République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Dr YAHIA FARES DE MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Mémoire de Fin d'Etudes pour l'obtention du diplôme de Master en Génie des Procédés

Option

Bioprocédés Pharmaceutiques

Thème

Etude de l'activité antimicrobienne de certains types de miel à une association avec certain extrait de plantes

Etudié par :

M^elle^. Bensaber Imen.
M^elle^. Zahraoui Fatma zohra

Proposé et dirigé par :

***M^me^*.Tassist. A**

Jury:
Président : Mr. Abouseoud.M
Examinateurs: M^me^. Zouambia.Y
M^me^. Maachou

Promotion 2011 / 2012

Remerciements

Nous remercions ***Dieu tout Puissant*** *de nous avoir permis de mener à terme ce mémoire, qui est pour nous le point de départ d'une merveilleuse aventure, celle de la recherche, source de remise en cause permanente et de perfectionnement perpétuel.*

Nous tenons à remercier tous qui nous ont aidées durant notre travail du projet de fin d'études. Certaines par leurs conseils et leurs connaissances scientifiques, d'autres par leur soutien moral et leurs présences dans les moments les plus difficiles.

Nos premiers remerciements vont à notre promotrice ***Mme. Tassist, Maître de conférences B au département de génie des procédés et Environnement (U. Médéa),*** *pour avoir accepté de nous encadrer, de nous orienter, de nous porter aide et assistance tout le long de la réalisation de ce mémoire.*

Nos remerciements vont à ***M Abouseoud, Maître de conférences A au département de génie des procédés et Environnement (U.Médéa),*** *qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider le jury.*

Nos remerciements s'adressent ***Mlle Zouambia et Maachou, Maîtrse assistantes A, faculté des sciences technologiques (U. Médéa),*** *d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

Un grand remerciement à ***Mr Djekkoune A, le responsable du laboratoire d'hygiène d'eau (DSP)****, Qui nous a accueilli au sein du son Laboratoire et qui a mis à notre disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail tout au long la période de recherche qu'il trouve ici notre respect et reconnaissance.*

Mes remerciements vont également à toute l'équipe du laboratoire physicochimie au niveau du Halle technologique du Université de Médéa et du laboratoire d'hygiène d'eau de la direction de santé publique (DSP) pour leur grande gentillesse.

Enfin, que tous les enseignants du primaire, du secondaire et de l'université qui nos ont donné le goût des études.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à ma famille, notamment:

A mes parents qui ont éclairé mon chemin,

qui mon assister moralement et matériellement durant tout mon cursus de formation. Je souhaite que Dieu le tout puissant leur accordent une longue vie pleine de réussite.

A mon mari Billel pour son aide et son encourage pour son soutien et compréhension

Je dédie aussi ce travail :

A ma belle mère et bon père

A mes belles sœurs et beaux- frères

A mes frères et sœurs :

Karima, Yasser, Bouchera et Farah

A ma nièce Aya

A tout les membres de la famille

A ma chère amie, ma binôme, Fatma Zohra qui m'a supporté durant ces cinq dernières années.et chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin.

A tout mes amies

Et enfin, à tous mes collègues de la promotion 2ème année Master Bioprocédés.

Imen

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

A mes parents qui m'ont offert sans condition leur soutien moral et financier, ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études.

A mes chères sœurs Houria et son mari, Nabila, Samira et a mon cher frère Farouk.

A mon cher neveu Houssem.

A ma grande mère et grand père.

A mes tantes et à mes oncles.

A chaque cousins et cousines.

A ma chère amie, ma binôme Imen et sa famille

A tout mes amies

Et enfin, à tous mes collègues de la promotion 2ème année Master Bioprocédés



Fatma Zohra

الملخص :
يتناول هذا العمل تقييم تأثير عينتين من العسل الطبيعي (السدرو اللبينا) وأربع عينات من النباتات الطبية (الزعيترة, ورق الغار, إكليل الجبل و العرعار) و (مستخلص النبات- العسل) كمضادات الميكروبات. ويتم اختبار هذه العينات على اثنين من السلالات الميكروبية الممرضة (المكورات العنقودية الذهبية و البكتيريا المعوية).
ويستند عملنا على تقييم تأثير مضادات الميكروبات بتقنية النشر على وسط النمو.
وأظهرت النتائج بوضوح تأثير العسل والمستخلصات النباتية على حساسية الجراثيم. وقد لوحظ هذا التأثير المثبط لجميع العينات المختبرة، مع وجود اختلافات من عينة إلى أخرى ومن سلالة الجرثومية إلى آخرى.
وجدنا أن جميع العينات تظهر نشاط معتدل ضد المكورات العنقودية الذهبية، وليس له تأثير ضد البكتيريا المعوية.

الكلمات الرئيسية : العسل، النباتات الطبية، المكورات العنقودية الذهبية، البكتيريا المعوية، نشاط مضاد للبكتيريا ، تركيز الحد الأدنى للكبت.

Résumé
Le présent travail est une contribution à l'évaluation de l'effet antimicrobien de deux échantillons de miel naturels (Euphorbe et Jujubier), quatre échantillons de plante médicinale (*Thym, laurier, genevrier, romarin*) et d'une association Miel-Extrait de plante. Ces échantillons sont testés sur deux souches microbiennes à Caractère pathogène (*Staphylococcus aureus et Escherichia coli*). Notre travail est basé sur l'évaluation de l'effet antimicrobien par la **technique de diffusion en gélose**. Les résultats obtenus montrent clairement l'impact du miel et des extraits de plantes sur la sensibilité microbienne. Cet effet inhibiteur a été constaté pour tous les échantillons testés, avec des différences d'un échantillon à un autre et d'une souche microbienne à une autre. Nous avons constaté que les tous les échantillons manifestent une activité modérée contre *Staphylococcus aureus* et aucun effet bactéricide contre *Escherichia coli.*

Mots-Clefs: Miel, Plantes médicinales, *E. coli*, *S. aureus*, Activité antibactérienne, CMI.

