

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI Laghouat

Faculté des Sciences
Département de Biologie



جامعة عمار تليجي - الاغواط

كلية العلوم
قسم البيولوجيا

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'Etat en Biologie

Option : Génie biologique

Thème :

***Contribution à l'étude de l'activité
antibactérienne des huiles essentielles
vis-à-vis de quelques bactéries***

Présenté Par:

- ❖ *DADA Fella*
- ❖ *DAHMANI Zohra*

Encadré :

Mr DJEDID Mebrouk (Promoteur)

Mr CHAIBI Rachid (Co-promoteur)

Juin 2012

(DADA et DAHMANI.)

(Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis de quelques bactéries).

Résumé :

Nous avons étudié l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites à partir de trois plantes : *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus globulus* et *pistacia atlantica*, récoltées de la région d'Aflou et de Laghouat. L'extraction des huiles essentielles est effectuée par l'appareil d'hydro-distillation qui a donné respectivement les rendements 1.31%, 1.09% et 0.19%.

Cette étude montre que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est la plus active comparée aux autres huiles testées, il est actif avec un volume de 10µl sur la plupart de bactéries testées où le diamètre d'inhibition varie entre 9.02 et 43.27 mm.

Les trois techniques, diffusion sur disque, contact direct (CMI) et micro atmosphère, révèlent que l'huile d'*Eucalyptus* possède une bonne activité inhibitrice avec des valeurs de CMI qui varient entre 0,43 µg/ml et 6,92 µg/ml selon les souches bactériennes.

Les huiles essentielles d'*Eucalyptus* et du *Romarin* possèdent des activités inhibitrices plus fortes sur la souche Gram positif *Staphylococcus aureus*, par contre les souches *Pseudomonas aeruginas* et *MRSA* possèdent une grande résistance, d'où la possibilité de leur utilisation comme des agents thérapeutiques. Les résultats ont aussi montré que l'huile de *Pistachier* ne possède aucune activité antibactérienne vis à vis de ces souches.

Mots clés : Huile essentielle, *Eucalyptus*, *Romarin*, *Pistachier*, bactéries pathogènes, effet antibactérien, CPG.

(المساهمة في دراسة الوظيفة الحيوية للزيوت الطيارة تجاه بعض البكتيريا)

المخلص:

قمنا بدراسة الوظيفة الحيوية للزيوت الطيارة المستخرجة من ثلاثة نباتات عطرية والتي تنبت في منطقتي الاغواط وأفلو: الكالببتوس (*Eucalyptus globulus*), اكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) و البطم (*Pistacia atlantica*). استخراج الزيوت الاساسية المستخلصة بعملية التقطير المائي اعطى المردود التالي: 1.31% , 1.09% , 0.19% على التوالي.

هذه الدراسة اثبتت ان الزيت الطيار للكالببتوس (*Eucalyptus globulus*) هو الأكثر فعالية مقارنة بالزيوت الاخرى المختبرة, فهو فعال يقدر ب: 10µل على اغلب البكتيريا المختبرة اين اعطى تثبيط يتراوح ما بين 9.02 مم و 43.27مم.

التقنيات الثلاث طريقة الانتشار عن طريق القرص , طريقة التفاعل المباشر (CMI) و الانتشار في الجو اظهرت ان الزيت الاساسي للكالببتوس (*Eucalyptus globulus*) يمتلك فعالية مثبطة جيدة بقيم CMI تتراوح بين 0.43 مل/غ و 6.92 مل/غ وهذا حسب البكتيريا المستخدمة.

الزيوت الاساسية للكالببتوس (*Eucalyptus globulus*) و لاكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) تمتلك وظيفة مثبطة للبكتيريا *Staphylococcus aureus* من نوع غرام موجب , بالمقابل فان البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و *MRSA* تمتلكان مقاومة كبيرة ضد هذه الزيوت , وبالتالي امكانية استخدام هذه الزيوت كعوامل مطهرة , وكما اثبتت ايضا هذه الدراسة ان زيت البطم لا يمتلك اي فعالية مثبطة ضد البكتيريا المستعملة.

الكلمات الافتتاحية: الزيت الطيار , الكالببتوس (*Eucalyptus globulus*), اكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) , البطم (*Pistacia atlantica*), البكتيريا الممرضة, التأثير المضاد للجراثيم, CPG

(DADA and DAHMANI).

(Contribution of study antibacterial activity of essential oils in front of some bacteria.)

Abstract :

We have studied the antibacterial activity of essential oils extracted from three aromatic plants grown in Aflou and Laghouat region: *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus globulus* and *Pistacia atlantica*. The extraction of essential oils by hydro distillation gave the following yields: 1.31%, 1.09% and 0.19%, respectively.

This studied shown that essential oil of Eucalyptus are the most actif in comparison with other tested oil, at a volume of 10 μ l tested at all bacterias varied between 9.02mm and 43.27mm.

This three technic, disc diffusion, direct contact and micro atmosphere is shown that the inhibitory activity the oil of *Eucalyptus globules* is most effective against bacteria strains with MICs ranging between 0, 43 μ g/ml 6, 92 μ g/ml.

All essential oils as *Eucalyptus* and *Romarin* processe inhibitory activity on Gramm positive strain of *Staphylococcus aureus*, however the *Pseudomonas aerogenas* and *MRSA* process a great resistance against oils essentials.

The result showed that *Pistache* oil has none activity antibacterial.

Key words: essential oils, *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus globulus* , *Pistacia atlantica*, pathogenic bacteria, antimicrobial effect,GC.

DEDICACES

Je rends grâce à **DIEU** le tout puissant qui m'a permis d'arriver **à ce but.**

Je voudrais en toute modestie dédier ce travail à :

La mémoire de mon père **MOHAMMED NOUR-EDDINE** que je
souhaiterais rencontrer au Paradis.

A la lumière de ma vie, à ma très chère mère **BENTOMAR**, qui a

Inséré le gout de la vie et le sens de la responsabilité pour sa tendresse

Et ma soutenue et encouragée et qui, sans leur amour, leur compréhension,
leur conseil et leur tolérance je n'aurais jamais pu atteindre mes objectifs.

A mes chères sœurs : **FETTOUM, WAFIA, NAIMA et LAMIA**. Qui

M'ont soutenue dans les plus durs, je ne la remerciais jamais assez...

A mes chères frères : **Mohammed Rida et Mustapha Nadir**. Pour leur présence et
leurs soutiens.

Je dédie ce travail à mon Fiancer **MOHAMED NADIR SAHRAOUI** qui a
toujours été à mes côtés, qui ma soutenue et encouragé.

A celle que je considère comme frères :

**ABDELKADER ORIF, AISSA BEN HARZALLAH, TAHER BEN SAAD et
AISSA LOUBACHRIA.**

A tous mes amies surtout : **Zohra, Manel et Zineb**

**Sont oublier : SAMAH, NOUR, MALAK, MERIEM, MARWA, NOUR-
EDDINE ADEM, ainsi les poupons MOHAMMED HABIB et NOUR IMANE**

A tous ceux qui m'ont assistée et encouragée.

A tous ceux qui me sont chers.

Fella

Dédicace

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie : Aux personnes les plus chères au monde mes chères parents que Dieu les protège. Ils m'ont toujours poussée à aller plus loin ; je leur suis très reconnaissante.

Mes chères sœurs Fatima Zohra khouloud, Setti et Fadila.

Mes chères Frères Abdelkader, Allal et Benyoucef, ainsi mes belles sœurs.

Sans oublies: youcef ayoub, Hadjer, Adem, Malak, Ahmed.

A Fella qui me donne le courage pour terminer notre mémoire.

Mes chers amis (es) : Zineb, Manel, Yasmine, Soumia, Messaouda, Hakim et Mokhtar.

Je dédie également ce travail à ma très chère personne : Takhi Fatma

Et je dédie surtout ce travail aux personnes qui m'ont beaucoup encouragée et soutenue : Mr Bouderbala Hamza, Ben Arfa Aissa, Benmebarek Hatem Ahmed Horma et Habai Hamid.

Tous mes enseignants et Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire

Zohra

REMERCIEMENT

Nous tenons à remercier DIEU le tout puissant qui nous a donné la force, la volonté et le savoir pour poursuivre nos études et réaliser ce travail.

Et au terme de notre travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre honorable encadreur M^r. Djedid Mebrouk qui nous a dirigé et aidé tout au long de ce travail ainsi que M^r .Chaibi Rachid d'avoir accepté et faciliter avec une grande générosité le déroulement de ce travail et pour leur conseils

Nous exprimons nos profonds remerciements et nos vives reconnaissances à M^r Sifi Ibrahim pour son aide de rendre ce travail aussi intéressant et pour son soutien, son orientation durant le long de ce travail.

Nous adressons un sincère remerciement aux personnes qui nous ont aidées à la réalisation de ce mémoire :

M^r Laidani Ykhlef Professeur à l'Université de Chlef, d'avoir accepté de nous orienter le long ce travail.

M^r B.Bekchich et M^r T. Benramdan, de leurs aides et leurs encouragements durant ce travail.

Nos remerciements s'adressent aux membres de jury, M^{me} EL HOUTI Fatiha et D^r BENALIA Mokhtar d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Nous devons également exprimées nos gratitudes à tous les professeurs de département de biologie et génie des procédés qui nous ont accompagnés le tout long de notre parcours scolaire et à tout le personnel du laboratoire de département de génie des procédés

Nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, en particulier l'ingénieur de laboratoire R.Mahfoudi et le responsable de la bibliothèque A.Belmadani.

SOMMAIRE

Résumé.....	I
Dédicace, Remerciements.....	II
Sommaire.....	III
Liste des tableaux.....	IV
Liste des figures.....	V
Abréviations.....	VI
Introduction.....	01

Synthèse bibliographique

I : Etude botanique des plantes

I.1- Introduction.....	02
I.2- Le Romarin.....	02
I.2.1- Définition.....	02
I.2.2- Description botanique.....	03
I.3- L'Eucalyptus.....	06
I.3.1- Définition.....	06
I.3.2- Description botanique.....	06
I.4- Le Pistachier d'Atlas.....	09
I.4.1- Définition.....	09
I.4.2- Description botanique.....	09

II : Les Huiles essentielles

II.1- Historique.....	12
II.2- Définition.....	13
II.3- Répartition.....	14
II.4- Localisation.....	14
II.5- Rôle des huiles essentielles dans la nature.....	15
II.6- Compositions chimique.....	15
II.7- Les propriétés fondamentales des huiles essentielles.....	17
II.7.1- Propriétés organoleptiques des huiles essentielles.....	17
II.7.2- Les propriétés physiques.....	17
II.7.3- Les propriétés chimiques.....	18
II.7.4- Les propriétés antiseptiques.....	18
II.7.5- Les propriétés pharmacologiques.....	18
II.7.6- Le pouvoir osmotique.....	18
II.8- Conditions de conservation et stockage.....	18
II.9- Domaines d'utilisation des huiles essentielles.....	19

III : Méthode d'extraction et d'analyse des huiles essentielle

III.1- Introduction.....	21
III.2- Extraction par distillation.....	21
III.2.1- L'hydro distillation.....	21
III.2.2- L'Entrainement à la vapeur d'eau.....	22
III.2.3- Procédé d'hydro-diffusion.....	23
III.2.4- Extraction par micro-onde.....	23
III.3- Extraction par pressage.....	24
III.4- Analyse chromatographique.....	25

SOMMAIRE

IV : Activité biologique des huiles essentielles

IV.1- INTRODUCTION	26
IV.1.1- Activité antibactérienne	26
IV.2- Le mode d'action des huiles essentielles	27
IV.3- Toxicité des huiles essentielles	28

V : Bactéries pathogènes

V.1- Introduction	29
V.2- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
V.3- <i>Staphylococcus aureus</i>	30
V.4- <i>MRSA</i>	32

Partie expérimentale

I- Extraction des huiles essentielles	33
I.1- Extraction par hydro-distillation	33
I.2- Détermination du rendement	34
II- Analyse chimique des huiles essentielles	36
II.1- La teneur en humidité de la matière végétale	36
II.2- Analyse chromatographie	36
III- Evaluation de l'activité antibactérienne	37
III.1- Origine des souches	37
III.2- La pré-culture des bactéries	37
III.3- Test antibactérien	38
III.3.1- Technique de l'aromatogramme	38
III.3.2- Méthode de contact direct sur milieu liquide CMI/CMB	41
III.3.3- Technique de micro-atmosphère	44
III.3.4- Antibiogramme	46

Partie résultats et discussion

I- Analyse chimique	49
I.1- Calcul du rendement de l'extraction des HE	49
I.2- Calcul du taux d'humidité	50
I.3- Caractéristiques organoleptiques	50
I.4- Analyse chromatographique qualitative	50
II- Evaluation de l'activité antibactérienne	51
II.1- Résultat du test de l'aromatogramme	51

SOMMAIRE

II.2- Résultat de la méthode de contact direct sur milieu liquide CMI/CMB	54
II.3- Résultat de test micro-atmosphère.....	57
II.4- Résultat d'antibiogramme.....	59
III- Discussion.....	61
Conclusion	65
Références bibliographiques.....	67
Annexe.....	72

Liste des Tableaux

Page

Tableau 1 : Classification botanique du <i>Romarin</i> (Boumlik, 1995).....	3
Tableau 2 : Classification botanique d' <i>Eucalyptus</i> (Richard, 1974).....	7
Tableau 3 : Systématique de <i>pistacia atlantica</i> desf. Subsp <i>atlantica</i>	10
Tableau 4: Condition opératoire d'hydrodistillation.....	34
Tableau 5 : Les conditions opératoires de chromatographie en phase gazeuse.....	36
Tableau 6: Codes et origines des souches pathogènes testées.....	37
Tableau 7: Les antibiotiques testés sur les bactéries avec leurs concentrations.....	47
Tableau 8: Résultats quantitatifs de l'extraction des huiles essentielles des trois espèces....	49
Tableau 9 : Résultat de taux d'humidité.....	50
Tableau 10 : Caractéristique organoleptiques des huiles essentielles.....	50
Tableau 11 : Diamètre des zones d'inhibitions des trois HE sur les trois souches bactériennes testées.....	51
Tableau 12: Concentration minimale inhibitrice de l'huile d' <i>Eucalyptus</i>	55
Tableau 13: Concentration minimale inhibitrice de l'huile de <i>Romarin</i>	56
Tableau 14 : Détermination de la CMI et CMB.....	56
Tableau15: Les Diamètres des zones d'inhibition d' <i>Eucalyptus</i> et <i>Romarin</i> vis-à-vis des trois souches.....	59
Tableau 16: Résultat de l'examen d'antibiogramme	60

Liste des Figures

Page

Figure 1: <i>Rosmarinus officinalis.l</i>	04
Figure 2 : Des photos illustrant l'arbre et les feuilles d' <i>Eucalyptus (Eucalyptus globulis.l)</i>	08
Figure 3 : Des photos illustrant l'arbre et les feuilles du pistachier de l'atlas (<i>Pistacia atlantica</i> Desf.) (Sifi 2010).....	11
Figure. 4 : Exemples des composés d'huile essentielle.....	16
Figure 5 : .Montage d'hydrodistillation des huiles essentielles.....	22
Figure 6: Sites et mécanismes d'action des huiles essentielles dans la cellule bactérienne (Burt, 2004).....	28
Figure 7 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
Figure 8 : <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Figure 9: <i>MRSA</i>	32
Figure 10: Montage d'hydrodistillation au laboratoire.....	34
Figure 11: Protocol expérimental de l'essai d'extraction et d'analyse des huiles essentielles.	35
Figure 12: Illustration de la méthode de l'aromatogrammes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988).....	39
Figure 13: Protocole expérimental de la méthode de l'aromatogramme (Laredj.2004).....	40
Figure 14: Méthode de contact direct sur milieu liquide.....	41
Figure 15: La technique de contact direct sur milieu gélosé	43
Figure 16: Méthode de détermination de la CMB en milieu gélose.....	44
Figure 17: Illustration de la méthode des microatmosphères (Zaika, 1988).....	45
Figure.18: Le rendement d'extraction des huiles essentielles des trois espèces étudiées.....	49

Figure 19: Activité antibactérienne des HE visà vis de <i>P.a</i> selon la méthode de l'aromatogramme.....	52
Figure 20: Activité antibactérienne des HE visà vis de <i>S.a</i> selon la méthode de l'aromatogramme	53
Figure 21: Activité antibactérienne des HE visà vis de <i>MRSA</i> selon la méthode de l'aromatogramme	53
Figure 22: La concentration minimale inhibitrice (CMI) d' <i>Eucalyptus</i> de la souche <i>S.a</i>	54
Figure 23: La concentration minimale inhibitrice (CMI) de <i>Romarin</i> de la souche <i>S.a</i>	54
Figure 24: Détermination d'HE d' <i>Eucalyptus</i> contre les deux souches bactériennes.....	56
Figure 25: Détermination d'HE de <i>Romarin</i> contre les deux souches bactérienne.....	57
Figure 26: Activité antibactérienne des HE visà vis de <i>P.a</i> selon la méthode de micro-atmosphère.....	58
Figure 27: Activité antibactérienne des HE visà vis de <i>S.a</i> selon la méthode de micro-atmosphère.....	58
Figure28: Méthode micro atmosphérique avec la souche <i>MRSA</i>	59
Figure 29 Test antibiogramme avec les souches bactériennes.....	60

Liste des Abréviations

%	: pourcentage.
°C	: degré Celsius.
µg	: micro gramme
<i>a</i>	: <i>aspergillus</i>
AFNOR	: Association Française de Normalisation
Amc	: Amoxicilin+Acide clavulanic
ATCC	: American type culture collection
BN	: Bouillon nutritif
CMB	: Concentration minimale bactéricide
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
CPG	: Chromatographe en phase gazeuse.
DMSO	: diméthyle sulfoxyde
DO	: densité optique
<i>E</i>	: <i>Eucalyptus</i>
g	: gramme
Gram-	: Gram négatif
Gram+	: Gram positif
H %	: taux d'humidité.
HE	: huile essentielle.
M	: masse d'huile essentielle.
M ₀	: masse de la plante fraîche
M ₁	: masse de la plante sèche.
McF	: Mac Farland
MH	: Mueller-Hinton
ml	: millilitre.
mm	: millimètre
MRSA	: <i>Staphylococcus aureus</i> résiste a la méthicilline
Ni	: Nitroxoline
OMS	: l'organisation Mondiale de la santé.
Ox	: Auxacilline
<i>P</i>	: <i>Pistachier</i>

P.a : *Pseudomonase aeruginosa*

Pc : Penicilline

Pm : poids moléculaire.

R : *Romarin*

R : rendement.

S.a : *Staphylococcus aureus*

Sxt : Trimethoprin+Sulfamethoxazole

UFC : Unité formant colonie

A decorative border of blue roses and butterflies. The roses are in various stages of bloom, with some fully open and others as buds. The butterflies are a mix of brown and yellow-orange, with intricate patterns on their wings. The entire border is set against a white background.

