

UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA -
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA
TERRE ET DE L'UNIVERS

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



MEMOIRE
MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Science de la Nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : biochimie appliquée

Présenté par:

Mme : FROUHATZoulikha.M^{elle} : LAHCINI Basma.

THEME

***Lutte biologique par l'huile
essentielle de
Rosmarinus officinalis.***

Soutenu publiquement

le : 30/06/2013

Devant le jury :

M ^{me} .OULD ELHADJ-KHELIL Aminata	Pr.	Président	U.K.M. Ouargla
Mr.LADJELSegni	Pr.	Encadreur	U.K.M. Ouargla
M ^{me} ALOUI Nabihha	E L	Co-encadreur	U.K.M. Ouargla
M ^{elle} HADJADJ Soumia	M A (B).	Examineur	U.K.M. Ouargla

Année universitaire : 2012/2013

Résumé : *Lutte biologique par l'huile essentielle de Rosmarinus officinalis*

Les huiles essentielles possèdent des activités antibactériennes importantes et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants .ce qui nous a conduits à effectuer l'étude de l'activité antibactériennes d'huile essentielle de la plante *Rosmarinus officinalis* et d'évaluer leurs propriétés physicochimiques.

D'après les résultats obtenus on remarque que le rendement en huile essentielle est de l'ordre de 0.76% est conforme aux standards international.

Les résultats des analysés physicochimiques de l'huile essentielle sont conformés aux normes (AFNOR) l'activité antimicrobienne a donné des résultats intéressantes inhibition de *l'Escherichia coli* par zone de diamètre 12mm, le *Staphylococcus aureus* par 9mm.

Mots clés : huile essentielle, activité antibactériennes, analyses physicochimiques, *Rosmarinus officinalis* .

المكافحة البيولوجية بالزيت الطيار لإكليل الجبل: ملخص

تملك الزيوت الأساسية لنبتة فعالية ضد بكتيرية مهمة و تستطيع ان تعوض بنجاح المضادات الحيوية التي أثبتت عدم نجا عنها ضد البكتيريا المقاومة الشيء الذي حثنا على دراسة الفعالية ضد بكتيرية لنبتة إكليل الجبل و دراسة الخصوصيات الفيزيوكيميائية للزيت المستخلص.

حسب النتائج المتحصل عليها نذكر ما يلي

المردود المتحصل عليه من خلال استخلاص الزيوت للأوراق و السيقان يقدر ب0.76% و يعتبر هذا الأخير جد مقبول حسب المعايير المعمول بها .

التحاليل الفيزيوكيميائية المجرات على الزيوت الطيارة أعطت نتائج مطابقة للمعايير الدولية AFNOR

الفاعلية ضد البكتيريا أعطت نتائج جد مفيدة بحيث يملك زيت إكليل الجبل فعالية ضد E. Coli بقطر 12mm و ضد S. aureus بقطر

9mm

الكلمات المفتاحية: الزيوت الأساسية, الفعالية ضد الميكروبية. التحاليل الفيزيوكيميائية, إكليل الجبل .

Abstract: Biological control by essential oil of *Romarinus*

Essential oils have important antimicrobial activities and can replace with success antibiotics which show their inefficiency against resistant microorganisms. In this study we have tested the antimicrobial activities of *Romarinus* and study the propriety physicochemical of essential oil extract.

After result obtain we find that the revenue of essential oil is 0.76 % this value acceptable to norm.

The result of analyses physicochemical of essential oil adapt to norm (AFNOR).

Activity antimicrobial is important contras *E.coli* by 12mm and contras *S.aureus* by 9mm.

Key Words:, essential oil, antimicrobial activit, analyses physicochemical, *Romarinus*.



Remerciements

*Avant tout nous remercions Dieu « ALLAH » le tout puissant
de nous avoir accordé la force,*

le courage et la patience pour terminer ce travail

*nous remercions notre encadreur de son grand aide durant
la réalisation de notre travail, il est orienté nous vers le
succès avec ses connaissances et partageants des idées et
aussi l'encouragement tout on long de notre épreuve,
comme il a été présent à tout moment qu'on à besoin de lui*

: M. Segni Ladjel.

Et Mm Nabihia Aloui(Co- encadreur)

*Nous remercions les membres de jury, chacun a son nom,
d'accepter de juger notre travail.*

*Une partie de notre travail est réalisé à laboratoire de génie
des procédés de l'université KASDI MERBAH Ouargla,
nous remercions tous les membres de l'équipe de ces
laboratoires pour leur accueil, leur sympathie ainsi que
leurs idées constructives*

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

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*À ma source De tendresse, l'être la plus chère dans le monde, la
femme*

La plus patiente

Ma chère mère

À mon père Ahmed

À mon amie Belkhyte et mon fille Rymasse

À mes chères sœurs

Atzohra et Hawaria

*À mes frères et le mère et les sœurs et les frères de mon amie mes
cousins et tous Mes amis*

Avec tous l'amour



ZOULEIKHA

DEDICACE

je dédie ce modeste travail :

*Aux deux être le plus chers au monde, qui
ont souffert nuit et jour pour nous couvrir de
leur amour, mes parents.*

*A mon père pour son patient avec moi et son
encouragement ;*

*A ma source de bonheur, la prunelle de mes
yeux, ma mère ;*

*Que le bon ALLAH vous garde en bonne
santé ;*

Je dédie aussi ce modeste travail :

A mes très chers frères et mes sœurs ;

Ainsi que pour toutes mes amies.

BASMA

LISTE DES FIGURES

N	TITRE	PAGE
1	Aspects morphologiques du romarin	3
2	Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle.	10
3	La morphologie de bactérie	16
4	Structure de la paroi bactérienne Gram+	19
5	Structure de la paroi bactérienne Gram-	20
6	Illustration de la méthode d'aromatogramme	22
7	Les étapes d'extraction d'huiles essentielles	25
8	Méthodologie de travail	26
9	Aromatogramme	32
10	Zone d'inhibition (mm) de l'huile essentielle.	35
11	Histogramme présent les zones d'inhibition pour <i>E. coli</i>	36
12	Histogramme présent les zones d'inhibition pour <i>Staphylococcus aureus</i>	37
13	Histogramme présent les zones d'inhibition pour <i>Streptococcus aureus</i>	38

LISTE DES PHOTOS

N	TITRE	PAGE
1	Montage d'hydrodistillation employé pour extraction de l'huile essentielle.	24
3	Huile essentiel de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	27
4	Photo d'un réfractomètre	27
5	Photo d'un densimètre	28
6	Photo d'un ph mètre	28
7	Dispositif de titrage pour définir l'indice	29
8	L'écoulement du milieu de culture	30
9	Préparation de l'inoculum	30
10	Ensemencement bactérien	30
11	Préparation des dilutions	31
12	Préparation des disques	39
13	Dilution de l'extrait pour <i>E.coli</i>	39
14	Dilution de l'extrait pour <i>Staphylococcus aureus</i>	39
15	Dilution de l'extrait pour <i>Streptococcus aureus</i>	40
16	Hydrolat pour <i>Streptococcus aureus</i>	40
17	Dilution 10^{-2} pour <i>Streptococcus aureus</i>	40
18	Dilution 10^{-3} pour <i>Streptococcus aureus</i>	40
19	Dilution 10^{-4} et 10^{-5} pour <i>Streptococcus aureus</i>	40
20	Dilution 10^{-1} pour <i>E.coli</i>	40
21	Hydrolat pour <i>E.coli</i>	41
22	Dilution 10^{-2} pour <i>E.coli</i>	41
23	Dilution 10^{-3} pour <i>E.coli</i>	41
24	Dilution 10^{-4} et 10^{-5} pour <i>E.coli</i>	41
25	Ethanol sur <i>Streptococcus aureus</i>	41
26	Ethanol sur <i>E.coli</i>	41
27	Ethanol sur <i>Staphylococcus aureus</i> .	41

Liste des tableaux

N	TITRE	PAGE
1	Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	33
2	Le rendement d'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i>	33
3	Tableau récapitulatif les caractéristiques d'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	34
4	Diamètres (mm) des zones d'inhibition des huiles essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> . (l'extrait brut)	35
5	Diamètres (mm) des zones d'inhibition des huiles essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .(les différentes dilutions).	36
6	Diamètres (mm) des zones d'inhibition de la dilution de <i>Streptococcus aureus</i>	37
7	Zone d'inhibition de l'hydrolat et éthanol sur les souches testées	38

Sommaire

<i>Introduction générale</i>	02
------------------------------------	----

Première partie : Etude bibliographe

Chapitre I : Présentation De l'espèce étudiée

I- <i>Rosmarinus officinalis</i>	03
I-1-Définition.....	03
I-2-Caractéristique botanique.....	03
I-3-Habitat.....	04
I-4-Utilisation.....	04
I-5-Propriétés du <i>Rosmarin</i>	04
I-6-Composition biochimique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	07

Chapitre II : Généralité sur l'huile essentielle

II-1-Définition	08
II-2-Classification	08
II-3- Répartition et localisation.....	08
II-3-1- Répartition	08
II-3-2- Localisation.....	09
II-4-Méthode d'extraction	09
II-4-1- Hydro distillation	11
II-5-Caractéristiques des huiles essentielles.....	11
II-6-Caractéristiques physico-chimiques d'huile essentielles.....	10
II-7-Composition des huiles essentielles.....	12
II-7-1-Composition chimique.....	12

Chapitre III : Lutte biologique

III-1-Définition	14
III-2-Généralité sur le monde microbien.....	14
III-3-Rôle des microorganismes dans les maladies.....	14
III-4-Infection.....	14

Sommaire

III-5-Morphologie et structure fine des bactéries	15
III-6-Bactériologie médicale	16
III-7-Bactéries Gram négatif	16
III-7-1-Genre <i>pseudomonas</i>	17
III-7-2- <i>Acinetobacter</i>	17
III-7-3- <i>Salmonella</i>	17
III-7-4-Genre <i>E.coli</i>	18
III-8-Bactéries à Gram positif.....	18
III-8-1- <i>Staphylococcus aureus</i>	18
III-8-2-Streptococcus.....	18
III-9- Résistance des bactéries Gram- à certaines huiles essentielles.....	19
III-10-Activité biologique d'huiles essentielles.....	20
III-11- Mécanismes d'action des huiles essentielles sur les bactéries.....	21
III-12--Principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	21
III-12-1- Aromatogramme.....	21
III-12-2-Détermination de concentration minimale inhibitrice CMI.....	22

Deuxième partie : Etude Expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

I-1 Matériel végétal	23
I-2 Les germes testés.....	23
I-3-Méthodes.....	23
I-3- 2-Extraction d'huile essentielle.....	23
I-3-3- Extraction par hydro distillation.....	23
I-4-Plan d'extraction.....	25
I-5- Plan expérimentale	26
I-6- Détermination du rendement d'extraction.....	27
I-7- Analyses physico-chimiques de l'huile essentielle.....	27
I-8-Activité antimicrobienne.....	28
I-8-1-Préparation du milieu de culture.....	28

Sommaire

I-8-1-1-Principe et méthode de préparation.....	28
I-8-1-2-Méthode.....	28
I-9-Ecoulement	29
I-10-Préparation de l'inoculum	29
I-11-Ensemencement.....	30
I-12-Préparation des dilutions d'huile essentielle.....	30
I-13-Incubation	31
I-14-Expression des résultats.....	31
I-15-Lecture des résultats.....	31
 <i>Chapitre II : Résultats et Discussion</i>	
II-1-Caractéristiques organoleptiques	33
II-2-Analyses de l'huile essentielle.....	33
II-3-Activité antimicrobienne.....	34
 <i>Conclusion</i>	 42
<i>Référence bibliographiques</i>	43
<i>Annexe</i>	46

Introduction

Introduction générale

Introduction

Depuis longtemps l'homme reconnaît et utilise les plantes pour se nourrir et pour traiter diverses maladies.