Abstract:
This work is a contribution to the evaluation of antimicrobial effect of two samples of natural honey (Spurge and Jujube), four samples of medicinal plant (Thyme, Laurel, Juniper, Rosmarin) and an association Honey-Herbal extract. These samples are tested on two microbial strains with pathogen character (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*). Our work is based on the evaluation of antimicrobial effect by the agar diffusion technique. The results clearly show the impact of honey and plant extracts on microbial sensitivity. This inhibitory effect was observed for all samples tested; with differences from one sample to another and from one microbial strain to another.We found that all samples show moderate activity against *Staphylococcus aureus* and no bactericidal effect against *Escherichia coli*.

Keywords: Honey, Medicinal Plants, *E. coli*, *S. aureus*, Antibacterial activity, MIC.

Liste des abréviations

AA: acide amine

ADH: Arginine dihydrolase.

AMC : acétylméthylcarbinol

C: Concentration (mole/l)

°C: degré Celsius

Cal: calorie

Cat: catalase

CCM: chromatographie sur couche mince.

CIT : citrate

cm: centimètre

CMB: concentration minimale bactéricide

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CPG: chromatographie en phase gazeuse.

CO2: dioxyde de carbone.

D : diamètre d'inhibition

d: densité.

dm : décimètre

DO : Densité optique.

E: euphorbe

E coli: *escherichia coli*

EIEC : Entéroinvasifs

EHEC : Entérohémorragiques

EPEC : Entéropathogène

ETEC : Entérotoxinogène

F : frai

g : gramme

h : heure

HE : huile essentielle

HPLC: chromatographie liquide à haute performance.

IND : indole

IR: Infrarouge

J : jujubier

K : kelvin

Kg : kilogramme

L : litre

LDC: Lysine décarboxylase.

m : mètre /masse (g)

mg : milligramme

Min : Minute.

ml : millilitre

mm : millimètre

n: nombre de moles (mole)

nm : nanomètre

ODC: Ornithine décarboxylase.

ONPG : Ortho-**N**itro**p**hényl- β-D **G**alactopyranoside

pm : Picomètre (1 pm = 10^{-12} m)

PH: potential hydrogen

RM : rouge de méthyle

S : sec

s : siemens

S aureus : *staphylococcus aureus*

SM : spectrométrie de masse.

T *:* température/transmittance(%)/ taux d'humidité(%).

TDA : Tryptophane désaminase

V: volume (ml ; L)

VP : Voges–Proskauer

ρ : La masse volumique (g/ml)

µg : microgramme

µl : microlitre

% : pourcentage

Liste des tableaux

Partie bibliographique

Tableau I.1: Les composants mineurs du miel…….. **7**

Tableau I.2 *:* Propriétés plus spécifiques des miels uni-floraux…… **10**

Tableau II.1 : Modes d'actions antimicrobien de quelques polyphénols……... **12**

Tableau II.2 : Principales localisations géographiques du thym en Algérie…….. **15**

Tableau II.3 : Classification de la plante thym……... **15**

Tableau II.4 : Composition de l'infusion aqueuse du Thym (en µg/mg d'extrait)…… **17**

Tableau II.5 : Les flavonoïdes trouvés par plusieurs auteurs dans les feuilles de thym…. **17**

Tableau II.6: Systématique de Rosmarinus officinalis……... **21**

Tableau II.7 : Classification botanique du Genévrier……. **26**

Tableau II.8 : Classification botanique de Laurus…… **29**

Tableau II.9: résultat de travaux de recherches sur les propriétés des extraits aqueux des plantes contre les microorganismes pathogènes……... **34**

Tableau II.10: résultat de travaux de recherches sur les propriétés des extraits par solvants des plantes contre les microorganismes pathogènes…… **35**

Tableau II.11: résultat de travaux de recherches sur les propriétés des huiles essentielles des plantes contre les microorganismes pathogènes…… **36**

Tableau III.1: Caractères biochimiques de *S aureus*…….. **39**

Tableau III.2: Caractères biochimiques d'*E coli*…… **41**

Partie expérimentale

Tableau V.1: Caractères macroscopiques des bactéries isolées sur leurs milieux sélectifs…… **71**

Tableau V.2: Résultats de l'identification biochimique d'*E. coli* par API 20…….. **72**

Tableau V.3: Résultats de l'identification biochimique de S. aureus…… **73**

Tableau V.4: Valeurs de la densité des échantillons de miel…… **74**

Tableau V.5 : pH des miels……... **74**

Tableau V.6: Pourcentages d'eau dans les deux types de miels…… **75**

Tableau V.7: Quantité des sucres réducteurs dans les miels…… **76**

Tableau V.8 : Données tirées à partir des spectres IR des miels…….. **78**

Tableau V.9: Diamètres d'inhibition (mm) obtenus pour les dilutions des miels……. **79**

Tableau V.10 : CMI des miels sur les deux souches bactériennes…… **80**

Tableau V.11 : Diamètres d'inhibition (mm) de *S. aureus* obtenus pour les miels dilués à 75% et traités à des températures différentes**…**……. **82**

Tableau V.12: Diamètres des zones d'inhibition de *S. aureus* obtenues pour le miel d'Euphorbe et de Jujubier (dilués à 75%) traités à des pH différents…….. **83**

Tableau V.13: Les zones d'inhibitions (mm) des souches avec les différents extraits……. **85**

Tableau V.14 : Taux d'humidité des feuilles sèches et fraiche du laurier…… **87**

Tableau V.15: Diamètre d'inhibition (mm) de *S. aureus* pour le Laurier sec et frais……... **87**

Tableau V.16 : Diamètres d'inhibition (en mm) de *S. aureus* obtenus pour les extraits du laurier frais préparés par décoction à différents rapport m/v…….. **88**

Tableau V.17 : Diamètres d'inhibition (mm) de *S. aureus* pour les extraits de Laurier frais à différents pH…… **90**

Tableau V.18: Diamètres des zones d'inhibition des deux bactéries (mm) pour les différentes dilutions des extraits du laurier frais préparé dans les conditions optimisées….. **91**

Tableau V.19: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de *Staphylococcus aureus* obtenus pour les dilutions des miels dans l'extrait du Laurier frais préparé dans les conditions optimisées……... **93**

Liste des figures

Partie bibliographique

Figure I.1: La récolte du pollen par une ouvrière…….... **1**

Figure I.2 : Composition moyenne du miel……. **6**

Figure II.1 : Photo de thym……. **13**

Figure II.2 : Répartition géographique du thym dans le monde…… **14**

Figure II.3 : Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris* L……. **16**

