

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عمار ثليجي بالأغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOuat

كلية العلوم

FACULTE DES SCIENCES

قسم البيولوجيا

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

**Etude de l'activité antibactérienne et antifongique de
l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis L***

Présenté par :

✍ M^{elle} MOUAZIZ Wafaa

✍ M^{elle} BENMEBAREK Asmaa

Devant le jury composé de :

Président(e) : Mr Laboukh Mourad	MAA	ENSO
Examineur(rice)s : Mr Gouzi Hicham	Pr	UATL
Rapporteur : Mr Benaceur Farouk	MCB	UATL
Co-Rapporteur : Mr Hamdi Mahfoud	Associé	UATL

Soutenu publiquement le : 22/06/2019

Résumé :

Dans le cadre de ce travail, on s'est intéressé à l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* récolté dans la région de Laghouat (El-ghicha). L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation. Aussi, l'effet antimicrobien/antifongique des huiles essentielles extraites est effectué sur quatre souches bactériennes et une levure par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé.

D'après les résultats obtenus, on remarque que le rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* est de 0,75%.

L'étude de l'activité antimicrobienne/ antifongique par la méthode de diffusion des disques a montré que ces huiles possèdent une bonne activité antimicrobienne surtout sur *Candida albicans* soit une valeur de diamètre de la zone d'inhibition de 14,6mm. Pour *S.aureus*, on a une valeur de diamètre de la zone d'inhibition de 12 mm, avec un degré de sensibilité variable pour les autres souches testées.

Mots clés: *Rosmarinus officinalis* L. huile essentielle, activité antimicrobienne, activité antifongique, extraction.

A bouquet of pink roses is positioned on the left side of the page, with some flowers in sharp focus and others blurred in the background. The background is a soft, warm-toned bokeh of light pinks and whites.

Dédicace

A mes parents,

Pour vos mains qui ont tant travaillées,

Pour votre cœur qui m'a tant donné

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé, Pour vos yeux qui furent
parfois mouillés, Pour vous qui m'avez tant aimé.

A ma sœur : Soumia.

A mon frère: Aimen Bachir

A toute ma famille et à tout ce qui me connais-je-vous aime.

A mon binôme Asmaa avec qui j'ai partagé les bons et les durs
moments.

A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours
de mon cursus à l'université :

Ismahane, Samira, Rokia, Meriem,, Manal, Khadija, Mebarka,
Rahma.

Sans oublier : les membres de club « BIORISE »

A tous qui me connaisse de près ou de loin.

Wafaa

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

*A ceux que j'aime le plus au monde mes très chers parents,
Leurs sacrifices et leurs encouragements toute ma vie, je ne
Saurais jamais comment exprimer mes sentiments pour avoir
Veillé sur mon éducation, jamais je ne peux les remercier
Assez de m'avoir donné le meilleur.*

*A la mémoire de mon père « **Ahmed** » qui nous a quitté si tôt, j'aurais aimé
que vous soyez parmi nous dans des moments pareilles. puisse le dieu le tout
puissant, l'avoir en sa miséricorde*

*A ma source de bonheur, la prunelle de mes yeux, ma mère "**Fatiha**".*

Que le bon ALLAH vous garde en bonne santé.

-A mes chère sœurs :

Djamila, Oumelkheir, Zohra

-A mes chère frères :

Omar et Salah

A mon chère fiancé :

Imad Eddine Dada

*qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout
au long de mes études .Que dieu les protège et leurs offre la chance
et le bonheur*

*A mes cousines : **Siham, Wiam, Fatima** et toute ma famille merci pour leurs
amours et leurs encouragements*

A ma deuxième famille :

*Ma deuxième mère : **El-Hadja Kheira***

*A mes deuxièmes sœurs : **Radhia, Naziha, Imane, Hakima, Aicha***

Merci pour leurs encouragements

*Sans oublier mon binôme **Waffa** pour son soutien moral, sa patience et sa
compréhension tout au long de ce projet*

A tous qui me connaisse de près ou de loin.

Asma



Remerciements

Nos remerciements s'adressent tout d'abord à DIEU, le tout puissant qui nous a tracé le chemin de nos vies et accordé la volonté et la patience nécessaire à la réalisation de ce mémoire. Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements

*Et notre vive connaissance à notre promoteur **M^r BENACEUR Farouk**., pour nous avoir encadré et dirigé ce travail et pour sa disponibilité, ses conseils et le temps
Qu'il a bien voulu nous consacrer.*

*Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements aux membres de jury. Merci à la Président **Mr LABOUKH Mourad**., d'avoir fait l'honneur de
présider le jury.*

*Que l'Examineur **Mr GOUZI Hicham**., trouvent ici
L'expression de nos Plus hautes considérations et de notre sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail.
Merci pour les remarques, suggestions et critiques que vous allez apporter, qui vont, Sans doute, nous permettre d'enrichir le
contenu de ce travail.*

*Un grand merci s'adresse à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à L'achèvement de ce modeste travail. Nous remercions tous nos enseignants qui nous ont suivis le long de nos études. Veuillez agréer nos professeurs
L'expression de nos sentiments très respectueusement dévoués.*

Wafaa et Asmaa

Tables des matières

Résumé

Dédicaces

Remerciements

Tables des matières

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des abréviations

I- Introduction - 1 -

II-SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1 Historique et origine du terme Romarin - 3 -

II.2 Etymologie et nomenclature - 3 -

II.3 Description botanique - 3 -

II.4 Systématique - 5 -

II.5 Répartition géographique..... - 5 -

II.6 Récolte - 5 -

II.7 Composition chimique de l'huile essentielle - 5 -

II.8 Utilisation et applications du romarin..... - 6 -

II.9 Huiles essentielles et activités biologiques - 8 -

II.9.1 Origine et localisation des huiles essentielles..... - 8 -

II.9.2 Rôle des huiles essentielles chez les plantes - 9 -

II.9.3 Techniques d'extraction - 9 -

II.9.4 Activités biologiques de l'huile essentielle de *R.officinalis* - 10 -

III- MATERIEL ET METHODES

III.1 Introduction - 14 -

III.2 Matériel utilisé..... - 15 -

Table des matières

III.2.1	Matériel biologique	- 15 -
III.3	Méthodes	- 18 -
III.3.1	Extraction de l'huile essentielle.....	- 18 -
III.3.2	Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	- 19 -
<i>IV-RESULTATS ET DISCUSSION</i>		
IV-	Résultats	- 25 -
IV.1	Rendement des huiles essentielles.....	- 25 -
IV.2	Activité antimicrobienne	- 26 -
IV.2.1	Résultats de tests de sensibilité aux antibiotiques	- 26 -
IV.2.2	Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disques	-28-
IV.2.3	Évaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	-33-
V-	Conclusion.....	- 37 -
Résumé	- 37 -
Références bibliographie:	- 37 -
Annexes	- 46 -

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Principaux composés de l'huile essentielle de Rosmarinus officinalis L. de divers pays	06
Tableau 02 : L'activité antimicrobienne qualitative de l'huile essentielle de romarin sur différentes souches bactériennes	12
Tableau 03 : Situation géographique du site de récolte	15
Tableau 04 : Origine des souches utilisées dans test d'activité antibactérienne	17
Tableau 05 : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés	21
Tableau 06 : Caractéristiques d'huile essentielle Rosmarinus officinalis	25
Tableau 07. Résultats de l'antibiogramme des germes étudiés en présence de quelques antibiotiques	27
Tableau 08 : Résultats de l'effet de l'huile essentielle du Romarin diffusé après méthode des disques	29
Tableau 09 : Les valeurs de CMI (exprimée en mg/ml) relatives aux souches testées avec le DMSO comme solvant	33

Liste des Figures

Figure 1: Feuille linéaire de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	04
Figure 2 : Diagramme général de la procédure expérimentale	14
Figure 03 : <i>Rosmarinus officinalis</i>	15
Figure 04: Dispositif de l'hydrodistillation à l'échelle du laboratoire – Appareil Clevenger	18
Figure 05: Organigramme décrivant l procédure pratique suivie	22
Figure 06 : Rendement en huile essentielle obtenue.	26
Figure 07: Effet de l'huile du romarin sur <i>K pneumoniae</i>	29
Figure 08: Effet de l'huile du romarin sur <i>Staphylococcus aureus</i>	30
Figure 09 : Effet de l'huile du romarin sur <i>E.coli</i>	30
Figure 10 : Effet de l'huile du romarin sur <i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	31
Figure 11: Effet de l'huile du romarin sur <i>Candida albicans</i>	31
Photo 12. Résultats de détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait du <i>R.officinalis</i> sur <i>C.albicans</i>	34

Liste des abréviations

AFNOR	Association française de normalisation
ATCC	American Type Culture Collection
CMI	Concentration minimum d'inhibition
d	densité.
MH	Mueller Hinton
RHE	Rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
LabVét-Lagh	Laboratoire Vétérinaire du la wilaya de Laghouat

Introduction



I- Introduction

L'Algérie, capitale de la méditerranée est réputée par ses potentialités et biodiversité écologique et naturelle. Elle renferme entre autres un trésor naturel connu sous le vocable de plantes médicinales et aromatiques (Abdallah H et al., 2004). Les modes d'utilisation de ces plantes soit sous forme d'infusion, tisane ou autre vis-à-vis de plusieurs maladies ont été transmis d'une génération à une autre et constituent un vrai patrimoine méritant sa mise en valeur et révélation de ses mystères (Goeb., 1999). Cependant, l'utilisation rationnelle et précise nécessite toujours un support académique avec des recherches pointues et des résultats concrets (Adersen et al., 2006).

Ce dernier temps, le domaine de la phytothérapie et/ou l'aromathérapie suscite de plus en plus l'attention des chercheurs notamment ceux travaillant dans le domaine de la microbiologie médicale ou clinique (Abdallah et al., 2004). Ces derniers continuent à rechercher des nouvelles alternatives et/ou solution en relation par exemple avec la résistance des microorganismes pathogènes aux antibiotiques (Small et Catling., 2000) et de même à exploiter le cadeau céleste pour en tirer profit de ses avantages en mettant en valeur des molécules bioactives d'intérêt pouvant faire l'objet de plusieurs applications d'excellence dans le domaine d'industrie pharmaceutique.

Les composés extraits à partir de ces plantes sont généralement des métabolites secondaires, le plus souvent des huiles essentielles. Parmi ces plantes médicinales, nous citant à titre d'exemple le romarin ou le *Rosmarinus officinalis*, plante si abondante et si commune dans la région méditerranéenne. Elle est considérée comme une espèce très importante de la flore algérienne pour son utilisation et son efficacité en médecine traditionnelle. Par ailleurs, l'évaluation de ses propriétés antimicrobienne, en particulier l'effet et/ou l'efficacité de son huile essentielle sur des bactéries et champignons pathogènes semble être une approche intéressante et a fait l'objet de ce présent travail dont nous visons à étudier l'activité anti-bactérienne vis-à-vis de quatre souches pathogènes (*E.coli*, *S.aureus*, *k.pneumonia*, *S. aureus (MRSA)*) et antifongique (contre *C.albicans*) de l'huile essentielle de romarin.

Le présent travail est réparti en cinq chapitres. Le premier chapitre une introduction, le deuxième chapitre présente une synthèse bibliographique aussi brève que succincte sur la plante en cause et quelques généralités sur les huiles essentielles. Dans le troisième chapitre nous décrivons le matériel et les méthodes utilisés pour réaliser cette étude avec de même comme quatrième partie une discussion des résultats obtenus. Enfin, une conclusion énumérant les déductions soulevées et les perspectives qui en découlent sera également présentée.