Les vertus thérapeutiques des plantes ont été expérimentées depuis lors et leurs précieuses caractéristiques se sont transmises oralement de génération en génération ou consignés dans les vieux écrits. Les remèdes de bonne réputation ont prévalu malgré le développement de la médecine moderne qui est venue marginaliser le recours aux techniques médicales naturelles (GOEB, 1999).

Selon HOSTETTMANN(1997), connaître une plante ayant des vertus médicinales suppose pouvoir décrire sa morphologie et son anatomie, connaître son origine et son mode d'action, apprécier l'incidence de ceux-ci sur sa qualité, analyser sa composition chimique et les facteurs qui peuvent la faire varier, connaître la structure et les propriétés des principes actifs aussi bien que leur activité pharmacologique, savoir apprécier la qualité par des éléments objectifs et mettre en œuvre des méthodes pour la contrôler et enfin d'appréhender tous les problèmes liés à l'utilisation des plantes et des produits qui sont issus: indication, contre-indication, effets secondaires, interactions médicamenteuses.

Rosmarinus officinalis est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. Les extraits des huiles essentielles de cette plante sont largement utilisés, dans la médecine traditionnelle, depuis des siècles contre une multitude de maux. Aujourd'hui, le *Romarin* est entré dans la médecine moderne (HOSTETTMANN, 1997)

L'objectif de notre travail est d'étudier les propriétés physico-chimiques et l'activité biologique de l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation de la partie aérienne de plante *Rosmarinus officinalis* pour d'éventuelles utilisations en lutte biologique.

Le plan de rédaction de ce mémoire est présenté comme suite :

- ✚ Une introduction générale.
- ✚ Le premier chapitre est réservé à la présentation de l'espèce étudiée (*Romarin*).
- ✚ Le deuxième chapitre est consacré aux généralités sur les huiles essentielles.
- ✚ Le troisième chapitre traite la lutte biologique.
- ✚ Le quatrième chapitre est préservé aux caractéristiques physico-chimiques et activité biologique.
- ✚ En fin une conclusion générale qui résume les résultats de notre travail.

Etude bibliographique

Chapitre I:

***Présentation d'espèce
étudiée.***

Présentation de l'espèce étudiée

I-Rosmarinus officinalis

I-1-Définition

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

I-2-Caractéristique botanique

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



Règne : plantes

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Lamiales (labiales)

Famille : Lamiaceae

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *Rosmarinus officinalis* L. (QUEZEL et

SANTA, 1963).

Fig.1 : Aspects morphologiques du *Rosmarin* (QUEZEL et SANTA, 1963).

I-3-Habitat

Originnaire des régions méditerranéennes, le *Romarin* pousse spontanément dans le Sud de l'Europe. On le cultive dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps. Il apprécie les climats chauds, modérément secs, les branches récoltées pendant l'été sont séchées à l'air et à l'ombre (HEINRICH et al. 2006).

I-4-Utilisation

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

Il est considéré utile pour contrôler l'érosion du sol (HEINRICH et al., 2006).

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

I-5-Propriétés du *Romarin*.

✓ Activité antibactérienne

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

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

✓ **Activité antifongique**

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

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

✓ **Activité antivirale**

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

✓ **Activité ovicide**

L'huile essentielle du *Romarin* s'est avérée un agent ovicide contre trois espèces de moustique (*Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*) (GILLJ et al., 2007), de même GILLIJ et al. ont trouvé que cette huile présente une activité répulsive contre les moustiques (*Aedes aegypti*) (PRAJAPATI et al., 2005).

✓ **Activité anti-oxydante**

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

En raison de ses propriétés anti-oxydantes, le *Romarin* est largement accepté en tant qu'épice dont l'activité anti-oxydante la plus élevée (WANG et al., 2008).

Plusieurs auteurs ont étudié l'utilisation des extraits du *Romarin* comme antioxydant pour conserver les produits à base de viande (NASSU et al.,2003; BALENTINE et al.,2006; FERNANDEZ-LOPEZ et al.,2005;SEBROTYNEK et al.,2005) .

✓ Effet anti-cancérogène

Grace à certains composants (Carnosol, Rosmaridiphénol, Rosmanol et l'acide rosmarinique), le *Romarin* est considéré comme une thérapie contre le cancer (ATIK BEKKARA et al.,2007).

✓ Effet anti-acétylcholinestérase

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

✓ Effet hypoglycémiant

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

✓ Effet anti-hépatotoxique

De nombreuses études ont été réalisées pour étudier l'effet anti hépatotoxique du *Romarin*, le travail a été concentré pour l'évaluation de l'efficacité de l'extrait méthanolique du *Romarin* pour normaliser certains paramètres histologiques et biochimiques du foie, après l'ingestion d'une hépatotoxine le tétrachlorure de carbone (CCl₄). Les résultats ont indiqué que cet extrait a empêché la peroxydation lipidique, (l'information, la nécrose, normalisé les taux de la bilirubine, la glycogène et l'activité de l'alanine aminotransférase) et enfin il a augmenté l'activité du glutathion-S-transférase (GST) (MARIE et al., 2004).

I-6-Composition biochimique du *Romarin*

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

Chapitre II:

Généralité sur l'huile essentielle

II-Généralité sur les huiles essentielles

II-1-Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverse partie des végétaux. Elles sont concentrées, volatiles, non huileuses et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur.

Actuellement, leurs utilisations en parfumerie et en alimentation est considérables c'est pour cette raison que l'organisme de normalisation AFNOR NF et ISO ont donné une définition plus précise des huiles essentielles ; ces dernières sont des produits obtenus à partir d'une hydro distillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (BELHADI, 2010).

II-2-Classification

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

- Les huiles majeures
- Les huiles médiums
- Les huiles terrains (CHAKOU et BASSOU, 2007).

II-3- Répartition et localisation

On rencontre les huiles essentielles dans divers familles botaniques elles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et forment dans le cytoplasme de cellules spécialisées (DEGRYSE et al ., 2008).

II-3-1- Répartition

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal et surtout chez les végétaux supérieurs, il y a 17500 espèces aromatiques.

Les familles botaniques capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont réparties dans un nombre limité des familles, Exemple : *Myrtaceae* (Girofle), *Lauraceae* (laurier), *Rutaceae* (citron), *Lamiaceae* (Menthe), *Apiaceae* (Coriandre), *Zingiberaceae* (Gingembre)..... etc. (BELLAKHDAR, J1997).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes de la plante, par exemples : dans les sommités fleuries (*Menthe, Lavande*) les feuilles (*Eucalyptus, Laurier*) les rhizomes (*Gingembre*) les fruits (*agrumes, badiane, anis*), les racines (*Vétiver*), les graines (*Muscades*), bien que cela soit moins habituel dans des écorces (*Cannelier*) (**BELLAKHDAR, J1997**).

II-3-2- Localisation

Elles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante. Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules ou s'assemblent sous formes de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles (**GONZALEZ-TRUJANO et al ., 2007**).

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence des structures histologique spécialisés, souvent localisée sur ou à proximité de la surface de la plante qui sont : cellules à huiles essentielles de *Lauraceae*, les poils sécréteurs des *laminaceae*, poches sécrétrices des *Myrtaceae*, des *Rutaceae*, et les *Laminaceae*, et les canaux sécréteurs qui existent dans des nombreuses familles. Il est intéressant de remarquer que les organes d'une même espèce peuvent renfermer des huiles essentielles de composition différente selon la localisation dans la plante (**DEGRYSE et al ., 2008**).

II-4-Méthodes d'extraction

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction de essences végétales.

En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ...), de la nature des composés (par exemple, les l'huile essentielles, huiles lourdes....). Le rendement en huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées ; Les principales méthodes d'extraction sont :

1. Distillation à vapeur saturée
2. Entraînement à la vapeur d'eau
3. Hydro diffusion
4. Expression à froid
5. Extraction par solvants
6. Hydro distillation
7. Extraction par les corps gras
8. Extraction par micro- ondes

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origine végétale restent identiques quelque soit le type d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation comme cela est explicité dans la figure 2 (MARIE ELISABETH et LUCCHESI, 2005).

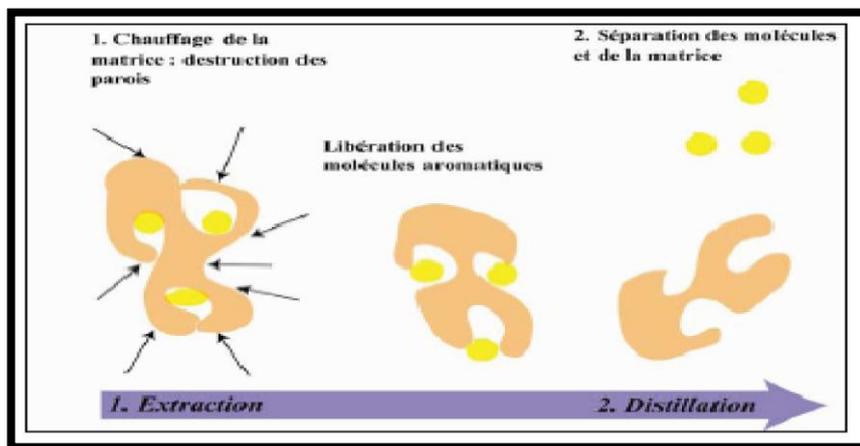


Fig. 2 : Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle (MARIE ELISABETH et LUCCHESI, 2005).

2-4-1- Hydro distillation

L'hydro distillation proprement dite est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité (MARIE ELISABETH et LUCCHESI, 2005).

Le principe de l'hydro distillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique (B. MEYER-WARNOD, 1984).

La température d'ébullition du mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation. Elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange (eau + huile essentielle) distille à une température inférieure à 100°C à pression atmosphérique (Normes AFNOR, 1992). Par contre, les températures d'ébullition des composés aromatiques sont la plupart très élevés (MARIE ELISABETH LUCCHESI, 2005) et (LUICITA.LAGUMEZ RIVERA, 2006).

La durée d'une hydro distillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures (**L.RAUL. H. OCHOA, 2005**). Selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait (**LUICITA. LAGUMEZ RIVER, 2006**).

Les principales raisons de cette préférence sont liées à la facilité de mise en oeuvre du procédé, son sélectivité et donc la qualité des produits obtenus.

Cependant l'hydro distillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre une détérioration de certains végétaux et la dégradation de certaines molécules aromatiques.

C'est ainsi que pour certains végétaux fragiles, comme par exemple les pétales de fleurs, une technique d'extraction plus appropriée est utilisée. Il s'agit de la (distillation dite sèche). Cette technique ancestrale, utilisée autrefois par les alchimistes arabes (**MARIE ELISABETH LUCCHESI, FARID CHEMAT, et al., 2004**).

II-5-Caractéristiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles aident à traiter les petites indispositions de la vie de tous les jours. Outre leur action curative, elles opèrent de manière préventive en stimulant le système immunitaire afin que votre organisme lutte plus efficacement contre les infections bactériennes et virales.

Parmi les propriétés les plus connues, on citera la propriété antiseptique. A l'heure où les germes microbiens deviennent de plus en plus résistants, ce qui implique pour l'industrie pharmaceutique de trouver des antibiotiques de plus en plus puissants (mais aussi de plus en plus destructeurs de la flore saprophyte responsable de notre immunité), les huiles essentielles offrent une véritable alternative (**JEAN BOTTON A, 1999**).