Figure II.4 : Photo du Romarin……... **20**

Figure II.5 : Aspects morphologiques du romarin…….. **22**

Figure II.6 : Photo du Genévrier……. **25**

Figure II.7 : Aspects morphologiques du genévrier……... **27**

Figure II.8 : photo du Laurier (*Laurus)*……. **28**

Figure II.9 : Aspects morphologiques du Laurus…….. **29**

Figure III.1 : *Staphylococcus aureus* observée en microscopie électronique à balayage.. **39**

Figure III.2: *Escherichia coli* observée en microscopie électronique à balayage…….. **40**

Figure III.3 : Courbe de croissance en présence d'antibiotiques…… **43**

Figure. III.4 : Exemple de détermination de la CMI en milieu liquide……..... **44**

Figure III.5 : Méthode de diffusion en milieu solide……. **45**

Partie expérimentale

Figure IV.1 : Présentation des échantillons de miels étudiés…… **46**

Figure IV.2: A: *E. coli* isolé sur Hektoen, B: *Staphylococcus aureus* isolé sur Chapman……... **46**

Figure IV.3: Le pH-mètre utilisé……... **61**

Figure IV.4: Refractomètre……..... **62**

Figure IV.5 : Les différentes dilutions du miel……..... **64**

Figure IV.6 : Ensemencement du milieu Muller-Hinton par la souche à tester…… **65**

Figure IV.7: Application des disques……... **65**

Figure IV.8 : Dépôt du miel dilué……..... **65**

Figure IV. 9: Décoction dans un chauffe-ballon…… **67**

Figure IV.10 : Les extraits de plantes à différentes teneures……..

Figure V.1: Résultats de l'API 20E d'*E. coli*…….. 72
Figure V.2: Spectre IR du miel d'Euphorbe……... 77
Figure V.3 : Spectre IR du miel de Jujubier…… 77
Figure V.4: Effet antibactérien des miels sur *Staphylococcus aureus*…… 79
Figure V.5 : Effet antibactérien des miels sur *E. Coli*…… 79
Figure V.6 : Effet inhibiteur des miels sur *Staphylococcus aureus*…… 80
Figure V.7 : Zones d'inhibition de *S aureus* obtenues pour les deux types de miel dilués à 75% et traités à des températures différentes..... 82
Figure V.8: Variation des zones d'inhibition de *S aureus* obtenues pour les deux types de miel en fonction de la température du traitement…… 82
Figure V.9 : Zones d'inhibition de *S. aureus* obtenues pour le miel d'Euphorbe et de Jujubier (dilués à 75%) traités à des pH différents..... 83
Figure V.10 : Influence du pH sur l'activité antibactérienne du miel d'Euphorbe et de Jujubier..... 84
Figure V.11: Effet des différents extraits de plante sur *S aureus*..…… 86
Figure V.12 : Teneur en humidité des feuilles sèches et fraiche de laurier…… 87
Figure V.13 : Effet inhibiteur de *S. aureus* obtenus pour des extraits de plante fraiche et sèche préparés par décoction…… 88
Figure V.14 : Effet inhibiteur des extraits du Laurier frais préparés par décoction à différents rapports m/v (souche : *S. aureus*)…… 89
Figure V.15 : Influence du rapport m/v sur l'activité antibactérienne de l'extrait du laurier frais préparé par décoction…… 89
Figure V.16: Effet inhibiteur des extraits de Laurier frais à différents pH sur Staphylococcus aureus**…**…… 90
Figure V.17: Influence du pH sur l'activité antibactérienne de l'extrait de Laurier frais... 90
Figure V.18: Effet antibactérien de l'extrait du Laurier frais préparé dans les conditions optimisées…… 91
Figure V.19: Effet inhibiteur des dilutions d'extraits du Laurier frais sur S. aureus…….. 92
Figure V.20: Effet des dilutions des miels dans l'extrait du Laurier frais sur *Staphylococcus aureus* …… 93

Table des matières

INTRODUCTION

Partie bibliographique

CHAPITRE I : le miel.

I.1. Définition…….. **1**

I.2. l'origine du miel…… **1**

I.2.1. L'origine directe……... **1**

I.2.2. L'origine indirecte…… **2**

I.3. Formation du miel…… **2**

I.4. Les types des miels……... **3**

I.5. Technologie du miel……. **4**

I.5.1. La récolte du miel…… **4**

I.5. 2. L'extraction de miel…… **4**

I.5.3. Le conditionnement de miel…… **4**

I.5.4. La Pasteurisation de miel……. **5**

I.5.5. La cristallisation du miel……. **5**

I.6. la Composition moyenne du miel……. **5**

I.6-1-Composition majeure ……..... **6**

I.6-2- Composants mineurs……..…. **6**

I.7-Propriétés du miel……. **7**

I.7-1 Propriétés physico-chimiques……... **7**

I.7-1-1-Densité……. **7**

I.7-1-2-Viscosités……. **7**

I.7-1-3-Chaleur spécifique…… **8**

I.7-1-4-Conductivité thermique…… **8**

I.7-1-5- La Conductibilité électrique…… **8**

I.7-1-6-Indice de réfraction…….. **8**

I.7-1-7-Coloration……..... **8**

I.7-1-8-L'hygroscopicité du miel…….. **9**

I.7-1-9-Fluorescence……..... **9**

I.7-1-10-L'acidité……..... **9**
I.7-2- Propriétés biologiques…… **9**
I.7.2.1 Propriétés alimentaire et diététique……... **9**
I.7.2.2 Propriétés thérapeutiques…….. **9**

CHAPITRE II : les plantes médicinales.