II-Synthèse bibliographique



II.1 Historique et origine du terme Romarin

Depuis l'antiquité, le romarin fut un symbole des fêtes et funéraires d'excellence. Il était abondamment utilisé pour confectionner des couronnes, de même, ses feuilles ont été utilisées pour orner les têtes des étudiants en Grèce, car le romarin était reconnu pour avoir une action stimulante sur les fonctions mentales. C'est grâce à l'énigmatique reine de Hongrie « Donna Isabella » qu'il a véritablement pris ses lettres de noblesses. L'histoire veut qu'un ermite ait glissé dans une eau de romarin, la formule d'une éternelle jeunesse. Celle-ci aurait permis à Donna Isabella, septuagénaire, laide, paralytique et goutteuse de retrouver la splendeur de ses 20 ans et de séduire un jeune Roi de Pologne(**Bellakhdar., 2006**).

II.2 Etymologie et nomenclature

Le mot Romarin (*Rosmarinus*) dérive du latin; « *Ros* »: rosée, et « *Marinus*»: marin ou de marin, ou encore du latin « *rhusmarinus* » (Sumac de mer).On l'appelle également «herbe-aux-couronnes », et en provençal, «encensier»(**Athamena., 2009**).

Il est connu sous différents noms selon la langue utilisée et/ou la région dont nous l'appelons en français : encensier, herbe aux couronnes, Romarin, Romarin officinal. ;en Anglais : Rosemary, en Arabe et noms vernaculaire: Iklil al jabal, Klil, Hatssalouban, Hassalban, Lazir, Azîir, Ouzbir, Aklel, Touzala (**Ghédira et Goetz., 2012**).

II.3 Description botanique

C'est un arbuste toujours vert de 0,5 à 2 m (**Cabras et Coroneo .,2004**). La tige ligneuse est couverte d'une écorce grisâtre et se divise en de nombreux rameaux opposés (**Naggar et Iharchine.,2015**). Les feuilles sont étroites, linéaires, sessiles, opposées et persistantes. Elles sont enroulées sur les bords, vertes à la face supérieure, velues et blanchâtres à la face inférieure (**Naggar et Iharchine.,2015**). Les fleurs sont d'un bleu pâle, maculées intérieurement de violet. Elles sont disposées en courtes grappes denses (**Bekkara et al.,2007**).Il se forme quatre akènes simples par fleur (**Khairi et Boussaid.,2011**).

A-Appareil végétatif :

- ❖ Racine : la racine du *Rosmarinus officinalis L.* est profonde et pivotante.
- ❖ Tige : arbuste ou sous arbrisseau, rameau de 0.5 à 2 mètre cette tige est tortueuse, anguleuse et fragile. L'écorce est linéaire à cyme plus ou moins simulant des épis.(**Sanon.,1992**).

II-Synthèse bibliographique

- ❖ Feuille: linéaire, gaufrée, feuilles coriaces, sessiles, opposées, rigides brillantes à bords repliés verdâtre en dessus plus ou moins hispides blanchâtre en- dessous de 18 à 50 x 1.5 à 3 mm .

Les feuilles sèches dégagent une forte odeur et un gout amer. Elles contiennent jusqu'à à 2% d'huile essentielle oleumRosmarinus =Oleumanthos, renfermant du Cinéol et du Borneol, des alcaloïdes et des acides organiques. Ces feuilles, voire l'essence de romarin, entrent dans la composition de nombreux produits Antirhumatismaux du fait de leur fortement rubéfiant sur la peau alcool spiritusrasmarinus (**Janvola et Jinistodola., 1983**).

Appareil reproducteur :

- ❖ Fleurs : en mai, très courtes grappes axillaires et terminales. Chaque fleur environ 1cm de long de couleur purpurin ; bleu pâle ou blanchâtre en cloche bilabée à lèvre supérieure ovale entière et à lèvre à 2 lobes lancéolés. Lèvre supérieure en casque légèrement bifide.
- ❖ Lèvre inférieure à 3 lobes dont le médian est à 3 lobes dont le médian est large et concave. Les 2 étamine sont plus longues que la corolle. L'ovaire présente 2 carpelles surmontées d'un style long courbe et bifide.
- ❖ Fruit : est tétrakène de forme ovale située au fond du calice. Peut être sous forme de baie, sèche et lisse (Figure1).



Figure 1: Feuille linéaire de *Rosmarinus officinalis* L.

II.4 Systématique

Selon **Quezel et Santa(1963)**, la classification taxonomique de *Rosmarinus officinalis* L. peut être donnée comme suit :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : Rosmarinus

Espèce : *Rosmarinus officinalis* L.

II.5 Répartition géographique

L'aire géographique du Romarin est spécifiquement méditerranéenne. Ainsi, il est répandu dans les pays européens à savoir la France, l'Espagne, et le Portugal. De l'autre côté du Gibraltar, on le retrouve au Maroc en Algérie, en Tunisie et en Libye. On le trouve sur les sols calcaires (**Halal, 2010**).

II.6 Récolte

La période de récolte et/ou la cueillette d'une plante est en relation avec la période de floraison dont pour le cas du romarin, on peut la retrouver durant presque toute l'année. Dans la littérature, la période la plus adéquate s'étend de Mai à Juillet et même jusqu'à Septembre.

II.7 Composition chimique de l'huile essentielle

Plusieurs travaux ont été réalisés sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. en Algérie, au Maroc, en Espagne, et en Afrique du Sud. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

II-Synthèse bibliographique

Tableau 01 : Principaux composés de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. de divers pays.

Composition chimique	Algérie (Djeddi et al., 2007)	Maroc (Derwich et al., 2011)	Espagne (Navaja et al., 2007)	Afrique du Sud (Okoh et al., 2010)
αPinéne	5.4	18.25	36.42	11.47
1, 8-Cineole	12.2	5.25	12.02	11.91
Camphene	7.2	5.02	11.08	5.70
1-Octen-3-ol	0.6	0.03	-	-
Eucalyptol	-	-	-	5.74
Borneol	10.6	3.10	4.00	-
Verbenene	-	-	-	-
Bornylacétate	5.3	4.35	2.13	9.19
Camphor	-	-	-	-
Verbenone	-	-	-	-
Verbenol	-	-	-	17.43
β-Pinéne	8.5	-	3.67	1.12
Linalool	2.2	-	0.66	2.02
β-Caryophyllene	10.9	2.02	1.64	0.17
3-Octanone	-	-	-	-
B-Phellanderene	-	-	-	-
Limonène	-	-	-	-
Sabinene	-	-	-	-

II.8 Utilisation et applications du romarin

Ces arbustes aromatiques sont largement cultivés depuis l'Antiquité à des fins médicinales, culinaires et ornementales. Le romarin a été utilisé à des fins médicinales comme tonique cérébrale et comme médicament doux pour nettoyer le foie. Dans la Grèce antique et à Rome, Le romarin était censé renforcer la mémoire, ce qui explique son statut de «plante du souvenir» et fidélité. (Begum et al., 2013).

En médecine traditionnelle, les infusions à base de tiges et de fleurs ont été utilisées pour traiter les maux de tête et le rhume, anti-colique et dysménorrhée, et antispasmodique (Al-Sereiti et al., 1999). Après l'extraction des huiles essentielles, l'eau distillée des fleurs

est également utilisée comme collyre pour améliorer la digestion et atténuer les maux de ventre.(**Argueta et al., 1994**).

Les plantes médicinales ont joué un rôle majeur en tant que source de substances pharmacologiquement actives. L'essence de romarin est aujourd'hui un produit prometteur pour les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires, dotés de ses propriétés chimiques. Les plantes médicinales ont joué un rôle majeur en tant que source de substances pharmacologiquement actives.(**Hernandez.,2016**).

Aujourd'hui, l'huile essentielle de romarin est un produit prometteur pour les industries pharmaceutique, cosmétique et alimentaire, doté de ses effets chimiques (**Takaki et al., 2008**), ainsi que de ses propriétés antioxydantes(**Menghini et al., 2010**).

Toutes ces activités biologiques font l'huile essentielle de romarin très intéressante pour l'industrie médicale, à la fois comme source de composants actifs et, de plus en plus, pour son utilisation future potentielle dans les formulations de médicaments. Des applications de *R. officinalis* en aromathérapie ont également été décrites dans plusieurs publications. Des résultats prometteurs ont démontré l'amélioration de la fonction cognitive chez les adultes en bonne santé et les patients atteints de la maladie d'Alzheimer(**Sayorwan et al., 2013; Pengelly et al., 2012 ;Hernández et al.,2016**).

A-En Aromathérapie

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques pour prévenir ou soigner certaines maladies par voie interne ou externe (**Rajendran et al., 2014**).

Les vertus thérapeutiques des essences aromatiques sont connues depuis l'antiquité (**Hmiri et al., 2011**). Ces huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne et d'origine fongique (**Billerbeck., 2007**).

Elles présentent également des propriétés relaxantes, énergisantes, anti-inflammatoires, et antioxydantes(**AbougheAngone et al., 2014**) ainsi que des propriétés anti cancéreuses (**ElOulilalami et al .,2013**).

B-Parfumerie et cosmétologie

L'utilisation des huiles essentielles comme un composant dans la fabrication des parfums, des savons, des détergents, des crèmes, des lotions et des gels parfumés permet de leur procurer un arôme agréable tout en préservant ces produits grâce aux propriétés

antibactériennes et antioxydantes des huiles essentielles (**Khan et Abou-rashed., 2010; Aburjai et al., 2003**).

C-.Industrie alimentaire

Au cours des dernières années les consommateurs sont de plus en plus préoccupés par la sécurité des aliments qui contiennent des agents conservateurs synthétiques (**Bin Shan et al., 2007**).

Ces derniers ont été utilisés dans les aliments pendant des décennies, ce qui peut conduire à des conséquences négatives sur la santé Humaine (**Nemet et Skrinjar, 2009**).

Par conséquent, il y a eu un intérêt croissant pour le développement de nouveaux types de composés antimicrobiens efficaces et non toxiques et agents aromatisants naturels, tel que les extraits d'épices et fines herbes utilisées comme additifs alimentaires et agents de conservation des aliments (**Bin Shan et al., 2007**).

Dans cet optique l'usage des huiles essentielles est conseillé du moment qu'elles sont connues à la fois pour leurs propriétés aromatisantes et antimicrobiennes et leur toxicité réduite comparée à celle des additifs alimentaires synthétiques (**Bassole et al., 2001**).

II.9 Huiles essentielles et activités biologiques

Les huiles essentielles sont des essences extraites de plantes, avec un arôme propre à chacune de ces dernières. Ce sont des mélanges de substances aromatiques volatiles et odoriférantes présentes en faibles quantités dans le végétal. Elles sont obtenues principalement des fleurs (rose, jasmin), des bourgeons (clous de girofle), des feuilles (lavande, menthe), des racines (iris, souchet), des fruits (orange) et des graines (fenouil, anis). Leur composition varie souvent selon les conditions climatiques et environnementales. (**Wylock., 1972**). Elles sont très volatiles et passent instantanément de l'état liquide à l'état gazeux (**Aboughe Agone.,2014**).

II.9.1 Origine et localisation des huiles essentielles

Les huiles volatiles peuvent être considérées comme des résidus du métabolisme végétal. Suite à la photosynthèse au niveau des chloroplastes, l'énergie produite (sous forme de glucides, NADPH et d'ATP) contribue au développement de la plante et indirectement à la biosynthèse de multiples composés secondaires parmi elles les huiles essentielles (**Narishetty et al., 2004**).

