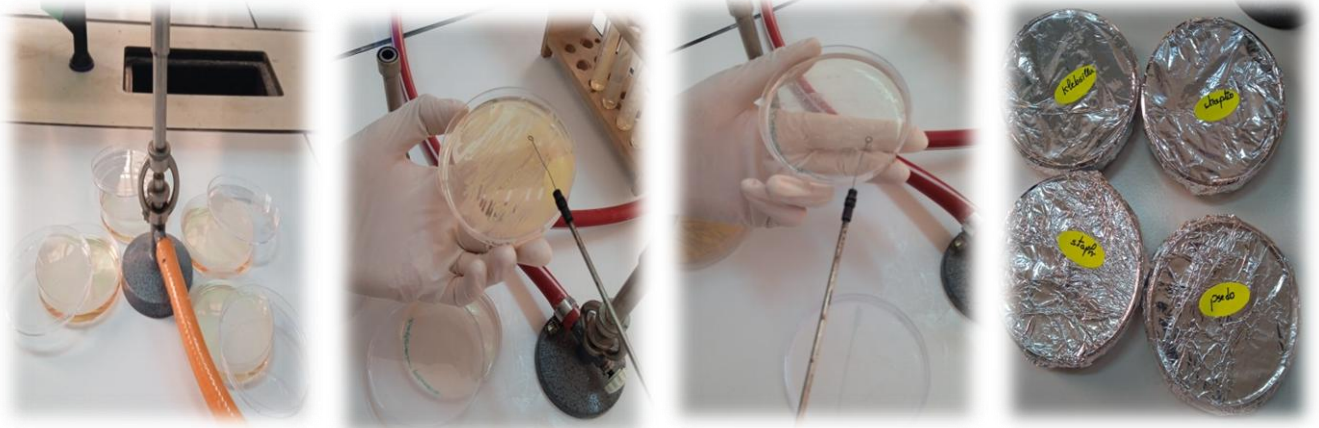


Figure :les différents étapes de repiquage des souches bactériennes testés

Coloration de Gram

I. Réalisation du frottis:

sur une lame, On dépose une goutte d'eau physiologique stérile. sur une lame puis on Ajoute à l'anse de platine stérilisée une goutte de la colonie isolée à partir culture jeune. Étaler sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame.

Le frottis réalisé doit être :

- Mince et homogène, étendu sur la lame sans toucher les bords
- Réalisé sur une lame propre et dégraisse, une goutte d'eau déposée en surface doit s'y étaler complètement.



Figure : Réalisation du frottis (photo personnelle,2022).

II. Fixation :

But : tuer les bactéries, fixer leur structure cytotologique, et les faire adhérer à la lame.

- Fixation par la chaleur :

- à utiliser seulement pour les frottis effectués à partir de **cultures bactériennes**
- passer la lame -frottis situé sur le dessus- dans la flamme chauffante, lentement et 3 à 4 fois de suite (attention de bien tenir la lame avec une pince) et laisser refroidir.



Figure : Fixation De structure cytotologique des souches bactériennes par la chaleur, et les faire adhérer à la lame (Photo personnel,2022).

III. Coloration :

❖ Principe :

Cette coloration est une coloration complexe qui permet de différencier les bactéries d'après leur forme et leur affinité pour les colorants.

La coloration permet de distinguer les bactéries Gram + des Gram – grâce à leurs Différences de nature de paroi. Les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus fine et riche en lipides, alors que les bactéries Gram positifs ont une paroi épaisse et pauvre en lipide.

Réalisation de la coloration :

Voici succinctement les différentes étapes de cette coloration :

1. Coloration par le violet de gentiane . Laisser agir 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée.

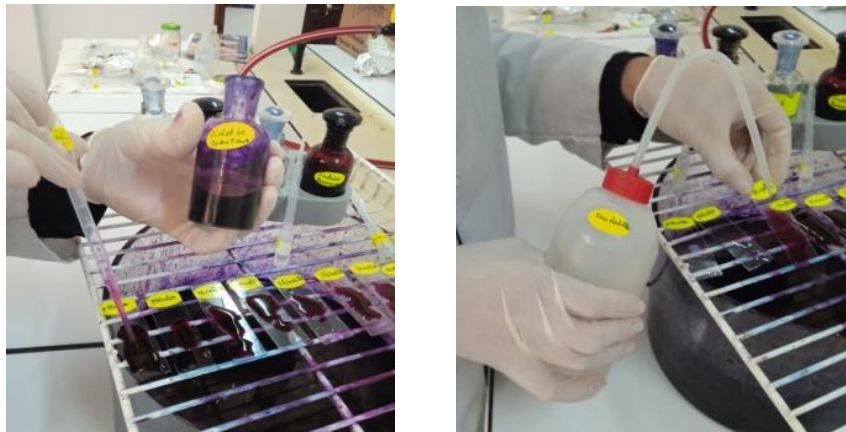


Figure : Coloration avec le violet de gentiane (photo personnelle,2022).