II.1. Les plantes médicinales…….. **11**
II.1.1.les éléments actifs des plantes (les polyphénols)…… **11**
II.2. Présentation de quelques plantes médicinales……. **13**
II.2.1. Le Thym…… **13**
II.2.1.1. Historique……... **13**
II.2.1.2. Localisation et répartition géographique…… **13**
II.2.1.3. Systématique……... **15**
II.2.1.4. Description botanique de la plante…….. **16**
II.2.1.5. Composition chimique…… **16**
II.2.1.6. Utilisations des feuilles de Thym……... **18**
II.2.1.7. Propriétés pharmacologiques et recherche en cours…….. **18**
II.2.2. Le Romarin…… **20**
II.2.2.1.Généralités…….. **20**
II.2.2.2. Etymologie…….. **21**
II.2.2.3. Origine et distribution de la plante…….. **21**
II.2.2.4. Culture…… **21**
II.2.2.5. Systématique……... **21**
II.2.2.6. Description botanique……. **22**
II.2.2.7. Composition biochimique du romarin……. **22**
II.2.2.8. Utilisation…… **23**
II.2.2.9. Propriétés du romarin……. **24**
II.2.3 Le Genévrier……... **25**
II.2.3.1. Historique…… **25**
II.2.3.2. Localisation et répartition géographique…… **26**
II.2.3.3. Classification……... **26**
II.2.3.4. Description botaniques……... **26**

II.2.3.5. Composition chimique de genévrier…….. **27**
II.2.3.6. Effets et usages médicinaux…… **27**
II.2.4. Le Laurier…….. **28**
II.2.4.1.Généralités……... **28**
II.2.4. 2. Origine et distribution géographique de la plante……. **28**
II.2.4. 3. Systématique……. **28**
II.2.4. 4. Description botanique de la plante…… **29**
II.2.4. 5. Composition chimique…….. **29**
II.2.4.6. Utilisation des feuilles de laurus…… **30**
II.2.4. 7. Propriétés pharmacologiques et recherche en cours…… **30**
II.3.Méthodes d'extraction des principes actifs des plantes…….. **33**
II.3.1. Extraction aqueuse de plantes…… **34**
II.3.2. Extraction par solvant…… **34**
II.3.3. Extraction des huiles essentielles…… **35**

Chapitre III : Pathogènes et agents antimicrobiens

III.1 Relation de l'homme avec le monde microbien…… **37**
III.1.1. Staphylococcus aureus…… **37**
III.1.2. Escherichia coli……. **40**
III.2 Agents antimicrobiens…….. **41**
III.2.1. Les antibiotiques……... **41**
III.2.2. Les extraits végétaux……. **42**
III.2.3. Les miels……... **42**
III.2.4. Action d'une substance antimicrobienne……... **43**
III.2.5. Techniques d'étude de l'effet antimicrobien……... **44**
III.2.5.1. Méthodes de détermination de la CMI……... **44**
III.2.5.2.Méthode de Détermination de la concentration minimale bactéricide (C.M.B) **45**

Partie expérimentale

CHAPITRE IV : Matériel et méthodes.

IV.1. Matériels……. **46**

IV.1.1 Matériels biologiques…… **46**

IV.1.1.1. Miels……. **46**

IV.1.1.2. Souches bactériennes…… **46**

IV.1.1.3. Les plantes…… **47**

IV1.2. Matériels non biologiques……. **47**

IV.1.2.1 Solutions, Produits et Milieux……... **47**

IV.1.2.2. Petits matériel et verrerie…….. **48**

IV.1.2.3. Grands matériels…… **48**

IV.2. Méthodes……. **49**

IV.2.1. Identification des souches utilisées…….. **49**

IV.2.1.1. Principe général…… **49**

IV.2.1.2. Etude macroscopique…… **50**

IV.2.1.3. Etude microscopique…… **50**

IV.2.1.4. Etude des propriétés biochimique des microorganismes…….. **52**

IV2.2. Etude du miel…… **61**

IV.2.2.1. Caractérisation physicochimiques…… **61**

a) La densité…… **61**

b) Le pH…….. **61**

c) Mesure de la teneur en eau…….. **61**

d) Dosage des sucres réducteurs par la méthode de Bertrand…….. **62**

e) Etablissement des spectres infrarouge…….. **63**

IV.2.2.2. Etudes de l'activité antibactérienne du miel…….. **64**

a) Détermination de la CMI……...…….. **64**

b) Etude de l'influence de la température…… **66**

c)Etude de l'influence du pH…….. **66**

IV.2.3. Etude des plantes…… **67**

IV.2.3.1 Méthodes d'extraction……. **67**

a)Extraction par infusion…….. **67**
b) Extraction par décoction…….. **67**
c) Macération à chaud……..…… **67**
IV.2.3.2. Effet antibactérien des extraits: Optimisation de la méthode d'extraction et le genre botanique…… **67**
IV.2.3.3. Optimisation de la nature de plante……. **68**
a)Mesure du taux d'humidité……. **68**
b)Etude de l'effet antibactérien des échantillons secs et frais…… **69**
IV.2.3.4. Optimisation du rapport Masse/Volume……... **69**
IV.2.3.5. Influence du pH sur l'effet antibactérien de l'extrait…… **70**
IV.2.3.6.Détermination de CMI de l'extrait……. **70**
IV.2.4. Etudes de l'activité antibactérienne d'une association Miel-Extrait de plante. **70**

CHAPITRE V : Résultats et discussions

V.1. Identification des souches bactériennes……... **71**
V.1.1. Etude macroscopique…… **71**
V.1.2. Etude microscopique…… **71**
V.1.2.1. Observation à l'état frais……. **71**
V.1.2.2. Observation après une double coloration (Coloration de Gram)…… **71**
V.1.3. Identification biochimiques…….. **72**
V.1.3.1. E. coli…….. **72**
V.1.3.2 S. aureus…… **72**
V.2. Etude du miel…….. **74**
V.2.1. Analyses physico-chimiques…… **74**
V.2.1.1. La densité…… **74**
V.2.1.2. Le pH…….. **74**
V.2.1.3. La teneur en eau…….. **75**
V.2.1.4. Dosage des sucres réducteurs……. **75**
V.2.1.5. Spectrophotométrie IR…… **76**
V.2.2. Activité antibactérienne du miel……... **78**
V.2.2.1. Détermination de la CMI…… **78**
V.2.2.2. Etude de l'influence de la température…… **81**

V.2.2.3 Etude de l'influence du pH…….. **83**
V.3. Etudes des extraits de plantes……... **84**
V.3.1. Effet antibactérien des extraits: Optimisation de la méthode d'extraction et le genre botanique……... **85**
V.3.2. Optimisation de la nature de la plante…….. **86**
V.3.2.1. Mesure du taux d'humidité…… **87**
V.3.2.2. Etude de l'effet antibactérien des échantillons secs et frais……... **87**
V.3.3. Optimisation du rapport Masse/Volume (m/v)……. **88**
V.3.4. Influence du pH…… **90**
V.3.5. Détermination de CMI de l'extrait du Laurier frais……. **91**
V.4. Etudes de l'activité antibactérienne d'une association Miel-Extrait de plante……. **92**

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes


Introduction

Introduction

Chaque année, les infections nosocomiales touchent près d'un million de patients hospitalisés augmentant la mortalité et la morbidité d'une façon significative **(Encarta, 2005)**.