INTRODUCTION

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter la recherche vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments. **(Belaïche, 1979).**

L'*Eucalyptus*, le *Romarin* et le *Pistachier* sont des plantes assez répandues, elles sont largement utilisées en médecine populaire en raison de ses multiples effets thérapeutiques. Elles sont préconisées, entre autres, dans le traitement des diarrhées, de l'infection respiratoire, cutanée et urinaire. **(Purchon, 1999 ; Huard et Huard, 1981).**

Cette exploitation du potentiel chimique des agro ressources passe par une première étape d'extraction des composés spécifiques d'une espèce botanique sélectionnée. Ceux-ci, en général, correspondent à des molécules à forte valeur ajoutée, mais présents en faible quantité. De nouveaux procédés d'extraction peuvent donc être utilisés de façon à obtenir ces constituants dans une fraction de concentration maximale et dans un état chimique le plus proche possible de leur structure native. **(Rose, 1965).**

Parmi ces constituants, on rencontre des composés ayant une activité biologique, ainsi qu'une activité olfactive. Ces composés font partie d'un ensemble dénommé « huile essentielle ». **(Ghoul., Abdellaout, 1997).**

Le présent travail est une étude visant la détermination de l'activité antibactérienne in vitro d'huile essentielle de ces plantes, vis-à-vis a un certain nombre de Germes impliqués dans différentes maladies à savoir : *Staphylococcus aureus*, *MRSA* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Cette étude a été structurée en trois parties essentielles :

La première partie concerne une synthèse bibliographique qui rassemble une étude botanique de nos plantes étudiées, les huiles essentielles, les méthodes d'extraction et d'analyses et leur activité biologique.

Une deuxième partie expérimentale qui consiste à présenter le matériel et les méthodes d'extraction par hydro-distillation et l'évaluation de l'activité antimicrobienne

La dernière partie présente les résultats expérimentaux obtenus et leur discussion.



PARTIE
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE



Chapitre I

*ETUDE
BOTANIQUE
DES
PLANTES*



I.1- INTRODUCTION

Il faut rappeler que l'exploitation du végétal pour produire des remèdes ne date pas d'aujourd'hui. De tout temps, l'homme a cherché à exploiter le végétal pour se nourrir et pour produire de l'énergie, mais aussi pour construire, améliorer et agrémenter son habitat, pour se protéger et se vêtir, pour se déplacer et transporter, pour décorer, etc. A ces utilisations plus ou moins directes et plus ou moins élaborées du végétal comme source de matériau, il faut ajouter celles des multiples molécules extraites du végétal dont les applications rejoignent le domaine des matériaux, à travers par exemple les produits de thérapeutiques traditionnelles qui sont fondées essentiellement sur l'utilisation d'extraits ou de principes actifs des plantes (**Chadefavd et Emberger., 1960**).

Ces exploitations du végétal, souvent concurrentes, ont donné lieu au développement de filières de production des médicaments à base des matières premières végétales et de transformations industrielles spécialisées. Un exemple classique est celui de la médecine traditionnelle et son utilisation dans les soins de santé et reconnaître l'importance des plantes médicinales (**Dubourg., 1992**).

De nombreux pays en développement, témoigne de la réalité de filières d'exploitation du végétal pour la production d'un remède.

La science qui en étudie la provenance, l'aspect, la composition et la façon de les appliquer s'appelle pharmacognosie son objet et également de découvrir de nouvelle plante médicinale de les récolter et de les cultiver (**Flangen, 1977**).

Les plantes utilisées dans le cadre de ce travail sont le *Romarin*, l'*Eucalyptus* et le *Pistachier*. Dans ce qui suit, on présentera une description botanique de ces trois plantes.

I.2 - Le Romarin

I.2.1 - Définition

Le *Romarin* est connu sous le nom de *Rosmarinus officinalis*, herbe aux couronnes, herbe aux couronnes, herbe aux troubadours.

Il appartient à la famille des labiacées est linné selon **Vernon et Richard (1976)** l'unique espèce du genre *Rosmarinus*.

L'étymologie de *Romarin* est le latin *Rosmaris*, ou la rosée marine, expression qui d'écrit merveilleusement l'humidité abondante des rivages particulièrement appréciés par cette plante qu'on appelle d'ailleurs rose marine ou encensier.

Cette labiacée typiquement méditerranéenne se cultive, cependant, très bien loin de son pays d'origine (**Bianchinie et Corbitta ,1975**).

I.2.2 - Description botanique

a) Origine botanique

Synonymes : encensier, rosaniline, herbe aux couronnes *Rosmarinus, Anthos, Libanotis*.

Nom botanique : *Rosmarinus officinalis.L*

Nom vernaculaire : klil, hatssa loupant, hassani, lazzi, azur, ouzbir, aklel, touzala.

Récolte : printemps- été (**Mahmoudi ,1992**).

b) Classification botanique

La classification botanique complète du *Romarin* n'a été achevée qu'au début de notre siècle en raison de l'extrême variabilité des espèces (tableau 1)

En effet, trois espèces du genre *Rosmarinus.L* ont été décrites : *Rosmarinus officinalis.L*, *Rosmarinus eriocalyx* et *Rosmarinus tomentosus*. (**Ouezem, 1963**)

Tableau 1 : Classification botanique du *Romarin*.

Classification	Espèces
Règne	Végétal
Embranchement	Phanérogames
S/embranchements	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Dialypétales
Famille	Labiées
Genre	Rosmarinus

Source : Boumlik, 1995.

c) Caractères généraux

Parmi les trois espèces de *Rosmarinus* le citées précédemment nous nous intéresserons au genre *Rosmarinus officinalis .L*, qui illustré dans la figure 1.

Rosmarinus officinalis.L est un arbrisseau toujours vert, fortement ramifié, haut de 10 à 50 cm, les feuilles sont sessiles, linéaires, coriaces, à face de poils blancs à gris. Les fleurs bilabées violet pâle, rarement blanches. L'inflorescence est un épi.

Terminale de faux verticilles, la corolle est bilabée 2/3, 2 étamines seulement sont fertiles Son fruit se compose de 4 petits achènes (tétrachène), luisants, d'un brun foncé (**Crete, 1965**).

A l'intérieur de chaque achène se trouve un embryon dépourvu d'albumen, à cotylédon bondés

Les glandes sécrétrices et/ou les cellules odoriférantes des quelles est extraite l'huile essentielle se trouvent essentiellement dans les feuilles et les sommités fleurir (**Beniston et al., 1984**).

Faite exceptionnels dans notre flore, la floraison a lieu toute l'année, elle est cependant plus importante d'avril à septembre (**Vernon et Richard, 1976**).



Figure 1- *Rosmarinus officinalis*.L (Google)

d) Habitat

Le *Romarin* tiré commun dans toute la région méditerranéenne, on la cultive communément dans les jardins (**Mahmoudi, 1992**).

Le *Romarin* demande un sol moyennement sec, calcaire, humifère, riche en éléments nutritifs, et une station abritée. Multiplication peut se faire par boutures. En plaçant celle-ci à sons châssis à la fin du printemps ou au début de l'été.

Dans les cultures à grande échelle, la multiplication se fait par semis. Le *Romarin* ne résiste ni au soleil intense ni à l'excès d'humidité, il est aussi spécialement sensible à la gelée et à un certain stade de développement. (**Flangen ,1977**).

e) Distribution géographique

Son aire géographique est spécifiquement méditerranéenne en France, elle est limitée à une bande côtière assez étroite s'étendant des alpes aux Pyrénées.

Et dans la péninsule ibérique situé au sud du Portugal et aussi en Afrique, on le trouve au Maroc, en Algérie à l'Egypte et au Liban (**Vernon et Richard, 1976**).

En Algérie le *Romarin* est une espèce végétale très répandue par exemple à

M'sila: 45000 ha

Ain temouchent: 800 ha

Bejaia : 500 ha

f) Composition biochimique

Il y a à peine un demi-siècle, et avec l'avènement des méthodes d'analyse, que l'identification des extraits de *Romarin* a commencé.

En **1961, Jaspersen- Schib et Flueck** confirment, par chromatographie sur couche mince, la présence de : bornéol, cinéole, limonène, acétate de bornyle, pinène.

En **1963** par chromatographe gaz liquide et spectrométrie infrarouge, **Schwenker et Klohen**.

Apportent la contribution sans doute la plus importante à l'étude du *Romarin*. Ils parviennent à séparer et à identifier : α pinène, β pinène, camphène, myrcène, limonène, 1,8-cinéole, p-cymène, linalol, caryophyllène, camphre, acétate de bornyle, bornéole, humilène.

-L'analyse par chromatographie en phase gazeuse a permis de détecter certains composés qui sont (**Vernom et Richard ,1976**) :

✚ Le camphène,

✚ A pinène,

✚ 1,8 - cinéol.

✚ Acétate de bornyle.

j) Domaine d'application

Depuis très longtemps, le *Romarin* est utilisé à des fins diverses ; la partie utilisée c'est les feuilles et les sommités fleuries (**Lucienne et al., 1980 ; Mahmoudi 1992**).

Le *Romarin* sert à la préparation de l'essence de *Romarin* et d'un extrait alcoolique appelle teinture de romarin, ces deux produits entrent dans la composition d'onguents et d'autres préparations pharmaceutiques à usage externe.

Le *Romarin* est aussi utilisée dans les liniments pour tarte le rhumatisme et la sciatique.

En usage interne, le *Romarin* favorise la digestion, il est diurétique, fortifiant des nerfs, carminatif et hypertenseur (**Flangen, 1977**).

I.3 - L'*Eucalyptus*

I.3.1 - Définition

L'*Eucalyptus* arbre à feuillage persistant, d'origine Australienne et peut atteindre à l'âge adulte 90 mètres. Les familles aromatiques sont bleues grise sur leur face externe et plus claires sur leur face interne (**Harding, 2004**). L'*Eucalyptus* est très cultivé en Afrique du nord (*Eucalyptus globulus*, *E camaldulensis*, *E gomphocephala*) où il joue un rôle économique important (**Chadefavd et Emberger, 1960**) et est d'exilons bois de construction. L'essence est obtenue par distillations d'*Eucalyptus globulus*, il existe plus de 600 espèces d'eucalyptus (**Guignard et al., 2004**).

I.3.2 - Description botanique

Nom vernaculaire : arbre à la fièvre (**Bianchinie et Courbetta, 1975**). D'après **Crete (1965)** le nom vernaculaire de l'*Eucalyptus* est gommier bleu.

a). Différents espèces d'*Eucalyptus*

Eucalyptus compte diverses espèces les plus importants sont :

E. robustus est un petit arbre (12 m) à écorce persistante, feuille large et fleur rouge, sauvant planté en terrain marécageux.

E. résinifier est un grand arbre (40m) à écorce persistante, feuilles étroites et fleurs jaunâtres.

E. globulus est un grand arbre (40m) à écorce lisse, caduque, feuilles assez étroites et arquées et grand fleur blanchâtre. C'est l'espèce le plus répandu en Europe, elle préfère les sols humides, redoute les froids au-dessous de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$

E.camaldulensis est un petit arbre (50m) à écorce lisse, caduque, feuilles étroites, et fleurs rouges.

E.viminalis est un grand arbre (50 m) à écorce lisse, caduque, feuilles très étroites et fleurs rouge (**Becker et al., 1983**).

b) Classifications

L'*Eucalyptus* appartient à la famille des myrtacées (**Richard, 1974**), il peut être classé en plusieurs désignations botaniques (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification botanique d'*Eucalyptus*.

Classification	Espèce
Règne	Végétale
Embranchement	Phanérogames
S/ embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédone
S/classe	Dialypétales
Série	Caliciflores
S/série	Diplo-méristémones
Ordre	Mytales
Famille	Myrtacées
Tribu	Leptospermées
Genre	<i>Eucalyptus</i>

Source : Richard, 1974.

c) Caractères généraux

Beaucoup d'espèces sont des arbres de grande taille, l'*E.amygdalin* peut atteindre 150 m de circonférence.

Les *Eucalyptus* présentent souvent un dimorphisme foliaire. Chez l'*E.globulus* le très jeune pied a une tige verte, quadrangulaire, portant des feuilles dépourvues de pétiole opposées est à limbe droit, horizontal. Le parenchyme palissadique se localise uniquement sous l'épiderme supérieur. Sur les pieds plus âgés, les feuilles sont alternés, pétiolées et à limbe plus ou moins falciforme.

Les deux faces de la feuille sont éclairées également et sont par suite toutes dépourvues de tissu plasmatique.

Chez les *Eucalyptus*, les fleurs à 4-5 pétales très réduits, presque inexistantes par fois soudés en un capiton caduque protègent les jeunes étamines. L'ovaire triloculaire ou quadri loculaire se transforme en une capsule, déhiscente au sommet (**Crete, 1965**).

Le fruit de cette espèce est une capsule lignifiée qui s'ouvre au sommet et libéré de nombreuses petites graines (**Becker et al., 1983**)



Figure 2 : Des photos illustrant l'arbre et les feuilles d'*Eucalyptus* (Google).

d) Habitat

Leur Comportement aux climats est variable selon les espèces ; mais rares sont-elles qui tolèrent des températures inférieures à $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Beaucoup ne tolèrent pas le calcaire. Des essais d'acclimatation sont en cours et, pour le moment, c'est surtout dans le midi et encore que l'on peut les rencontrer, en ornement, mais aussi en reboisement (**Becker et al., 1983**).

Les *Eucalyptus* ont été introduits dans de nombreuses régions pour dessécher des terrains marécageux, leur croissance très rapide exigeant une importante consommation d'eau (**Crete, 1965**).

e) Distribution géographique

Dans le monde l'*Eucalyptus* bel arbre ornementale originaire de l'Australie méridionale. L'Eucalyptus est acclimaté en Provence, Espagne, Italie, Algérie, en Amérique du nord (Mexique, Floride, californiens), en Amérique du sud (brésil, chili) (**Lucienne et al., 1980**).

f) Domaine d'application

Du fait de leurs richesses en principes actifs ; les feuilles des rameaux âgés (**Lucienne et al., 1980**), est la partie la plus utilisée.

Elles ont une odeur fortement aromatique et une saveur à la fois aromatique et amère. Grâce à la présence d'un tanin, l'*Eucalyptus* a une action toxique et astringente. Mais il doit surtout sa réputation à une huile essentielle.

L'*Eucalyptus* où il est conseillé pour l'asthme et les bronchites chronique, comme antiseptique, dans les affections des voies respiratoires, de l'appareil urinaire et intestinal les fumigations et les inhalations sont utiles contre la toux. Pour les asthmatiques on conseille les pastilles et les cigarettes préparées avec les feuilles séchées à l'ombre fièvre (**Flangen, 1977**).

Les feuilles de l'*Eucalyptus officinal* sont hypoglycémiantes et qu'elles contiennent une substance, vraisemblablement un tanin, possèdent une action détoxifiante vis-à-vis des toxines diphtériques et tétaniques et se montrant antimicrobienne sur les bactéries Gram (**Lucienne et al., 1980**).

I.4 - Le Pistachier de l'atlas

I.4.1- Définition

Le *Pistachier* est un arbuste de 3 à 5 m de long, à rameaux rougeâtres et à odeur résineuse ; feuilles à rachis finement ailé ; inflorescences en grappes lâches ; fruits globuleux de couleur rouge-brun renfermant une graine verte.

C'est une espèce nord-africaine, endémique, relativement commune dans toute l'Algérie avec une prédilection pour les lieux arides; mais elle est moins réponde dans le sahara (**Baba Aissa, 2011**).

I.4.2- Description botanique

Une des premières descriptions du *Pistachier* de l'atlas remonte à 1799 .Une des plus récentes phylogénies de *Pistacia atlantica* Desf. *Subsp. atlantica* a été présentée par **APG II (2003)** puis **Thorne et reveal (2007)** (Tableau 3).

Tableau 3 : Systématique de *Pistacia atlantica* desf. Subsp *atlantica*.

Division	Angiosperms*
Classe	Eudicots*
Sous-classe	Core eudicots*
Super-ordre	Rosids*
Sous-ordre	Eurosids ii*
Ordre	Sapindales dumort. (1829)**
Famille	Anacardiaceae r.br. (1818) ou pistaciaceae martinov (1820) Ou terebinthaceae juss. (1789)**
Sous –famille	Anacardioideae link (1831) ou pistacioideae burnett (1835) **
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>atlantica. Atlantica</i> desf
Subsp	<i>Pistacia Atlantica</i> desf. <i>Atlantica</i>

Source : Thorne et Reveal., 2007, APG II., 2003.

* taxon confirmé par **APG II 2003**

** taxon confirmé par **Thorne et Reveal, 2007**

Le Pistachier de l'atlas : *Pistacia atlantica* desf. En latin.

-*elbetoum, botma, betouma* ou *btouma*, en arabe local

-*iggh*, en berbère.

Est un bel arbre ayant été décrit dans divers ouvrages scientifiques.

a) Caractéristique botanique

Le *Pistacia atlantica* desf. Est un arbre dioïque, de 15-20m de hauteur, à tronc pouvant atteindre 1m de diamètre avec une couronne arrondie et très volumineuse (**El Oualidi et al., 2004**) (figure 3).

➤ les feuilles

Elles sont caduques, composées de sept à neuf folioles lancéolées, un peu ondulées, glabres et portées sur un pétiole légèrement ailé (**Cuvier, 1826 in Amara, 2009**). Ces feuilles, relativement grandes, rougissent à l'automne puis tombent (**Daget et Godron, 1974**).



Figure 3 : Des photos illustrant l'arbre et les feuilles du pistachier de l'atlas (*Pistacia atlantica* Desf.) (Sifi 2010).

b) Répartition géographique

Pistacia atlantica occupent une aire très vaste, englobant la région nord-africaine, Asie tempérée et tropicale, Europe (**Khaldi et al 1996**).

Quezel et Santa (1963), précisent qu'en Algérie, le *betoum* est assez commun, sauf dans les zones très arrosées. Il existe à l'état disséminé, dans la région de Djelfa, de Laghouat et de Ghardaïa (**Belhadj, 2001**).



Chapitre II

LES HUILES ESSENTIELLES



II.1 - Historique

Pendant des millénaires l'utilisation des plantes fut le principal recours de l'homme pour lutter contre les maladies. Peu à peu, l'homme ne se contenta plus de préconiser l'emploi des plantes telles qu'elles se trouvaient dans la nature, mais à en extraire les principes actifs comme les huiles essentielles.

Depuis la plus haute antiquité, les parfums et arômes furent utilisés. Ils furent étroitement associés à la vie spirituelle (Egypte, Arabe), ainsi qu'à l'histoire de la médecine (Grèce, Empire romain, Empire Arabe). Au premier millénaire avant notre ère, l'usage des parfums était déjà connu en Chine (**Ben bouali, 2002**).

Les Arabes découvrirent, vers la fin du $X^{\text{ème}}$ siècle, (alors que l'Europe était au moyen âge), la distillation des plantes, Ibnou Sina, médecin et philosophe musulman (980-1027), fut l'un des premiers à élaborer un procédé d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau (**Nahar et al., 2004**).

Au début de la Renaissance (en Europe) vers le $XIV^{\text{ème}}$ siècle, des manuscrits vénitiens mentionnent les huiles essentielles de *Sauge* et de *Romarin* (**Ben bouali, 2002**).