En principe, les huiles essentielles se localisent dans toutes les parties vivantes de la

plante, mais elles sont souvent présentes majoritairement dans : les brindilles, les fleurs, les feuilles, les racines et les graines. Les cellules sécrétrices peuvent être localisées à la surface des différents organes de la plante, ce qu'on appelle localisation exogène, ou à l'intérieur de l'organe, localisation endogène. Dans certaines espèces végétales les deux types de structure sécrétrice ont été observés (**Werker et al., 1994 ; Charchari et al., 2007**).

II.9.2 Rôle des huiles essentielles chez les plantes

Le rôle des huiles essentielles dans la physiologie de la plante reste encore mal connu. Toutefois, elles sont en général considérées comme des déchets du métabolisme ou des sous-produits de l'activité métabolique d'une plante (**Amiot., 2005**).

Cependant, plusieurs effets apparents utiles ont été décrits telles que la réduction de la compétition des autres espèces de plantes (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines. Certains auteurs pensent que les huiles essentielles pourraient avoir un rôle attractif vis-à-vis des insectes pollinisateurs et les microorganismes, favorisaient ainsi la pollinisation (**Bruneton., 1999;Guignard et Potier., 2000**).

D'autres auteurs affirment que les huiles essentielles jouent un rôle hormonal, régulateur et catalyseur dans le métabolisme végétal, assurer leur ultime défense et semblent aider la plante à s'adapter à son environnement (**Fouché et al., 2000**).

II.9.3 Techniques d'extraction

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières et à la sensibilité considérable de leurs certains constituants. Le choix de méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire et de l'usage de l'extrait.

Les principales méthodes d'extraction sont :

- Hydrodistillation.
- L'Entraînement à la vapeur d'eau.
- L'hydrodiffusion.
- L'expression à froid.
- Extraction par solvants.
- Extraction par les fluides supercritiques.
- Extraction par micro-ondes.

Quel que soit le type d'extraction utilisé, Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origine végétale restent identiques. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation (Lucchesi.,2005).

II.9.4 Activités biologiques de l'huile essentielle de *R.officinalis*

a-Activité anti-oxydante

La demande des consommateurs pour des produits alimentaires sains offre la possibilité de développer des antioxydants en tant que nouveaux aliments fonctionnels. (Ojeda-Sana et al., 2013) ont publié que les huiles essentielles de romarin riches en myrcène présentent une forte activité antioxydante . Auparavant, (Wang et al., 2008) ont comparé les activités antioxydantes de l'huile essentielle de *R. officinalis* L. et de trois de ses composants principaux (1,8-cinéol, α -pinène et β -pinène) à l'aide du dosage 2,2-diphénylpicrylhydrazyle (DPPH%) et du β -carotène dosage de blanchiment. Dans l'analyse du pourcentage de DPPH, l'huile essentielle de romarin a montré une activité antioxydante plus forte par rapport aux étalons standards .Les fortes capacités antioxydantes de ces huiles suggèrent que l'huile essentielle de romarin fera une source d'antioxydants naturels d'excellence, et donc une alternative potentielle aux conservateurs synthétiques utilisés dans l'industrie alimentaire.

b-Activité antimycotoxique et antifongique

L'huile essentielle de romarin peut être utilisée sans danger comme agent de conservation dans certains types d'aliments pour les protéger contre les infections fongiques. (Rasooli et al., 2008).

Pitarokili et al. (2008) ont testé l'activité antifongique de l'huile essentielle spontanée de *R. officinalis* de Grèce contre cinq champignons phytopathogènes:

Sclerotinia sclerotiorum, *Phytophthora nicotianae*, *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* et *Fusarium proliferatum*. Le champignon le plus sensible était *Ph.nicotianae*, suivi de *S. sclerotiorum*, *S. cepivorum*, *F. proliferatum* et *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*.

C-Activité anti-microbienne :

Les préoccupations du public concernant la sécurité sanitaire des aliments ont conduit à la recherche de composants antimicrobiens naturels puissants. Entre autres l'huile essentielle de romarin est bien connue pour son activité bactéricide puissante. Dans cet optique, (**Gómez-Estaca et al., 2010**) et d'autres chercheurs ont testé l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de romarin contre 18 genres de bactéries, dont la plupart sont des agents pathogènes alimentaires courants et des bactéries contribuant à la détérioration des aliments (tableau II).

Certains auteurs ont également signalé un effet inhibiteur in vitro de l'huile essentielle de romarin sur des micro-organismes pathogènes tels que *E. coli*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (**Burt., 2004**).

Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux huiles essentielles, car il a été démontré que les structures de paroi cellulaire hydrophiles de bactéries à Gram négatif bloquaient la pénétration de composants hydrophobes à travers la membrane cellulaire (**Burt, 2004**).

Les mécanismes par lesquels certains composants présents dans l'huile essentielle exercent leur activité antibactérienne sont mal compris .(**Ojeda-Sana et al.,2013**) ont signalé un effet bactéricide associé à des lésions de la membrane cellulaire causées par le 1,8-cinéol .Ces auteurs ont évalué les modifications de la perméabilité membranaire d'*E. Coli* et d'*Enterococcus faecalis* après un traitement au α -pinène ou 1,8-cinéol.

En ce qui concerne l'efficacité de l'huile essentielle par rapport aux composants individuels qui définissent son chimotype, Il a été démontré qu'un effet synergique peut se produire en combinant les composants volatils, principalement un mélange de l' α -pinène et le 1,8-cinéol (**Jiang et al., 2011**).

En plus de ces deux composants majeurs, les composés mineurs peuvent également contribuer de manière significative à l'activité antimicrobienne. Les bactéries du genre *Brochothrix thermosphacta* constituent la microflore prédominante dans la viande réfrigérée stockée dans une atmosphère modifiée à haute teneur en oxygène. (**Hernandez.,2016**)

Bien que ces bactéries soient sensibles à l'huile essentielle de romarin, lorsqu'elles sont utilisées dans une atmosphère modifiée, cette huile ne produit pas les résultats escomptés. En effet, l'huile essentielle de romarin est non seulement inefficace contre *B.*

II-Synthèse bibliographique

thermosphacta à une concentration inhibitrice minimale (CMI) de 2, mais elle a également un effet néfaste sur la qualité organoleptique de la viande (Nowak et al., 2012). Par conséquent, l'application pratique des huiles essentielles peut être limitée pour des raisons de saveur (Hernandez.,2016).

Tableau02 : L'activité antimicrobienne qualitative de l'huile essentielle de romarin sur différentes souches bactériennes.

<i>Souche</i>	<i>Activité</i>
<i>Salmonella choleraesuis</i>	+++
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	++
<i>Listeria innocua</i>	++
<i>Citrobacter freundii</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	++
<i>Shigella sonnei</i>	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+++
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++
<i>Bacillus cereus</i>	+++
<i>Listeria monocytogenes</i>	+
<i>Clostridium perfringens</i>	+++
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+++
<i>Shewanella putrefaciens</i>	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	++
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	+++
+++ : totalement inhibé, ++ partiellement inhibé, +légèrement inhibé, -pas d'inhibition	

III- Matériel et Méthodes



III.1 Introduction

Ce présent travail a pour but d'étudier l'effet de l'huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* sur la croissance des microorganismes. La partie expérimentale abordée peut être présentée en deux axes comme suit :

- L'extraction d'huile essentielle de l'espèce végétale.
- L'étude du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques avec la détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI).

Un diagramme récapitulatif de la procédure suivie est donnée ci-dessous :

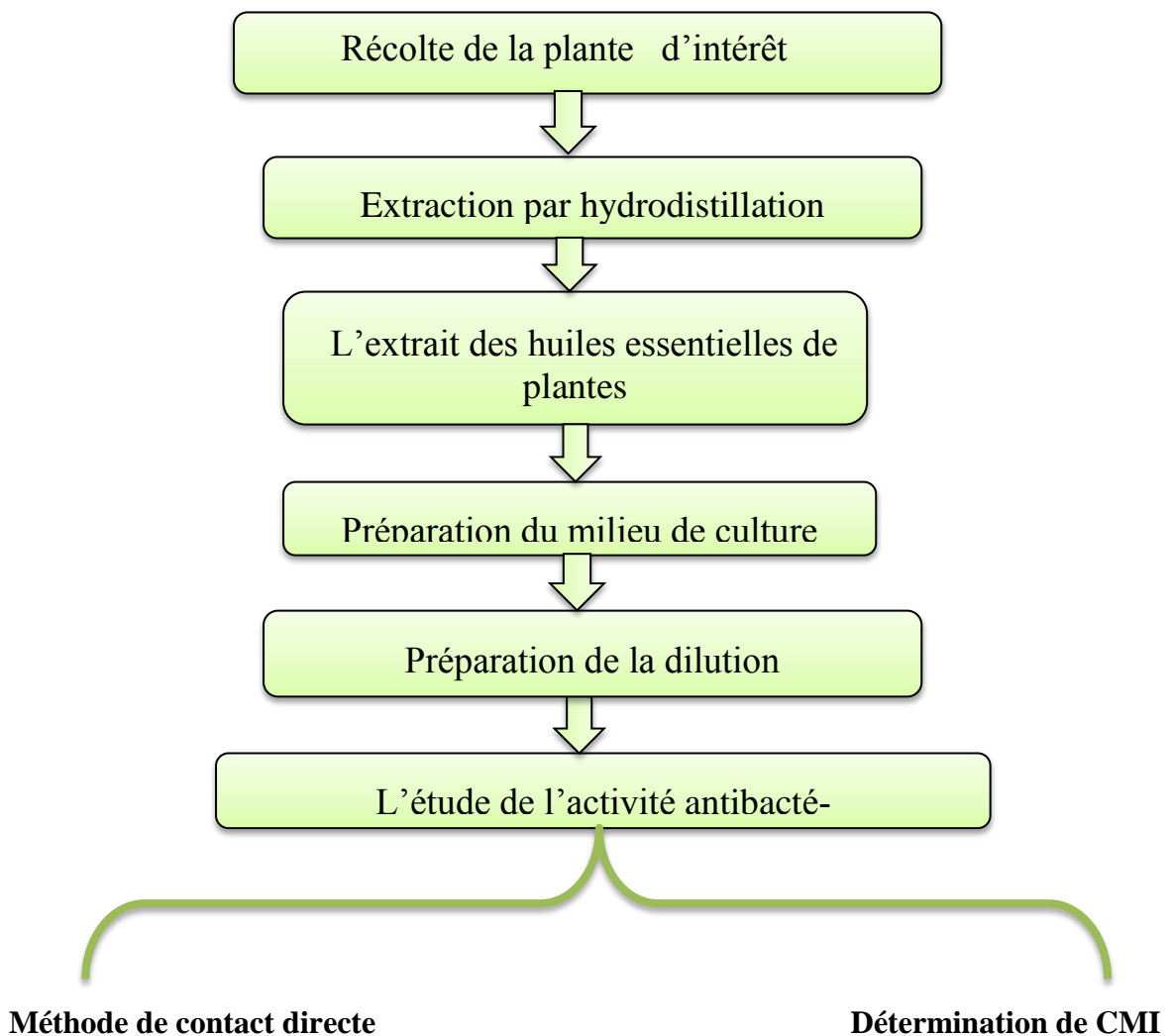


Figure 02 : Diagramme général de la procédure expérimentale.

III.2 Matériel utilisé

III.2.1 Matériel biologique

III.2.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des feuilles de *Rosmarinus officinalis* récoltées dans la région de Laghouat (El ghicha) durant le mois de janvier 2019. Les coordonnées correspondantes sont récapitulées dans le tableau 03.

Tableau 03: Situation géographique du site de récolte.