L'usage excessif d'agents antibactériens chimiques dans la médication humaine ainsi que dans l'élevage animal conduit à l'apparition de souches bactériennes résistantes **(Mau et al, 2004)**. La résistance croissante aux antibiotiques constitue le facteur majeur justifiant le recours au développement et/ou la mise au point de nouveaux agents antimicrobiens. Ainsi, certaines études se sont concentrées sur les agents et les propriétés antimicrobiennes des principes actifs des produits dérivés de source naturelle, qui ont été longtemps utilisés dans la phytothérapie traditionnelle pour prévenir ou guérir les infections **(Sousa et al., 2006**).

Le miel a fait, ces dernières années, l'objet de plusieurs recherches. Le miel comme d'autres denrées alimentaires présente des caractéristiques physiques, chimiques et microbiologiques qui nécessitent des études approfondies **(Adam et al, 1974)**. Le miel pourrait donc constituer un véritable remède aux infections nosocomiales cutanées. Cependant avant de l'utiliser il faut savoir son spectre et son mode d'action, et par conséquent son mode d'utilisation (Compatibilité avec le germe, concentration et température d'application).

Les extraits bruts des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses. Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phyto-médicaments présentés sous diverses formes galéniques simples répondant à une réglementation précise en matière d'évaluation portant sur l'innocuité, l'efficacité thérapeutique et la stabilité.

L'objectif de notre étude se résume à une étude des propriétés antibactériennes de deux types de miels (Euphorbe et jujubier) et des extraits de quatre plantes : Laurier, Genévrier, Thym et Romarin. Une association « Miels-Extrait le plus actif » a été réalisée afin de détecter l'effet synergique des deux composants.

Dans la première partie de notre travail nous avons résumé les principales données bibliographiques récentes relatives au thème abordé : des généralités sur le miel et les extraits de plantes ainsi les méthodes permettant d'évaluer leurs effets antimicrobiens.

Dans un premier volet de la partie expérimentale de ce travail, nous avons ciblé :

- une caractérisation physico-chimique de deux types de miel (Euphorbe et Jujubier) pour les paramètres suivants: pH, densité, teneur en eau, taux des sucres réducteurs et le spectre IR.
- une évaluation de l'activité antibactérienne de ces deux types de miel en utilisant la méthode de diffusion sur gélose afin de déterminer leurs Concentrations minimale inhibitrice (CMI).
- une étude de l'influence du pH et de la température sur l'activité des miels afin de pouvoir confirmer leur mode d'action.

Dans un deuxième volet de notre expérimentation, nous nous sommes intéressés à une étude détaillée sur quatre plantes : Laurier, Genévrier, Thym et Romarin en ciblant les objectifs suivants:

- une évaluation de l'activité antibactérienne des extraits obtenus par trois méthodes d'extraction les plus simples : infusion, macération et décoction. Ceci nous permet de trancher la méthode d'extraction optimale et de déterminer la plante la plus actif,
- une optimisation de la nature et la concentration de l'extrait de la plante la plus actif,
- une étude de l'influence du pH sur l'activité de l'extrait choisi,
- une évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait le plus actif en déterminant sa CMI dans les conditions optimisées.

Dans une troisième partie, une évaluation de l'activité antibactérienne des dilutions des deux types de miel dans l'extrait de plante choisi a été réalisée afin de déterminer l'effet synergique entre les différents constituants de la plante et les miels testés.

Enfin, cette mise au point ne constitue qu'un début à des études plus détaillées visant des associations Miels-Plantes plus complexes qui trouveront des applications thérapeutiques.

.


Partie bibliographique



Chapitre I:Le miel

I.1. Définition:

Il existe de nombreuses définitions du miel mais on peut en retenir deux. La première, établie par Moreaux, définit le miel comme étant "la matière sucrée recueillie par l'abeille sur les plantes vivantes et qu'en la modifiant, elle l'emmagasine dans ses rayons de cire". La seconde correspond à celle du législateur qui définit le miel comme étant "la denrée produite par les abeilles mellifiques à partir du nectar des fleurs ou de sécrétions provenant de parties vivantes de plantes ou se trouvant sur elles, qu'elles butinent, transforment, combinent avec des matières spécifiques propres, emmagasinent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche. Cette denrée peut être fluide, liquide ou cristallisée"**(Huchet, 1996)**.



Figure I.1: La récolte du pollen par une ouvrière (Marchenay, 2007).

I.2. l'origine du miel :

Le miel vient des plantes par l'intermédiaire des abeilles. Et cela à partir du nectar recueilli dans la fleur, ou du miellat recueilli sur les plantes, selon qu'il vient du nectar ou du miellat, il existe l'origine directe et indirecte **(Jean-prost, 1987)**.

I.2.1. L'origine directe (Miel de nectar):

Le nectar est un liquide sucré et mielleux, il se produit à la surface des parties spéciales appelés nectaires, qui sont en forme de turgescences, situés soit sur les feuilles, appelés nectaires Extrafloraux, soit sur les fleurs, (sépales, pétales, carpelles) appelés nectaires Floraux, retrouvés par exemple chez la plante de Thym. Pour recueillir un litre de nectar, on estime qu'il faut entre 20000 et 100000 voyage des abeilles **(Gonnet, 1982)**.