Au début du $XVI^{\text{ème}}$ siècle, Paracelse, médecin suisse, considéré comme le père de la pharmacochimie étudia l'extraction de « l'âme » des végétaux sous forme de « quintessence » ou « cinquième essence » à laquelle on donnera le nom « d'esprit » : puis « d'essence » et « d'huiles essentielles » (**Nahar et al., 2004**).

Au $XVII^{\text{ème}}$ siècle, les pharmaciens utilisaient ces produits grâce à l'effet thérapeutique de certaines herbes.

Le $XIX^{\text{ème}}$ siècle vit apparaître les premières analyses mettant en évidence que tous les hydrocarbures terpéniques sont formés de suites d'unités isopréniques (C_5H_8) et, c'est en 1866 que Kekulé donnera l'appellation des « terpènes », alors que la découverte de la règle « isoprénique » par **Otto Wallach (1877)**, lui valut de recevoir le prix de Nobel en chimie, 1910.

En 1939, **Léopold Ruzicka** reçut, également, le prix Nobel de chimie pour la mise en évidence de la présence de poly-terpènes qui sont composants des huiles essentielles.

Autre fois, considérés comme les espèces définies, les essences livrent peu à peu leurs secrets depuis l'avènement de la chimie organique à la fin du *XIX^{ème}* siècle.

Au début du *XIX^{ème}* siècle, la grande révolution industrielle a tout misé sur l'essor de la chimie de synthèse délaissant les substances végétales phyto-aromatique. A l'heure actuelle les huiles essentielles représentant la base de l'industrie des parfums, cosmétiques et des médicaments qui constituent une ressource non négligeable pour un bon nombre de pays.

II.2- Définition

Les huiles essentielles sont des liquides aromatiques appelées aussi essences aromatiques. Elles sont produites et emmagasinées dans certains cellules de la matière végétale et se retrouvent naturellement dans diverses parties des plantes, des fleurs, des fruits, des bois et des épices. Elles constituent la plus grande force vitale de la plante (**Ben ziane, 2004 ; Benzaamia, 2005**).

Scientifiquement, l'essence est la sécrétion d'un mélange plus ou moins complexe dont les constituants jouent du point de vue de leur parfum des rôles d'inégales importances, le terme « essentielle » se comprenant comme la caractéristique de la plante.

La densité de la plupart des huiles essentielles est inférieure à la densité de l'eau et généralement compris entre 0,759 et 0,990 (**Ghoul, Aabdellaout, 1997**).

En principe, toutes les parties d'une plante contiennent ces huiles essentielles, mais elles sont souvent majoritairement dans l'une d'elles.

La teneur des plantes en huiles est faible de 1 à 3% (**Nahar et al., 2004**).

Les huiles essentielles se distinguent des huiles fixes et des lipides par leur volatilité, qui augmente avec la chaleur.

On regroupe les huiles essentielles en 11 familles de substances chimiques (**Rahmani et Boutkil, 1998**) qui sont :

-les esters ; - les phénols ; -les lactones et coumarines ; - les oxydes ; - les alcools ; - les cétones ; - les acides ; - les aldéhydes aromatiques ; - les aldéhydes ; - les sesquiterpènes ; - les mono terpènes.

En industrie agroalimentaire, les huiles essentielles sont des matières grasses liquides à température ordinaire, extraient des végétaux (*olive, colza, arachide...*) et utilisés en cuisine pour les sauces et les fritures.

En phytopharmacie, elles sont utilisées dans la préparation de très nombreuses spécialités phytosanitaires, elles constituent des éléments nutritifs, énergétiques et riches en vitamine A, D et E (**Ben bouali, 2002**).

II.3- Répartition

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal, ils n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, il y aurait après «lawrence» 175000 espèces aromatique. Cependant elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles : Conifères, Rutacées, Ombellifères, Myrtacées, Lamiacées, Poacées. Elles sont situées dans des glanes minuscules dans différentes parties de plante aromatique et rares sont les plantes dans lesquelles il se concentre dans un seule organe. Tous les organes peuvent en renfermer, surtout les feuilles et les sommités fleuries, mais on en trouve dans les racines ou rhizomes (vétiver, gingembre), dans les écorces (cannelles), le bois (camphrier), les fruits (poivres et le citron), les grains (muscade et la coriandre), même dans les feuilles (le basilic) (**Bruneton, 2009 in Laghouitr Oum Kelthoum, 2012**).

II.4- Localisation

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal pour les familles à haute teneur en matières odorantes comme les labiacées. Elles sont alors stockées dans des cellules à huiles essentielles, dans des poils sécréteurs (lamiaceae), dans des poches sécrétrices (myrtceae ou rutaceae) ou dans des canaux sécréteurs (apiaciaceae ou asteraceae) .elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essences sont localisées dans les tissus internes :c'est le cas des rhizomes de fougère mâle par exemple(**Bruneton, 2009 in Laghouitr Oum Kelthoum, 2012**).

Sur le site de stockage, les goutteles d'huiles essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associées à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air.

II.5- Rôle des huiles essentielles dans la nature

Le rôle des huiles essentielles dans la physiologie de la plante reste encore mal connu. Elles semblent avoir une action sur les plantes elles-mêmes et sur les consommateurs des chaînes alimentaires. Toutefois, les parfums émis jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs. De plus, en règle générale, elles constituent un moyen de défense naturel contre les insectes prédateurs et les microorganismes. Les substances émises sont dans ce dernier cas appelées « phytoalexines ». Ce type de toxine n'est produit qu'en cas d'infection et n'entre donc pas dans la composition d'une huile essentielle provenant d'une plante saine. La sauge libère quant à elle des substances dans l'atmosphère telles du cinéole, du camphre et d'autres composés voisins afin d'inhiber la germination et le développement d'espèces prairiales en concurrence. Ces composés agissent par absorption dans un sol sec (**Guignard et al., 1985**).

L'intérêt pour les produits naturels dans l'alimentation et dans l'industrie pharmaceutique grandissant, **Baratta et al. (1998)** ont réalisé une expérience visant à mettre en évidence les propriétés biologiques de plusieurs huiles essentielles. Leurs propriétés antiseptiques se révèlent utiles contre les parasites tels que les poux. Elles pouvant avoir un rôle télétoxique sur les plantes par les agents allélopathiques et les inhibiteurs de germination (**Guignard et al 1985**).

Par d'autres façons on peut dire que les huiles essentielles sont des ressources énergétiques et catalytiques qui facilitent certaines réactions chimiques conservent l'humidité des plantes dans les climats désertiques (**Belhadj et al., 2003**).

II.6- Compositions chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles est très complexe, généralement de nombreux constituants appartiennent à deux grandes familles chimiques d'origine biogénétiques distinctes selon la voie métabolique empruntée ou utilisée (**Arnaud, 1985**).

Les huiles essentielles sont constituées de :

❖ Les composés terpéniques

Ce sont des hydrocarbures cycliques et volatils, se trouvant dans les essences naturelles. Ils sont en grande partie responsables de l'odeur caractéristique des huiles.

Dans les huiles essentielles, nous retrouvons exclusivement des mono- et sesquiterpènes.

Les terpènes sont très répandus dans la nature et surtout dans les plantes comme constituantes des huiles essentielles (**Bendekken, 1994**).

II : Les huiles essentielles

Ces composés sont de structure chimique variée, ils peuvent être acycliques, monocycliques, bi cycliques ou même tricycliques.

Nous pouvons avoir les différents types des terpènes comme c'est illustré dans la figure 4, les héli terpènes, les poly terpènes, les squiterpènes, les tétraterpènes, etc...

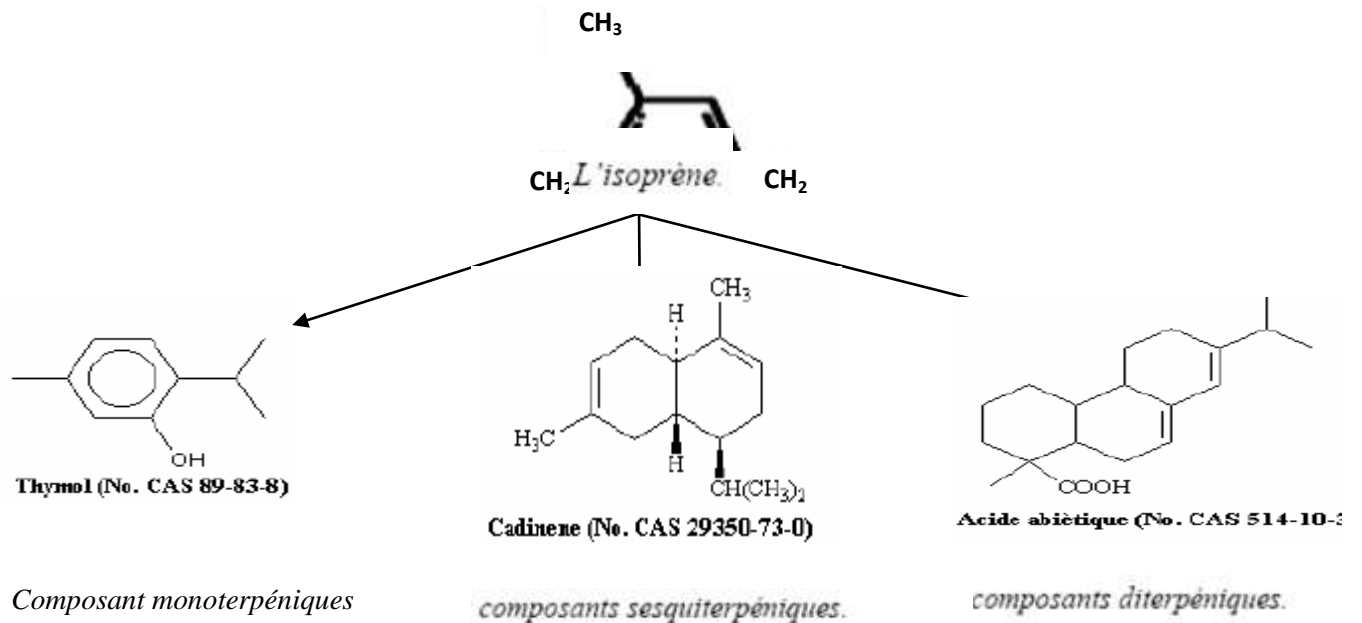


Figure. 4 : Exemples des composés d'huile essentielle.

➤ Les composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoïdes, ce sont des arènes issues d'une voie métabolique secondaire.

Les huiles essentielles sont aussi constituées de composés aromatiques hydrocarbonés, riches en terpènes, parfois oxygénés (rose, menthe, etc...), sulfurés; les esters, les acides, les aldéhydes de la série terpénique, les composés phénoliques, les alcools (qui jouent un rôle très important dans les principes odorants des plantes végétales (Ghoul, Aabdellaout, 1997), les monoterpénols, les sesquiterpénols, les diterpénols (Benziane 2004 ; Benzaaamia, 2005), les cétones non terpénique, les cétones acycliques; les phénols (Berigand, 2002), les quinones (Ghoul et Aabdellaout, 1997).

➤ **Autres familles biochimiques :**

- Azulènes : ce sont des hydrocarbures bicyclique aromatiques ;
- Coumarines : malgré leur faible concentration dans les huiles essentielles, leur action est puissante. Ce sont des esters intramoléculaires aromatiques (**Ben ziane, 2004 et Benzaaamia, 2005**).

II.7- Les propriétés fondamentales des huiles essentielles

Autrefois et jusqu'à 1960, ces propriétés étaient utilisées pour détecter les huiles naturelles de celles reconstituées (**Hachemi, 2002**).

II.7.1- Propriétés organoleptiques

Les huiles essentielles se caractérisent par certaines propriétés dont les plus importantes (**Hachemi, 2002**) sont :

- Etat liquide en générale à température ambiante.
- Volatilité à température ambiante (odorante).
- Couleur général incolore à jaune pâle mis à part l'huile essentielle de *camomille* romaine est de couleur bleue claire.

II.7.2- Les propriétés physiques

Les huiles essentiellement possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques.

En effet, elles sont généralement moins denses que l'eau (exception faite des huiles essentielles, girofle et saffran).

Les huiles essentielles sont peu polaires et peu solubles dans l'eau, mais solubles la plupart des solvants organiques et à titre élevé dans les alcools.

Elle peut Sensible à l'oxydation et ont généralement tendance à se polymériser pour former des produits résineux, ce qui rend leur conservation limitée (**Bernard et al, 1998**).

II.7.3- Les propriétés chimiques

Les propriétés chimiques sont caractérisées par l'indice d'acide, d'indice d'ester et l'indice d'hydroxyle, ainsi que par le dosage de quelques composés majoritaires, tels que les phénols, les terpènes, les cétones et les cinéols (**Bernard et al, 1998**).

II.7.4- Les propriétés antiseptiques

Les huiles essentielles ont une action bactériolytique et non pas seulement bactériostatique vis-à-vis des microbes et des virus pathogènes (**Buronzo, 2008 ; Zhiri, 2006**).

II.7.5- Propriétés pharmacologiques

Il arrive souvent que l'on confonde l'activité d'une huile essentielle avec celle de la plante dont elle est issue. Il faut savoir qu'une telle superposition n'est que rarement possible.

Par ailleurs, si l'on peut étudier et décrire les effets biologique et/ou pharmacologique d'un mono terpène, d'un sesquiterpène ou d'un alkyl benzène pur, il est difficile, parfois impossible de parler de pharmacologie d'une huile essentielle, c'est-à-dire d'un mélange.

L'éventail des propriétés attribuées (et parfois expérimentalement démontrées) aux huiles essentielles est assez large ; cependant quelques propriétés fondamentales se dégagent parmi lesquelles nous pouvons citer : les propriétés spasmolytiques sédatives et irritantes (**Naas et Saidani, 2001**).

II.7.6- Le pouvoir osmotique

Le pouvoir osmotique est pris en considération dans les domaines cosmétiques, kinésithérapie et en balnéothérapie (**Balkz, 1986**).

II.8- Conditions de conservation et stockage

L'huile essentielle se conserve parfaitement bien quelques années, à l'abri de la chaleur et de la lumière pour préserver leur qualité. Avec le temps, elles s'oxydent, ce phénomène étant amplifié par la chaleur, l'air, la lumière...

On a d'ailleurs retrouvé des essences dans des doubles jarres en terre cuite dans les pyramides d'Egypte. Des flacons en verre teinté anti-actinique, brun ou de l'aluminium vitrifié vernissé, en acier inoxydable, presque entièrement remplis et fermés de façon étanche (l'espace libre étant rempli d'azote ou d'un autre gaz inerte) sont nécessaires à la bonne conservation des huiles essentielles. Après un an ou deux, on n'utilise plus les huiles

essentielles en traitement interne .Elles peuvent toutefois servir dans les diffuseurs d'arômes, sans inconvénient (**Buronzo, 2008**).Une essence bien distillée se conserve trois ans ou moins.

La relative instabilité des molécules constitutives des HE implique des précautions particulières pour leur conservation. En effet, les possibilités de dégradation sont nombreuses, facilement objectivées par la mesure d'indices chimiques (indice d'acide...), par la détermination de grandeurs physiques (indice de réfraction, pouvoir rotatoire, densité...) et/ou par l'analyse chromatographique. Les dégradations pouvant modifier les propriétés et/ou mettre en cause l'innocuité de l'huile essentielle. Dans certains cas, un antioxydant approprié peut être ajouté à l'huile essentielle. Dans ce cas, cet additif est mentionné lors de la vente ou l'utilisation d'huile essentielle. Par ailleurs des incompatibilités sérieuses peuvent exister avec certains conditionnements en matières plastiques. Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des HE. (**AFNOR, 2000, in Laghouitr Oum Kelthoum, 2012 ; Bardeau, 2009**).

II.9- Domaine d'utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être utilisées dans les cas suivants : friction, inhalation, vaporisation, bain aromatique, diffusion, bain de pieds en compresse, massage et soin de la peau...

Dans certains cas, il est possible d'en faire un usage interne, mais il ne fait pas dépasser trois gouttes par jour, sauf sur conseil d'un thérapeute (**Huardet, 1981**).Différents secteurs utilisent les huiles essentielles, à l'état naturel ou se forme d'isolats (des substances pures isolées de huile essentielle) tels que le pinène, la scarole, le linalol, le citral, le safrol. Comme matière première pour la synthèse des principes actifs médicamenteux, des vitamines, des substances odorantes, des parfums et des produits de cosmétologie (**Brunton, 1993 in Sifi 2010**).

- **En thérapeutique**

Les huiles essentielles, ont depuis longtemps été employées pour leurs effets thérapeutiques, c'est l'aromathérapie qui est l'art de la science d'utiliser ces huiles essentielles pour maintenir ou améliorer la santé et la beauté. Etymologiquement le mot aromathérapie signifie le traitement des maladies « thérapie » par les arômes (essences ou huiles essentielles) « arôma » (**Purchon, 1999 ; Huardet, 1981**). Les propriétés des huiles essentielles sont aujourd'hui mises en lumière par le progrès

scientifique ; elles sont antiseptiques, antimicrobienne, anti-infectieuses, cicatrisante, de plus certains revitalisent et stimulent l'énergie vital. Elles sont donc toniques, elles sont volatiles ce qui permet de les utiliser pour purifier l'atmosphère (**Purchon, 1999 ; Huardet, 1981**).

- **En parfumerie ou cosmétologie :**

Les huiles essentielles sont largement utilisées par les grands laboratoires de cosmétologie. Elles entrent la fabrication des parfums, eaux de toilette, savons et des détergents, crème cosmétique, shampooing, lotions et pommade de soin (**Huard et Huard, 1981**).

- **En agro-alimentaire**

Les huiles essentielles donnent la saveur aux condiments (poivre) et aux aromatisants (*Menthe, Anis, Oranger, Thym, Romarin, Laurier et Sauge*). Chacune de ces espèces doit en effet sa saveur à une ou plusieurs molécules aromatiques particulières, entrant dans la composition de son essence. Dans l'industrie agro-alimentaire, c'est les huiles essentielles qui sont très utilisées (confiserie) (**Huard et Huard, 1981**).

- **En entretien :**

Les huiles essentielles sont utilisées dans la fabrication des nettoyeurs ménagers pour le sol et murs, anti-moustique, en caustiques divers (**Grosjean, 2007**).



Chapitre III

Méthodes D'extraction et D'analyse des huiles essentielles



III.1- Introduction

Les huiles essentielles sont extraites de la matière végétale par différents procédés. Le choix de la technique dépend de la localisation histologique de l'essence dans le végétal et de son utilisation dans les diverses industries.

Les principales méthodes d'extraction peuvent être représentées comme suite:

- La distillation (racine, feuille).
- L'enfleurage (les fleurs).
- L'expression (fruit).

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au procédé d'hydro distillation puisque nous avons orienté notre étude vers l'extraction des HE dans les feuilles de ces plantes et qui est le plus adapté aux travaux que nous avons envisagé.

III.2- Extraction par distillation

La distillation est un procédé de séparation basé sur la différence de composition entre un liquide et la vapeur engendrée. La technique implique la condensation de la vapeur et la récupération des fractions liquides résultantes. On parle de distillation simple ou fractionnée

Lorsqu'il s'agit de liquides miscibles. On peut également procéder à la distillation de liquides non miscibles. C'est le cas de l'hydrodistillation des huiles essentielles (**Rose, 1965**). Deux méthodes de distillation sont principalement utilisées : l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation la distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage.