Nom scientifique	Région de récolte	Altitudes(m)	Latitude	Longitude	Date de récolte
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Laghouat, (El ghicha)	1138m	33.9164°	2.5379°	1/02/2019

Après la récolte, les plantes ont été identifiées au laboratoire académique de département de biologie de l'université de Laghouat à l'aide d'un spécialiste dans le domaine. Une photo réelle d'une plante ainsi récoltée est présentée dans la figure 3.



Figure 03 : *Rosmarinus officinalis* (Original.,2019)

III.2.1.2 Microorganismes testés

1. Souches bactériennes

1.1 *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des cocci à gram positif qui tendent à grouper en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (**Dworkin et al., 2006**).

Staphylococcus aureus est un germe aérobie - anaérobie facultatif .Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales. Ainsi, il possède une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de staphylocoques. (**Hennekineet al., 2003**)

Cette bactérie est très répandue chez l'Homme et dans de nombreuses espèces animales. Chez l'Homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains ayant la bactérie au niveau des muqueuses et des zones cutanées humides. Il développe rapidement des résistances aux antibiotiques et les souches hospitalières ne sont souvent sensibles qu'aux glyco-peptides (**Dworkin et al., 2006**).

1.2. *Klebsiella pneumoniae* :

Klebsiella pneumoniae est un germe de la famille des Entérobactériaceae. C'est un bacille Gram négatif, aéro-anaérobie, immobile et capsulé. Les colonies bactériennes sont volumineuses, bombées, brillantes et visqueuses (**Kouch., 2015**).

1.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Ce sont des bacilles à Gram négative, aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates. Ces bactéries sont catalase positives et ne possèdent pas d'oxydase (**Le Minor et al., 1990**).

Elles font parties de la flore commensale de l'Homme et des animaux à sang chaud (**Euzéby., 2011**).

Escherichia coli a la particularité de coloniser le tractus gastro-intestinal dans les premières heures de la vie et il représente près de 80% de la microflore aérobie (**Vernozy Rozand et Montet., 2001**).

2. Souche fongique

2.1. *Candida albicans*

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes (**Ezekowit et al., 1991**).

III-Matériel et Méthodes

Ainsi, elle se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère, tout en formant des colonies blanches crémeuses. (Kabha et al.,1995).

Candida albicans appartient à la flore commensale des individus sains. Chez l'Homme, cette levure constitue un sérieux problème de santé, notamment chez des patients immunodéprimés et ceux sous thérapies immunosuppressives (Stahl et Ezekowitz., 1998).

Les souche microbiennes utilisées dans cette étude proviennent de l'ATCC, (Tableau04).

Leur croissance est réalisée à 37°C sur gélose Mueller-Hinton Agar (MHA bio Mérieux)

Tableau 04. Origine des souches utilisées dans test d'activité antibactérienne.

Souche	Gram	Code	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (MRSA)	Positif	ATCC 43300	LabVét-Lagh
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	négative	ATCC 4352	LabVét-Lagh
<i>Escherichia.coli</i>	négative	ATCC 8739	LabVét-Lagh
<i>Staphylococcus aureus</i>	positive	ATCC 29312	LabVét-Lagh
<i>Candida albicans</i>	—	ATCC 10231	LabVét-Lagh

MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline ; ATCC : American Type Culture Collection ; LabVét-Lagh : Laboratoire Vétérinaire du la wilaya de Laghouat.

III.2.1.3 Matériel expérimental

Pour effectuer cette étude, on a utilisé les verreries, et les appareillages, et aussi un ensemble des réactifs, des milieux de culture et des produits chimiques dont une description détaillée est présentée dans l'annexe 1.

III.3 Méthodes

III.3.1 Extraction de l'huile essentielle

La mise en œuvre de l'extraction des produits naturels en général, et des huiles essentielles en particulier, est confrontée à un certain nombre de problèmes, qui sont le plus souvent:

- La faible teneur de l'huile essentielle dans la matière végétale.
- Les contraintes de récoltes saisonnières du matériel végétal qui posent le souci de son stockage.

Afin d'étudier l'activité biologique de notre huile essentielle, nous avons choisi l'hydrodistillation comme méthode d'extraction d'huile essentielle. C'est le procédé le plus simple et souvent utilisé.

. Cette technique est basée sur l'immersion d'un échantillon solide (végétal) dans l'eau portée à ébullition, la vapeur saturée d'huiles essentielles traverse un serpentin ou elle se condense pour donner le distillat qui est composé de l'eau florale et de l'huile essentielle (Figure, 04).



Figure 04: Dispositif de l'hydrodistillation à l'échelle du laboratoire – Appareil

Clevenger (Original.,2019)

III.3.1.1 Mode opératoire

Dans un ballon d'une capacité de 2 litres, on introduit 100 g de matière végétale découpée. Puis, on ajoute un volume d'eau qui correspond à 2/3 de la capacité du ballon.

Ensuite, on adapte le ballon à l'appareil de condensation et on alimente le réfrigérant en eau. Ainsi, le ballon et son contenu sont mis sur un chauffe-ballon.

Les huiles essentielles entraînées par les vapeurs d'eau générées dans le ballon sont dirigées vers le col de cygne (le coude) qui relie le ballon au réfrigérant. Enfin le distillat est récupéré dans un erlenmeyer recouvert d'un papier aluminium pour le protéger de la lumière. On le conserve au réfrigérateur. L'extraction des huiles essentielles dure plus de 2 heures.

III.3.1.2 Caractéristiques de l'Huile essentielle

La caractérisation d'une huile essentielle consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur, saveur).
- Déterminer ses indices physiques (Rendement et densité).

A-Analyse physique

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

B-Détermination des rendements en huiles essentielles :

L'extraction par hydrodistillation d'huile essentielle de la plante étudiée a été menée chaque jour, pour définir la valeur maximale du rendement en fonction du temps de séchage et dans les mêmes conditions de travail. Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal utilisé pour cent (AFNOR, 2000). Après récupération des huiles essentielles, le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R^{dt} = m/m_0 \times 100$$

R^{dt} : rendement en huiles essentielles (en %) pour 100 g de la matière sèche.

m : masse d'huiles essentielles récupérées (g)

m_0 : prise d'essai du matériel végétal (g).

C-Mesure de la densité

La densité a été calculée en comparant la masse volumique (ρ) de notre huile essentielle avec celle de l'eau. En pratique, un volume bien déterminé aura une masse précise du quelle nous pourrions estimer approximativement concentration massique pondérale.

III.3.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*, la méthode de diffusion sur milieu gélosé Muller Hinton a été adoptée.

Selon **Fauchère et Avril.(2002)**, l'aromatogramme est une méthode qui se réalise in vitro. Elle est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disque ou méthode par diffusion en milieu gélosé.

Elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné d'huile essentielle (**Kheyar et al., 2014**).

A- Test de sensibilité aux antibiotiques

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet de nos extraits bruts. On a utilisé différents antibiotiques : Gentamicine 10µg (CN), Acide Nalidixique 30µg (NA), Imipenen 10µg (IMI), Amoxicilline 30µg (AML), Ampicilline 10 µg (AMP). Le choix des antibiotiques a été fait en fonction de la disponibilité. La Nystatin a été d'autre part testé en tant qu'antifongique vis-à-vis de la souche du *Candida albicans*.

Les disques des antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé (Müeller-Hinton Agar pour les souches bactériennes et Sabouraud pour la levure), préalablementensemencé avec un inoculum à 0.1 Macfarland des souches à étudier. La lecture fait après 24 heures d'incubation à 37°C pour les bactéries et après 48 heures à 27°C pour la levure. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les extraits des huiles essentielles de *R.officinalis*

B. Préparation des précultures

Les souches microbienne à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétri contenant du milieu Müeller-Hinton Agar et la souche fongique a été cultivée dans des boites de pétri contenant du milieu Sabouraud. Après 24 heures d'incubation à 37°C, un inoculum pour chaque suspensionbactérienne et fongique d'une densité optique de 0.1 mesurée à 620 nm a été préparé dans l'eau physiologique stérile.

C-Méthode de diffusion sur gélose (méthode de Vincent)

L'évaluation de l'effet antibactérien d'huiles essentielle de *R.officinalis* est testée par la méthode de la diffusion sur gélose selon les recommandations (**NCCLS., 2000**).

La méthode des disques est une méthode de diffusion des produits à tester à partir d'un disque de papier (Whatman N°1) qui permet de mesurer qualitativement la sensibilité des souches aux effets antimicrobiens (**Aouni et al., 2013**).

III-Matériel et Méthodes

La méthode des disques est choisie dans cette étude pour sa fiabilité et sa simplicité. Cette méthode nous fournit des résultats préliminaires sur la sensibilité de la souche et l'activité antibactérienne du notre HE, grâce aux diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des disques mesurés en millimètres (mm).

La souche bactérienne est préparée dans du milieu de culture approprié et adaptée aux normes. Les disques imprégnés dans l'huile essentielle sont déposés à la surface de ces milieux et incubés à 37 °C pendant 24 heures. Tous les essais sont effectués à deux reprises.

La mesure du diamètre des zones d'inhibitions est transcrite dans différents symboles à l'activité (**Tableau 5**) (**Moreira et al., 2005**).

Tableau 05: Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés. (**Moreira et al., 2005**)

Diamètres de la zone d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité du germe
<8	-	Résistant
9 – 14	+	Sensible
15 – 19	++	Très sensible
>20	+++	Extrêmement sensible

Pour chaque boîte la mesure de la zone d'inhibition indique la sensibilité de ce germe, nous avons deux actions proposées à se produire :

- Soit une action bactéricide où nous ne remarquons aucune croissance microbienne autour des disques.
- Soit une action bactériostatique, dont il y'a des zones d'inhibition autour des disques disposés sur la surface de milieu de culture.

Une récapitulation de protocole expérimental est présentée dans l'organigramme suivant