Leur efficacité se révèle en effet stable dans le temps et la preuve est faite tous les jours de leur grande efficacité, là où certains antibiotiques échouent désormais. (**ZABEIROU ; HACHIMOU, 2005**).

II-6-Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène (**BRUNETON, 1993**), Les principales caractéristiques sont :

- Liquides à température ambiante.
- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- Volatiles et très rarement colorées.
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec 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
- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau.
- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques
- 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 (ZABEIROU et HACHIMOU, 2005).

II-7-La composition des huiles essentielles

II-7-1-Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes :

✚ le groupe de terpénoïdes .

✚ le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

D'après (GUENTER, 1975). La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés.

Selon (BRUNETON, 1999). Cette structure varie en fonction :

Du nombre d'atomes de carbone qui les constitue :

✚ Les monoterpènes.

✚ Les sesquiterpènes.

✚ Rarement les diterpènes.

✚ Du caractère saturé ou insaturé des liaisons.

✚ De leur agencement : linéaire ou cyclique.

✚ De la configuration spatiale (forme de chaise, de bateau, de trièdre...).

+ De la nature des groupes fonctionnels à savoir :

+ Terpènes : $R_1-HC=CH-R_2$.

+ Alcools terpéniques : $R-OH$.

Cétones: R_1-CO-R_2 .

+ Phénols : C_6H_6-OH .

+ Aldéhydes : $R-CHO$.

+ Esters : $R_1-COO-R_2$.

+ Ethers : R_1-O-R_2

Chapitre III:

Lutte biologique

III-Lutte biologique

III-1-Définition

Ces dernières décennies, la protection de l'environnement s'impose de plus en plus comme une préoccupation mondiale majeure. La méthode classique de lutte biologique par utilisation de micro-organisme, de prédateurs, de parasitoïdes et de substances naturelles d'origine végétale, les industries agrochimiques orientent de plus en plus leur effort vers l'étude de produits naturels pour la recherche de nouveaux insecticides (**SARNI-MANCHDO et CHEYNIER, 2006**).

III-2-Généralité sur le monde microbien

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

III-3-Rôle des microorganismes dans les maladies

Ces organismes engendrent des maladies chez les êtres humains, les animaux et les végétaux en attaquant les cellules vivantes et en les divisant et en produisant des substances toxiques appelées toxines. Les organismes responsables peuvent mourir, mais la toxine peut rester et engendrer la maladie (**P.BERCHE et al., 2002**).

Citons par exemple le *Staphylocoque*, la *Salmonelle* et le *Clostridium*, qui empoisonnent la nourriture, le *Salmonella typhi* (provoque la fièvre typhoïde), le *Clostridium letani* (provoque le tétanos), et le *Corynebacterium diphtheriae* (provoque la diphtérie) (**ESCOTT, HARLEIN, KLEIN, 2006**).

III-4-Infection

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

- 1- ingestion d'eau ou d'aliments contaminées (voies digestives).
- 2- inhalations d'aérosols ou des particules associées à des bactéries (voies respiratoires).
- 3- inoculation cutanée par contact direct ou indirect (voies cutanées).
- 4- inoculation muqueuse directe par la salive ou la sécrétion sexuelle

5- inoculation transcutanées par les insectes (*Yersinia pestis*, *Rickettsia*, *Borrelia* ...).par traumatismes ou manipulation iatrogènes (**ESCOTT, HARLEIN, KLEIN ,2006**).

Les événements communs à toutes les maladies infectieuses :

- ✓ La rencontre de l'agent infectieux et de l'hôte.
- ✓ La pénétration de l'agent infectieux à l'intérieur de l'hôte.
- ✓ La diffusion de l'agent infectieux a partir de site d'entrée.
- ✓ La multiplication de l'agent infectieux à l'intérieur de l'hôte
- ✓ Les dommages causés aux niveaux des tissus, par l'agent infectieux, par l'hôte, ou bien par les deux (**SCHAECHTER et al ., 1999**).

III-5-Morphologie et structure fine des bactéries

On peut distinguer trois formes caractéristiques : les sphériques, les allongées et les spiralées. La position des bactéries les unes par rapport aux autres est également une caractéristique distinctive importante.

Les diplocoques sont disposés en paires. Les staphylocoques forment des groupes (du grec *staphulê* = grain de raisin), alors que les streptocoques forment des chaînes (du grec *streptos* = chaîne). (**ESCOTT, HARLEIN, KLEIN ,2006**).

Les bactéries allongées (bacilles) peuvent varier en longueur et en épaisseur.

Elles forment également des chaînes. Les bactéries spiralées (spirilles) peuvent également varier en longueur et en épaisseur, et en nombre de spires (Figure .9).

La taille des coques varie entre 0,4 et 1,5 μm (1 μm = 0,001 mm). La longueur des bacilles peut varier entre 1 et 10 μm , même si quelques espèces sont plus grandes ou plus petites, et La structure cellulaire des bactéries Comme toutes les autres cellules, (figure 9) contient un semi-liquide, une substance riche en protéines appelée cytoplasme. Le cytoplasme contient les ribosomes, où a lieu la synthèse des protéines, et les enzymes qui participent au métabolisme de la cellule. La matière de réserve, telle que les graisses et le glycogène, se trouve également dans le cytoplasme.

L'ensemble sert de "squelette" à la bactérie et lui donne sa forme définitive. Cette paroi cellulaire est également entourée à l'extérieur d'une couche visqueuse plus ou moins développée. Lorsqu'elle est très épaisse, on parle alors de "capsule". (**ESCOTT, HARLEIN, KLEIN ,2006**).

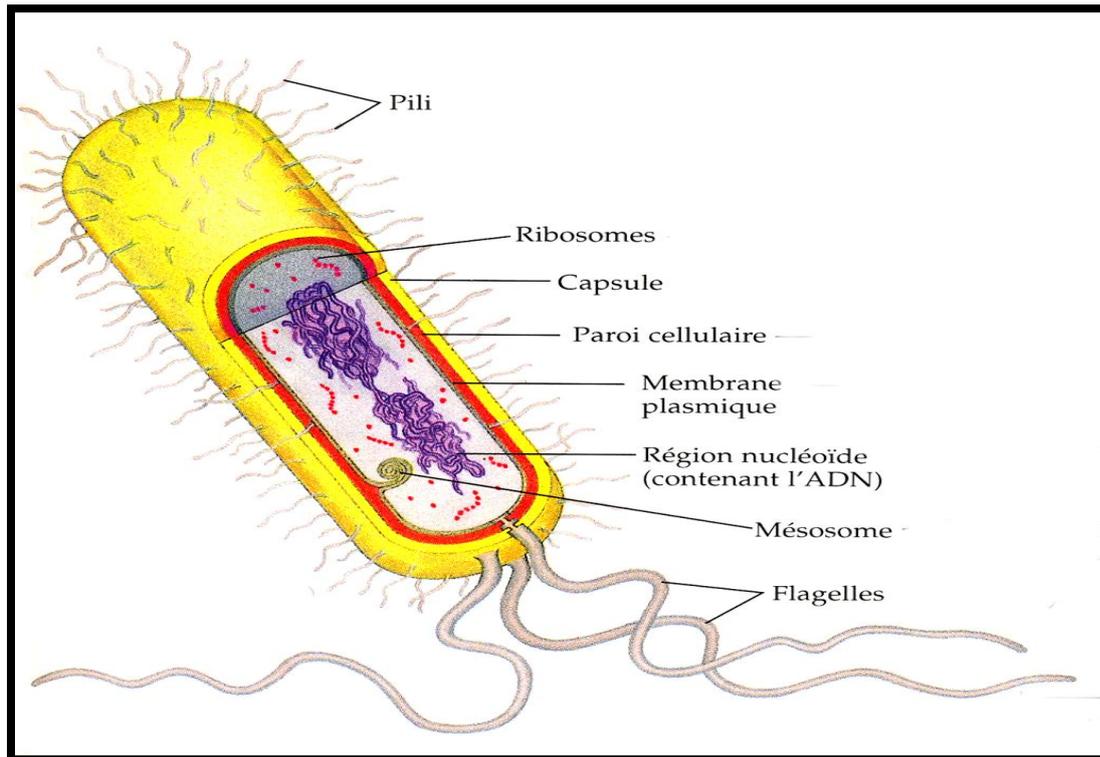


Fig. 3 : la morphologie de bactérie (LES BEAUJARDINS.COM)

III-6-Bactériologie médicale

Ce nous savons du rôle se la flore normale dans le domaine de la santé et de la pathologie provient surtout de travaux dont on ne peut tirer que des arguments indirects :études avec des animaux stériles, observation de patients sous antibiotique, etc. on pense que, du point de vue immunologique et microbiologique, la flore normale contribuerait à préservé notre santé, surtout en éloignant les germes qui pourraient nous infecter ,et peut – être aussi en entretenant un niveau de stimulation immunologique permanent dans l’organisme (ESCOTT ,HARLEIN,KLEIN, 2006).

III-7-Bactéries Gram négatif

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

III-7-1-Genre *Pseudomonas*

Bacilles à Gram négatif, mobiles par une ciliature polaire, rarement immobiles, non sporulés. Bactéries chimio-organotrophes avec un métabolisme strictement respiratoire avec comme accepteur terminal d'électrons l'oxygène en aérobiose et pour certaines espèces le nitrate en anaérobiose avec synthèse d'une nitrate-réductase (respiration des nitrates). Oxydatifs ou inactifs dans l'épreuve de Hugh et Leifson.

Presque toujours oxydase (+) c'est-à-dire possédant pour la plupart une chaîne cytochromique complète comprenant le cytochrome C et un cytochrome C oxydase. (**FAUCHERE et AVRIL, 2002**) et (**JUDD et al ., 2002**)

III-7-2-*Actinobacter*

Il s'agit de coccobacilles, courts, souvent en diplocobacilles, immobiles, à Gram négatif. Ce sont des aérobies stricts, souvent encapsulés, ne réduisant pas les nitrates, catalase (+), oxydase (-). Prototrophes, ils peuvent croître sur un milieu minéral avec une source de carbone simple. GC 39 à 47 moles %.(**JEAN-PIERRE, 2006**).

Bactérie ubiquitaire, *Actinobacter* se trouve principalement dans le sol et l'eau (douée, marine), les eaux d'égouts, isolée parfois dans le lait et les produits laitiers, dans les aliments. Elle est très fréquemment isolée chez l'homme : peau, salive, urine, conjonctive. Elle figure parmi les bactéries de la flore résidente normale du revêtement cutané. (**ESCOTT, HARLEIN, KLEIN ,2006**).

III-7-3-*Salmonella*

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

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

III-7-4-l'espèce *E. coli*

E. coli est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux.

Dans l'intestin, *E. coli* est l'espèce aérobie quantitativement la plus importante, présente à raison de 10⁹ corps bactériens par gramme de selles. Cette population bactérienne ne représente qu'environ 1 % de celle des anaérobies (voir encadré sur la flore du tube digestif). (NAUCILIEL C et VILDE J.L ,2005).

La recherche d'*E. Coli* dans l'eau d'alimentation (colimétrie) est fait pour apprécier sa potabilité. La présence d'*E. Coli* dans l'eau est le témoin d'une contamination fécale récente et la rend impropre à la consommation (JEAN-PIERRE, 2006).