III. 2.1- L'hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique (figure 5).

Lors de la distillation des huiles essentielles, des phénomènes sont à la base d'échanges de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres sur la qualité et le rendement de la production.

Les expérimentations (**koedam, 1987 ; denny, 1988**) conduites jusqu'à épuisement du substrat en essence montrent que la durée de la distillation est plus longue pour les organes de plantes ligneuses que pour les herbacées. Cette différence est fortement liée à la localisation des structures d'élaboration ou de stockage des essences qui peuvent être superficielles ou

internes. De ce fait, elles ont une influence sur le déroulement de l'hydro distillation, c'est-à-dire sur les mécanismes successifs mis en jeu, et par conséquent sur la durée.

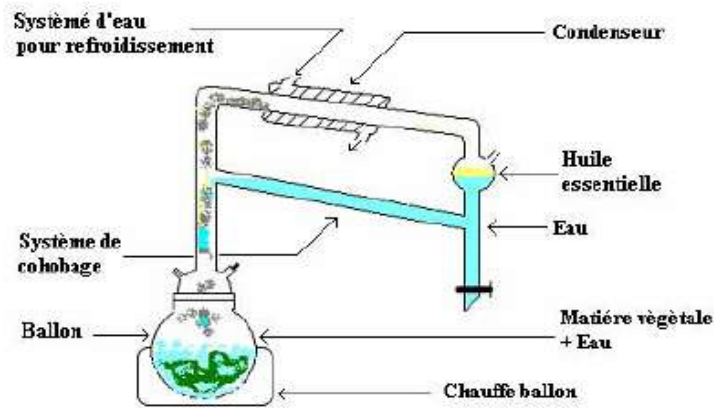


Figure 5. Montage d'hydrodistillation des huiles essentielles.

Dans le cas où ces structures sont superficielles, la membrane externe ou la cuticule qui constituent les seules barrières à la libération de l'huile essentielle, est vite rompue à ébullition, les composés volatils sont aussitôt évaporés. Lorsque les essences sont sous-cutanées, elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau ou sa vapeur. Elles sont alors évaporées comme dans le cas des sécrétions superficielles (**koedam, 1982**). En ce qui concerne la localisation des sites producteurs d'essence, les molécules odorantes sont rencontrées dans tous types d'organes : racine, tige, bois, écorce, feuille, fleur, fruit, etc... elles sont produites par diverses structures spécialement différenciées dont le nombre et les caractéristiques sont très variables (**Paupardin et al., 1990**).

Nous distinguons :

- Les poils glandulaires épidermiques rencontrés souvent chez les *labiaceae*, *Géraniaceae* et *Rutaceae*. Ils produisent les essences dites superficielles.
- Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant des cellules et des poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les *Myrtaceae*.

III.2.2- L'entraînement à la vapeur d'eau

C'est la méthode la plus courante, la matière végétale est placée dans un alambic, elle ne rentre pas en contact avec l'eau, par la suite, on fait passer la vapeur d'eau sous

pression, grâce à l'effet de la chaleur, les molécules d'essences contenues dans la matière végétale éclatent et l'essence s'évapore facilement (**Rahmani et Boutkil, 1998**).

III.2.3 – Procédé d'hydro-diffusion

Ce procédé consiste à pulvériser la vapeur d'eau de haut en bas à travers le végétal dispose dans un autoclave parallélépipédique grillagé.

Ce procédé consiste à récupérer l'huile essentielle des végétaux en faisant passer à travers ces derniers un courant de vapeur d'eau. Ces vapeurs saturées en composés organiques volatils sont condensées et récupérées par décantation.

Selon **Guenther (1972)**, les phénomènes intervenant lors de l'entraînement à la vapeur seraient des phénomènes d'osmose et de la diffusion libre.

Comme dans le cas de l'entraînement à la vapeur d'eau sèche, le matériel végétal n'est pas en contact direct avec l'eau mais avec la vapeur et le principe consiste à faire circuler celle-ci de haut en bas au travers du végétal.

Dans des conditions les cellules végétales sont soumises à une action Co-osmotique du flux de vapeur d'eau, l'extrait associé à l'eau condensée au contact du végétal s'écoule vers un collecteur. Ce procédé évite un grand nombre d'artefacts liés à une température excessive. Il donne des produits de qualité, riches en composés oxygénés, même de faible volatilité, qui sont, généralement, les plus recherchés (**Brunton., 1993, in Sifi 2010**).

III.2.4- Extraction par micro-onde

L'extraction de l'huile par la technique micro-onde donne de bons résultats avec des temps d'extraction considérablement réduits par rapport aux autres techniques. Sur d'autres produits, par exemple, le café. L'aspect quantitatif est satisfaisant et doit être développé.

Parmi l'ensemble des procédés d'extraction, une méthode utilisant une source de rayonnement micro-onde semble avoir un potentiel élevé.

Cette technique d'extraction est basée sur l'entraînement à la vapeur dans lequel l'énergie thermique est apportée par les micro-ondes.

La préparation d'extrait de la matière végétale utilisant un four micro-onde en présence de solvant a déjà donné des résultats intéressants (**Rahmani et Boutkil, 1998**).

III.3- Extraction par pressage

La mention « première pression à froid » signifie que l'huile a été obtenue par simple pression mécanique, à température contrôlée et filtrée sur du papier buvard ou centrifugée.

Aucun solvant ou produit chimique n'ont été utilisés pour la pression des fraudes, cette mention ne peut être employée que si l'huile a été chauffée à température comprise entre 25 à 60°C strictement nécessaire à son obtention.

Cependant certaines graines subissent un préchauffage avant pressage. Avec l'ancienne méthode, il était difficile d'obtenir une extraction efficace sans nuire à la qualité de l'huile et des tourteaux à cause de l'énorme pression et de chaleur engendrée par la machine.

Cette opération se fait à des pressions beaucoup moins considérables et avec dépense d'énergie moindre que dans le pressage mécanique seul (**Rahmani et Boutkil, 1998**).

III.4- Analyse chromatographique

L'analyse des huiles essentielles se fait par chromatographie en phase gazeuse (CPG) ; cette technique permet de séparer et d'identifier les constituants, dont l'échantillon est vaporisé et injecté au sommet de la colonne. La colonne est enfermée dans le four du CPG. La colonne peut être de deux types : colonne classique ou colonne capillaire (**Ougla, 1997**).

L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La température au sein du four peut être programmée.

La CPG reste l'une des techniques d'analyse la plus utilisée. L'identification des constituants d'une huile essentielle est difficilement réalisable uniquement par CPG (**Anton, 2005**).

Les paramètres chromatographiques tel que le temps de rétention, l'aire du pic, etc..., donnent une information sur la nature des molécules et fournissent une analyse qualitative et quantitative.



Chapitre IV

ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES



IV 1- INTROUCTION

L'utilisation des plantes aromatique et des huiles essentielles en thérapeutique, remonte aux temps les plus anciens (**Belaïche, 1979**).

De nombreuses études traitent des activités des huiles essentielles. Parmi ces activités, nous pouvons citer à titre d'exemple :

- ❖ Activité antibactérienne
- ❖ anti-oxydante
- ❖ Activité antifongique
- ❖ Activité anti-inflammatoire
- ❖ Activité antivirale
- ❖ Activité anticancéreuse

Les plantes aromatiques et épices sont utilisées, depuis des siècles, dans les préparations alimentaires non seulement pour la saveur qu'elles apportent mais, également, pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques.

IV.2- Activité antibactérienne

Les huiles essentielles de l'origan, le *Romarin*, la *Sauge*, le *Thym* et le *Clou* de girofle sont riches en composés phénoliques tels que l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le *Carvacrol* est le plus actif. Ces trois composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterico*, *Clostridium jejuni*, *Lactobacillus sake*, *Staphylococcus aureus* et *Helicobacter pylori* (**Fabian et al. 2006**).

Des études ont été consacrée à l'effet de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* contre la souche *staphylococcus aureus*, résistante à la *Méthicilline* ("*methicillin-resistant staphylococcus aureus*" ou *MRSA*) (**Chan et al., 1998**).

Cette huile, dont le composé majoritaire est le terpinène-4-ol, a montré une inhibition de croissance marquée *in vitro* contre la prolifération de *MRSA*.

D'autres familles de composés tels que des alcools, des aldéhydes et des cétones monoterpéniques (le géraniol, le linalool, le menthol, le terpinéol, le thujanol, le myrcénol, le citronellal, le néral, le thujone, le camphre et le carvone) ainsi que des phénylpropanes (cinnamaldéhyde) et des monoterpènes (γ -terpinène, ρ -cymène) présentent, aussi, des propriétés antibactériennes intéressantes (**Burt, 2004**).

IV.2- Le mode d'action des huiles essentielles

Bien que les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et leurs composants aient été examinés dans le passé, le mécanisme d'action n'a pas été étudié en détail (**Lambert *et al.* 2001**).

Plusieurs auteurs rapportent que les actions des huiles essentielles dans la cellule bactérienne sont :

- La dégradation de la paroi cellulaire
- La dégradation de la membrane cytoplasmique
- Dégradation des protéines membranaires
- Les fuites du contenu cellulaire.
- La coagulation du cytoplasme
- L'épuisement de la force motrice de protons.
- La destruction ou l'inactivation du matériel génétique (**Juven *et al.*, 1994 ; Ultee *et al.*, 1999 ; Oosterhaven *et al.* 1995 Ultee *et al.*, 1999**).

Les emplacements ou les mécanismes considérés comme sites d'action pour les composants d'huiles essentielles, dans la cellule bactérienne, sont indiquées dans la figure 6, tels que décrits par **Burt (2004)**.

Il est généralement reconnu que l'action antimicrobienne des huiles essentielles dépend de leur caractère hydrophile ou lipophile.

Les terpénoïdes peuvent servir d'exemples d'agents lipidiques solubles qui affectent les activités catalytiques des enzymes membranaires, telle que l'action sur les voies respiratoires (**Kalemba, 2003**).

Mann *et al.*, (2000) a été prouvé que l'efficacité de l'agent antibactérien augmente, généralement, avec ses propriétés lipophiles, à la suite de l'action sur les cytomembranes.

Certains composants de l'huile essentielle, de nature phénolique), entraînent une perturbation de la couche extérieure lipopolysaccharidique suivie par la désintégration partielle de la membrane externe (**Knobloch *et al.*, 1986 ; Helander *et al.*, 1998 ; Dorman et Deans, 2000 ; Ultee *et al.*, 2002**).

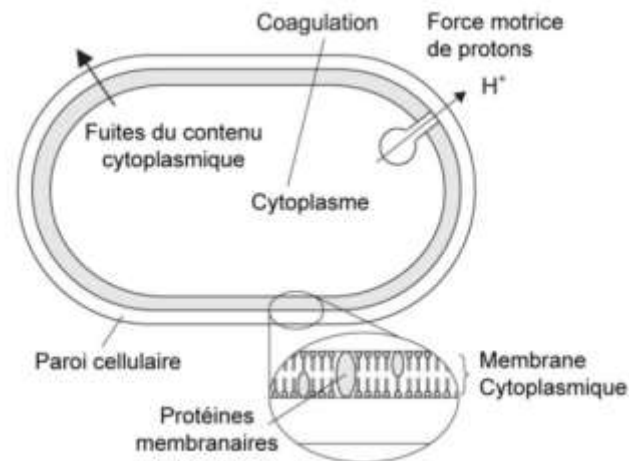


Figure 6: Sites et mécanismes d'action des huiles essentielles dans la cellule bactérienne (Burt, 2004).

Les travaux d'Ultee *et al.* (1999) chez les *Bacillus cereus*, montrent que le carvacrol provoque un effet inhibiteur. Cet effet se traduit par une forte diminution de l'ATP intracellulaire, la réduction du potentiel membranaire et du pH intracellulaire ainsi qu'une influence sur le flux de potassium (intra et extracellulaire). Ceci explique l'endommagement de la membrane cytoplasmique.

IV.3- Toxicité des huiles essentielles

Les HE peuvent être toxiques à des doses élevées, ainsi celles du *Romarin* sont cholérétiques, diurétiques et provoquent une action spasmolytique due au boréal. En général chez l'homme l'ingestion de 10 à 30 ml d'huile essentielle peut être mortelle mais aux doses plus faibles, on note des troubles digestifs, de l'hypotension, de l'hypothermie et une confusion mentale (Bruneton 1999 in Sifi 2010).



Chapitre v

BACTERIES PATHOGENES



V.1- INTRODUCTION

Les maladies infectieuses représentent encore une importante cause de morbidité et de mortalité chez les êtres humains en particulier dans les pays en voie développement.

Même si les compagnies pharmaceutiques ont produit un certain nombre de nouveaux médicaments antibactériens dans les dernières années, la résistance à ces médicaments a augmentée par les bactéries et est devenue une préoccupation mondiale en général.

Les bactéries ont la capacité génétique à transmettre et à acquérir des résistances aux médicaments utilisés comme agents thérapeutique (**Nascimento, 2000**).

Le taux d'émergence de la résistance multiple aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes dans le monde entier est un problème majeur de santé publique.

Les plantes médicinales ont été étudié durant longtemps, les avantages potentiels des infections mixtes, la thérapie de l'infection graves dans lesquelles il faut connaître l'organisme responsable, l'amélioration de l'activité antibactérienne, en réduisent le temps nécessaire pour le traitement antimicrobien à long terme et la prévention de l'émergence des souches résistantes (**Abdole, 2008**).

V.2-. *Pseudomonas aeruginosa*

La bacille pyocyanique (du grec : *puon, pus* ; et du latin : *cyaneus* bleu foncé) est maintenant désigné sous le nom de *Pseudomonas aeruginosa* (du latin : *aes*, airain, cuivre ; *aerugo*, rouille d'airain, vert de gris ; *aeruginosus*, couvert de rouille) (Figure 7)

C'est une bactérie gram négative, bâtonnets (0.5-1 μm x 1.5-5 μm). La plupart des espèces ont un ou plusieurs flagelles par cellule, habituellement polaires non grainés, aérobies ou anaérobies facultatifs, métabolisme respiratoire qui est habituellement chimio-organohétérotrophe catalase positif (**Singleton, 1984**).

C'est une bactérie qui vit normalement à l'état saprophytique dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux ; elle résiste mal à la dessiccation. Mais elle peut aussi vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux et exercer chez certains de ces hôtes un pouvoir pathogène indiscutable. Sur le plan médical, cette bactérie est habituellement incluse dans la liste des « bactéries pathogènes » ; il est convenu de la définir comme un agent pathogène (**Singleton, 1984**).

P.a est capable de produire de nombreux métabolites diffusant dans le milieu environnant, qui ont été très étudiés parce que beaucoup d'entre eux jouent un rôle pathogène naturel (Singleton, 1984).

P.a est l'exemple caractéristique d'une bactérie dite pathogène opportuniste, c'est-à-dire qu'elle ne détermine de maladie que chez la sujette immunodéprimée ou bien après inoculation agressive. La pathologie engendrée est très polymorphe aussi bien chez l'animal d'élevage que chez l'homme (Veron, 1984).

Le réservoir naturel de *P.a* bactérie saprophyte, est l'eau douce ou la mer, les végétaux au contact de cette eau et sols humides. Elle est capable de résister à de nombreux prédateurs ou toxiques, grâce à sa disposition en micro colonies à au moins un antibiotique, parmi ceux qui sont habituellement actifs, hébergent un plasmide ou plus rarement plusieurs plasmides, chaque plasmide peut porter un ou plusieurs facteurs de résistance ; certains de ces facteurs sont des transposons.

A côté de la résistance de nature plasmidique, la résistance d'origine chromosomique joue aussi un rôle important (Veron, 1984).

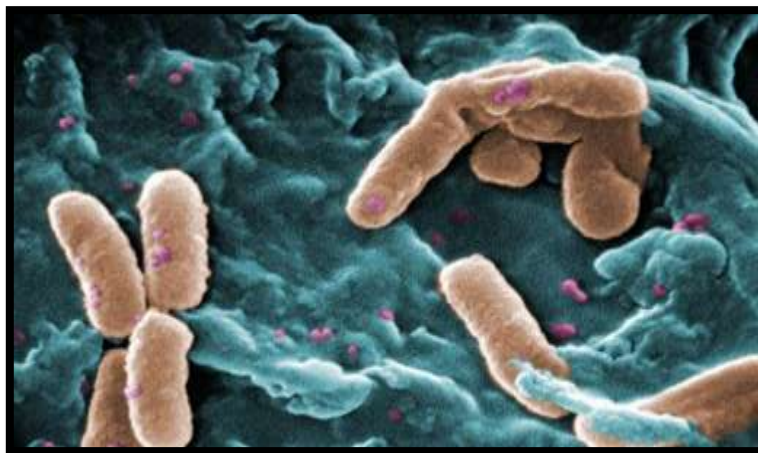


Figure 7 - *Pseudomonas aeruginosa* (Google).

V.3- Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus occupe une place très importante dans la pathologie infectieuse humaine et animale, en effet sa découverte remonte dès l'aube de l'ère pasteurienne. C'était le 3 mai 1880, que Pasteur et Koch décèlent sa présence dans des pus de féconcle et d'ostéomyélite.

S.a est un parasite microscopique en forme de grains sphériques associés plus fréquemment en amas ou en grappe de raisin et après une coloration de gram, ces cocci regroupés en amas retiennent le violet de gentiane (**Ayquem et al., 1998**).

Selon **Schachter et al. (1999)**, les staphylocoques (*cocci* Gram positif) sont des bactéries pyogènes, fréquemment rencontrées, ils peuvent provoquer des abcès locaux dans l'organisme, depuis la peau (boutons) jusqu'à la moelle osseuse. Ils sont parfois responsables de maladies plus spécifiques comme l'endocardite.

Les staphylocoques produisent un grand nombre de toxines et d'enzymes qui agissent localement et qui jouent un rôle dans la résistance à la phagocytose, ils font partie des bactéries pathogènes les plus résistantes et sont difficiles à éliminer de l'environnement humain et sont à l'origine de nombreuses infections nosocomiales. Certaines souches fabriquent aussi des toxines responsables d'intoxications alimentaires, de syndrome du choc toxique (TSS) et une maladie rencontrée surtout chez les enfants, le syndrome de Lyell.

Le réservoir naturel de *S.a* est l'homme, très rapidement après la naissance, *Staphylococcus aureus* colonise la peau, le tube digestif et la région périnéale des nouveau-nés. Un pourcentage élevé de la population reste porteur en permanence ou par intermittence en particulier dans les fosses nasales. A partir des sites de portage et de façon intermittente, il colonise les zones humides (aisselles) ou peut être isolé des mains. *Staphylococcus aureus* peut également être isolé de la peau et des muqueuses des animaux. Quand elle est éliminée dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement.

Et selon **Raoult (1998)**, la morphologie macro et microscopique des *S.a* (figure 8) est en général très caractéristique. Elles se présentent sous l'aspect de cocci Gram (+) de 0,8 à 1 μ m de diamètre, isolées en diplocoque ou groupées en amas évoquant l'aspect en grappe de raisin.