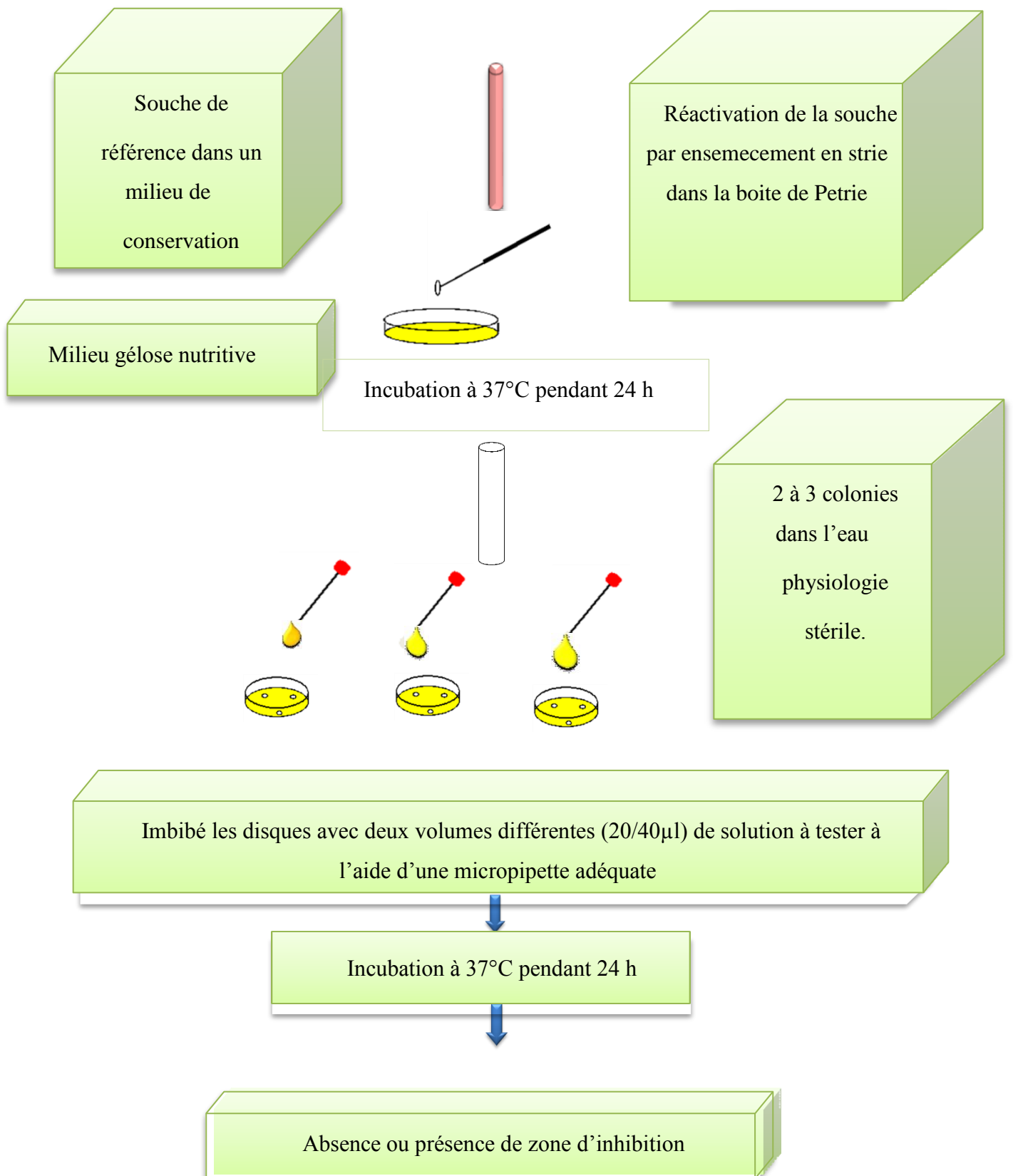


Figure 05: Organigramme décrivant la procédure pratique suivie

Avec une suspension fraîchement préparée et ensemencée sur les milieux gélosés. Nous imbibons un disque de papier Wattman stérile N°01 de 6 mm de diamètre avec trois volumes différents (20 et 40 µl) de dilutions croissantes d'extrait d'huile essentielle en utilisant le DMSO comme diluant (1/2 : 1/4) puis nous les déposons sur la surface de gélose ensemencée ensuite les incubons l'ensemble pendant 24 heures à 37 C°.

D-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI (concentration minimale inhibitrice) est la plus faible concentration d'antibiotique ou de substance antimicrobienne inhibant toute croissance visible après un temps d'incubation de dix-huit à vingt-quatre heures. La CMI permet de définir la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes aux substances antimicrobiennes (**Kablan et al., 2008**).

L'huile essentielle *Rosmarinus officinalis* a été diluée dans le DMSO (Dimethylsulfoxyde) afin d'obtenir une gamme de concentration de 0.3 - 3 mg/ml, Le même volume de DMSO est utilisé comme témoin négatif. La suspension microbienne est préparée selon les normes 0,1 McFarland (**Cavallo et al., 2005**), 0,1 ml d'inoculum est immédiatement ensemencé dans la gélose à l'aide d'un écouvillon.

La concentration minimale inhibitrice est la concentration qui correspond à le tube où il y a absence de croissance bactérienne.

(**Aligianis et al., 2001**) ont proposé une classification des extraits du matériel végétal sur la base des résultats des CMI, comme suit :

- Forte inhibition : CMI inférieure à 0.5 mg/ml.
- Inhibition modérée : CMI varie de 0.6 mg/ml à 1.5 mg/ml.
- Faible inhibition : CMI supérieure à 1.6 mg/ml.

IV-Résultats et discussion



IV- Résultats

IV.1 Rendement des huiles essentielles

L'huile essentielle a été extraite de matériel végétal sec. Notre huile essentielle a été obtenue par hydrodistillation, une méthode couramment utilisée pour l'extraction d'une huile essentielle (Marie Elisabeth.,2005).Les paramètres organoleptiques de notre huile essentielle sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR. (Afnor., 2000).

Tableau 06: Caractéristiques d'huile essentielle *Rosmarinus officinalis*

Propriétés	Valeur pratique / Description	Référence
Rendement (%)	0,75	0.5-2
Densité (g/cm ³)	0,9085	0,905-0,921
pH	6,03	6-7
Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile, limpide
Couleur	Jaune clair	Presque incolore jaune pâle
Odeur	Camphrée	Caractéristiques fraîche, plus ou moins Camphrée selon l'origine

Nous avons obtenu un rendement en huiles essentielle équivalent à 0,75% pour le romarin. Ces valeurs sont conformes aux normes AFNOR (0,5-2).Cela peut être due aux différents facteurs qui rentrent en jeu, parmi lesquels, nous citons ; la nature du sol, la période de la récolte, la durée de séchage, le mode d'extraction. (Zabeirou et Hachimou.,2005).

Le rendement en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* obtenu (0,76%) est le même obtenu pour le romarin récolté du Blida (Mechri et Akhdif.,2016) mais inférieur à ceux trouvés pour le romarin du Liban (1,5%) (Hilan et al.,2006) et celui de la Tunisie(1,85%) (Ayadi .,2011).

Le rendement en huile essentielle est variable en fonction de la plante utilisée, le matériel employé pour l'extraction et la méthode d'extraction aussi bien l'origine de la plante. (Mechri et Akhdif., 2016).

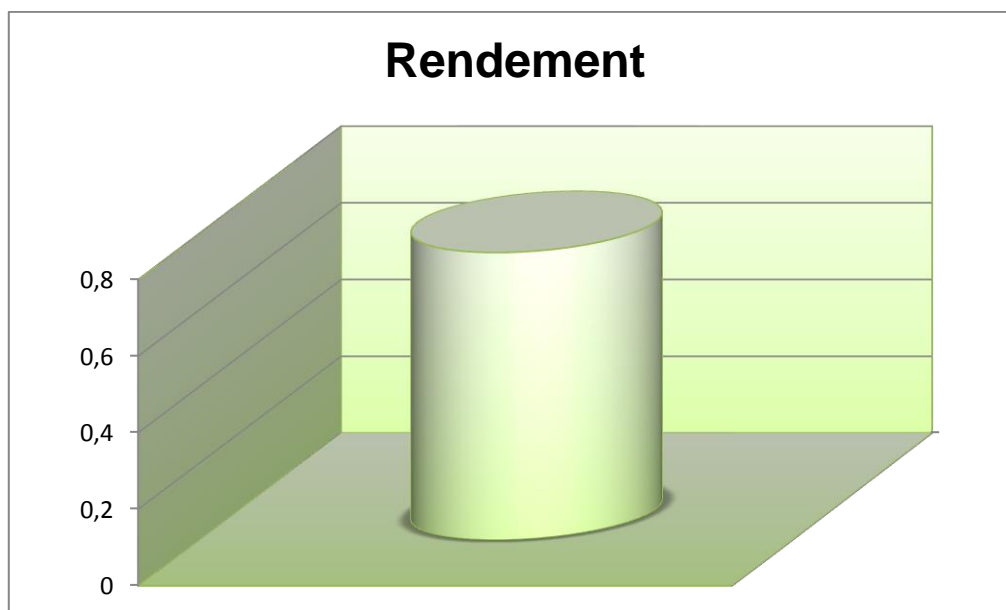


Figure 06 : Rendement en huile essentielle obtenue.

Les propriétés physico-chimiques telles que la densité, le pH, constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité des huiles essentielles (Afssaps., 2008).

En effet, Les paramètres physico-chimiques sont influencés par les conditions édaphiques, climatiques ainsi que les conditions de cultures des plantes. Il est logique que leurs valeurs soient différentes d'un endroit à un autre dans le globe (Kulkarni et al., 1996; Juliani et al., 2006). Selon (Yerou et al., 2016), la densité de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinallis L.* est de 0.90 Ce qui indique une composition chimique complexe.

IV.2 Activité antimicrobienne

IV.2.1 Résultats de tests de sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Le tableau (07) reporté les valeurs, en millimètre, des zones d'inhibitions atteintes avec les différentes souches bactériennes et la souche fongique respectivement.

Tableau 07. Résultats de l'antibiogramme des germes étudiés en présence de quelques antibiotiques.

	Diamètre de la zone d'inhibition en (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (<i>MRSA</i>)	<i>C. albicans</i>
AMP 10 µg	10.2 ± 1,838	6 ± 0	44 ± 0	R	-
AML 30µg	13.245±0,3	6±0	42.08±0,593	R	-
CN : 10µg	26.98 ±	20.485±0,261	23.185 ± 0,53	24,185 ± 0,435	-
NA : 30µg	21.01 ±	17.55 ± 0,325	11.095±0,304	R	-
IMI: 10µg	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	18.05 ±0,763	R	-
Nystatin(10µg)	-	-	-	-	27,205 ± 1,124

D'après les résultats du tableau VII, on observe que les différentes souches de bactéries étudiées réagissent différemment aux antibiotiques testés. Parmi les souches étudiées, la souche *S.aureus* (*MRSA*) se révèle multi-résistantes, tandis que les trois autres semblent être plus sensibles

La levure *Candida albicans* était fortement inhibée par la nystatine (10 µg) comme antifongique où un diamètre d'inhibition d'environ 27 mm a été enregistré respectivement

De plus, la souche *S. aureus* a montré une sensibilité élevée en la comparant avec les deux autres souches Gram négative .Généralement, les bactéries Gram-positives sont plus sensibles par rapport aux bactéries Gram négatives (**Abirami et al., 2012**).

Ces dernières ayant une membrane externe composé de phospholipides, de protéines et riche en molécules de lipopolysaccharide .Leur membrane formant une barrière imperméable (**Bouterfas et al.,2014; Ambreeni et al., 2012**) qui empêche l'entrée de substance environnementale comme les antibiotiques et les anti-inhibiteurs (**Mendes et al., 2013**). La membrane est également associée à l'enzyme dans l'espace périplasmique qui sont capables de décomposer la molécule introduite de l'extérieur (**Adaykalaraj et al.,**

2012). en revanche, les bactéries Gram-positives sont plus sensibles ayant seulement une couche de peptido-glycane externe qui n'est pas une barrière de perméabilité effective (Abirami et al., 2012).

IV.2.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disques

On a étudié in vitro le pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis*, par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide. L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits à tester vis-à-vis de cinq germes pathogènes à savoir *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29312), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) (43300ATCC) et *Candida albicans* (ATCC 10231), après une durée d'incubation adéquate avec de même une température convenable pour chacune.

Les résultats ainsi obtenus sont récapitulés dans le tableau VIII.

Tableau 08 : Résultats de l'effet de l'huile essentielle du Romarin diffusé après méthode des disques

Microorganisme	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	C 1 (mg/ml)	C2 (mg/ml)
<i>Escherichia coli</i>	10,6±0,02	8,1±0,01
<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM)	10±0	7±0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11±0,1	8,9±0,02
<i>Staphylococcus Aureus</i>	12±0	8,5±0,04
<i>Candida albicans</i>	14,6±0,02	10,3±0,02

Selon les résultats de l'effet de l'huile essentielle du romarin sur la croissance des microorganismes testés, on constate que les souches testées présentent une sensibilité modérée vis-à-vis de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Une description des résultats obtenus via l'étude de l'effet de l'huile du romarin sur les différentes souches microbiennes est récapitulée dans les figures 07, 08, 09, 10,11.