III-8-Bactéries à Gram positif

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

III-8-1-*Staphylococcus aureus*

Cocci à Gram positif, appartient à famille des micrococaceae ,ubiquitaire qui retrouve dans le sol, l'air et l'eau, c'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme, on le trouve à l'état normal dans l'oropharynx ,les fosses nasales, dans les selles et au niveau du périnée ou des aisselles (BASSOU et CHAKOU,2006).*S.aureus* résistante à plusieurs antibiotiques difficiles à traiter aux médicaments (DOUH,KHALIFA,2006).

les *staphylococcus aureus* produisent des toxines comme hémolysine (DOUH, 2006).et les entérotoxines qui provoquent habituellement de vomissement et souvent la diarrhée peu de temps après l'ingestion de nourriture contaminée (LAVERGNE et BURDIN, 1973).

III-8-2-*Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* rassemble des espèces bactériennes qui ont en commun un certain nombre de caractères.

Ce sont des cocci à Gram positif, sphériques ou ovoïdes, disposés en paire pour former des diplocoques et pouvant se présenter sous forme de chaînettes parfois longues, ils ne sporulent

pas. Ils ne possèdent ni catalase (à la différence des staphylocoques), ni oxydase (à la différence des *Neisseria*).

- Ils peuvent se développer en aérobiose, ont un métabolisme fermentatif et sont à considérer comme des anaérobies tolérant l'oxygène.

Des bactéries anaérobies strictes ont la même morphologie et appartiennent au genre *Peptostreptococcus*. (ESCOTT, HARLEIN, KLEIN, 2006).

III-9- Résistance des bactéries Gram- à certaines huiles essentielles

Chez les bactéries à Gram+, le peptidoglycane est très épais et associé à des protéines pariétales exposées et à des structures polyosidiques (acides lipoteichoïques, acides teichoïques...). Par contre chez les bactéries à Gram-, le peptidoglycane est très fin et associé à une enveloppe externe complexe définissant un espace périplasmique. Cette membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe constituée de phospholipides, de protéines (porines...) et lipopolysaccharides (LPS). L'espace périplasmique est rempli d'enzymes qui dégradent les substances complexes pour qu'ils puissent traverser la membrane cytoplasmique, et inactivent les produits chimiques toxiques (antibiotiques, métaux lourds...) (FOUZIA DJENADI, 2011).

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

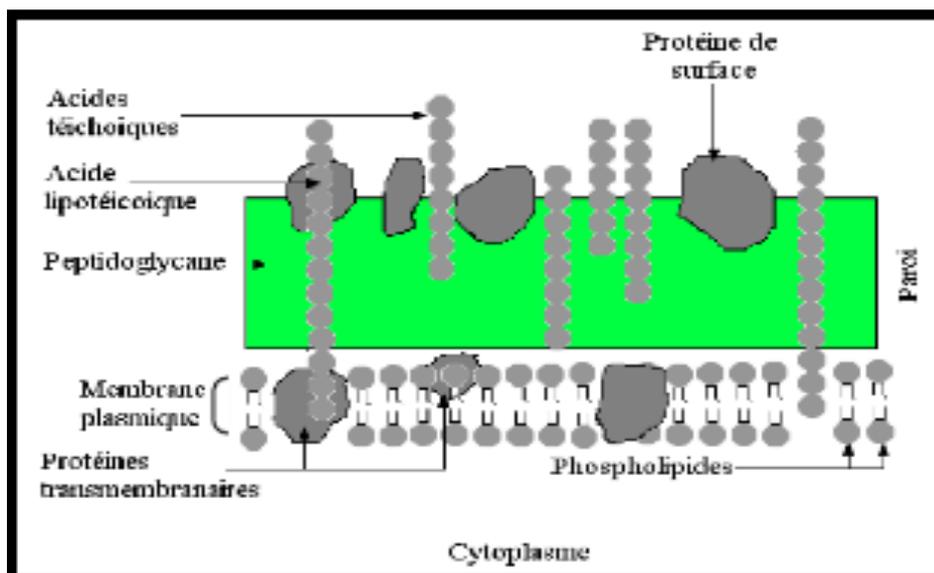


Fig. 4: Structure de la paroi bactérienne Gram+ (d'après LAVIGNE, 2007).

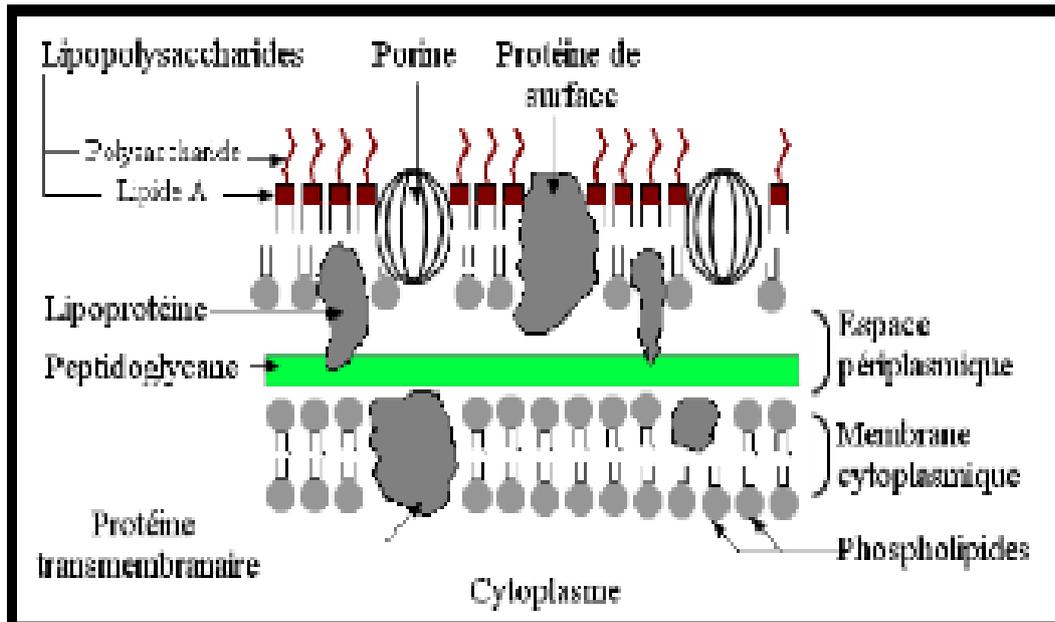


Fig. 5: Structure de la paroi bactérienne Gram- (d'après LAVIGNE, 2007).

III-10-L'activité biologique d'huiles essentielles

Les H.E. possèdent de nombreuses activités biologiques. Selon les travaux (**E. VAGI, B. SIMANDI, A. 2005**), ces activités sont liées essentiellement à la composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires de ces extraits et à leurs effets synergiques.

Empiriquement reconnue depuis des siècles, la confirmation scientifique de l'activité antimicrobienne des H.E. est récente. Elle ne date que du début du siècle dernier avec les travaux du Dr GATTFOSSE, le père de l'aromathérapie en France.

Beaucoup d'études ont été réalisées au sujet de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes et de leurs H.E. (**BOUDJEMAA NOUR ELYAKIN et al ., 2010**).qu'elles soient citées dans des ouvrages, dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès d'aromathérapie scientifique. Cette activité a été utilisée dernièrement pour la conservation du patrimoine bibliographique des musées évitant ainsi l'altération des ouvrages par des petits animaux nuisibles, et elle est naissante pour traiter la qualité de l'air dans les bâtiments (**FOUZIA DJENADI, 2011**).

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

III-11- Mécanismes d'action des huiles essentielles sur les bactéries

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

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

III-12-Les principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne des H.E.

III-12-1- Aromatogramme

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des H.E. testées, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (BOUDJEMAA et al., 2010). Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar1 réalisée dans une boîte de Pétri.

Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d' H.E. (Figure 6).

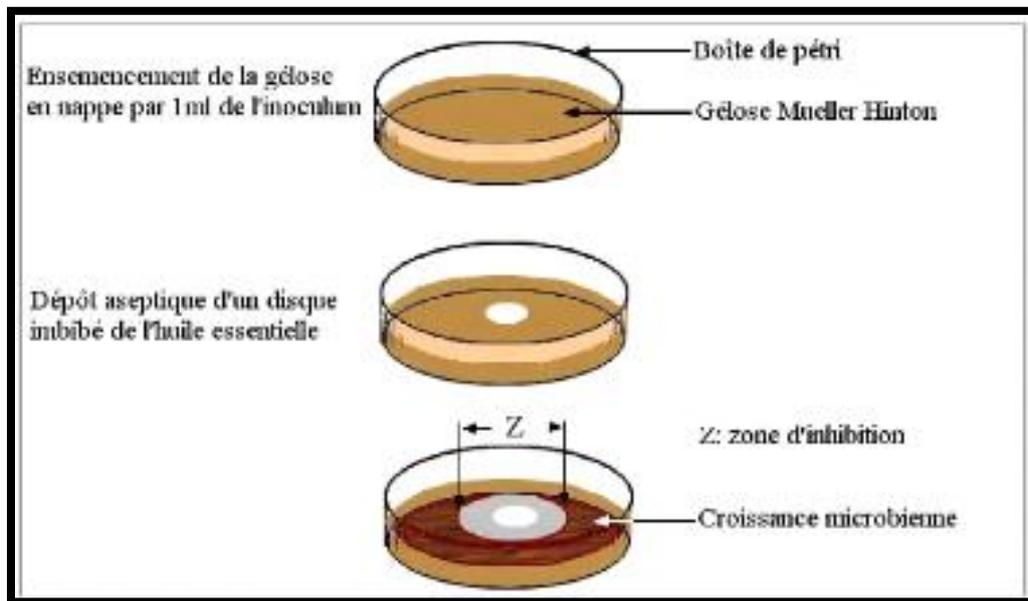


Fig. 6: Illustration de la méthode d'aromatogramme (ZAIKI, 1988).

III-12-2 Détermination de concentration minimale CMI:

L'efficacité de l'huile essentielle contre les microorganismes peut être fournie par la concentration minimale inhibitrice CMI; est la concentration la plus faible de l'huile essentielle capable d'empêcher le développement d'un microorganisme

Grâce à la méthode de dilution on peut déterminer la CMI, elle consiste si elle se fait au préalable à préparer une série de tubes contenant l'eau physiologique plus l'extrait chaque tube avec une concentration déterminée le 1^{er} tube 25 % et le 2^{ème} tube 50 % et le 3^{ème} tube 75 % et le 4^{ème} tube 100 % et on prépare des boîtes pétrie chaque boîte contenant le milieu de culture avec les souches bactériennes, et on applique la méthode de disque, on imbibé les disques avec les différentes dilutions et placée sur les géloses inoculées dans les boîtes. On calcule la CMI est égale la concentration de dilution la plus faible qui inhibe la croissance de bactérie après 6 à 8 heures d'incubation (Caillet et Lacroix, 2007).

Chapitre IV:

Matériels et méthodes

I-Matériels et méthodes

I-1 -Matériel végétal

Il est constitué de la plantes *Rosmarinus officinalis* qu'est collectée au niveau de l'université kasdi Merbah Ouargla durant le Mois d'Avril 2013.

La partie sur laquelle nous avons basée notre travail est la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* (Tiges et feuilles).

I-2 –Matériel biologique

Les germes testés sont provenus du laboratoire de microbiologie de département des sciences de la nature et de la vie d'Ouargla, de l'hôpital Mohamed Boudiaf et de la clinique de la commune de Ruissate. Il s'agit de : *Staphylococcus aureus* (Gram+), *Escherichia coli* (Gram-), *Streptococcus termophus*(Gram+).