S. Aureus élaboré un pigment caroténoïde qui donne aux colonies une coloration jaune ou orange d'intensité très variable selon les souches.

La paroi cellulaire homogène et épaisse des bactéries gram positives est constituée principalement de peptidoglycane qui contient souvent un pont interpeptidique et une grande quantité d'acides teichoïques qui sont connectés soit aux lipides de la membrane plasmique et des acides tels que l'alanine ou des sucres comme le glucose sont attachés au glycérol ou ribitol (**Lansing et al., 2003**).

Elles sont pigmentées immobiles, non sporulées et ne possèdent pas de capsule visible en microscopie optique sauf de très rares souches (**Ferron, 1984**).



Figure 8 : *Staphylococcus aureus* (Google).

V.4 - *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA)

Les bactéries *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) (Figure 9) qui est couramment appelées « staphylocoque doré », sont des hôtes du milieu hospitalier.

Elles peuvent causer des épidémies d'infection, notamment post opératoires. La mortalité des septicémies semble être supérieure à celle causée par les infections par les *Staphylocoques* méthicilline sensibles (Laupland *et al.*, 2008). Les infections à MRSA+ sont généralement plus graves, avec une mortalité plus élevée (Cosgrove *et al.*, 2003).

Le potentiel toxique de cette souche nous a incités à l'inclure parmi les souches étudiées. Les infections à *S. aureus* sont très fréquentes et apparaissent sous des aspects cliniques très variés.

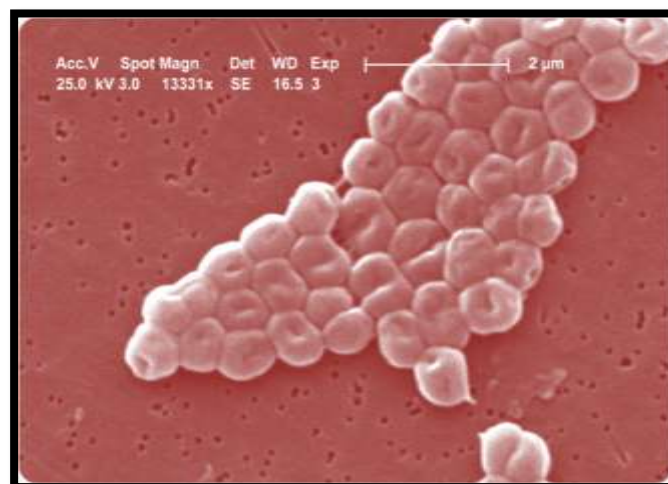


Figure 9 : Vue microscopique de MRSA (Google).

The page is decorated with four clusters of white roses and gold tinsel. Two clusters of roses are on the left side, and two are on the right side. Two strands of gold tinsel, each with a white fabric flower at its end, are positioned at the top and bottom of the page, framing the central text.

PARTIE
EXPERIMENTALE

I- Extraction des huiles essentielles

Cette étude a été effectuée à l'université de Laghouat ; elle a été réalisée au laboratoire de recherche de génie de procédés, cependant l'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée au laboratoire de microbiologie de département de biologie. Nous avons récoltés trois plantes qui sont le *Romarin*, l'*Eucalyptus* et le *Pistachier*, qui proviennent des régions distinctes; le *Romarin* d'Aflou, le *Pistachier* et l'*Eucalyptus* de Laghouat. La date de récolte est la fin février jusqu'au début mars.

On ne peut choisir n'importe quel procédé d'extraction des huiles, toutefois les normes liées à l'utilisation industrielle des extraits limitent en général le choix du procédé à savoir :

- La localisation histologique des composés aromatique dans le végétal.
- Le rendement en huile obtenue.
- La quantité et la qualité sont tous des paramètres qui peuvent orienter le choix technologique d'extraction (**Bruneton., 1999, in Sifi 2010**).

Nous avons procédé à l'extraction des huiles essentielles de ces trois plantes par la méthode d'hydrodistillation. Les huiles essentielles extraites ont subi des tests afin de déterminer qualitativement et quantitativement leurs action antibactérienne vis-à-vis des trois souches pathogènes qui sont : *Staphylococcus aureus* (*S.a*), *MRSA* et *Pseudomonas aeruginosa* (*P.a*).

I.1- Extraction par hydrodistillation

- L'extraction des huile essentielles a été effectuée principalement sur la partie feuille de la plante.
- La quantité de matière végétale prise est de 100 g par manipulation.
- L'étude est réalisée sur un montage d'hydrodistillation (Figure 10) qui comprend l'appareillage suivant :
- Montage d'hydrodistillation est du type Clevenger doté d'une chauffe ballon et muni d'un ballon de capacité de 1000ml.

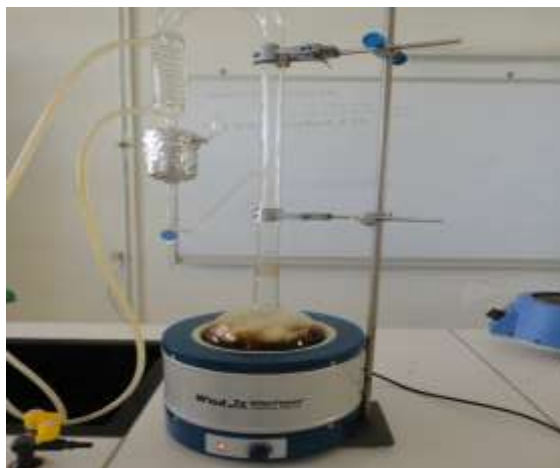


Figure10 : Montage d'hydrodistillation au laboratoire.

Les conditions opératoires ont été extrapolées à partir des essais préliminaires comme présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Conditions opératoires d'hydrodistillation.

Paramètre	Condition opératoire
Quantité de matière végétale	100 g
Quantité d'eau distillée	2/3 de volume de ballon
Température	+ 50°C
Temps d'extraction	5 h

Par ailleurs, nous avons également calculé le rendement d'extraction de chaque plante que nous avons pu ensuite le comparer avec la littérature.

I.2- Détermination du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal à traiter (**Carre, 1953 in Bekhechi-Benhabib, 2001**).

$$R\% = (M/M_0) \times 100$$

R% : rendement en huile essentielle exprimée en %.

M: masse d'huile essentielle en gramme.

M₀: masse de la matière végétale séchée en gramme.

Pour extraire et faire des études sur les HE de nos plantes nous avons suivi le protocole indiqué dans la figure 11.

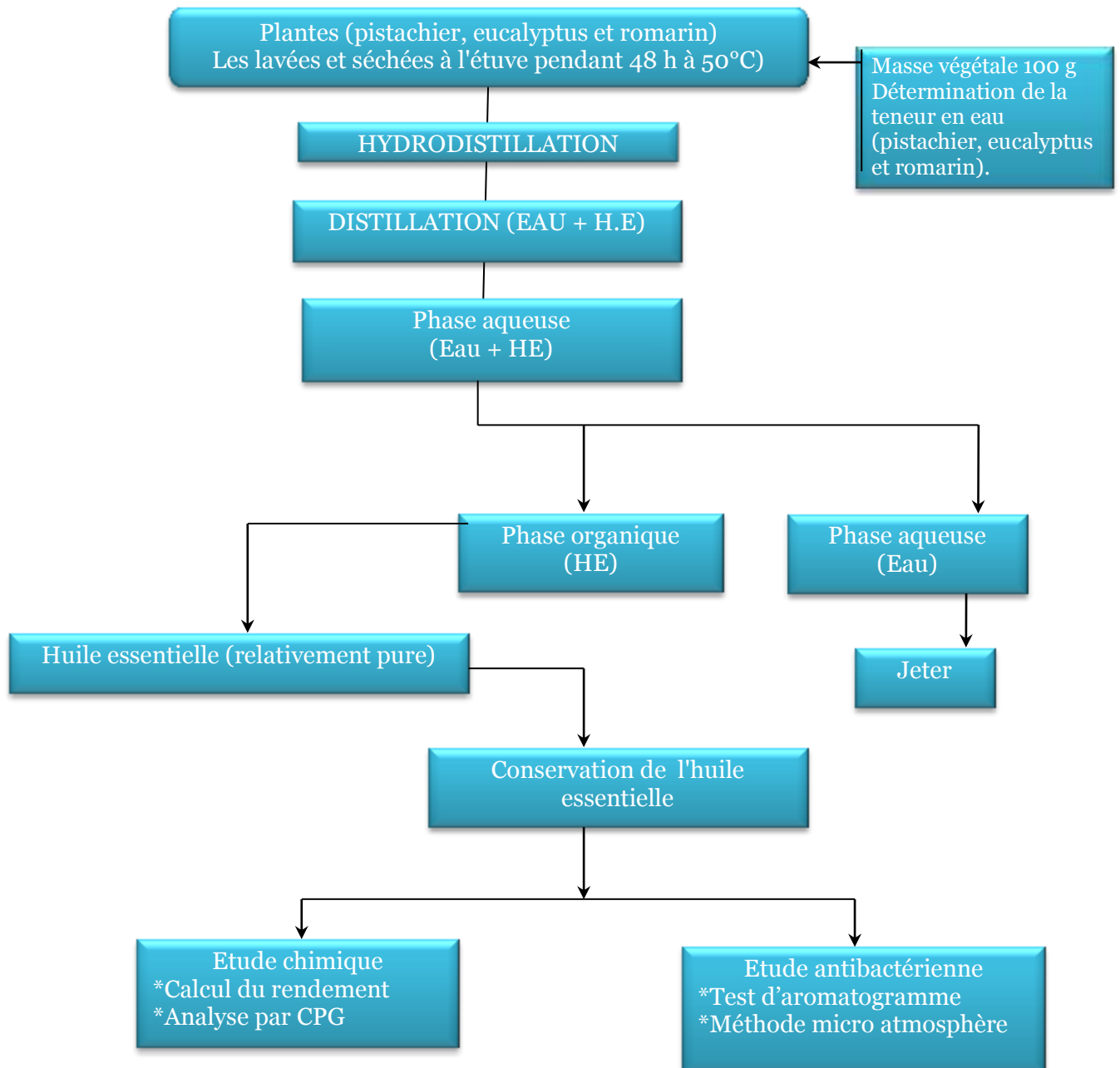


Figure 11 : Protocol expérimental de l'essai d'extraction et d'analyse des huiles essentielles.

II- Analyse chimique des huiles essentielles

II.1- La teneur en humidité de la matière végétale

L'humidité représente la quantité d'eau en gramme, contenue dans 100 g de produit dans les conditions particulières et sans transformation chimique de ce produit.

➤ Mode opératoire

Nous mettons la plante dans l'étuve durant 48 heures et à une température de 50°C, ensuite, nous repesons la plante séchée et calculons le taux d'humidité par la formule suivante :

$$H\% = (X/M_0) \times 100 \text{ où } X = M_0 - M_1$$

M_0 : masse de la plante fraîche M_1 : masse de la plante séchée.

II.2- Analyse chromatographique

La technique chromatographique employée est la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Cette technique permet de séparer et d'identifier les différents constituants de l'échantillon.

L'Analyse chromatographique a été réalisée par l'appareil CPG du type **Schimadzu** (CG-17A) doté d'un injecteur, un four, un détecteur et une colonne capillaire dont les caractéristiques et les conditions opératoires sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5: les conditions opératoires de chromatographie en phase gazeuse.

Colonne	La phase stationnaire	PEG 20 M
	Longueur	25 m
	Diamètre	0.32 mm
	Épaisseur du film	5 µm
La température	Injecteur	60°C
	La programmation de température	60°C- 10 min 4°C/min – 45 min 240°C – 5 min
	Détecteur	240°C
Gaz vecteur	(H ₂)	
Volume	0.3 à 0.5 µl	

III- Evaluation de l'activité antibactérienne

Pour effectuer les différents essais évaluant l'activité antibactérienne, nous avons utilisé le matériel suivant :

- Les épindorffs, les pipettes pasteur, les boites de pétrie, les écouvillons stériles, les tubes à essai et bec bunzen.
- Plaque chauffante, étuve et balance électrique
- Autoclavage, spectrophotomètre et vortex.

III.1- Origine des souches

Le type et le code des souches utilisées dans notre travail sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6: Codes et origines des souches pathogènes testées.

	Microorganisme	Référence	Source
Bactéries à Gram –	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27553	Institut Pasteur-Alger
Bactéries à Gram +	<i>MRSA</i>	ATCC 43300	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	

III.2- La préculture des bactéries

La préculture des bactéries a été faite par les étapes suivantes :

- 10 ml de bouillon nutritif (annexe 1) a été inoculé à partir d'une colonie bien isolée.
- Après 24 heures, on prend des colonies bien isolées à l'aide d'une pipette pasteur.
- Décharger la pipette pasteur dans 5 ml d'eau physiologique stérile.
- Agiter jusqu'à l'homogénéisation.
- L'inoculum est ajusté à 0,5 Mac Ferland (**Lahlou, 2004**), ce qui correspond à une DO de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm (**Atwal, 2003**) ; on obtient l'équivalent de 10⁸UFC/ml.

III.3- Test antibactérien

La détermination de l'action antibactérienne des huiles essentielles, sur *staphylococcus aureus*, *MRSA* et *Pseudomonas aeruginosa*, est réalisé par les techniques de l'aromatogramme, la CMI (la concentration minimale inhibitrice), la CMB (la concentration minimale bactéricide) et la micro atmosphère.

III.3.1. Technique de l'aromatogramme

a- Principe

La technique de l'aromatogramme a été réalisée selon la méthode de Vincent, c'est une méthode par diffusion sur milieu solide ou méthode des disques (figure 12).

L'aromatogramme est une technique simple qui consiste à noter le devenir d'un germe au contact d'un certain nombre d'huiles essentielles végétales naturelles, il n'est qu'un examen complémentaire pratiqué, apporte au clinicien un complément d'information (**Laredj, 2004**).

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles dans un milieu nutritif solide coulé en boîtes de pétrie (**Pibiri, 2006**).

b- Mode opératoire

Nous avons adopté cette technique, en raison de son large emploi dans ce domaine (**Burt et Reinders, 2003 ; Burt, 2004; Bekhechi et al. 2008**).

-Du milieu de culture gélosé, M-H maintenu en surfusion est coulé dans des boites de pétri avant chaque essai.

-A partir d'une culture pure sur milieu d'isolement ; on prend des colonies bien isolées à l'aide d'une pipette pasteur.

-La suspension de chaque souche est préparée dans l'eau physiologique stérile et ajustée à 10^8 UFC/ml.

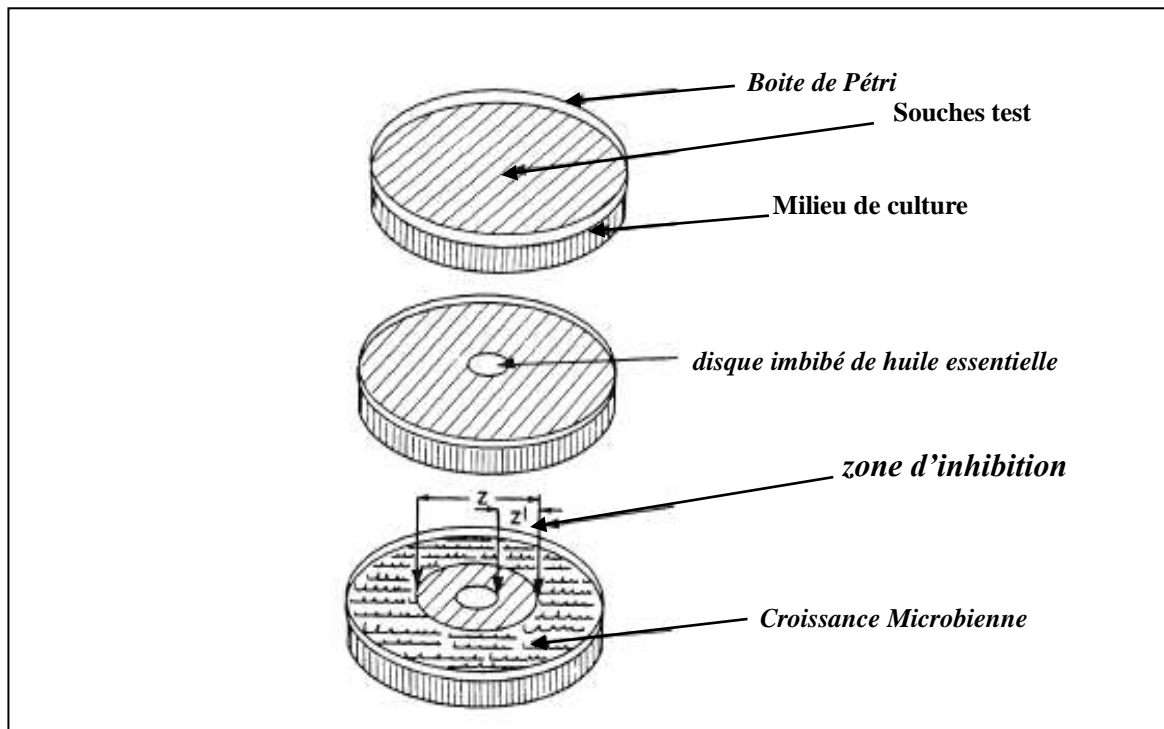


Figure 12 : Illustration de la méthode de l'aromatogrammes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988).

- On prend 100 μ l de suspension bactérienne est on le met sur la surface gélosée.
 - Avec l'écouvillon frotter sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées. La boîte est tournée 3 fois de 60° pour assurer une homogénéité du tapis bactérien.
 - Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de pétrie, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois
 - Les disques papier whatman n°3, stériles de 6 mm de diamètre, sont déposés sur le milieu de culture.
 - Il ne faut pas mettre plus de 3 disques par boîte,
 - Met sur chaque disque 10 μ l d'huile essentielle testé sur les boîtes ensemencées.
- Les huiles d'*Eucalyptus* et du *Pistachier* sont très visqueuse donc on a fait une dilution par DMSO 10%
- La dilution de $\frac{1}{2}$ a été faite (Lahlou, 2004).
 - La boîte est ensuite fermée.
 - pour l'incubation : placer les boîte de pétrie en position renversée dans une étuve réglée à T= 37°C pendant 24 heures.

Pour plus de clarté et de simplicité dans la présentation de notre travail, un protocole expérimental illustre la méthode de l'aromatogramme indiqué dans la figure 13. Les analyses ont été effectuées sur chaque échantillon à raison de 2 essais par analyse, afin de mieux s'assurer de la fiabilité des résultats.