Composition du Nectar

Le nectar est une exsudation sucrée plus ou moins visqueuse, en fonction de sa teneur en eau. Il contient environ 90% de sucres, les plus courants étant le saccharose, le glucose et le fructose. Les proportions de ces sucres sont relativement stables pour une même espèce végétale. Le nectar contient également des acides organiques (acides fumarique, succinique, malique, oxalique, etc.), des protéines, notamment des enzymes, des acides aminés libres

(acides glutamique et aspartique, méthionine, sérine, tyrosine, etc.), et des composés inorganiques (comme les phosphates). On peut également retrouver dans certains nectars des composés huileux, des alcaloïdes ou des substances bactéricides. Chaque espèce végétale fournira un nectar aux caractéristiques bien spécifiques qui contribueront à donner au miel sa saveur et son parfum **(Marchenay, 2007)**. Selon leurs origines végétales, les nectars contiennent plus ou moins du saccharose. On les classe en :

- Des nectars à saccharose prédominant ;
- Des nectars à taux égaux de saccharose, fructose et glucose ;
- Des nectars avec prédominance du glucose et du fructose (**Schweitzer, 2005).**

I.2.2. L'origine indirecte (Miel de Miellat)**:**

Le miellat est un produit plus complexe que le nectar faisant intervenir un intermédiaire, généralement, des insectes de la famille des Homoptères tel que les pucerons, leur pièces buccales sont disposées pour piquer et absorber les aliments liquides telle que la sève des végétaux et rejettent l'excèdent des matières sucrées sous forme des gouttelettes, que les abeilles récupèrent sur les feuilles des plantes (**Gonnet, 1985)**.

Composition du miellat

Le miellat des pucerons est composé généralement des sucres (mélizitose, le glucose, et dextrine et de gommes), de protéines et d'acides aminés, de vitamines tel que la thymine et la biotine, de minéraux et d'acides organiques (acides nitriques et acides maliques) **(Kloft, 1968)**.

I.3. Formation du miel (Huchet, 1996):

Le miel est produit par les abeilles selon le processus suivant : le nectar est prélevé par les abeilles butineuses, qu'elles emmagasinent dans leur jabot avec la salive, elles transforment le saccharose en sucre simple (fructose, glucose) sous l'action d'une invertase.

Les abeilles appartiennent à l'ordre des Hyménoptères qui regroupent 20000 espèces d'abeilles. Toutes collectent du nectar et du pollen, s'en nourrissent et participent sans relâche à la pollinisation des plantes et au maintien des équilibres naturels. Parmi les abeilles productrices de miel, l'abeille mellifère et ses races est la plus intéressante à élever, c'est elle qui assure les meilleurs rendements. De nombreux rôles sont définis à l'intérieur de la ruche (gardiennes, ouvrières, butineuses...). Chaque abeille accomplira au cours de sa vie toutes ces fonctions.

Une butineuse effectue entre 20 et 50 voyages par jour, chacun demandant environ 15 minutes. Le rayon d'action moyen se situe entre 500 mètres et 2 kilomètres, d'où l'importance, en plus des conditions climatiques et de la nature du sol, de la végétation des alentours du

rucher. Elle prélève sur les fleurs le nectar, liquide sucré, sécrété puis excrété par des glandes dites nectarifères, présentes sur de nombreuses plantes.

Le changement de la solution sucrée en miel commence déjà lors du voyage, au cours duquel elle est accumulée dans le jabot de l'abeille. C'est dans son tube digestif que s'amorce la longue transformation: des enzymes agissent sur le nectar. Le saccharose, sous l'action de l'invertase, se transforme en glucose, fructose, maltose et autres sucres. Les modifications physico-chimiques se poursuivent dès l'arrivée à la ruche. A son retour, la butineuse régurgite sa charge, la passe aux ouvrières, qui elles-mêmes la communiquent à d'autres et ainsi de suite. D'individu en individu, la teneur en eau s'abaisse en même temps que le liquide s'enrichit de sucs gastriques et de substances salivaires : invertase, diastase, et gluco-oxydase. Simultanément, d'autres sucres sont synthétisés, qui n'existent pas au départ. La goutte épaissie est déversée ensuite dans une alvéole qui sera, après évaporation, obturée par un opercule de cire. A ce moment, la solution sucrée transformée, qui contient encore 50% d'eau environ, va subir une nouvelle concentration par évaporation, qui se fait sous la double influence :

- d'abord de la chaleur régnant dans la ruche et qui est d'environ 36°C ;
- ensuite de la ventilation assurée par le travail des ventileuses qui entretiennent un puissant courant d'air ascendant par un mouvement très rapide de leurs ailes. On arrive ainsi à une proportion d'environ 20% d'eau et de 80% de sucres, correspondant aux pourcentages normaux du miel. Cette solution représente le miel stocké dans les cellules. Ces dernières, une fois remplies, sont cachetées par un mince opercule de cire, permettant une excellente conservation.

I.4. Les types des miels:

Il existe nombreuses variétés de miel qui peuvent être classées en fonction:

1. de l'origine sécrétoire : miel de nectar et le miel de miellat ;

2. de l'origine géographique : déterminée par analyse pollinique. En général, on admet qu'un miel provient principalement d'une certaine source de nectar lorsque le pollen correspondant est au stade dominant **(Louveaux, 1970)**;

3. de l'origine florale : nous avons les miels monofloraux et les miels multifloraux **(Donadieu, 1984):**

-Les miels monofloraux (unifloraux):

Les miels monofloraux sont élaborés à partir du nectar et/ou du miellat provenant d'une seule espèce végétale et cela nécessite d'installer les ruches à proximité de la plante

recherché **(Clément, 2002)**. Les miels monofloraux possèdent des caractéristiques palynologiques, physico-chimiques et organoleptiques spécifiques **(Bogdanov, 2005)**.

-Les miels multifloraux (polyfloraux):

Les miels multifloraux, ou miel toutes fleurs, souvent classés suivant les lieux de récolte (miel de montagne, de forêt, etc.), ou encore suivant les saisons (miel de printemps ou d'été) **(Donadieu, 1984)**.

I.5. Technologie du miel :

I.5.1. La récolte du miel:

La récolte du miel peut se faire dès la fin de la miellée. S'il s'agit d'un miel monofloral, elle se fera à la fin de la floraison de la plante concernée, tandis que pour un miel toutes fleurs, elle se fera vers la mi-août au moment des dernières floraisons. L'apiculteur retire les cadres de miel, après avoir chassé les abeilles par enfumage ; il sort les cadres des hausses et les amène à la miellerie (local réservé à l'obtention du miel); il enlève alors les opercules de cire à l'aide d'un couteau à désoperculer **(Clément, 2002)**.