I-3-Méthodes

I-3-1- Extraction d'huile essentielle

L'extraction a été réalisée au niveau du laboratoire de génie des procédés Université Kasdi Merbah Ouargla.

I-3-2-Extraction par hydro distillation

L'extraction de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* a été effectuée par hydro distillation dans un appareil de type Clevenger (Photo 2).

A chaque fois on prend la plante sèche de *Romarin* avec de l'eau (2/3 , 1/3) est introduite dans une ballon de deux litre, l'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures .Les vapeurs chargées d'huile essentielle traversant un réfrigérant de 40 cm se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.(Photo 3).

Les huiles essentielles récupérées dans de petits flacons opaques et stockée à 4°C



Photo.1: Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'huile essentielle.

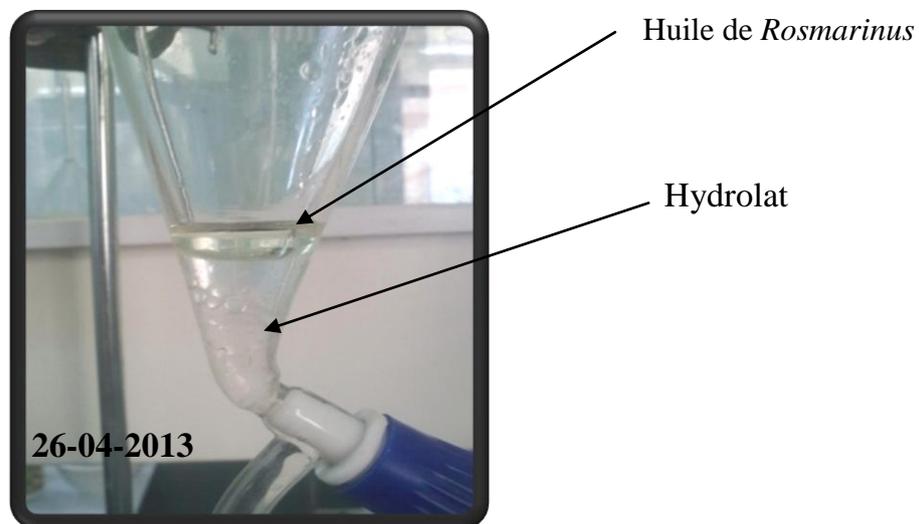
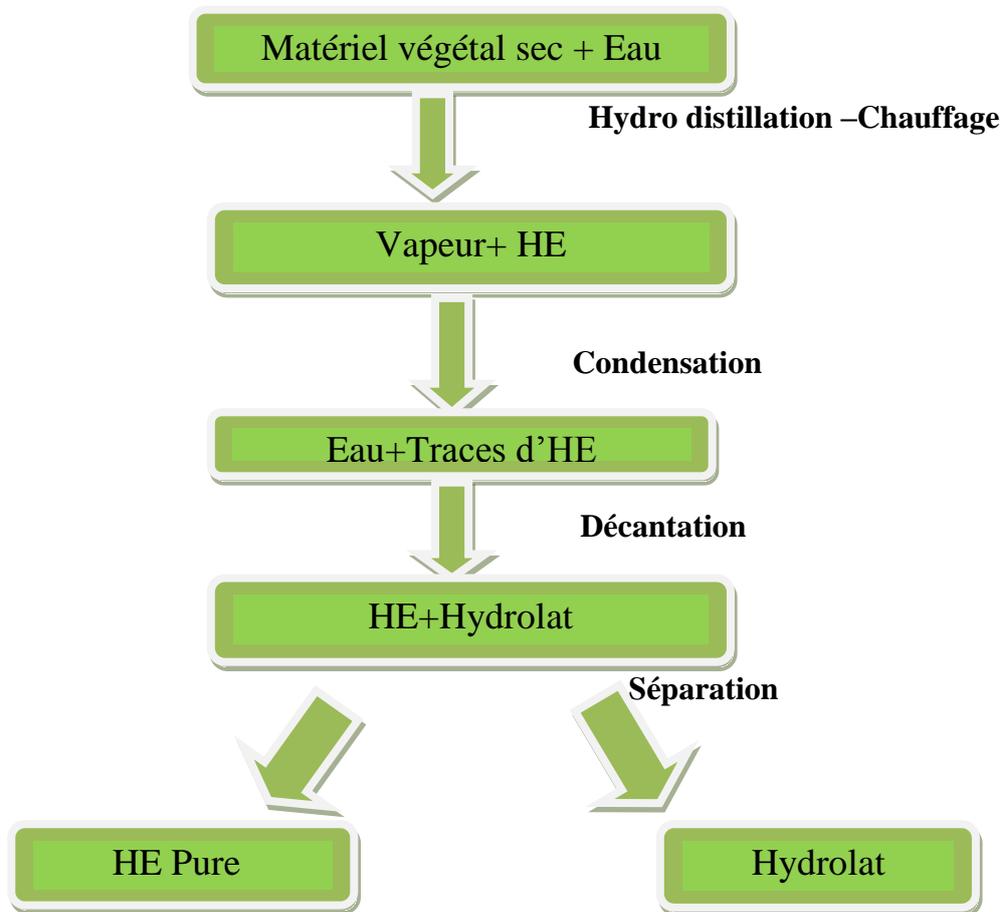


Photo.2: Huile essentiel de *Rosmarinus officinalis*.

I-4-Plan d'extraction**Fig.7:** Les étapes d'extraction d'huile essentielle

I-5- Plan d'expérimentale

Le protocole général de notre travail est comme suite :

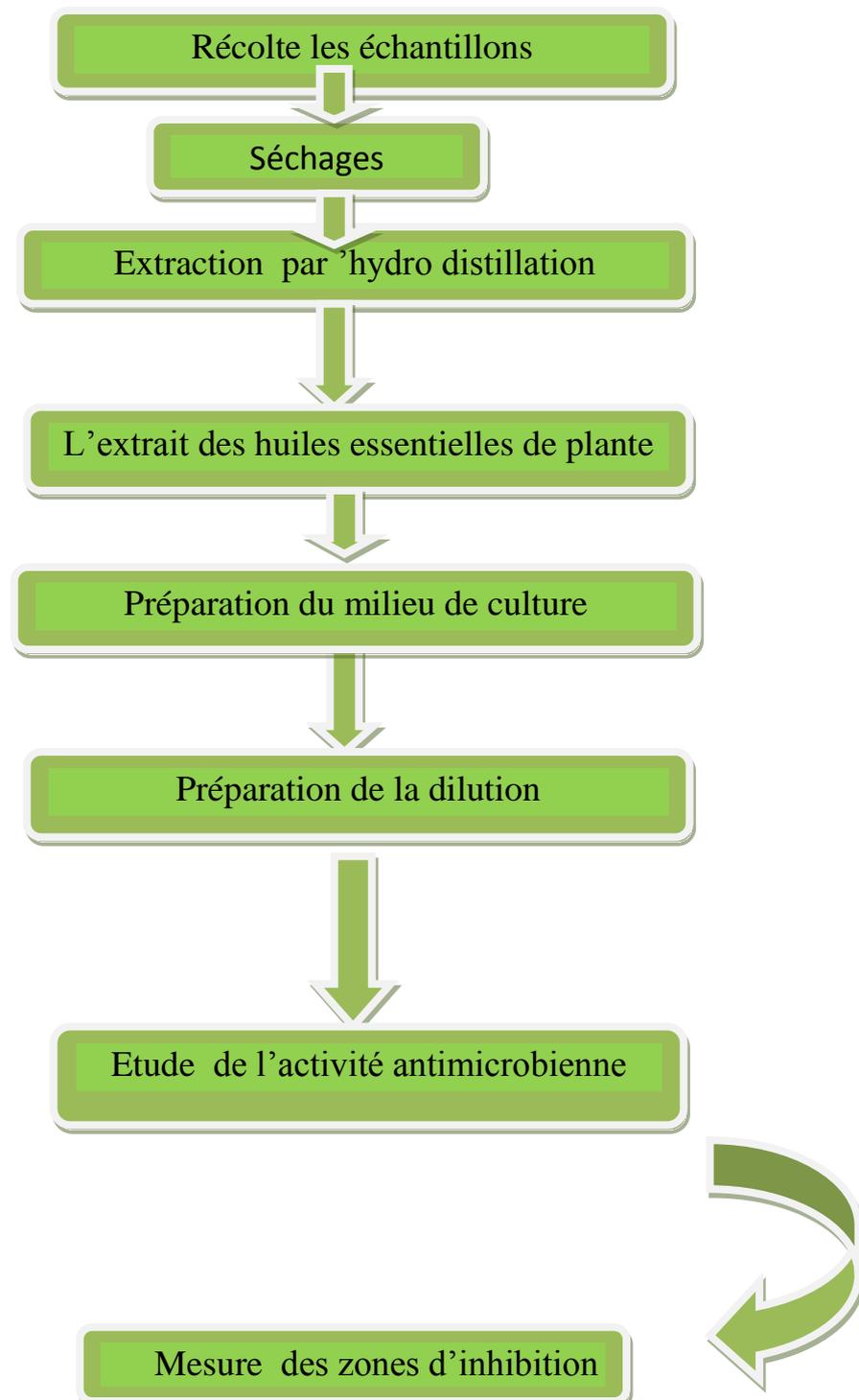


Fig. 8 : Plan expérimental

I-6- Détermination du rendement d'extraction

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle (R_{HE}) 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 :

$$R_{HE} (\%) = M'/M \times 100$$

R_{HE} : Rendement en huile essentielle en %.

M' : Masse d'huile essentielle en gramme.

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme .

Le résultat obtenu est:

$$R = 0.76\%$$

I-7- Analyses physico-chimiques de l'huile essentielle

Après l'extraction de l'huile essentielle de *Romarin* on a fait les analyses physico-chimiques suivantes :

- Le pH
- Indice de réfraction
- Densité
- Indice d'acide

2-1.2. pH

Le résultat obtenu est :

$$PH=6.00$$

2.1.3. Densité

On a utilisé un densimètre pour mesurer la densité,

Et pour calculer la densité à 20°C suivant la formule:

$$d^{20} = d^T + (T-20) \times 0.00073$$

Le résultat obtenu est :

$$d^{20} = 0.9117$$



Photo.3: pH mètre



Photo. 4 : Densimètre

2.1.4. Indice de réfraction

Afin de mesurer l'indice de réfraction on a utilisé un réfractomètre, puis on a calculé cette valeur à 20 °C par la formule suivante:

$$n_D^{20} = n_D^T + (T-20) \times 0.0045$$

Le résultat obtenu est:

$$n_D^{20} = 1.5026$$



photo.5: Réfractomètre

2.1.5 .Indice d'acide

$$I_a = (5.61 \times V) / M$$

Le résultat obtenu est :

$$I_a = 1.82$$



Photo.6 : Dispositif de titrage

I-8-Activité antimicrobienne

I-8-1-Préparation du milieu de culture

On a choisie comme milieu Muller –Hinton

I-8-1-1-Principe de méthode de préparation

La gélose de Mueller Hinton a été formulée à l'origine comme un milieu gélose transparent simple servant à la culture de différents types de bactéries celle-ci est aujourd'hui largement utilisé.

I-8-1-2-Méthode

- ✓ Préparer le matériel nécessaire comme le bac benzène, les boites de pétries....etc.
- ✓ Mettre le 1^{er} réactif l'agar dans l'eau chaude, cette étape est plus importants pour préparé un bon milieu.

- ✓ Ajouter les autres réactifs un par un, à la fin ajoute l'amidon et mettre le milieu dans l'autoclave pendant 15 minute et à 116 C°.