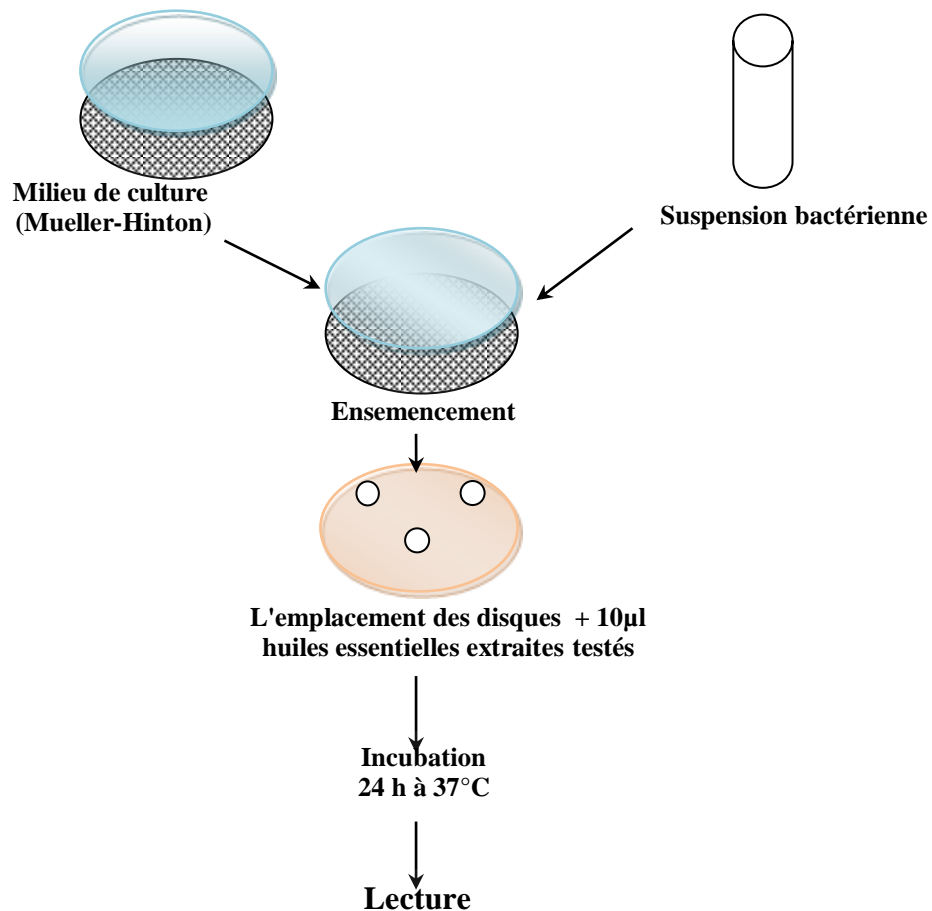


Figure 13. Protocole expérimental de la méthode de l'aromatogramme (**Laredj, 2004**)

c- Lecture

-Mesurer avec précision les diamètres zones d'inhibition par le pied de coulisse.

-Au terme de ces délais, nous avons noté les résultats qui ont été exprimé en trois niveaux d'activité (**.Billerbeck, 2007**).

- Résistant : diamètre de la colonie < 6 mm
- Intermédiaire : 6mm<diamètre de la colonie<13mm
- Sensible : diamètre de la colonie > 13mm

III.3.2- Méthode de contact direct sur milieu liquide (CMI/CMB)

La détermination des concentrations CMI et CMB a été effectuée par la méthode de contact direct en milieu liquide.

Les souches bactériennes, dont le diamètre d'inhibition par les huiles essentielles était supérieur ou égal à 13 mm dans la méthode d'aromatogramme, ont été considérées comme sensibles. Elles ont fait l'objet de la détermination de la CMI et la CMB.

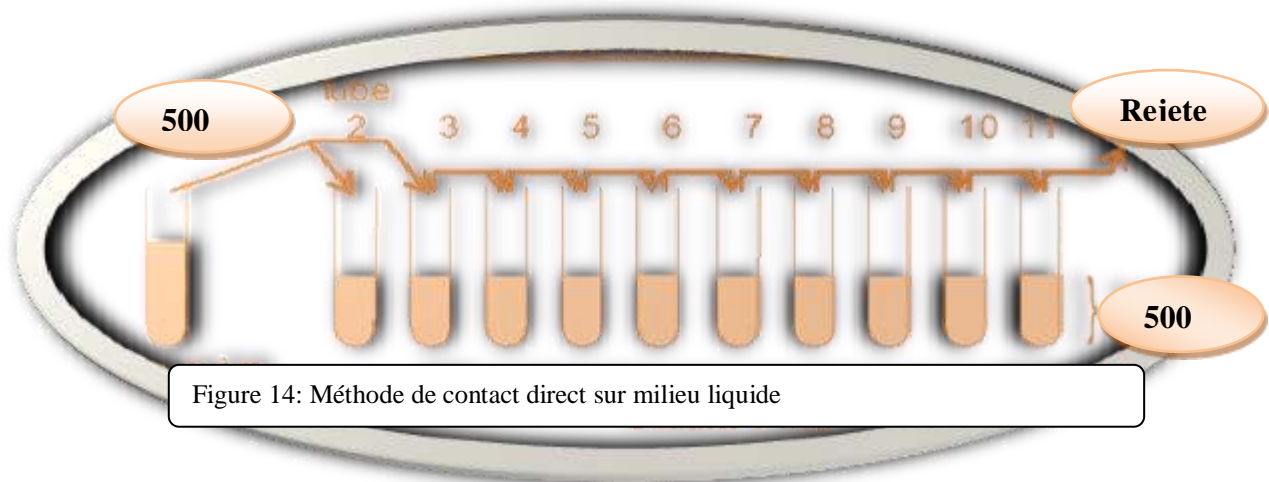
➤ La concentration CMI

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'huile essentielle pour laquelle on n'observe pas de croissance visible (**Karapinar et Aktug, 1987**).

a- Principe

La CMI a été déterminée par la méthode de contact direct en milieu liquide modifiée, décrite par **Senthilkumar et al. (2009)**. (Figur 14).

Dilution des H.E



b- Mode opératoire

- Une suspension de chaque souche, ajustée à 10^8 UFC/ml, est préparée,
- Puis nous l'avons diluée au 1/10 par l'eau physiologique

Cette suspension est incorporée dans le bouillon nutritif pour avoir une charge microbienne finale de 10^5 UFC/ml.

- Les souches bactériennes de *staphylococcus aureus* et de *MRSA*, Sont ensemencées sur 10 ml de bouillon et incubée à 37°C pendant 24 heures.

Partie expérimentale

Pour la détermination de la CMI d'huile d'*Eucalyptus* et du *Romarin*, une solution mère a été préparée par la dissolution de 100 µl d'huile essentielle d'*Eucalyptus* et de *Romarin* chacune dans 500 µl du DMSO.

Puis la préparation des dilutions de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024 pour huile d'*Eucalyptus* et *Romarin*.

A chaque dilution, on ajoute à 3,5 ml de bouillon nutritif pour avoir des concentrations finales de 0,11 µg/ml et 0,10 µg/ml d'*Eucalyptus* et *Romarin* successivement.

Un tube sans huile essentielle, contient 3.5ml de bouillon nutritif, 10 µl de suspension bactérienne et 500 µl de DMSO à 10%, a été utilisé comme témoin.

Pour la mise en culture, les tubes ont été incubés à 37°C, pendant 24 heures

c-Lecture

- Observation des troubles dans les tubes donne présence d'une croissance bactérienne.
- Calcul de CMI.

➤ La concentration CMB

a- Principe

Les tubes présentant un contenu limpide (indication visible d'absence de croissance) sont ensemencés sur milieu M-H solide, afin de déterminer la CMB. L'ensemencement se fait par des traits parallèles dont un trait par concentration, à l'aide d'une pipette pasteur, afin de prélever, à chaque fois, le même volume d'inoculum (figure 15).

La CMB est considérée comme étant la plus faible concentration pour laquelle aucune croissance n'est observée après repiquage en milieu de culture frais, pendant l'incubation (**Onawunmi, 1989**).

b- Mode opératoire

A partir des cultures de 24h dans des tubes pour déterminer la CMI, on a ensemencé les tubes qui n'ont pas une croissance visible on les met dans des boîtes de pétrie, en stries (figures 15 et 16), afin de déterminer leur CMB

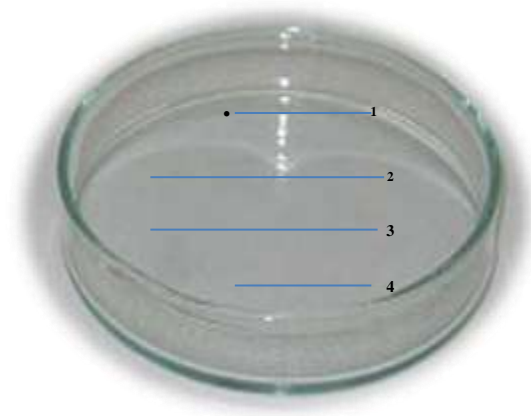


Figure 15: La technique du contact direct sur milieu gélosé (CMB).

c- Lecture

La lecture des résultats se fait à l'œil nu :

- Milieu limpide, après inoculation et incubation, implique l'effet antibactérien de l'huile essentielle testée.
- Présence d'un trouble indique son inefficacité (signe de croissance bactérienne).

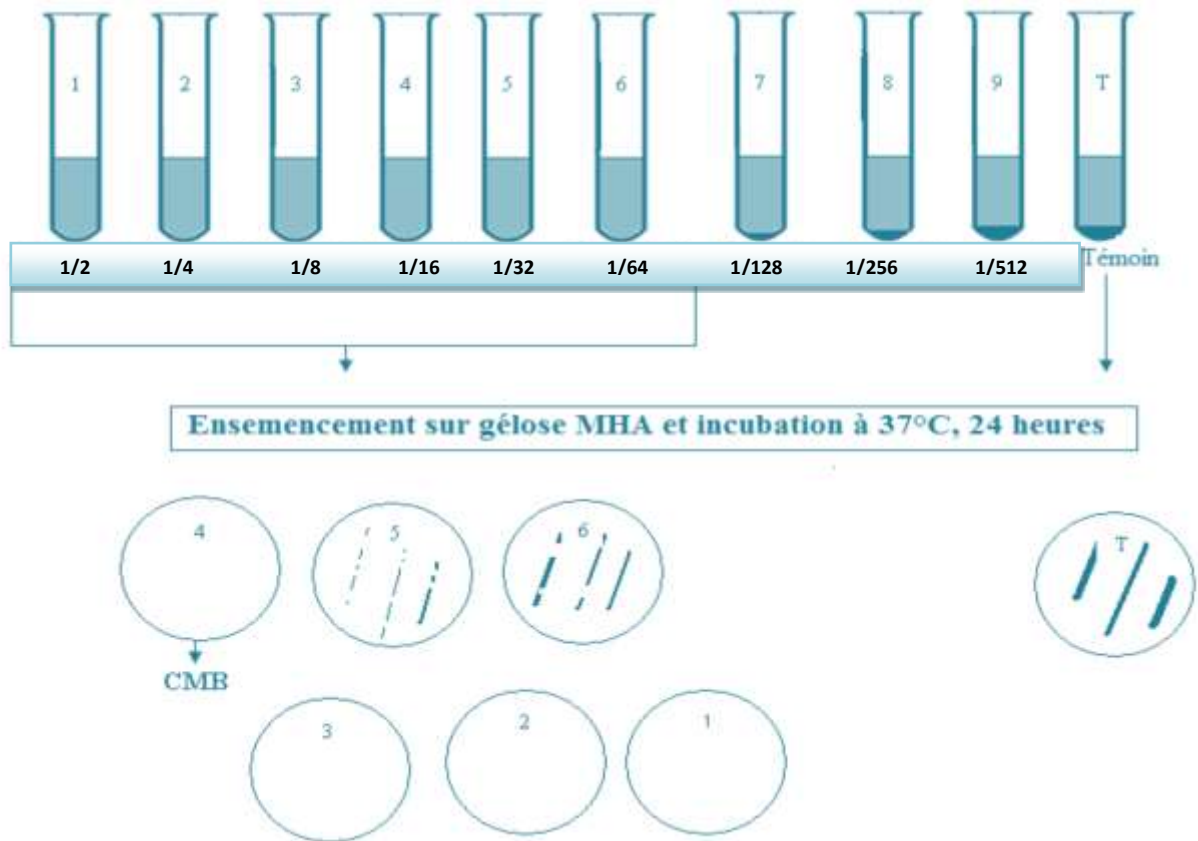


Figure 16: Méthode de détermination de la CMB en milieu gélose.

III.3.3- Technique de micro atmosphère

Le but de cette méthode est d'exploiter les propriétés de la phase volatile des huiles essentielles.

a- Principe

Dans cette technique ; le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de pétri ; renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé (Figure 17).

Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse, sont encore peu nombreux (**Berg, 1963 ; Naves, 1974**).

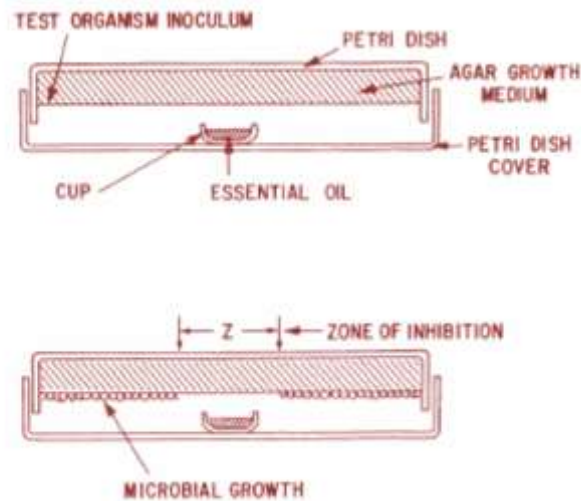


Figure 17: Illustration de la méthode des microatmosphères (Zaika, 1988).

b-Mode opératoire

Le protocole de la technique micro atmosphère est techniquement proche de celle des aromagrammes. La différence réside principalement dans la position du bouchon remplie à l'huile essentielle.

-Du milieu de culture gélosé (M-H) maintenu en surfusion est coulé dans des boîtes de pétrie), on prend deux boîtes pour huile d'*Eucalyptus* et *Romarin* pour chaque souches

-À partir d'une culture pure sur milieu d'isolement :

-On prend la suspension de chaque souche qui a été préparée dans l'eau physiologique stérile et ajustée à 10^8 UFC/ml.

-On prélève 100µl de suspension bactérienne de trois souches est on le met dans la surface gélosée.

-Avec l'écouvillon frotter sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées. La boîte est tournée 3 fois 60° pour assurer une homogénéité du tapis bactérien.

-On prend les couvercles des boîtes coulé par MH + 100 µl souche bactérienne est on dépose sur chaque couvercle au centre un bouchon d'épindorff.

-On remplit ces bouchons par 50 µl d'huile

-Puis on inverse la boîte et on le met dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

-Les boîtes ne doit pas être déplacé dans l'étuve il faut que ces huiles ne bouge pas.

c- Lecture

Après 24h on va récupérer les boîtes et voir l'existence des zones d'inhibitions, on va le mesurer à l'aide d'un pied de coulisse.

III.3.4- Antibiogramme

a- Principe

Ce test a pour but d'étudier l'antibiogramme des germes utilisés et de les comparer avec l'effet de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus* ; le *Romarin* et le *Pistachier*.

La technique d'antibiogramme utilisée est celle de la diffusion de disques en gélose conçue par **Chabbert en 1973**.

b- Mode opératoire

Nous avons testé l'effet antimicrobien de différents antibiotiques couramment utilisés sur trois souches pathogènes.

Le milieu de culture utilisée était le Mueller-Hinton agar.

Sur cette gélose et après introduction de l'inoculum, des disques imprégnés de chaque antibiotique ont été déposés.

Après de 24h d'incubation ; une zone d'inhibition a été remarquée autour du disque contenant l'antibiotique auquel le germe est sensible.

Pour l'expérience, 1 ml d'une dilution de 10^{-3} d'un bouillon bactérien a été introduit dans chacune des boîtes de gélose de Mueller-Hinton.

Après 24h d'incubation à $37^{\circ}C$; le diamètre de la zone d'inhibition de la souche a été calculé.

➤ Technique

Nous avons utilisé des disques de 6 mm de diamètre imbibés d'antibiotiques à différentes concentrations conditionnés par le fabricant (Institut Pasteur- Alger) par paquets de disques. Le tableau 7 présente la liste des antibiotiques testés sur les bactéries à des concentrations conditionnées.

Partie expérimentale

Tableau 7: Les antibiotiques testés sur les bactéries avec leurs concentrations.

Les Antibiotiques Utilisés	Les concentrations
Oxacilline	5µg
Nitroxoline	20µg
Amoxycillin+ acide clavulanic	20/10µg
Trimethoprim+ sulfamethoxazole	1,25/23,75µg
Pénicilline	6 µg

➤ Ensemencement

-Tromper l'écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.

-Etaler à l'aide d'un écouvillon stérile la suspension bactérienne en frottant l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas, en stries serrées.

-Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.

-Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

➤ Application des disques d'antibiotiques

-Presser chaque disque d'antibiotiques à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour s'assurer de son application. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé, puis les boîtes sont laissées durant 20 minutes à la température ambiante pour permettre la diffusion de l'antibiotique.

Il est préférable de ne pas mettre plus de 5 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre.

➤ Incubation

Les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37°C

c- Lecture

-on mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.

-on compare les résultats aux valeurs critiques standards.

-selon le diamètre d'inhibition, on classe la bactérie dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire, ou résistance (**Ammari et al., 2005**).

A decorative border surrounds the central text, featuring white roses and gold tinsel. The roses are arranged in vertical clusters on the left and right sides, while the gold tinsel forms diagonal lines connecting the top and bottom corners.

PARTIE
RESULTATS ET
DISCUSSION

I-Analyse chimique

Les trois plantes : *Pistachier*, *Eucalyptus* et *Romarin* ont été sélectionnées pour leurs propriétés biologiques, elles ont été récoltées la fin février jusqu'aux le début de mars.

I.1. Calcul du rendement d'extraction des H.E

Après une durée d'extraction de 5 heures par hydro-distillation, les rendements en huile essentielle obtenus à partir des trois plantes étudiés sont reportés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Résultats quantitatifs de l'extraction des huiles essentielles des trois espèces.

Espèce	<i>Romarin</i>	<i>Pistachier</i>	<i>Eucalyptus</i>
R%	1,31	0,19	1,09

Le rendement calculé des huiles essentielles des trois plantes extraites par le procédé d'hydro-distillation est représenté dans l'histogramme (figure 18). Le rendement de *Rosmarinus officinalis* est le plus élevé (1,31%) par rapport aux genres *d'Eucalyptus globulus* et de *Pistacia atlantica* avec des rendements de 1,09% et 0,19%, respectivement.