I.5. 2. L'extraction de miel:

Aujourd'hui, on extrait le miel des cellules par centrifugation à l'aide d'extracteurs tangentiels ou radiaires. Le miel est ensuite recueilli dans un maturateur (simple récipient de décantation en inox) d'une capacité de 50 kg à 2 tonnes, à une température de 30-35°C (pour retarder la cristallisation). Il va y rester 2 à 8 jours au cours desquels les bulles d'air retenues dans la masse ainsi que les impuretés (fragments de cires, de propolis et amas de pollen) remontent à la surface du miel et constituent une écume qui sera retirée. Cette épuration peut également être obtenue par filtration. Le miel passe alors par un tamis qui retient les impuretés, et s'écoule dans un bac **(Clément, 2002)**.

I.5.3. Le conditionnement de miel:

Après filtration, le miel est coulé directement dans les récipients de vente. Le miel doit être mis à l'abri de l'air et de l'humidité ceci afin d'éviter certaine dénaturation et surtout des fermentations, d'où la nécessité de récipients bien remplis et hermétiquement fermés. Si le miel a stocké présente un risque de fermentation, il faudra impérativement le pasteuriser ou le conserver a une température de 4 à 5°C **(Huchet, 1996)**.

I.5.4. La Pasteurisation de miel:

Cette technique consiste à chauffer le miel très rapidement; lorsque la température de 78°C est atteinte, le miel passe dans un circuit de cambrage, puis dans un circuit de refroidissement ; il ressort après 5 à 8 minutes, à la température de 42°C. La pasteurisation a pour but de détruire les levures et d'éliminer les cristaux restant dans le miel et qui peuvent favoriser la cristallisation. Le miel peut ainsi se conserver à l'état liquide pendant au moins six mois, le temps nécessaire à la consommation **(Louveaux, 1985)**.

I.5.5. La cristallisation du miel:

Tous les miels n'ont pas la vocation pour rester à l'état liquide. Trop riches en glucose, même après pasteurisation, ils risqueraient de recristalliser de façon irrégulière. Pour obtenir une cristallisation fine et homogène, on procède à un ensemencement du miel après pasteurisation et refroidissement complet. On mélange intimement au moyen d'appareils spéciaux un miel à cristallisation très fine avec le miel à faire cristalliser. On utilise environ 10 % de semence. Les cristaux ajoutés au miel servent d'amorce et, en quelques jours, à la température de 14 °C, la plus favorable à la croissance des cristaux, tout le miel est cristallisé dans le système souhaité **(Louveaux, 1985).**

I.6. la Composition moyenne du miel (fig. I .2) :

Comme nous l'avons vu, le miel est un produit très complexe dont la fabrication demande plusieurs étapes qui toutes ont une influence sur sa composition chimique finale. En effet, la composition qualitative de ce produit est soumise à de nombreux facteurs très variables qu'il est impossible de maîtriser tels que: la nature de la flore visitée et celle du sol sur lequel pousse ces plantes, les conditions météorologiques lors de la miellée, la race des abeilles, l'état physiologique de la colonie, etc. En schématisant à l'extrême, on pourrait dire que la composition moyenne du miel est la suivante (**Huchet, 1996)**:

- Hydrates de carbones (sous formes de sucres divers) : 79,5%
- Eau : 17%
- Divers : 3,5%.

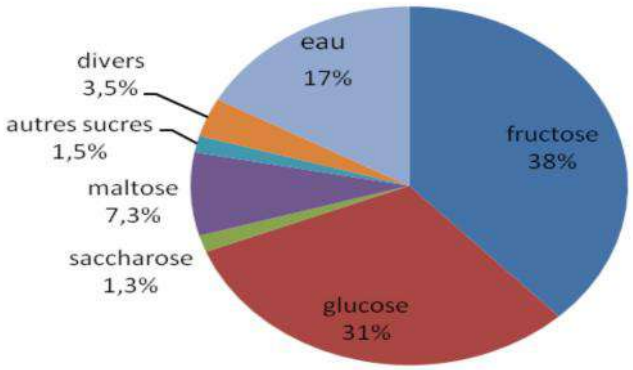


Figure I.2 : Composition moyenne du miel **(Bruneau, 2002)**.

On peut toutefois établir la liste des principaux éléments constitutifs de la façon suivante :

I.6-1-Composition majeure :

- **L'eau** : L'eau est présente en quantité non négligeable puisque sa teneure moyenne est de 17,2%, mais comme le miel est un produit biologique, cette valeur peut varier. En fait, les abeilles operculent les alvéoles lorsque la teneur en eau avoisine 18% (**Huchet, 1996)**.
- **Glucides :** Les glucides représentent de 95 à plus de 99% de la matière sèche des miels **(Louveaux, 1968)**. Parmi ces sucres, figurent le fructose et le glucose, que l'on trouve en quantité voisine dans les miels. Cependant, le rapport de la quantité de fructose sur la quantité de glucose est très important et varie de 0,76 à 1,76 environ. La quantité de saccharose peut aller jusqu'à 7% et celle du maltose varie de 2 à 7% **(Khenfer, 2001).**

I.6-2- Composants mineurs :

Ce sont les acides, les protéines et amino-acides, les vitamines, les enzymes et les minéraux. Ces différents éléments ont été regroupés dans le **tableau I.1**.

Tableau I.1: Les composants mineurs du miel.