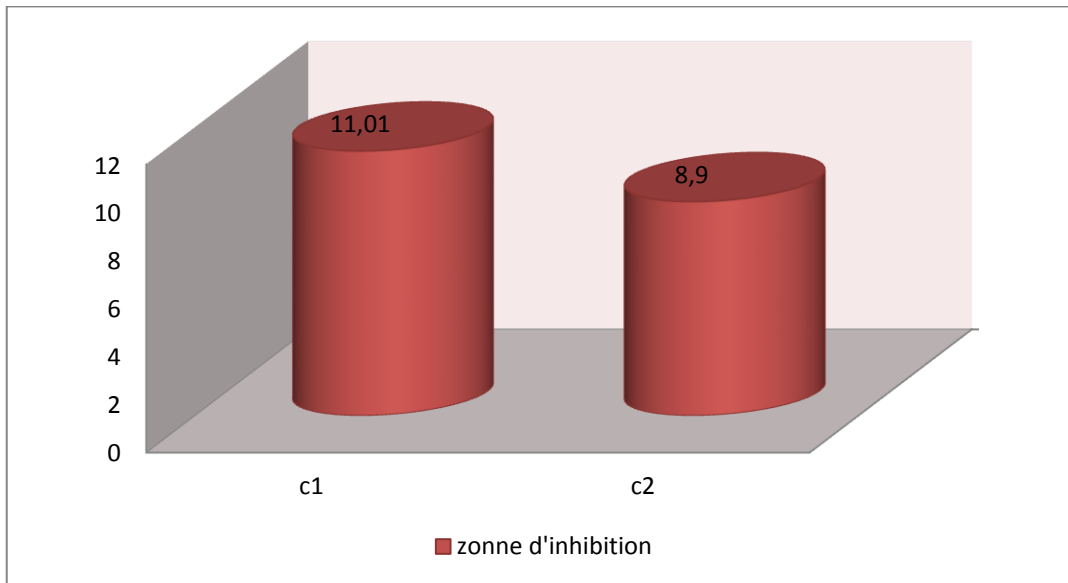


Fig. 07: Effet de l'huile du romarin sur *Klebsiella pneumoniae*

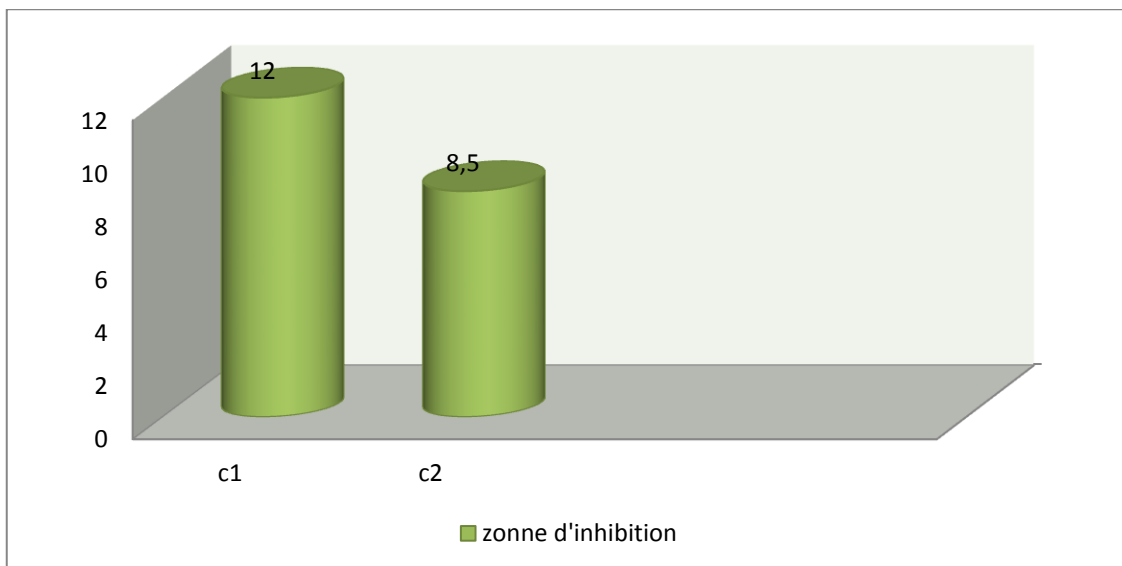


Fig. 08: Effet de l'huile du romarin sur *Staphylococcus Aureus*

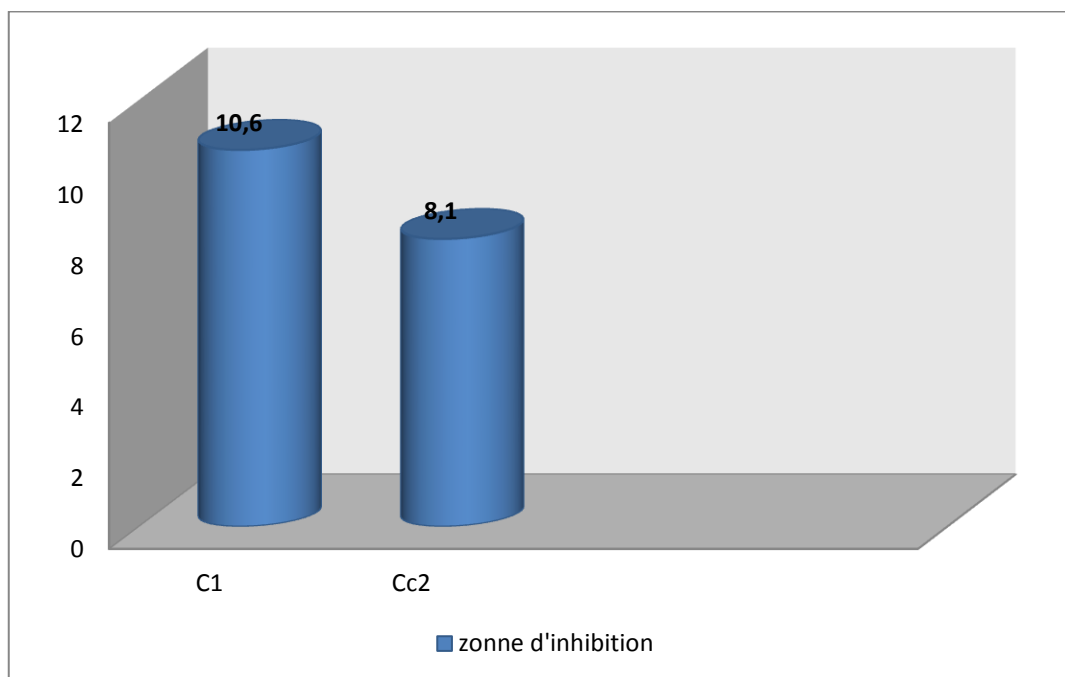


Fig. 09 : Effet de l'huile du romarin sur *Escherichia. coli*

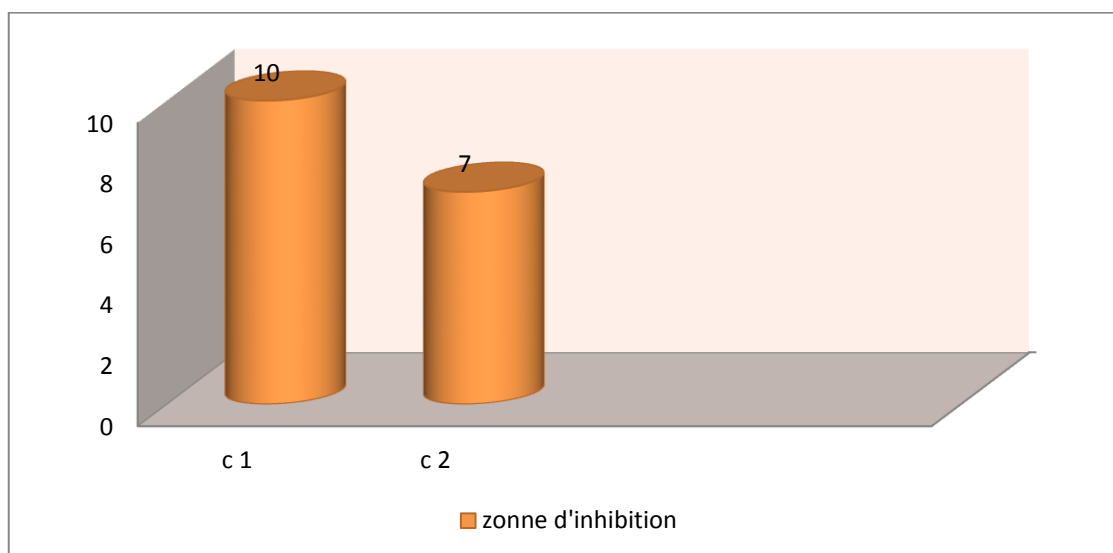


Fig. 10 : Effet de l'huile du romarin sur *Staphylococcus aureus* (MRSA)

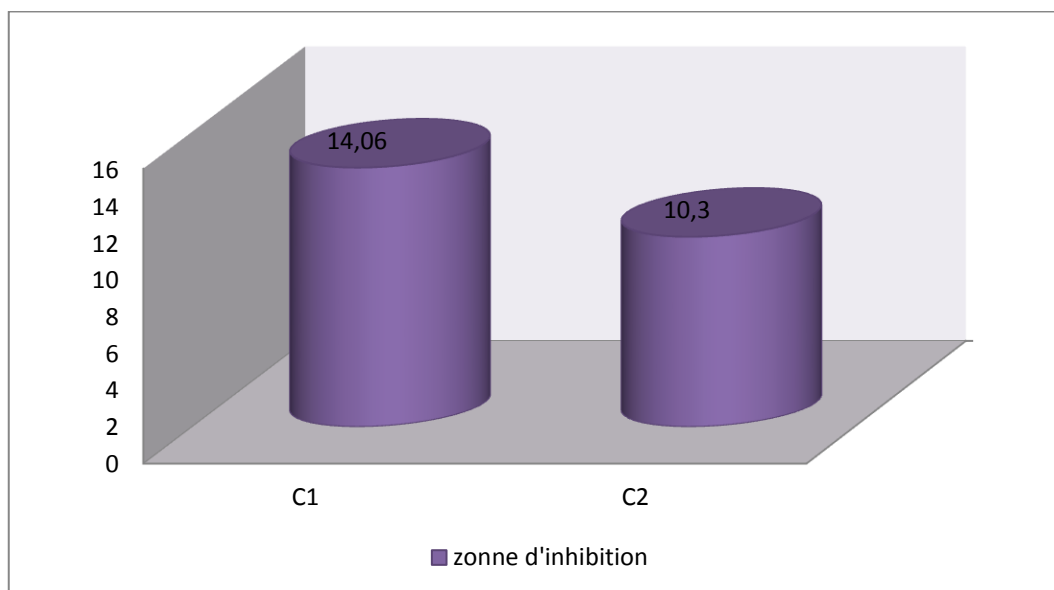


Fig. 11: Effet de l'huile du romarin sur *Candida albicans*

L'analyse des résultats de l'effet de l'huile essentielle du Romarin sur la croissance des différentes souches microbiennes testées, montrent que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est douée d'une activité antimicrobienne aussi bien contre les bactéries Gram⁺ que Gram⁻ ainsi que contre la levure, ce qui est en accord avec les travaux de (Ayadi et al., 2011) qui ont rapporté que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* présente un effet antibactérien notamment sur les souches bactériennes à Gram négative.

De même, (Lopez et al., 2005) rapportent que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a une activité inhibitrice vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* et *Candida albicans*, ce qui ne fait que confirmer les résultats de la présente étude.