- **Les réactifs :**

Formule approximative pour un litre d'eau.

- Hydrolysate acide de caséine (peptone).....17.5g.
- Extrait de bœuf3.0g.
- Amidon.....1.5g.
- Agar.....17.0g.

I-9-Ecoulement



Photo.7. Ecoulement du milieu de culture

I-10-Préparation de l'inoculum

A partir des boîtes contenant les germes pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus termophilus*), on a préparé des suspensions microbiennes pour chaque espèce. A l'aide d'une pipette pasteur on prélève deux ou trois colonies pures et bien isolées qu'on décharge dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérilisée. L'enrichissement dure pendant 2 à 3 heures.



Photo.8: Préparation de l'inoculum

I-11-Ensemencement

Sur des boites contenant le milieu gélosé (Muller Hinton) d'une épaisseur de 2 mm bien séché, on introduit 3 à 5 ml de l'inoculum. On obtient ainsi, un étalement uniforme en nappe.



Photo .9: Ensemencement bactérien

I-12-Préparation des dilutions d'huile essentielle

L'extrait est repris avec de l'éthanol .les dilutions ont été effectuées seulement sur L'extrait d'huile de *Romarin*. Les dilutions effectuées sont : 100% ,75%,50% et 25%.



Photo.10. Préparation des dilutions

I-13-Incubation

Les disques sont prélevés à l'aide d'une pince stérilisé, puis imbibés avec des différentes dilutions d'extrait brut de *Romarin* jusqu'à imprégnation totale du disque. Les disques ainsi traités déposés sur la surface de la gélose inoculée diffusés, puis incubés à 37c° a l'étuve pendant 24 heures.

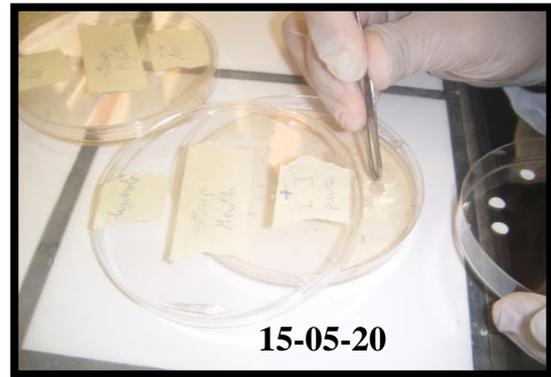


Photo.11 : Préparation des disques

- ✓ Des témoins imbibés seulement par l'éthanol sont testés.

I-14-Expression des résultats

L'activité antimicrobienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'un pied à coulisse la zone d'inhibition. (Figure.11.).

I-15-Lecture des résultats

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibitions de la croissance microbienne autour des disques contenant l'extrait à tester.

Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibitions et peut être symbolisés par des croix. La souche ayant un diamètre :

- $D < 8\text{mm}$: Souches résistante (-).
- $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$: Souches sensible (+).
- $15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$: Souches très sensible (++) .

- $D > 20$ mm : Souches extrêmes sensible (+++) (**DURAFOUR, et al., 1990 ; PONCE et al., 2003**).

Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibitions à l'extérieur de la boîte fermée..

Le Classement des bactéries se fait dans l'une des catégories : sensible ou résistante.

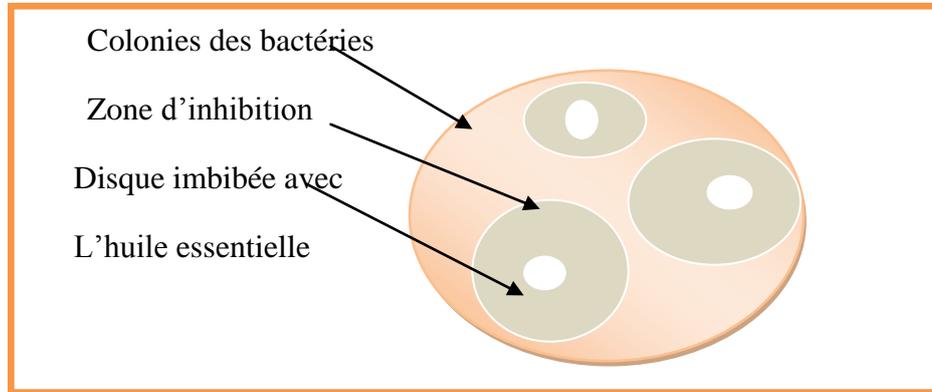


Fig. 9 : Aromatoگرامme

D'après (**CAILLET et ses collaborateurs ,2007**). L'action antimicrobienne des H.E. se déroule en trois phases:

- ❖ Attaque de la paroi bactérienne par l'H.E., provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaire.
- ❖ Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire. et la synthèse des composants de structure.
- ❖ Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

Chapitre V:

Résultats et discussion

II-Résultats et discussion

II-1-Caractéristiques organoleptiques

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est extraies par technique de hydrodistillation, il est liquide mobile, d'une coloration jaune clair et à odeur camphrée, les resultats obtenus sont représentés dans le tableau 01.

Tableau 01 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis*.

	Aspect	Couleur	Odeur
L'AFNOR	Liquide mobile, limpide	Presque incolore à jaune pâle	Caractéristique fraîche, plus ou moins camphrée selon l'origine
Huile essentielle	Liquide mobile	Jaune clair	Camphrée

Notre huile essentielle est obtenus par hydrodistillation est la méthode normé pour l'extraction d'une huile essentielle (MARIE ELISABETH L ,2005) . les paramètres organoleptiques de notre huile essentielle sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR.(AFNOR ,1999).

II-2-Les analyses de l'huile essentielle

Nous avons obtenu un rendement d'huile essentielle de 0.76% et à un densité de 0,9117 ,un pH de 6,054 , indice de réfraction de 1,5026 et un indice d'acide de 1,823, les résultats sont représentées dans le tableau 02.

Tableau 02 : Tableau récapitulatif des caractéristiques de l'huile essentielle de *Romarin*

Propriétés	Valeur pratique	Référence
Rendement (%)	0.76	0.5 - 2
Densité (g/cm³)	0.9117	0.905-0.921
pH	6.054	6 - 7
Indice de réfraction	1.5026	1.3356 -1.3500
Indice d'acide	1,823	0.5 -2,0

Le rendement 0,76 est conforme avec les normes AFNOR.(0,5-2), Cela peut être due aux différents facteurs qui rentrent en jeu, parmi eux on cite la nature du sol, la période de la récolte, la durée de séchage, le mode d'extraction. La densité est faible puisque il contient plus des monoterpènes (ZABEIROU et HACHIMOU ,2005) ., et un pH acide l'huile contienne beaucoup plus des acides (BELLKHDAR ,1997) .,et un indice de réfraction de 1,5026 élevé un peu que le valeur d' AFNOR l'indice de réfraction élevé c'est-à-dire un teneur en monoterpènes forte .les résultats obtenues sont conformes aux normes internationales(AFNOR ,1999).

II.2. L'activité antimicrobienne de l'extrait et ces dilutions

Le tableau 01 illustre les variations des diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes apparues en présence de l'extrait de *Rosmarinus officinalis*

Tableau 03 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Souches bactériennes	Zone d'inhibition (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	9
<i>Escherichia coli</i>	12
<i>Streptococcus termophilus</i>	8

L'huile de *Rosmarinus officinalis* présent un effet positif sur les trois souches bactériennes étudiées avec des zones d'inhibition de 9 mm, 12 et 8 mm respectivement pour *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Streptococcus termophilus*.

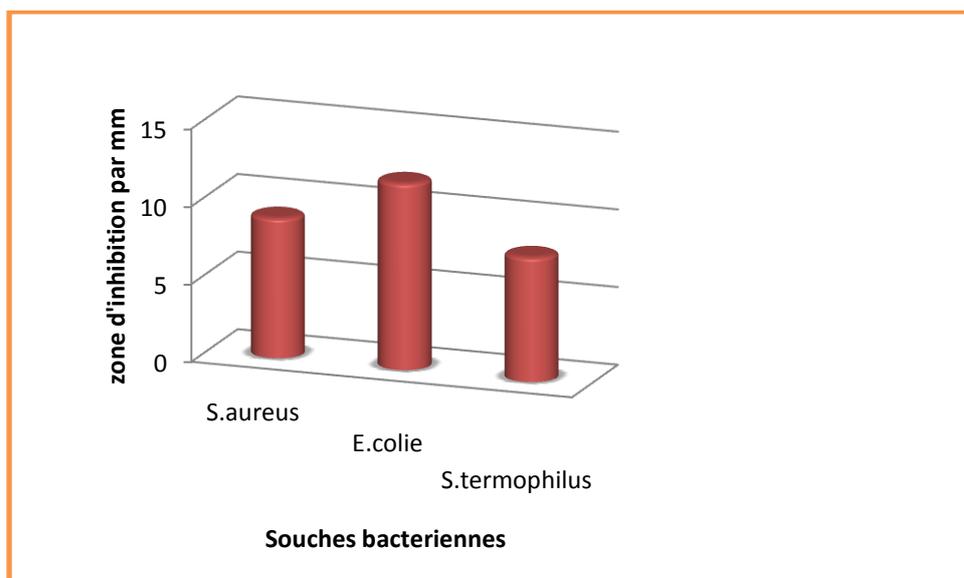


Fig.10 : Zone d'inhibition (mm) de l'huile essentielle.

L'extrait de *Romarin* à une activité antimicrobienne importante contre l'*Escherichia coli* par sa zone d'inhibition de 12 mm et la zone d'inhibition de *staphylococcus aureus* est égal à 9mm et le *streptococcus termophilus* par une zone d'inhibition de 8mm, donc la souche *E.coli* Gram⁻ est sensible à l'huile essentielle et le *staphylococcus aureus* est moins sensible et enfin le *streptococcus termophilus* Gram⁺ résistante. donc le composé majoritaire de l'huile essentielle du *Romarin* est le cinéole (50 %) suivi du camphre (12 %), de l' α -pinène (10 %) et du bicyclo-3.1.1-heptane (6,5%). L'HE de *Romarin* présente une activité antimicrobienne contre *E.coli*, *Staphylococcus*. (Skocibusic et al., 2006, Sharififar et al., 2007) note que L'activité antibactérienne des huiles essentielles est due à la présence des alcools à longues chaînes et des composés phénols qui inhibent la croissance des bactéries

Les résultats obtenus après la dilution de l'huile, sont présentés dans les tableaux et les figure ci-dessous. .

Tableau 04 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition des dilutions pour *E coli*.