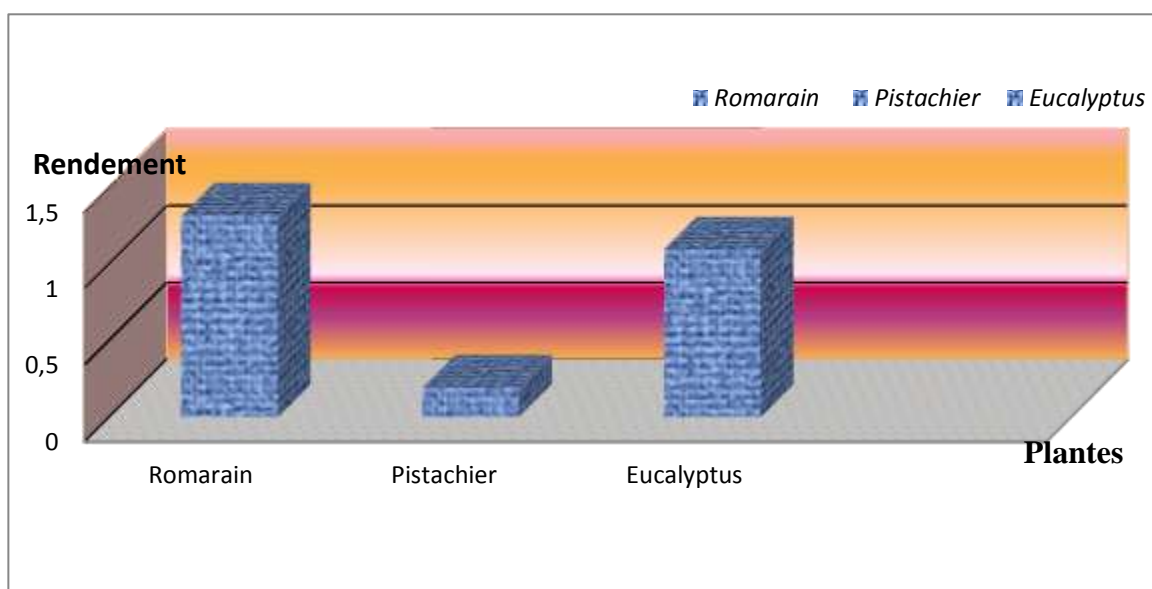


Figure 18: Le rendement d'extraction des huiles essentielles des trois espèces étudiées.

I.2-Calcul du taux d'humidité

D'après le calcul de taux d'humidité des trois plantes sélectionnés, on aboutit aux résultats résumés dans le tableau 9. Ces résultats montrent que le Pistachier a un taux d'humidité moyen par contre le taux d'humidité des autres plantes est relativement élevé.

Tableau 9: Résultats de taux d'humidité.

Espèce	<i>Romarin</i>	<i>Pistachier</i>	<i>Eucalyptus</i>
Taux d'humidité	67,15 %	50 %	60,38 %

I.3- Caractéristiques organoleptiques

La distillation est conduite pendant cinq heures, durée nécessaire à l'épuisement de la matière première (environ 90%) en huile essentielle.

L'huile essentielle obtenue possède des caractères organoleptiques résumés au tableau 10.

Tableau 10: Caractéristique organoleptiques des huiles essentielles.

Caractéristiques		Huiles essentielles		
		<i>Romarin</i>	<i>Pistachier</i>	<i>Eucalyptus</i>
Organoleptiques	Couleur	Jaune pâle	Jaune pâle	Vert jaunâtre
	Odeur	camphré	Fraîche	Fraîche
	Aspect	liquide	visqueux	Légèrement visqueux

I.4- Analyse chromatographique qualitative

Les huiles essentielles de *Romarin*, *Pistachier* et *Eucalyptus* récupérées par l'hydro-distillation ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (annexes 5). Les chromatogrammes des trois extraits des HE sont représentés dans l'annexe 6.

Les chromatogrammes dès l'extraits du *Romarin* et d'*Eucalyptus* montrent que leur HE sont composées de plusieurs constituants marqués par des temps de rétention différents.

Par contre le chromatogramme de l'extrait du *Pistachier* présente seulement quelques pics dont la résolution est très faible, ceci est du probablement aux mêmes conditions opératoires appliquées à l'analyse par CPG pour les trois extraits en même temps.

Cette analyse reste à titre qualitative et non quantitative en raison de non disponibilité des différents étalons connus des HE à l'échelle de laboratoire de chimie d'où l'identification des constituants de ces huiles essentielles est devenue impossible.

II- Evaluation de l'activité antibactérien

Les H.E. exercent une activité antibactérienne soit en empêchant la multiplication des germes bactériens, soient en provoquant leur destruction par perturbation d'une ou plusieurs étapes métaboliques, au niveau d'un équilibre physicochimique indispensable à la vie de la bactérie.

II.1- Résultats du test de l'aromatogramme

Les résultats de l'effet antibactérien des huiles essentielles sur les souches bactériennes, par la méthode d'aromatogramme, sont représentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Diamètre des zones d'inhibitions des trois HE sur les trois souches bactériennes testées.

	Diamètres des zones d'inhibition (mm)			
	<i>Eucalyptus</i>	<i>Pistachier</i>	<i>Romarin</i>	Témoin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9,83 ± 0,29	0	10,33 ± 0,57	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	44,03 ± 0,04	0	26,53 ± 1,72	0
<i>MRSA</i>	09,02 ± 1,84	0	13,60 ± 2,74	0

Après les ensemencements des trois souches bactériennes et la réalisation du test de l'aromatogramme, ces souches bactériennes réagissent différemment par l'action des huiles essentielles des trois plantes (*Eucalyptus*, *Pistachier* et le *Romarin*).

A partir de ces zones d'inhibition, nous observons un effet antibactérien plus important pour l'huile essentielle d'*Eucalyptus* vis-à-vis des deux souches bactériennes (*P.a* et *S.a*) et une résistance bactérienne élevée de ces souches pour l'huile essentielle de *Pistachier*.

Quant à l'huile de *Romarin* montre un effet antibactérien plus important par rapport à la souche *MRSA*, et *P.a*. Avec des proportions moins importantes, et la souche *S.a* ne révèle pas une résistance comme le montre les résultats dans le tableau 11.

Partie résultats et discussion

Le diamètre des zones inhibitrices, d'huile essentielle issue des trois plantes vis-à-vis de ces souches, est illustré dans le tableau 11 et les figures 19, 20 et 21.

Rappelons que l'inhibition se manifeste par l'absence définitive d'un développement visible d'une souche bactérienne.



Témoin *P.a*



Huile de *Romarin*



Huile d'*Eucalyptus*



Huile de *Pistachier*

Figure 19: Activité antibactérienne des HE vis-à-vis de *P.a* selon la méthode d'aromatogramme.



Témoin *S.a*



Huile de *Romarin*



Huile d'*Eucalyptus*



Huile de *Pistachier*

Figure 20: Activité antibactérienne des HE vis-à-vis de *S.a* selon la méthode d'aromatogramme.



Témoin *MRSA*



Huile de *Romarin*



Huile d'*Eucalyptus*



Huile de *Pistachier*

Figure 21 : Activité antibactérienne des HE vis-à-vis de *MRSA* selon la méthode d'aromatogramme.

II.2- Résultat de la Méthode de contact direct sur milieu liquide (CMI /CMB)

Résultat de CMI

D'après les résultats de l'activité antibactérienne effectuée sur les huiles essentielles par la méthode de diffusion sur agar, l'huile essentielle d'*Eucalyptus* (figure 22) et *Romarin* (figure 23) possèdent le pouvoir inhibiteur le plus important sur toutes les bactéries pathogènes utilisées par rapport aux HE de *Pistachier*.

A partir les résultats de la méthode d'aromatogramme ; les HE de *Romarin* et l'*Eucalyptus* ont été choisi pour évaluer leur pouvoir antibactérien vis-à-vis les souches les plus sensibles par cette méthode, utilisant la méthode de contact direct en liquide afin de déterminer leur concentration minimale inhibitrice (CMI).

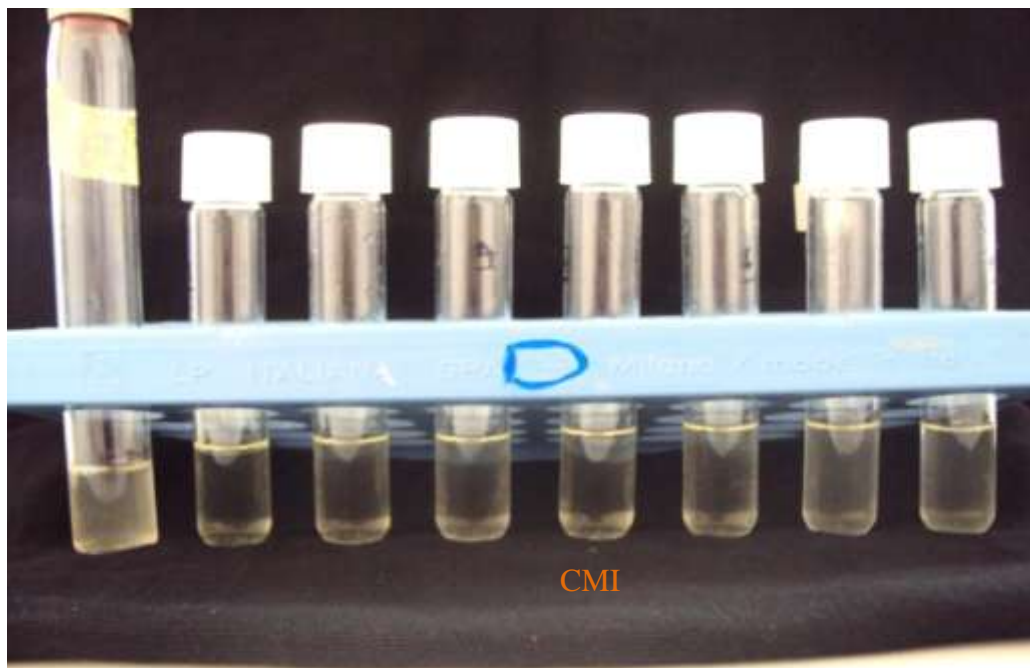


Figure 22: La concentration minimale inhibitrice (CMI) d'*Eucalyptus* de la souche *S.a.*

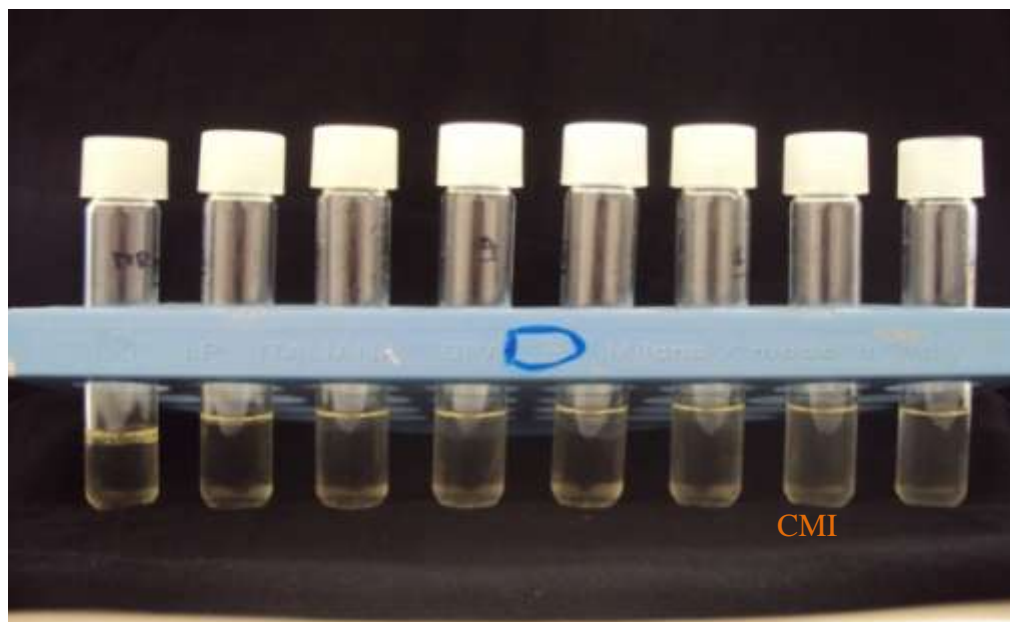


Figure 23 : La concentration minimale inhibitrice (CMI) de *Romarin* de la souche *S.a.*

Les résultats obtenus (Tableau 12) de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* sur les bactéries testées dans le bouillon nutritif révèlent que la souche *Staphylococcus aureus* est plus sensible à une concentration (CMI) de 0,43 µg/ml et la souche *MRSA* est sensible à une CMI égale 6,92 µg/ml.

Tableau 12: Concentration minimale inhibitrice de l'huile d'*Eucalyptus*.

	Dilution d'HE d' <i>Eucalyptus</i>									
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
	55,37 µg/ml	27,68 µg/ml	13,84 µg/ml	6,92 µg/ml	3,46 µg/ml	1,73 µg/ml	0,86 µg/ml	0,43 µg/ml	0,21 µg/ml	0,11 µg/ml
<i>S.a</i>	-	-	-	-	-	-	-	-CMI	+	+
<i>MRSA</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

+ : croissance de la bactérie ; - : absence de la croissance de la bactérie.

Pour les résultats obtenus cités dans le Tableau 13, par la méthode de contact de l'huile essentielle de *Romarin*, montre que la souche *Staphylococcus aureus* est le plus sensible à une concentration (CMI) de 0,41 µg/ml et *MRSA* à 1,65 µg/ml.

Partie résultats et discussion

Tableau 13: Concentration minimale inhibitrice de l'huile de *Romarin*.

	Dilution d'HE de <i>Romarin</i>									
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
	52,93 µg/ml	26,46 µg/ml	13,23 µg/ml	6,61 µg/ml	3,30 µg/ml	1,65 µg/ml	0,83 µg/ml	0,41 µg/ml	0,20 µg/ml	0,10 µg/ml
SE	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
MRSA	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

+ : croissance de la bactérie ; - : absence de la croissance de la bactérie.

Résultat de CMB

Les résultats de la détermination de la concentration minimale bactéricide sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14: Détermination de la CMI et CMB.

Huiles essentielles	Souche bactérienne	CMI (µg. ml ⁻¹)	CMB (µg. ml ⁻¹)	CMB/CMI
<i>Eucalyptus globulus</i>	SE	0,43	0,43	1
	MRSA	6,92	6,92	1
<i>Rosmarinus officinalis</i>	SE	0,41	0,41	1
	MRSA	1,65	1,65	1

D'après les résultats de la détermination de CMB, nos échantillons en huiles essentielles de *Romarin* et *Eucalyptus*, montrent une activité bactéricide contre les souches *Staphylococcus aureus* et *MRSA* (figures 24 et 25).



Staphylococcus aureus



MRSA

Figure 24: Détermination d'HE d'*Eucalyptus* contre les deux souches bactériennes.



Staphylococcus aureus



MRSA

Figure 25: Détermination d'HE de *Romarin* contre les deux souches bactériennes.

II.3- Résultat de test micro-atmosphère

Après 24 h on a récupéré les boîtes et on mesure les zones d'inhibitions par le pied de coulisse (Figure 26, 27 et 28), les résultats sont présentés dans le tableau 17.

Les résultats obtenus par l'utilisation de la méthode micro-atmosphère des huiles essentielles de *Romarin* et *Eucalyptus* sur *S.a*, *P.a* et *MRSA* exprimées par une diminution plus au moins notable des colonies antibactériennes avec l'huile d'*Eucalyptus* et *Romarin*.

Les huiles essentielles d'*Eucalyptus* et le *Romarin* en vapeur donnent un bon résultat par la méthode micro atmosphère avec la souche *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibition différents et aucun effet avec les autres souches utilisées.



Témoins *P.a*



Huile *Romarin*



Huile d'*Eucalyptus*

Figure 26: Activité antibactérienne des HE vis-à-vis de *P.a* selon la méthode de micro-atmosphère.



Témoins *S.a*



Huile *Romarin*



Huile d'*Eucalyptus*

Figure 27: Activité antibactérienne des HE vis-à-vis de *S.a* selon la méthode de micro-atmosphère.



Témoin *MRSA*



Huile *Romarin*



Huile d'*Eucalyptus*

Figure 28: Activité antibactérienne des HE vis-à-vis de *MRSA* selon la méthode de micro-atmosphère.

Tableau 15 : Les Diamètres des zones d'inhibition d'*Eucalyptus* et *Romarin* vis-à-vis des trois souches.

Souche bactérienne / Huiles Essentielle	<i>S.a</i>	<i>P.a</i>	<i>MRSA</i>
<i>Eucalyptus</i>	14mm	0mm	0mm
<i>Romarin</i>	9.47mm	0mm	0mm

II.4- Résultat de l'Antibiogramme

Les résultats de l'examen d'antibiogramme obtenus à partir de la figure 29, étant comparés au tableau de l'annexe 2, d'où on aura le résultat final regroupé dans tableau 16. On a utilisé pour ce test cinq types d'antibiotiques pour les trois souches bactériennes.



Staphylococcus aureus

Pseudomonas aeruginosa

MRSA

Figure 29: Test antibiogramme avec les souches bactériennes.

Les résultats du tableau 16 montrent que l'espèce la plus résistante est *Pseudomonas aeruginosa*, par contre la souche la plus sensible c'est *Staphylococcus aureus*.

A partir de ces résultats, on observe que la souche *Staphylococcus aureus* est plus sensible à l'huile essentielle d'*Eucalyptus* comparé aux antibiotiques sélectionnés AMC, OX et SXT car l'existence des zones d'inhibition plus importantes ayant un diamètre de 44.03 mm pour cette huile par rapport aux antibiotiques AMC, OX et SXT qui ont respectivement un diamètre de 23,91 mm, 26.16 et 21,21 mm.

Tableau 16: Résultat de l'examen d'antibiogramme.

Souches/ATB	Ox	Ni	Amc	Sxt	Pc
<i>S.a</i>	S	I	S	S	I
MRSA	R	I	S	S	R
<i>P.a</i>	R	R	R	R	R

Sensible, Intermédiaire, Résistance.

Par contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* est très résistante aux antibiotiques sauf NI. Cette souche montre une grande sensibilité aux huiles essentielles d'*Eucalyptus* et du *Romarin*.

Concernant la souche MRSA, les résultats montrent une sensibilité aux antibiotiques AMC, NI et SXT meilleure que les différentes huiles essentielles par contre les antibiotiques PC et OX ne possèdent aucune activité comparés à ces huiles.

III- Discussion

Le rendement moyen des plantes en huile essentielle est de 1,31%, 0,19% et 1,09% (v/m) pour les plantes *Romarin*, *Pistachier* et l'*Eucalyptus*, respectivement. Le rendement correspond à la moyenne des rendements obtenus par plusieurs extractions.

Dans le cas du *Romarin*, le rendement est légèrement inférieur à celui du *Romarin* d'Algérie 1,5% selon **Porte et al., (2000)**.

La même remarque pour l'*Eucalyptus*, en comparant notre rendement 1,09 % à celui obtenu par la littérature 3% en utilisant la même technique d'extraction.

D'après les résultats obtenus ; nous pouvons dire que le rendement de *Pistachier* qui est de 0,19% est non intéressant et insatisfaisant pour une étude microbienne.

Cette différence dans les rendements peut être attribuée à la diversité de provenance du matériel végétal, à la grande variabilité de cette matière qui est due principalement au climat, au sol, au temps de séchage,...etc., ainsi aux procédés des différentes méthodes d'extraction (entraînement à la vapeur et l'hydro-distillation), aux conditions opératoires, notamment, lors du chauffage du mélange (matière végétale/eau).

En effet, de plus la température de l'eau circulant au niveau du Clevenger permettant ainsi d'obtenir une température constante tout au long de l'extraction.