D'autre part, selon (Conner et Beuchat., 2000), l'action des huiles essentielles contre les levures peut vraisemblablement être le résultat de l'affaiblissement des processus enzymatique impliqués dans la production énergétique et la synthèse de ses composants structuraux, ce qui confirme la forte sensibilité de *Candida albicans* vis-à-vis de l'huile essentielle du Romarin lors de cette étude qui s'est traduite par l'apparition d'une grande zone d'inhibition.

Il est postulé que les différents composants des huiles essentielles montrent différents degrés d'activité contre les bactéries Gram⁺ et/ou des bactéries Gram⁻ (Dorman et Deans., 2000). Ainsi, la composition chimique des huiles essentielles peut varier selon plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques (Lahlou., 2004).

(Skocibusic et al., 2006) et (Sharififar et al., 2007) ont affirmé que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est due entre autres à la présence des alcools à longues chaînes et des composés phénols qui inhibent la croissance des bactéries.

Selon (Griffin et al., 1999) et (Davidson et Naidu., 2000), les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes développent leur action contre les bactéries grâce à l'interaction avec la membrane cellulaire.

D'après les résultats, on remarque que l'huile essentielle du romarin possède une activité antibactérienne et antifongique, dont la souche la plus sensible est *Candida albicans*. Alors que la souche la moins sensible est *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

IV.2.3 Évaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la plus basse concentration capable d'empêcher une croissance bactérienne visible. La CMI n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur (Mann et Markham., 1998).

Nous rapportons dans le tableau, les CMI de notre extrait le plus actif de notre bactérie lors de l'étude en milieu liquide, Les CMI sont inversement proportionnelles aux changements de couleurs.

Tableau 09: Les valeurs de CMI (exprimée en mg/ml) relatives aux souches testées avec le DMSO comme solvant

Espèces	CMI (mg/ml)
<i>E.coli</i>	1.01
<i>K. pneumoniae</i>	0.8
<i>S. aureus</i>	0.6
<i>C.albicans</i>	0.3

(Yakhlef *et al* .,2011) ont proposé une classification des extraits du matériel végétal sur la base des résultats des CMI, comme suit :

- forte inhibition : CMI inférieure à 0.5 mg/ml ;
- inhibition modérée : CMI varie de 0.6 à 1.5 mg/ml ;
- faible inhibition : CMI supérieure à 1.6 mg/ml.

Ainsi selon cette classification, on constate une forte inhibition de l'extrait de d'huile essentielle de *rosmarinus officinallis* sur les souches testés a eu lieu impliquant que l'extrait de Romarin pourra faire l'objet d'un bactéricide et/ou fongicide d'excellence.

Les différences observées pour les valeurs de CMI peuvent s'expliquer par la présence de composés antibactériens dans notre extrait de plante à différentes concentrations, mais aussi par rapport au choix des techniques utilisées. (Yakhlef *et al.*, 2011).

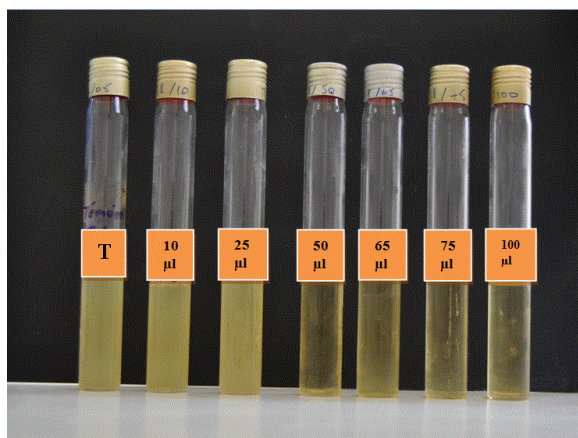


Photo 12. Résultats de détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait du *R.officinalis* sur *C.albicans*.

(Boutabia et al., 2016) ont rapporté une étude détaillée sur l'activité antibactérienne de l'huile du Romarin de la région de hammamet (Tebessa-Algérie). Les résultats obtenus à partir de l'aromatogramme ont montrés que les souches de *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus aureus* (SAMR), ont été les bactéries les plus sensibles aux extraits du *Rosmarinus officinalis*. (Jordán et ses collaborateurs.,2013) ont mentionné qu'une forte proportion d' α -pinène augmente l'efficacité des huiles essentielles du romarin contre *Staphylococcus aureus*, tandis que la présence de 1,8 cinéole, comme le composé le plus abondant, diminue considérablement l'efficacité de ces huiles.

(Makhloufi ., 2012) a rapporté à son tour dans sa thèse de doctorat une étude bien précise sur l'activité antibactérienne de Romarin du Bechar et de valeur de CMI équivalente à 0,5 a été estimé pour l'extrait méthanolique de Romarin vis à vis de *S.aureus* et *E.coli*.

En outre, (Giordani et al., 2008) ont rapporté une valeur de CMI équivalente à 0,2208 $\mu\text{g/ml}$, pour le romarin d'Annaba vis-à-vis des souches de *C.albicans* mais dans l'étude de (Ksouri et al., 2017) portée sur l'HE de cette même plante, collecté de la même région et testé sur des isolats cliniques de, ces auteurs ont enregistré des valeurs de CMI plus élevée (2,399 à 3,108 mg/ml).

Étant donné que l'HE d'une plante aromatique est un mélange complexe de plusieurs composés, l'attribution d'une propriété biologique à l'un de ses composants reste difficile.

IV-Résultats et discussion

Les composés majeurs sont généralement les garants des effets biologiques. En effet, les analyses chromatographiques ont montrés que le romarin a un profil chimique dominé Surtout par 1,8-cinéole et bornéol.

En général, dans des études réalisés à travers le monde, où ils ont démontrés que ces terpènes agissent sur l'intégrité cellulaire, l'inhibition des processus de respiration et de transport d'ions et augmentent la perméabilité des membranes cellules fongiques (**Lima et al.,2005 ; Tangarife-Castaño et al.,2011**).

Parallèlement, dans cette espèce de romarin, le groupe de terpènes isolé par plusieurs auteurs comme le bornéol, le camphre, la camphène et le bornyle acétate,ont été signalés à être responsable de l'activité antimicrobienne par (**Rasooli et al.,2008**).

En effet, la sensibilité des micro-organismes peut varier selon le germe testé, la composition de l'huile essentielle, la région et la saison de récolte car une même huile essentielle peut être bactéricide vis-à-vis de certaines souches, bactériostatique vis-à-vis d'autres ou sans effet (**Hermal.,1993**).

Conclusion



V- Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Dans ce travail, on a entrepris une étude sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* récoltée de la région d'El Ghicha (Laghouat).

L'extraction de L'huile essentielle a été réalisée par hydro distillation. La valeur du rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* est de 0,75%. L'étude de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des disques a montré des résultats intéressants vis-à-vis à des microorganismes testés.

Les extraits ont un bon effet bactériostatiques sur les bactéries Gram positives par rapport aux bactéries Gram négatif ainsi que sur la souche fongique utilisée. Parmi les souches microbiennes étudiées, *Candida albicans* semble être la souches les plus sensible vis-à-vis des extraits, tandis que *Staphylococcus aureus* (MRSA) est la souche la moins sensible.

Les CMI enregistrées (*Candida. albicans* 0.3mg/ml, *Staphylococcus. aureus* 0.6mg/ml *Klebsella.pneumonia* : 0.8mg/ml, *Escherichia.coli* :1.01mg/ml), d'une part, l'importance d'activité antimicrobienne des extraits de *R.officinalis*, d'autre part, son efficacité thérapeutique.

Il ressort de la présente étude que l'huile essentielle de *R. officinalis* étudiée peut être utilisée comme une bonne source naturelle d'agents antimicrobiens. Dans cette étude nous avons utilisé des extraits bruts, ce qui ne nous renseigne nullement sur la nature des composés responsables des activités antimicrobiennes observées. Par conséquent, comme perspectives, il serait nécessaire d'effectuer d'autres travaux complémentaire afin d'isoler et d'identifier la ou les substances responsables des activités antimicrobienne et de déterminer leur mécanismes d'action et aussi d'évaluer d'autres activités biologiques de cette plante médicinale et aromatique par exemples : activité antiparasitaire, anti-inflammatoire et/ou antivirale.

ملخص :

في هذا العمل، درسنا النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات من الزيت العطري *Rosmarinus.officinalis* التي يتم حصادها في منطقة الأغواط (الغيشة). تم استخراج الزيت العطري عن طريق التمييع المائي. أيضا، يتم تنفيذ تأثير مضاد للميكروبات / مضاد للفطريات من الزيوت الأساسية المستخرجة على اربع سلالات بكتيرية و خميرة من خلال طريقة نشر الاقراص على وسط أجار. من النتائج التي تم الحصول عليها، يلاحظ أن إنتاجية الزيت العطري للجزء الجوي من *Rosmarinus.officinalis* هي 0.75%. أظهرت دراسة النشاط المضاد للميكروبات / مضاد للفطريات بواسطة طريقة الانتشار للأقراص أن هذه الزيوت لها نشاط جيد مضاد للميكروبات، خاصة *candida albicans*، أي قيمة قطر منطقة تثبيط 14.6 ملم. بالنسبة ل *S.aureus*، هناك قيمة قطر لمنطقة تثبيط 12ملم ، مع درجة متفاوتة من الحساسية للسلالات الأخرى التي تم اختبارها. **الكلمات المفتاحية:** إكليل الجبل ، زيت أساسي ، نشاط مضاد للميكروبات ، نشاط مضاد للفطريات ، استخلاص.

Résumé :

Dans le cadre de ce travail, on s'est intéressé à l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* récolté dans la région de Laghouat (El-ghicha). L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation. Aussi, l'effet antimicrobien/antifongique des huiles essentielles extraites est effectué sur quatre souches bactériennes et une levure par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé.

D'après les résultats obtenus, on remarque que le rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* est de 0,75%.

L'étude de l'activité antimicrobienne/ antifongique par la méthode de diffusion des disques a montré que ces huiles possèdent une bonne activité antimicrobienne surtout sur *Candida albicans* soit une valeur de diamètre de la zone d'inhibition de 14,6mm. Pour *S.aureus*, on a une valeur de diamètre de la zone d'inhibition de 12 mm, avec un degré de sensibilité variable pour les autres souches testées.

Mots clés: *Rosmarinus officinalis* L. huile essentielle, activité antimicrobienne, activité antifongique, extraction.

Abstract :

In this work, we studied the antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* harvested in the region of Laghouat (El-ghicha). The extraction of the essential oil was carried out by hydrodistillation. Also, the antimicrobial / antifungal effect of the extracted essential oils is carried out on four bacterial strains and a yeast by the diffusion method of the disks on agar medium.

From the results obtained, it is noted that the yield of essential oil of the aerial part of *Rosmarinus officinalis* is 0.75%.

The study of antimicrobial / antifungal activity by the diffusion method of the disks showed that these oils have a good antimicrobial activity, especially on *Candida albicans*, ie a diameter value of the inhibition zone of 14.6 mm. For *S.aureus*, there is a diameter value of the inhibition zone of 12 mm, with a varying degree of sensitivity for the other strains tested.

Keywords : *Rosmarinus officinalis* L., essential oil, activity microbial, extraction.