Dilution	100%	75%	50%	25%
zone d'inhibition	12mm	9mm	8mm	7mm

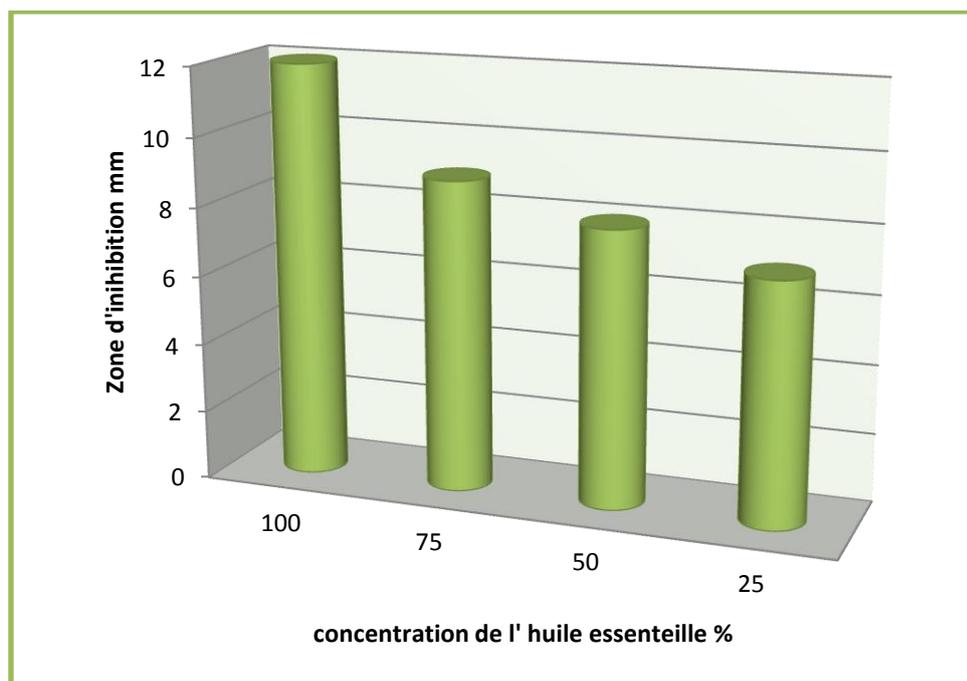


Fig. .11 : Histogramme présent les zones d'inhibition pour *l'Escherichia coli*

La souche *Escherichia coli* donnée un diamètre de 9 mm avec la dilution 75% et un zone de 8 mm avec la dilution 50% et un diamètre de 7 mm avec la dilution 25%, donc pour *l'Escherichia coli* est sensible pour toutes les dilutions de l'huile de *Romarin*.

Tableau 05 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition des dilutions pour *Staphylococcus aureus*

Dilution	100%	75%	50%	25%
zone d'inhibition	9.5mm	7mm	7mm	8mm

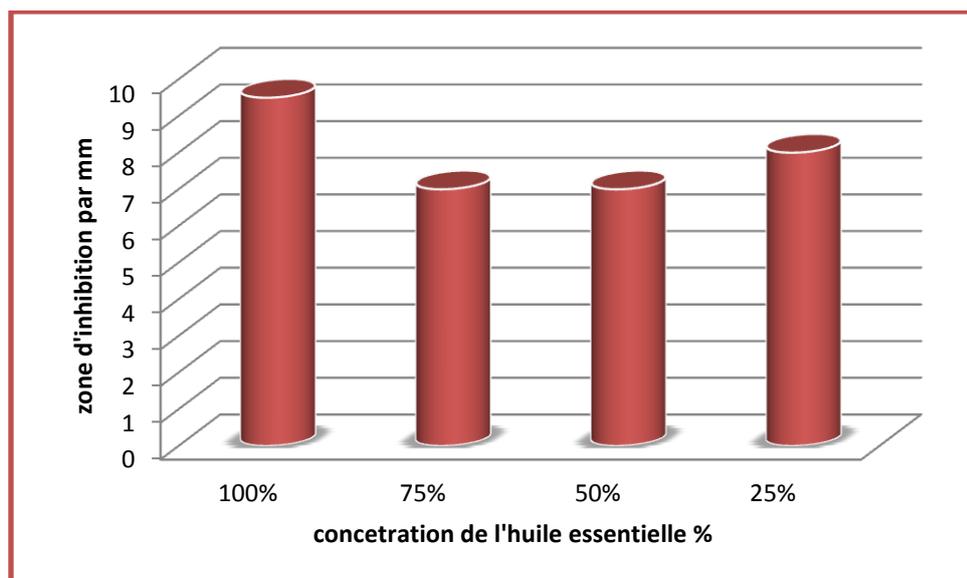


Fig .12 : Histogramme présent les zones d'inhibition pour *Staphylococcus aureus*

La souche *Staphylococcus aureus* donnée un diamètre de 7 mm avec la dilution 75% et un zone de 7 mm avec la dilution 50% et un diamètre de 8 mm avec la dilution 25% ,donc *Staphylococcus aureus* est moins sensible pour toutes les dilutions de l'huile de *Romarin*.

Tableau 06: Diamètres (mm) des zones d'inhibition des dilutions pour *streptococcus termophilus*

Dilution	100%	75%	50%	25%
% zone d'inhibition	8mm	8mm	6mm	6mm

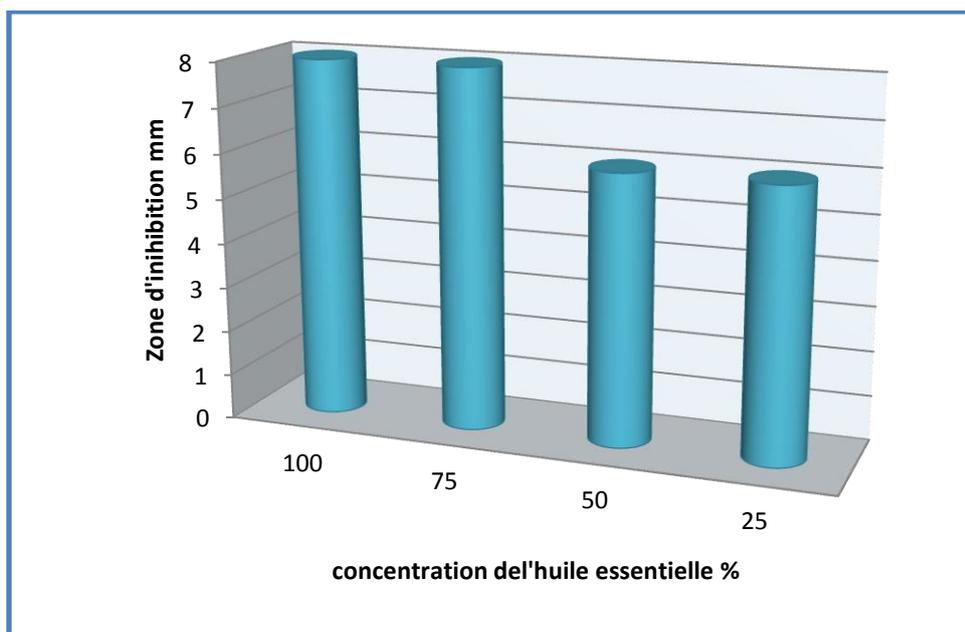


Fig.13 : Histogramme présent les zones d'inhibition pour *Streptococcus termophilus*

La souche *Streptococcus termophilus* donnée un diamètre de 8 mm avec la dilution 75% et un zone de 6 mm avec la dilution 50% et un diamètre de 6 mm avec la dilution 25% ,donc pour l'*Escherichia coli* est sensible pour toutes les dilutions de l'huile de *Romarin* ,La souche *streptococcus termophilus* est résistance pour les dilutions d'huile de *Romarin*.

L'étude de l'activité antibactérienne de ces huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* sur des souches de bactéries gram positive et gram négative montre que ces huiles possèdent une activité antibactérienne surtout contre le *Staphylococcus aureus* ,et *Escherichia coli* .

-La concentration minimale inhibitrice d'huile de *Rosmarinus officinalis*

Après les résultats enregistrés la bactérie *Escherichia coli* ayant présenté une sensibilité vis-à-vis toutes les dilutions de l'extrait. Dont on marque un diamètre d'inhibition variée de 12 à 7 mm, et la souche *Staphylococcus aureus* un diamètre d'inhibition variée de 9.5 à 7 est le moins sensible et pour le *Streptococcus trmophilus* un zone d'inhibition de 8mm à 6 mm.

La concentration minimale (CMI) obtenue suite à la dilution de l'extrait est 25%.

Tableau° 07 : Zone d'inhibition de l'hydrolat et éthanol sur les souches testées.

	Hydrolat	Ethanol
<i>Staphylococcus aureus</i>	■	■
<i>Escherichia coli</i>	■	■
<i>Sterptococcus termophilus</i>	■	■

- D'après les résultats obtenus des témoins qui sont tous négatifs on peut déduire que l'hydrolat et l'éthanol de *Rosmarinusn* n'a aucun effet sur la croissance de souches testées. (photo 24et 25).



Photo.12: Dilution de L'extrait pour l'*Escherichia coli*



photo .13: Dilution de L'extrait pour *Staphylococcus aureus*.



Photo.14 : Dilution de l'extrait pour *Streptococcus termophilus*.

1-La souche *Streptococcus termophilus*

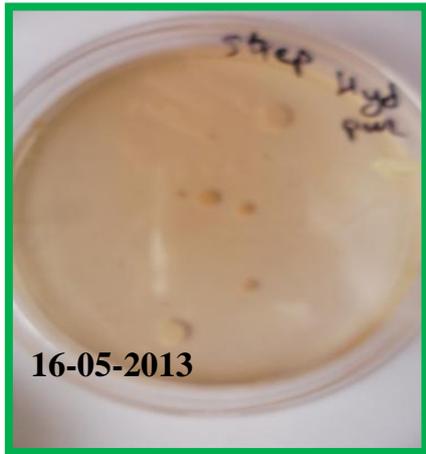


Photo.15: Hydrolat



photo .16: Dilution 10^{-2}



Photo .17: Dilution 10^{-3}



photo.18: Dilutions 10^{-4} et 10^{-5}

2-La souche *E. coli*



Photo.19 : Dilution 10^{-1}



Photo.20 : Hydrolat



Photo.21: Dilution 10^{-2}



Photo.22: Dilution 10^{-3}



Photo.23: Dilutions 10^{-4} et 10^{-5} .



Photo.24 : Ethanol sur *Streptococcus thermophilus*



15-05-2013

Photo.25 : Ethanol sur *E. Coli*

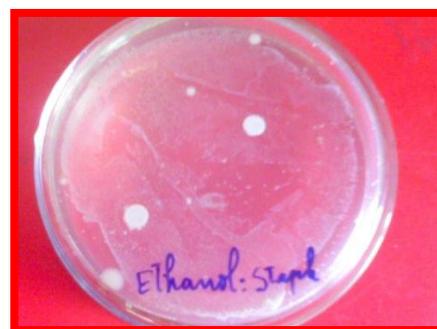


photo.26 : Ethanol sur *Staphylococcus aureus*.

Conclusion générale

Conclusion générale

Conclusion générale

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

L'objectif de notre travail consiste à faire une étude physicochimique et biologique d'huile essentielle de *Rosmarinu officinalis* de la région d'Ouargla- Algérie.

La valeur du rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* était de 0.76%. Cette valeur est identique avec celles obtenus chez d'autres études de la même espèce

Les résultats obtenus montrent que les huiles essentielles de *Romarin* extrait par hydro distillation ont des propriétés physicochimiques (la densité, l'indice de réfraction, indice d'acide) sont conformes aux normes AFNOR.

De même que l'activité biologique de l'huile du *Romarina* donné un pouvoir antibactérien très important surtout sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* à la base de résultats trouvés on peut conclure prédire que nos huiles essentielles peuvent servir comme base de lutte biologique.

*Références
Bibliographiques*

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

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

ATIK BEKKARA et al (2007). Composition chimique de L'huile essentielle de *Romarin officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & santé* .7 :6-11

BELAKHDAR, J (1997) .La pharmacopée marocaine traditionnelle. Idis PRESS (Ed). Paris, p. 764.

BELOUED, A (1998). Plantes médicinales d'Algérie. 2^{ème} Edition .Office des publications.

BOULLARD (2010). BOUDJEMAA Nour Elyakin et BEN GUEGUA Hadjer, L'effet antibactérien de *Nigella Sativa*. Université Kasdi Merbah Ouargla.