2. Mordançage au lugol étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.

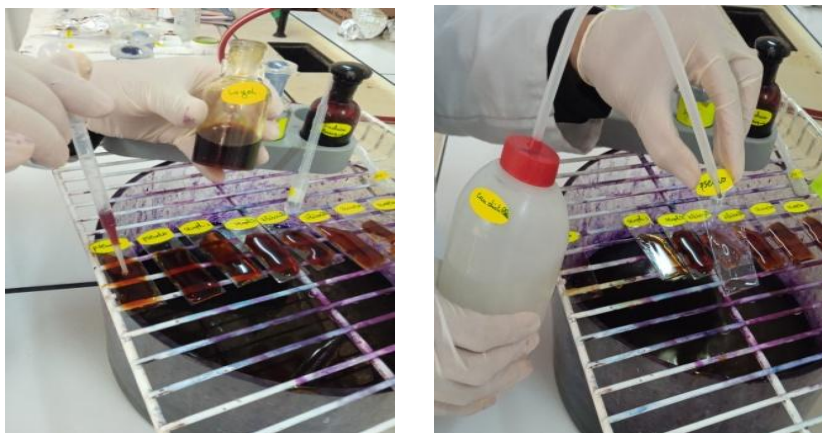


Figure : Coloration avec le lugol (photo personnelle.2022).

Annexes03

3. Décoloration rapide à l'alcool à 95° : verser goutte à goutte l'alcool sur la lame, et surveiller la décoloration 5 secondes. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée.

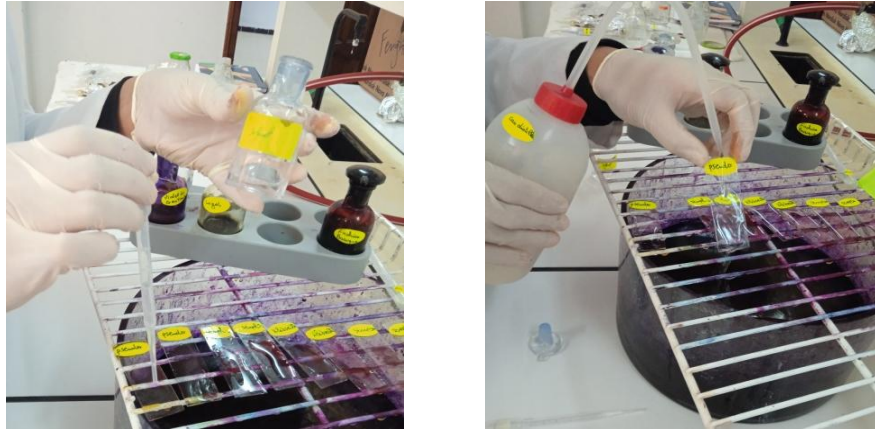


Figure : décoloration avec l'alcool à 95° (photo personnelle,2022).

- 4.Recoloration à la fuschine. Laisser agir de 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée.

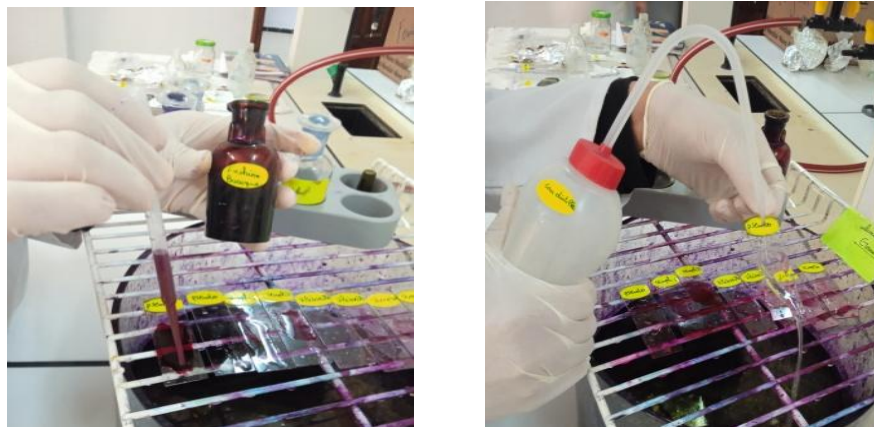


Figure : recoloration avec la fuschine (photo personnelle ,2022).