Références Bibliographiques



1. **Abdallah H. and Sahki R. (2004).** Le Hoggar promenade botanique. Espèces herbacées. Edition Ésope, 311 p.
2. **Aboughe Angone, S. (2014).** « Some properties of the medicinal plants essential oils of Gabon. 13, 5 pp. 283-287».
3. **Aburjai, T., & Natsheh, F. M. (2003).** « Plants used in cosmetics. Phytotherapy research, 17, pp. 987-1000 ».
4. **Adesegun S. A., Fajana A., Orabueze C. I. et Coker H. A. B. 2007.** Evaluation of
5. **AFNOR Association Francaise de Normalisation, 1986,** Recueil de norme française « Huiles essentielles » paris, AFNOR NF T 75 – 006.
6. antioxidant properties of *Phaulopsis fascisepala* C B Cl (Acanthaceae). *Evidence based*
7. **Athamena, S., Laroui, S., & Athamena, M. (2015).** « Phenolic Composition, Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis*. Sciences et Technologie, 21-30 ».
8. **Avril J.L., Dabernat H., Denis F. et Monteil H., 2000** - Bactériologie clinique. 3ème Edition. Ellipses, Paris, p.602.
9. **Ayadi S., Jerribi. et Abderrabba M., 2011- Extraction** et études des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* cueillie dans trois régions différents de la Tunisie. Unité de recherche physico-chimique moléculaire .IPFST boite postale, la marsa Tunisie, p.51.
10. **Bahorum T., 1997- Substances naturelles actives : La flore Mauricienne, Une Source D’approvisionnement Potentielle,** AMAS. Food and Agricultural Research Council Scientific Correspondence.
11. **Bari M.A., Islam W., Khan A.R. and Mandal A., 2010-** Antibacteriel and antifungal activity of *Solanum torvum* (Solanaceae). *Int. J. Agric. Biol.*, (12): 386-390
12. **Bassole, H., Kabore, Z., & Traore, A. (2001).** « Etude des profils bactériostatiques et bactericides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale. *Pharm. Méd. Trad.*, 11, 113-122 ».
13. **Bekkara Atik, Bousmaha F, Taleb bendiab L, Boti S.A, Casanova J. (2007).** Composition chimique de l’huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à

- l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Bio & San.*(7): 6-11.
14. **Bellakhdar Jamal .(2006).** Précis de phytothérapie moderne ; plantes médicinales au Maghreb et soin de base / Ed le Fennec. P : 294-295.
 15. **Bernard, T., Perineau, F., Bravo, R., Delmas, M., & Gaset, A. (1988).** « Extraction des huiles essentielles : chimie et technologie. *Information chimie*, pp. 179-184 ».
 16. **Bernath, B., (1991).** « Hethelyi, Herba Hung ».
 17. **Bouguerra A et Zeghou K ., 2009** - Etude des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle extrais des fleurs sèches de lavandula officinalis . Mémoire d'ingénieur .INATAA, Université Mentouri Constantine,46p .
 18. **Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F., Chefrour, A (2016).** « Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis L.de la région de Hammamet (Tébassa-Algérie). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85, 174-189 ».
 19. **Burt, S. (2004).** « Essential oils:their Antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiologie*, 94 (3), 223-253 ».
 20. *complementary and alternative medicine.*, **6 (2) : 227-231.**
 21. **Conner D.E. et Beuchat L.R., 2000-** Effect of essential oil from plants of food spoilage yeast. *J. Food Sci.*, (49): 429-434.
 22. **Damerdji, A., Ladjmi, L., & Doumandji, S. (2005).** « Malacofaune associée à Rosmarinus officinalis L. (Labiatae):Inventaire et aperçu biologique prés de Mansourah (Tlemcen, Algérie. *Sciences et Technologie* (23), 11-20 ».
 23. **Davidson P.M . et Naidu A.S., 2000-** Phyto-phenols, Natural Food Antimicrobial Systems. Ed. CRC, Press: 265-293.
 24. **Derwich E., Benziane Z. et Boukir A., 2010** - GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of Mentha pulegium grown in Morocco . *Res.J .Agric . Biol. Sci*, 6 (3):191-198.
 25. **Djenane D., Yanguela J., Derviche F., Bouras L. et Roncales P., 2012-** Utilisation des composés des feuilles d'olivier comme agents antimicrobienne : application pour la conservation de viande fraiche de dinde, *Revue 'Nature et technologie*,(7) :53 - 61.
 26. **Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schkeufer K.H .and Stackebrandt E.,**

- 2006 - The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3eme éd.; Springer, New- York. Vol 4, Chap.1.2.1. The genera Staphylococcus and Micrococcus: 4-75.
27. **El Amri, J., Elbadaoui, K., Zair, T., Bouharb, H., Chakir, S., & Alaoui, T. I. (2014).** « Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L. et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*, 82, 7481- 7492 ».
28. **Euzéby J. P., (2011).** Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire.
29. **Ezekowitz R.A., Williams H., Koziel M. Y., Armstrong A., Warner F.F. and Richards., 1991** - Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature*, (351): 155-158.
30. Fauchère J.L. et Avril J.L., 2002 - Bactériologie générale et médicale. Ed. Ellipses Paris, 365.p.
31. **Fellah, S., Romdhane, M., & Abderraba, M. (2006).** « Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*. cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal-Société Algérienne De Chimie*, 16(2), 193».
32. **Ghebru H., 1988** - Contribution à l'étude du pouvoir pathogène des *Escherichia coli*. Mémoire de maîtrise et Sciences Vétérinaires en Microbiologie Immunologie. Nantes.
33. **Griffin S., Wyllie S., Markham J. L. et Leach D.N - 1999-** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.*, (14): 322-332.
34. **Halal Y., 2010** - Etude et biomasse du Romarin (*Romarinus officinalis* L.) dans le massif des Béni-Imloul-Aures-Algérie, université de la foresterie, p.71.
35. **Hammiche V., 1988-** Systèmes et morphologie botanique, O.P.U.
36. **Hennekine J.A ., Kerouanton A ., Brisabois A.et Buyser M .L., 2003** - Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J Appl Microbiol*, (94):321- 329.
37. **Hmiri, S., Rahouti, M., Habib, Z., Satrani, B., Ghanmi, M., & El Ajjouri, M. (2011).** « Evaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*Eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. *Bultin de la Société Royale des Sciences de liège*, 80, 824-836 ».

38. **Hulin, V., Mathot, A. G., Mafart, P., & Dufosse, L. (1998).** « Antimicrobial properties of essential oils and flavour compounds. Sciences des Aliments (France) ».
39. **Ichiro, A., E., R. E., Thomas., M., & Berton, Z. (1974).** « Biologically Active Components from Mycobacterial Cell Walls.I.Isolation and Composition of Cell Wall Skelton and Component P3. Jurnal of the National Cancer Institute ».
40. **Janvolak K., Jinistodola L., 1983-** Plantes médicinales illustration de Francis et Severa. Traduction française 1985-by Griind . 256-258p.
41. **Kabha K.L., Nissimov A., Athamna Y., Keisari H .,Parolis L.A., Parolis R.M., Grue J., Ezekowitz D.E. and Ohman .,1995 -** Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in Klebsiella pneumoniae. Infection and immunity, (63): 847-852.
42. **Khan, I.A, E. A. (2010).** « Used in Food, Drugs, And Cosmetics (éd. 3 éme). Wiley ».
43. **Khiari, D., & Boussaid, M. (2000).** « Diversité phénotypique de quelques populations de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) en Tunisie. Tropicultura, 18(4), 203-207».
44. **Kunst F.N. et Ogasawara .,1997 -** The complete genome sequence of the grampositive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature, 390(6657): 249-56.
45. **Le Minor L., Popoff M.Y. et Bockemühl J.,1990 -** Supplement 1989 (n. 33) to the Kauffmann-White scheme. Res Microbiol, (141) :1173–1177.
46. **Lopez P., Sanchez C. et Neri C., 2005-** Solid and vapor-phase antimicrobial activity of Six essential oils : susceptibilty of selected foodbotne bacterial and fungal strains. Journal of Agricultural and food chemistry, 53, (17): 6963- 6964.
47. **Madjour S., 2013-**Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne d'une labiée *rosmarinus officinales*.Thèse du mémoire, université des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la vie., Biskra, 64 p.
48. **Naggar, M., & Iharchine, K. (2015, September).** « Pour une valorisation durable des produits forestiers non ligneux cas des facies a romarin de l'Oriental du Maroc. Ressources Médicinales de la flore Française, Tome II Vignot Freres. Paris ».ournal of Environmental Biology, 28(4), 731-733 ».
49. **Nauciel C., 2000 -** Bactériologie médicale. Masson .Ed. Paris, 276p.
50. **Nemet .,Skrinjar M. M. (2009).** « Caractérisation et variabilité des plantes a parfume

- aromatiques et médicinales de corse et de l'ouest algériens. Apteff, 40, pp. 1-220 ».
51. **Newman D.J., Cragg G.M .et Snader K.M.**, 2003 – Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat Prod*, 66(7): 1022-1037.
52. **Nicholson W.L. et Munakata N.**, 2000 - Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3): 548-572.
53. **Ouibrahim A** 2014 « Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'Est Algérien. Thèse de doctorat »
54. **Pibiri M.C.**, 2006-Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Institut des infrastructures, des ressources et de l'environnement section d'architecture. Ecole poly technique fédérale de Lausanne, 177p.
55. **Quezel, P., Santa, S. (1963)**. « La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris: Tome II.CNRS ».
56. **SANON E.**, 1992-*Arbre et arbrisseaux en Algérie* O.P.U. Ben Aknoun. Algérie N°686 Alger. 121p.
57. **Sharififar., Moska M. H., Mansouri S. H., Khodashenas M .et Khoshnoodi M.**, 2007 - *Food control*, (18) :800-805.
58. **Skocibusic M., Bezic N., Dunkic V.**,2006 - *Food Chem*, (96) : 20-28.
59. **Small E.et Catling P.M.**, 2000 – *Les cultures médicinales canadiennes*. Presses scientifiques du CNRC, Ottawa(Ontario), Canada, p. 281.
60. **Stahl, P. D. and Ezekowitz R. A.**, 1998 -The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current opinion in immunology*,(10): 50-55.
61. **Verdrager J.**, 1978 - *Les médicaments qui nous viennent des plantes médicinales modernes*. Ed. Maloine, Paris, 233p.
62. **Vernozy-Rozand C. et Montet M.P.**, 2001- *Escherichia coli O157:H7*. Librairie Lavoisier, TEC & DOC. Paris, France.
63. **Wylock, M. (1972)**. « Les aromates dans les tablettes Ge de Mycénes. *Studi micenei*

edegeo- anatolici (Vol. 15) »

64. **Zabeirou et Hachimou ., 2005** - Étude comparative entre les Huiles essentielles de la Menthe Verte (Mentha Spicata L) et de la Poivree (Mentha Piperita L) dans la région d'Ouargla .Mémoire de DES Biochimie –Université de Kasdi Merbbah.,Ouargla, p.16.
65. **Zhiri, A. (2006)**. « Aromathérapie: un peu d'histoire. Sience, Nutrition, Prévention et santé, 6 ».

Annexes



Annexe 1 : Matériels non biologique utilisée dans le laboratoire

Verreries et petite matériels	Appareillage et dispositifs	Réactifs et milieux des cultures
Tubes à essais	Réfrigérant	L'eau physiologique
Béchers Fioles	Bain marie	L'eau distillée
Pipettes pasteur	Bec benzène	Muller-Hinton (M.H)
Micropipette	Balance	Sabouraud
Boîtes de pétri	Autoclave	Gélose nutritive (G.N)
Anse de platine	Etuve	L'eau javel
Papiers filtre Pince		Agar Agar
Pissette Cuvette de spectrophotomètre		Glucose
Portoir		NACL
Ciseau		DMSO
Erlenmeyer		
Coton-tige		