Ces variations dans la concentration de l'huile essentielle produite par la plante ont été observées aussi par **Veres et al., (2003)**, c'est le résultat des différents facteurs intervenant lors de la culture de la plante notamment les facteurs climatiques (chaleur, froid, stress hydrique).

Concernant l'activité antimicrobienne, les résultats obtenus montrent que les huiles essentielles de *Romarin* et d'*Eucalyptus* possèdent une activité antibactérienne. Cette activité s'exprime par la présence d'une zone d'inhibition pour tous les microorganismes testés, par contre le huile de *Pistachier* non aucun effet sur les bactéries.

Pour l'espèce *Rosmarinus officinalis*, l'activité antibactérienne a été confirmée par les travaux de **Bousbia et al., (2009)** qui ont conclu que l'huile essentielle des feuilles de *Rosmarinus officinalis* extraite par hydro-distillation et testé par la méthode de diffusion sur disque exerce un large spectre antibactérien avec la souche *S.a* et *Listeria monocyto* de diamètre de 15 mm à 21 mm, respectivement.

Pour un volume de 10µl d'huile essentielle d'*Eucalyptus* par disque, la souche *Staphylococcus aureus* était plus résistante que la souche *P.a* avec des zones d'inhibition de 11 mm et 9 mm de diamètre respectivement selon **Janssen et al., (1986)**. Ces résultats sont incomparable avec ceux de notre travail où la souche *Staphylococcus aureus* était plus sensible que *Pseudomonas aeruginosa* et *MRSA* avec des zones d'inhibitions de 43,27 mm, 9,83 mm et 9,02 mm, respectivement.

La comparaison de nos résultats sur l'action de l'huile essentielle de *Romarin* sur les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *MRSA* d'une part avec un volume de 10µl par disque de 6mm de diamètre et ceux obtenus avec les même espèces bactériennes d'un volume de 10µl de l'huile essentielle par disque de 4 mm de diamètre d'autre part montre clairement la sensibilité des souches que nous avons expérimenté avec des zones d'inhibition de 16,6 mm et 15 mm contre 11 mm et 8,5 mm respectivement (**Piccaglia et al., 1993**).

Les résultats obtenus avec l'aromatogramme montrent que la souche *MRSA*. Les diamètres des zones d'inhibition de 0 mm jusqu'à 13,60 mm de diamètre pour les trois huiles essentielles. Les résultats de l'antibiogramme montre la sensibilité de la souche Gram positive *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques parmi les trois souches testées car les zones d'inhibition combrent toute la boîte de pétri, ça signifie une inhibition presque totale de la croissance bactérienne.

L'effet antibactérien des huiles essentielles extraites des trois plantes a montré des résultats satisfaisantes et importantes cela semble être lié à la présence de certaines fonctions chimiques trouvant dans les composés aromatiques des huiles essentielles, responsable en général de l'effet bactéricide des trois souches bactériennes, tels que les composés phénoliques qui sont réputés d'avoir une grande action antibactérienne.

La résistance des souches de *P.a* à l'huile testée n'est pas surprenante. En fait, cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides qui est en relation avec la nature de sa membrane externe car cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre *P.a* deviennent actives. En milieu liquide, à l'exception la souche de *P.a* qui se montrent résistantes aussi bien à l'action bactéricide de l'huile essentielle d'*Origanum compactum*, (**Mann et al., 2000**), comme notre cas, *P.a* montrent une résistance élevé à l'action bactéricide par l'huile de *Romarin*.

Nos résultats du rapport CMI/CMB, montrent une action bactéricide de ces huiles essentielles de deux plantes étudiés vis-à-vis les souches *S.a* et *MRSA*, qui sont comparables aux résultats trouvés par **Mann et al., 2000**.

La méthode micro-atmosphère est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse sont encore peu nombreux à savoir (**Sarbach, 1962 Dubreuil et al., 1993 ; Billerbeck, 2007 ; Pibiri et al., 2005**). Le but de cette technique est d'exploiter les propriétés de la phase volatile des huiles essentielles.

Benjilali et al., (1984), ont observé que pendant l'évaluation de l'activité antibactérienne pour l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, la composition dans l'espace libre (Méthode de micro-atmosphère saturé) peut être différente de la composition liquide en huile essentielle.

Un bon résultat a été observé le pouvoir bactéricide des huiles d'*Eucalyptus* et du *Romarin*, testé en vapeur par la méthode micro-atmosphérique où les zones détectés ont un diamètre de 14 mm et 9,47 mm, respectivement. Par contre l'huile essentielle de *Pistacia atlantica* n'a aucun effet sur *les souches*.

Nakatani (1987), a démontré que les bactéries de gram positive sont plus sensibles c'est le cas de **Biondiet et al., (1993)**, ont montré que les composés les plus actifs se sont les constituants phénoliques. Cependant, la détermination des combinaisons possibles des composés les plus actifs d'huiles essentielles a pu être de grande importance, malheureusement la composition de nos essences n'était pas totalement définie en raison du manque des moyennes pour une analyse chimique complète.

Vu que nos produits présentent une activité, ceci provient probablement aux composants non identifiés peuvent éventuellement conter les constituants phénoliques.

Pour notre étude nous avons eu des résultats des tests antibactériens de l'huile d'*Eucalyptus* par les deux méthodes ; méthode de contact direct exploitée par la CMI et la méthode de disques de diffusion exploitée par le diamètre d'inhibition donnant toujours une activité. On a trouvé que *S.a* est sensible par rapport à *P.a* et *MRSA* dont le diamètre d'inhibitions de *S.a* est de 43,27 mm et une CMI de l'ordre de 0,43 µg/ml et un diamètre d'inhibition pour *MRSA* est de 13,60 mm et une CMI de 6,92 µg/ml.

Cette connaissance pourrait également aider à comprendre la gamme de l'efficacité de ces huiles en ce qui concerne la variation compositionnelle provoquée par des facteurs tels que le type plante, l'endroit géographique et la période de l'année (**Kokkini et al., 1989**).

Le développement de la résistance aux antibiotiques peut être intrinsèque ou acquis et peut être transmis dans la même ou des espèces différentes de bactéries. La résistance normale est réalisée par mutation spontanée de gène et la résistance acquise étant réalisé est par le transfert des fragments d'ADN comme des transposons à partir d'une bactérie à l'autre.

D'autres avantages potentiels d'huiles essentielles au-dessus des antibiotiques sont que les bactéries ne semblent pas développer la résistance aux huiles essentielles. Cependant, le futur essai rigoureux est nécessaire pour éliminer d'une manière concluante le développement potentiel de la résistance contre les huiles essentielles.

A decorative border surrounds the central text, featuring blue roses on green stems and two gold butterflies with intricate patterns on their wings. The roses are scattered along the top, bottom, and sides, while the butterflies are positioned in the upper right and lower left corners.

CONCLUSION

Dans la chronologie de cette étude nous avons essayé en premier lieu d'extraire les huiles essentielles à partir de certaines plantes aromatiques, nous ont permis de sélectionner trois plantes (*Eucalyptus*, *Pistachier* et *Romarin*), et en deuxième lieu prévoir leurs propriétés biologiques intéressants qui est antibactériennes.

Les résultats de notre travail expérimental ont permis de confirmer la faisabilité de la technique d'extraction "Hydro-distillation" à l'échelle laboratoire. Les extractions ont fourni trois huiles essentielles, l'ensemble de ces extraits ont été analysés en terme qualitatifs (CPG).

L'objectif principal de cette étude a été déterminé la présence l'une des activités biologiques des huiles essentielles obtenues à partir des plantes sélectionnées, afin d'exploiter cette propriété des huiles essentielles et trouver des applications dans les domaines phytosanitaire et cosmétique.

- Les rendements d'extraction ont indiqué que les feuilles sont plus riches en huile essentielle de *Rosmarinus* (1,31%) que celles de *d'Eucalyptus globulus* (1,09%).

En plus de leurs rendements importants, les huiles essentielles des plantes testés possèdent aussi des effets antibactériennes, l'huile d'*Eucalyptus* provoquant un effet inhibiteur plus grand que l'huile de *Romarin*, à l'exception de l'huile essentielle de *Pistachier* qui est la plus faible, même a plus grand volume utilisé 10 μ l, elle ne présent pas un effet inhibiteur sur les souches étudiées. la souche qui possède une grande résistance aux HE est *P.a*. Par contre *S.a* est la plus sensible.

Les huiles essentielles d'*Eucalyptus* et *Romarin* possèdent la même activité inhibitrice sur les bactéries étudiées, la seule huile essentielle qui porte une activité importante sur *S.a* est l'*Eucalyptus* puis le *Romarin*. La bactérie *S.a* est plus sensible aux huiles essentielles des deux plantes étudiées que *P.a* et *MRSA*.

La méthode de contacte directe en milieu liquide (CMI/CMB) a montré des bons résultats pour l'effet de *Romarin* et *Eucalyptus* sur les souches bactériennes et donne des résultats analogue de la méthode de disque.

Et pour la méthode micro-atmosphère a montré que l'huile d'*Eucalyptus* est plus efficace par rapport à l'huile de *Romarin* sur les souches utilisées.

Conclusion

Le but réel de ce travail est l'application des huiles essentielles en tant que substance naturelles à la place des antibiotiques utilisées dans les traitements antibactériens pour fragiliser ou tuer les bactéries.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Annexes 1 : Composition des milieux de culture.

Mueller-Hinton Agar (MH)

Infusion de viande de bœuf	4g.
Peptone de Caséine.....	17.5g.
Amidon de Maïs.....	1.5g.
Agar.....	15g.
Eau distillé q.s.p.....	1000ml.
pH.....	7.4.

Bouillon nutritif

Peptone.....	15g/l.
Extrait Levure.....	3g/l.
Chlorure de sodium.....	6g/l.
Glucose.....	1g/l.
pH	7,2

Annexe 2 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques testées.

Antibiotiques Testés	Charge des disques	Diamètre critiques (mm)		
		Résistant	Intermédiaire	Sensible
Auxacillin (Ox)	5 µg	>20	20	20<
Nitroxolin (Ni)	20 µg	> 12	12-30	<30
Amoxycilin+Acide clavulanic (Amc)	20/10 µg	>14	14-21	21<
Trimethoprin+Sulfamethoxazole (Sxt)	1.25/23.75µg	10>	10-16	16<
Penicillin (pc)	6 µg	<8	8-29	>29

Annexe 3 : Les masses des huiles essentielles.

	Masse de plante fraîche	Masse de plante séchée	masse de 100µl d'huile
Eucalyptus	100 g	39,62 g	0,0886 g
Romarin	100g	32,85 g	0,0847 g
Pistachier	100g	50 g	_____

Annexe 4 : Les diametres des zones d'inhibition en (mm) de cinq antibiotiques sélectionnés vis-à-vis *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *MRSA*.

Antibiotiques testés	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>MRSA</i>
OX	26 ,16	0	0
NI	19,16	23,27	9,11
AMC	23,91	21,96	0
SXT	21,21	24,60	0
PC	22,17	0	0

Annexe 5 : Chromatographie en phase gazeuse.



Annexe 6 : Chromatogrammes des échantillons des huiles essentielles

C-RSA CHROMATOPAC

CH=1

DATA=1:@CHRM1.C00

ATTEN= 4

SPEED= 4.0

*Right CH
V=0.3ml*

0.0
 2.5
 5.0 4.323
 7.5 7.138
 10.0
 12.5
 15.0
 17.5
 20.0
 22.5
 25.0
 27.5
 30.0
 32.5
 35.0
 37.5
 40.0
 42.5
 45.0
 47.5
 50.0
 52.5 52.004
 55.0
 57.5
 60.0

GENERATED BY
 OPERATOR
 DATE
 TIME

C-RSA CHROMATOPAC CH=1 Report No.=3

DATA=1:@CHRM1.C00 11/06/04 12:17:20

*+ CALCULATION REPORT **

HEIGHT	PK	IDNO	CONC	NAME
--------	----	------	------	------

TOTAL	0	0	0	
-------	---	---	---	--

73

7:2

5	8.3	176217	44254	V	0.3979
6	8.373	197772	44100	V	0.4465
7	8.452	197962	44465	V	0.447
8	8.53	1533300	43882	V	3.4619
9	9.636	1005824	26359	V	2.271
10	10.66	88287	17821	V	0.1993
11	10.139	176490	17841	V	0.3985
12	10.28	612124	17435	V	1.3821
13	11.771	1247456	29449	V	2.8165
14	12.071	169731	26362	V	0.3832
15	12.264	281423	27577	V	0.6354
16	12.351	138330	27909	V	0.3123
17	12.422	1224402	28312	V	2.7645
18	14.605	101235	4975	V	0.2286
19	14.761	48038	5231	V	0.1085
20	15.116	120075	6428	V	0.2711
21	15.276	63180	6862	V	0.1427
22	15.434	64962	7901	V	0.1467
23	15.5	23745	6806	V	0.0536
24	15.593	64147	6942	V	0.1448
25	15.739	69055	6779	V	0.1559
26	16.217	177896	8181	V	0.4017
27	16.333	94879	8075	V	0.2142
28	16.498	84915	7965	V	0.1917
29	16.664	44382	7486	V	0.1002
30	19.195	13651464	195489	V	30.8227
31	19.373	2149909	215200	V	4.8541
32	19.543	2209527	231954	V	4.9887
33	19.677	1814938	241931	V	4.0958
34	19.864	308160	41936	V	0.6963
35	20.768	450254	30718	V	1.0166
36	21.04	214679	9222	SV	0.4847
41	24.955	55334	1725	V	0.1249
42	25.881	16547	716	V	0.0374
46	27.746	4686	394		0.0106
47	27.815	4967	395	V	0.0112
48	28.413	28990	1709	V	0.0655
49	28.49	26077	1700	V	0.0589
50	29.514	105647	2476	V	0.2385
52	30.818	7154	353	V	0.0162
53	32.283	5542766	143342	SV	12.5146
54	32.517	2734	222	T	0.0062
55	34.001	1528783	43441	V	3.4517
56	34.418	476780	29657	SV	1.0765
57	35.139	5714	372	T	0.0129
58	36.242	215439	7886	V	0.4864
59	36.897	355133	12409	V	0.8018
60	38.09	1825236	65231	V	4.1211
61	38.454	2205326	75608	SV	4.9793
62	38.732	11175	2505	T	0.0252
63	38.879	4449	1020	T	0.01
64	39.169	3282	343	T	0.0074
65	39.145	4390	452	TV	0.0099
68	40.499	19865	1216	TV	0.0449
69	41.146	12393	520	TV	0.028
71	41.483	4113	418	TV	0.0093
72	41.939	7979	513	TV	0.018
73	42.446	52957	3378	TV	0.1196
76	43.934	11917	654	TV	0.0269
78	44.661	3849	265	TV	0.0087
79	45.035	5094	317	TV	0.0115
80	45.3	7958	509	TV	0.018
81	45.844	2679	260	T	0.006
84	46.911	193200	9691	V	0.4362
85	47.384	48216	3591	V	0.1089
86	48.423	55415	2391		0.1251
87	49.133	6270	244	V	0.0142
88	49.956	11048	438	V	0.0240
90	51.098	51189	2422	V	0.0458
91	51.712	26853	1572	V	0.0606

2
05

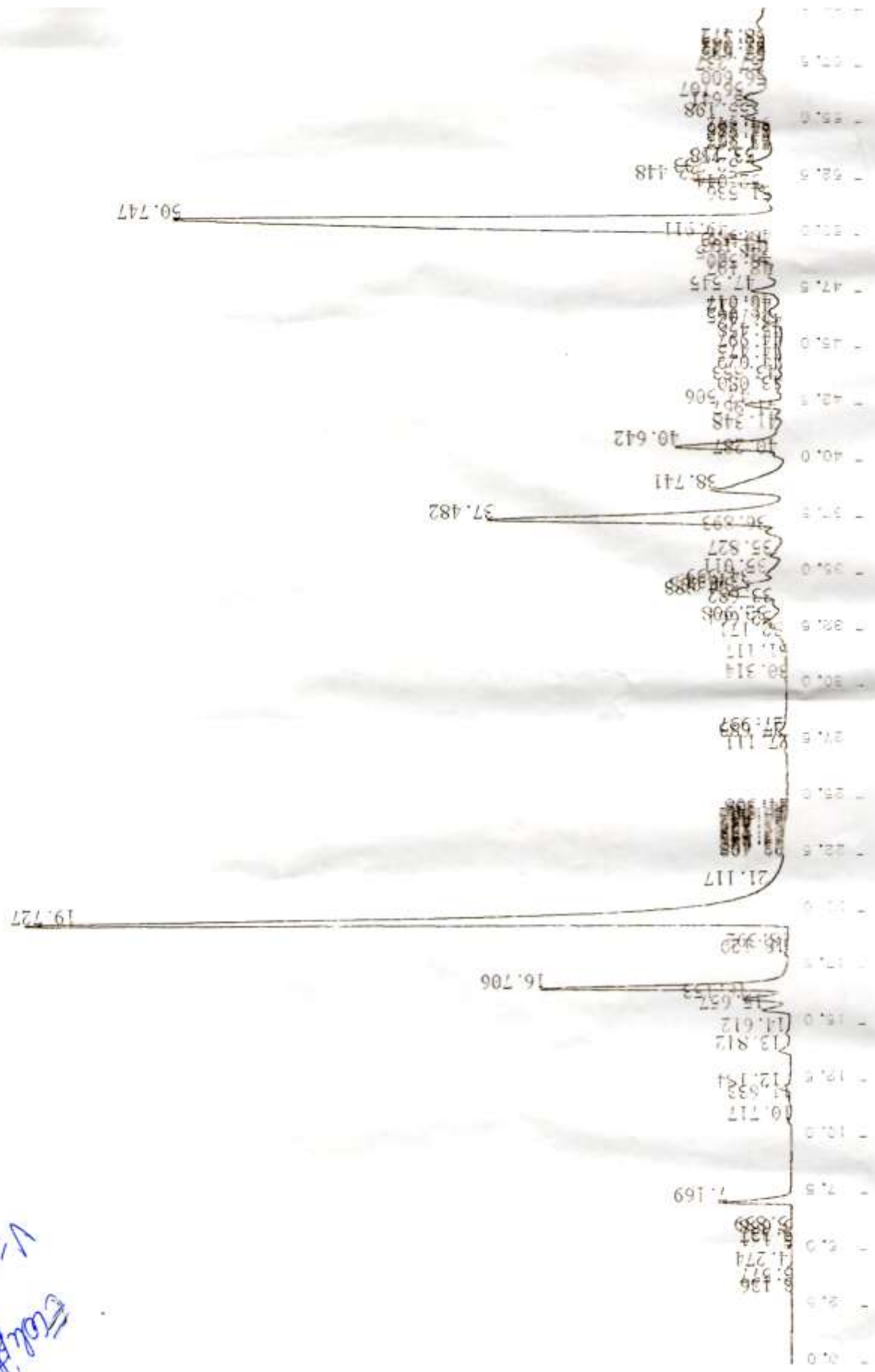
60
60
60

60
60
768

283

418

999



V=0.13Ml
EtOH/Bus

Peak 1
V

18038

18038