- 5.Egoutter entre 2 morceaux de papier-filtre et laisser sécher

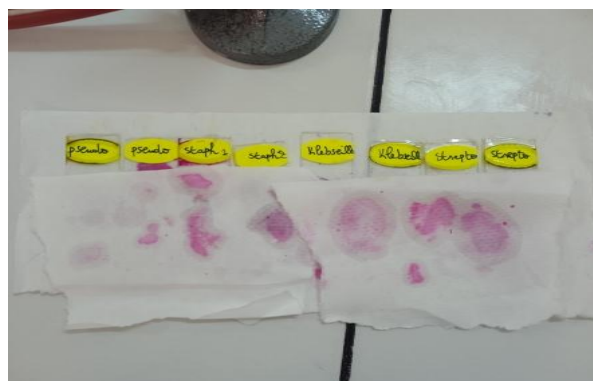


Figure : séchage des lames (photo personnelle ,2022).

Annexes03

IV .Mise au point

- Repérer les bactéries à l'objectif x40.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis
- Faire la mise au point en forte luminosité (condensateur levé et diaphragme ouvert) objectif x100.
- Se placer dans un endroit où la répartition des bactéries est homogène et la coloration nette
- Eliminer les lames dans le bocal déchets non infectieux.

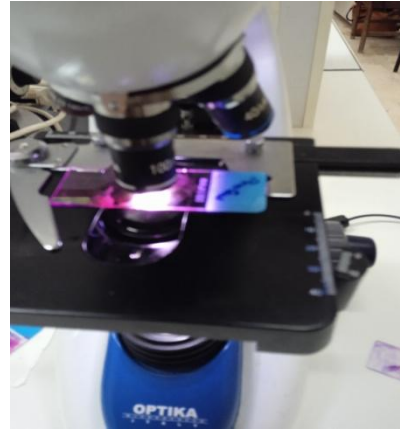
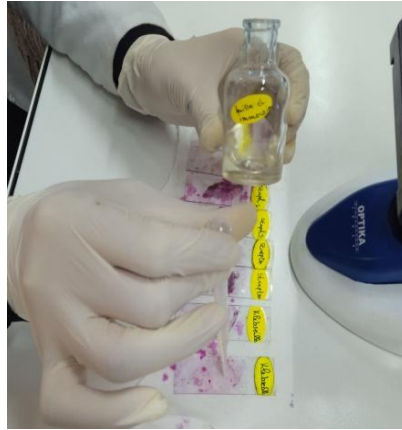


Figure : examination à l'immersion et l'observation microscopique(photo personnelle ,2022).

V. Observations

On peut noter la morphologie des bactéries et la coloration de celles-ci : les bactéries violettes sont dites Gram positives, celles qui sont roses sont dites Gram négatives. On peut également noter l'homogénéité de coloration de la bactérie.

Standard McFarland :

Les normes McFarland sont utilisées comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes pour que le nombre de bactéries se situe dans une gamme de concentrations donnée afin de normaliser les tests microbiens.

❖ Composition :

Standard	1% BaCl ₂ (ml)	1%H ₂ SO ₄ (ml)	Approximatif M Bactérien Suspension / ml
0.5	0.05	9.95	1.5 x 10 ⁸

Procédures :

1. Mélanger la solution de McFarland Standard sur un mélange vortex avant l'examen. Assurez-vous que McFarland Standard est aliquoté dans un tube c'est la même taille et le même diamètre que le tube utilisé pour préparer la suspension d'essai.
2. Préparez une suspension d'essai en obtenant une culture pure de l'organisme d'essai et inoculer un bouillon approprié.
3. En présence d'un bon éclairage, visuellement comparer la turbidité de la suspension d'essai avec celle de la norme McFarland en comparant la clarté des lignes sur le Wickerham carte.
4. Si la suspension d'essai est trop légère, inoculer avec des organismes supplémentaires ou incuber le tube jusqu'à ce que la turbidité corresponde à celle de la norme. Si une dilution est nécessaire, utiliser une pipette stérile et ajouter suffisamment de bouillon ou de solution saline pour obtenir une turbidité qui correspond à celle de la norme.



Figure : Préparation standard de McFarland(photo personnelle ,2022).

Annexe 05

Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* par la méthode d'Aromatogramme

Tableau : Diamètre des zones d'inhibitions de chaque concentration avec les souches testés pour l'HE de *Rosmarinus officinalis* pure.

		L'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i>			
Concentration d'huiles pure		5µl	10µl	20µl	
Les souches bactériennes	Les boites	Essai 1	Essai 2	Essai 3	
		D(mm)			
G+	<i>Staphylococcus aureus</i>	Boite01	15	25	34
		Boite02	18	22	28
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Boite01	18	20	28
		Boite02	15	21	25
G-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Boite01	07	10	20
		Boite02	06	10	15