BALENTINE et al (2006) .The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and during storage of ground beef. *Meat Science.* 73, p.413-421.

BRUNETON, J (1999) .Pharmacognosie ,phytochimie ,plantes médicinales. 3^{ème} Edition .Tec & Doc (Ed) .Paris,p.575

CAILLET S, LACROIX M ,2007. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de recherche en Sciences appliquées à l'alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier ,université de Laval (Québec) .

ESTEM(Ed). Plantes médicinales du monde réalités et croyances Paris, p.660..

E. Vagi, B. SIMANDI, A. SUHAJDA, E (2005). Hethelyi. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum marjorana* L. Extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *J.*, 38, 51-57

ESCOTT, HARLEIN, KIEIN (2006). Microbiologie 2^e édition française, de boek, P : 2.

GUENTER E (1975). The essential oils Vol II, III, IV, V, VI, and D. Van Nostrand Ed. New York USA.

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

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

Gill J et al (2007). Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants

GONZALEZ-TRUJANO et al(2007). Evaluation of antinociceptive effect.

GOEB Ph(1999). Aromathérapie pratique et familiale. Ed. MDB.

Gonzalez-Trujano, M.E. et al (2007). evaluation of antinociceptive effect of *Romarin officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol*.111:476-482.

HENRICH, et al (2006). Ethnobotany and Flavonoids-potent and versatile.

HOSTETTMANN K(1997). Tout savoir sur le pouvoir des plantes. Ed. Favre. S.A. Lausanne. Suisse.

JEAN BOTTON A (1999). Pharmacognosie « Photochimie plante « médicinales 3^{ème} éd TEC.DOC Paris. P484-p540.

JEAN-PIERRE DEDET (2006). la microbiologie de ses origines aux maladies émergentes. ISBN978-26106-B, P 213 -245.

JUDD et al (2002). Botanique systématique une perspective phylogénétique .pp84-87

L.RAUL. H. OCHOA(2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » D'origine végétale. Thèse De L'institut National Polytechnique De Toulouse.

MARIE ELISABETH LUCCHESI (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles : p 17 ; 23, 52,

MARIE ELISABETHI LUCCHESI, FARID CHEMAT, and JACQUELINE SMADJA(2004). Flavour And Fragrance Journal Flavour Fragr. J.; 19: 134–138

MEYER, WARNOD J (1984). Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils, Perfumer & Flavorist, 9, 93-103.

M.E. LUCCHESI (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse d'Université de la Réunion

NAUCIEL C et VILDEJ.L (2005) .Bactériologie médicale.2^{ème} Ed .Masson . Paris .ISBN : 2-294-018583.257p.

NORMES AFNOR RECUEIL DES NORMES FRANCAISESE (1992). Huiles essentielles. AFNOR, Paris,

PRAJAPATI et al (2005) .Insecticide, repellent.

P.BERCHE et al (P.C.E.M.2) (2002/2003).Bactériologie générale, faculté de médecine Necker –enfants malades. P.16.

SACCHETTI, et ses Collaborateurs (2005).Growing in Argentina.Bioresource Technology . (In press).

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

SEBROTYNEKet al (2005) .Comparison of natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. Meat science .69:289-296

SHARIFIFAR, F, Mosha, M.H., Mansouri, S. H., Khodashenas, M., Khoshnoodi, M., 2007.Food Control,(18),800-805.

SKOCIBUSIC, MSkocibusic,M., Bezic, N.,Dunkic, V., 2006. Food Chem., (96), 20–28.

SOTELO-FELIX et al ,(2002). Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat .*J Ethnopharmacology* .81:145-154.

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

ZABEIROU ; HACHIMOU (2005). Étude comparative entre les Huiles essentielles de la Menthe Verte (*Mentha Spicata L*) et de la Poivree (*Mentha Piperita L*) dans la région d'Ouargla .Mémoire de DES Biochimie –Université de Kasdi Merbbah _Ouargla .p16

ZAMBONLLI., A.Z. D'AURELIO., A. Severi., E. BENVENUTI., L. MAGGI., A. BINACHI. (2004). Chemical composition and fungicidal activity of comercial essential oils of thymus vulgaris L J. Essent Oil Res 16(1), 69-74

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

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

Annexes

Annexe I



Photo : Autoclave



Photo. : Bain marine



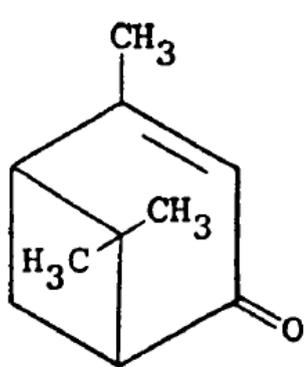
Photo: Appareille de comptage



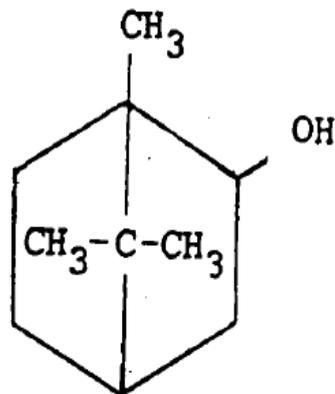
Photo: L'ingrédient de préparation de milieu de culture

Annexe II :

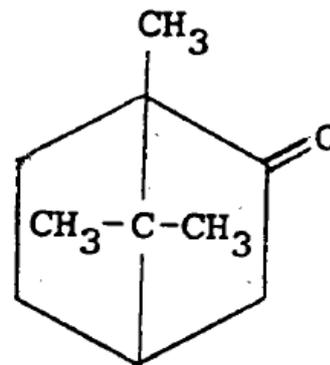
Les structures chimiques des principaux composés présents dans l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*:



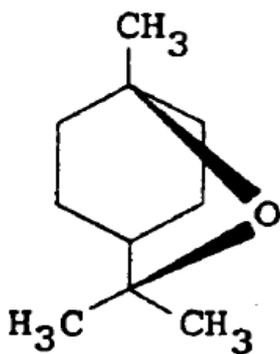
VERBENONE



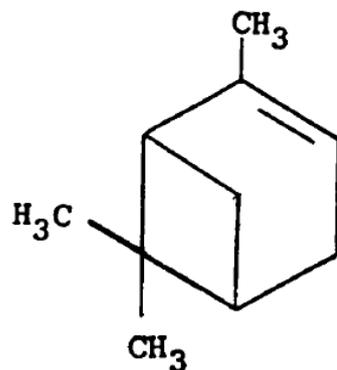
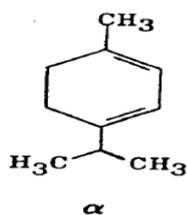
BORNEOL



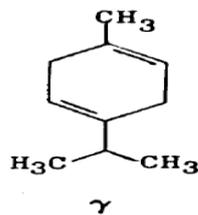
CAMPHRE



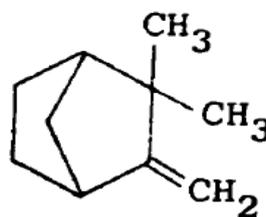
CINEOL (ou EUCALYPTOL)

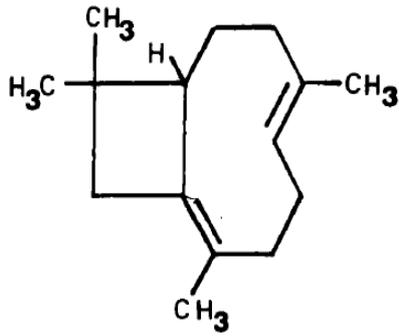
 α -PINENE

TERPINENE

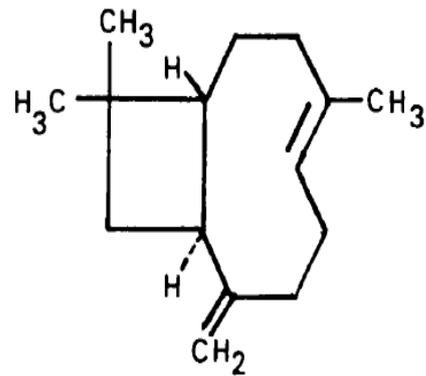


CAMPHENE

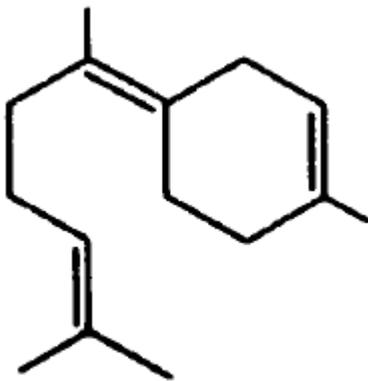




CARYOPHYLLENE



HUMULENE



BISABOLENE

Annexe III : Tableau de nombre des colonies des bactéries.

Les souches	Nombre des colonies
<i>Staphylococcus aureus</i>	478
<i>Escherichia coli</i>	676
<i>Streptococcus termophilus</i>	344

Résumé : Lutte biologique par l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

Les huiles essentielles possèdent des activités antibactériennes importantes et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants. Ce qui nous a conduits à effectuer l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la plante *Rosmarinus officinalis* et d'évaluer leurs propriétés physicochimiques.

D'après les résultats obtenus on remarque que le rendement en huile essentielle est de l'ordre de 0.76% est conforme aux standards internationaux.

Les résultats des analyses physicochimiques de l'huile essentielle sont conformes aux normes (AFNOR) l'activité antimicrobienne a donné des résultats intéressants inhibition de *Escherichia coli* par zone de diamètre 12mm, le *Staphylococcus aureus* par 9mm.

Mots clés : huile essentielle, activité antimicrobienne, analyses physicochimiques, *Rosmarinus officinalis*.

ملخص

المكافحة البيولوجية بالزيت الطيار لإكليل الجبل

تملك الزيوت الأساسية لنباتة فعالية ضد بكتيرية مهمة و تستطيع ان تعوض بنجاح المضادات الحيوية التي أثبتت عدم نجا عنها ضد البكتيريا المقاومة الشيء الذي حثنا على دراسة الفعالية ضد بكتيرية لنباتة إكليل الجبل و دراسة الخصوصيات الفيزيوكيميائية للزيت المستخلص.

حسب النتائج المتحصل عليها نذكر ما يلي

المردود المتحصل عليه من خلال استخلاص الزيوت للأوراق و السيقان يقدر بـ 0.76 % و يعتبر هذا الأخير جد مقبول حسب المعايير المعمول بها .

التحاليل الفيزيوكيميائية المجرات على الزيوت الطيارة أعطت نتائج مطابقة للمعايير الدولية AFNOR.

الفاعلية ضد البكتيريا أعطت نتائج جد مفيدة بحيث يملك زيت إكليل الجبل فعالية ضد *E. Coli* يقطر 12mm و ضد *S.aureus* يقطر 9mm

كلمات مفتاحية: الزيوت الأساسية, الفعالية ضد الميكروبية, التحاليل الفيزيوكيميائية إكليل الجبل .

Abstract: Biological control by essential oil of *Rosmarinus*

Essential oils have important antimicrobial activities and can replace with success antibiotics which show their inefficiency against resistant microorganisms. In this study we have tested the antimicrobial activities of *Rosmarinus* and study the propriety physicochemical of essential oil extract.

After result obtain we find that the revenue of essential oil is 0.76 % this value acceptable to norm.

The result of analyses physicochemical of essential oil adapt to norm (AFNOR).

Activity antimicrobial is very important contras *E.coli* by 12mm and contras *S.aureus* by 9mm.

Key Words: essential oil, antimicrobial activities, physicochemical analyses, *Rosmarinus*