Acides 0,3%	Protéines, Amino-acides 0,4%	Vitamines	Minéraux 0,2%	Divers	Enzymes
Acide gluconique A-acétique A-citrique A-lactique A-malique A-oxalique A-butyrique A-pyroglutamique A-succinique A-formique **(Huchet, 1996)**	-Matières albuminoïdes -Matières azotées - Traces: Trypsine, Leucine Histidine, Alanine, Glycine, Méthionine -A. Aspartique **(Khenfer, 2001)**	-Thiamine -Riboflavine -Pyridoxine -A-pantothénique -A- ascorbique -A- nicotinique -Biotine -A- folique **(Louveaux, 1968)**	-Calcium -Chlore -Cuivre -Fer -Magnésium -Manganèse -Phosphore -Potassium -Silicium -Sodium -Soufre **(Donadieu, 1978)**	-Esthers volatiles -Acétylcholine -Pigments -Colloïdes -Facteur antibiotique **(Khenfer, 2001)**	-Invertase -Amylase -Catalase -Phosphatase -Gluco-oxyase **(Louveaux, 1985)**

I.7-Propriétés du miel :

I.7-1-Propriétés physico-chimiques :

I.7-1-1-Densité:

La densité d'un miel homogène est le rapport, exprimé en nombre décimal, de la masse volumique de ce miel à la masse volumique de l'eau pure à 4 °C. (La masse volumique s'exprime en kg/dm^3). La densité du miel varie approximativement de 1,39 à 1,44 à 20 °C. Le miel est donc un produit relativement dense. Les variations de la densité proviennent surtout des variations de la teneur en eau. Plus un miel est riche en eau moins il est dense **(Gonnet, 1982)**.

I.7-1-2-Viscosités:

La majorité des miels ont une viscosité normale, c'est-à-dire qu'ils suivent les lois de Newton sur l'écoulement des fluides **(Louveaux, 1985)**. La viscosité du miel dépend de trois facteurs qui sont, sa teneur en eau, sa composition chimique et de sa température (**Huchet, 1996)**. La viscosité est très élevée à basse température. Elle décroit rapidement lorsque la température augmente **(Jean-prost, 1987)**. Pour des températures variant de 30 à 35°C, la viscosité est minimale, c'est d'ailleurs la température de la ruche. C'est pourquoi les

apiculteurs sont contraints, au cours des opérations de centrifugation, d'extraction et de mise en pots, d'opérer à température suffisamment élevée **(Louveaux, 1985)**.

I.7-1-3-Chaleur spécifique :

La chaleur spécifique d'un corps est la quantité de chaleur nécessaire pour élever de $1^{o}C$ la température d'une unité de poids de ce corps. La chaleur spécifique d'un miel à 17 % d'eau, est de 0.54 cal/g.k à 20°C. Cela veut dire qu'il faut approximativement deux fois moins d'énergie (de joules) pour réchauffer du miel que pour réchauffer la même masse d'eau. La Chaleur spécifique varie très peu d'un miel à l'autre **(Louveaux, 1985)**.

I.7-1-4-Conductivité thermique :

La conductivité thermique est une mesure du transfert de chaleur. Elle est aussi désignée en tant qu'indice thermique. La conductivité du miel est relativement faible. Pour un miel liquide, elle s'élève à $12 \cdot 10^{-5}$cal/cm/s/°C, pour un miel cristallisé, elle est de $12.9 \cdot 10^{-5}$ cal/cm/s/°C. Le miel est mauvais conducteur de la chaleur, donc bon isolant thermique (**Gonnet, 1985)**.

I.7-1-5- La Conductibilité électrique :

La conductibilité électrique est la propriété d'un corps de permettre le passage du courant électrique **(Gonnet, 1982)**. Le miel à une conductivité électrique dans de fortes proportions suivant sa teneur en eau et sa teneur en matières minérales. Elle est évaluée à l'aide d'une unité particulière, le Siemens. Pour une solution à 20% de matière sèche et à la température de 20°C, la conductibilité va de 1 à plus de 10^{-4} $S.cm^{-1}$ (**Huchet, 1996)**.

I.7-1-6-Indice de réfraction :

L'indice de réfraction est une propriété optique qui caractérise toute substance transparente. Il est en fonction de la teneur en eau et de la température. L'indice de réfraction de miel est d'autant plus élevé que sa teneur en eau est plus basse **(Gonnet, 1982)**. L'indice de réfraction varie de façon presque linéaire avec la teneur en eau, de telle sorte qu'il est possible de connaitre très rapidement cette teneur en mesurant l'indice de réfraction **(Louveaux, 1985)**.

I.7-1-7-Coloration :

La coloration est une caractéristique physique importante des miels car elle est en rapport avec leur origine florale et avec leur composition **(Gonnet, 1982)**. La couleur d'un miel donc un caractère très important sur le plan commercial **(Louveaux, 1985)**.

I.7-1-8-L'hygroscopicité du miel :

Le miel tend à absorber l'humidité de l'air et, si on le laisse trop longtemps dans une atmosphère humide, cette absorption peut être considérable. Un miel "normal", contenant 18% d'eau, peut atteindre, au bout de trois mois, une hygrométrie de 55%: son poids a alors augmenté de 84%. D'autre part, lorsqu'on veut dessécher le miel, il est nuisible de le maintenir en atmosphère rigoureusement sèche, parce qu'il se forme en surface une pellicule dure qui empêche le reste d'eau de s'évaporer (**Huchet, 1996)**.

I.7-1-9-Fluorescence:

Beaucoup de miels présentent une fluorescence plus ou moins marquée, mais on ne sait rien de précis sur cette caractéristique (**Huchet, 1996)**.

I.7-1-10-L'acidité:

Tous les miels ont un caractère acide

- Le pH du miel de nectar varie de 3,5 à 4,5
- Le pH du miel de miellat varie de 4,5 à 5,5

L'acidité mesurée est celle d'une solution à 10% de miel dans de l'eau distillée à température ambiante ("20°C") **(site 1).**

I.7-2- Propriétés biologiques:

I.7.2.1 Propriétés alimentaire et diététique :

L'action énergétique élevée du miel (300 calories pour 100 g) est due à la présence des sucres simples directement assimilables. Cette richesse calorique présente le grand avantage de permettre l'administration d'un grand nombre de calories sous un volume très réduit de nourriture, ce qui est d'un grand intérêt dans tous les cas de perte de l'appétit, tout particulièrement chez l'enfant et les personnes âgées**(Donadieu, 1984)**.

Le miel apporte en outre des vitamines du groupe B, indispensable à l'assimilation des sucres et des sels minéraux, en quantité sertes insuffisantes, mais pouvant compléter les apports des autres aliments **(Signorini, 1978).**

I.7.2.2 Propriétés thérapeutiques :

Le miel contient des substances antibactériennes auxquelles on a donné le nom global d'inhibines. L'action antibactérienne du miel est certainement à l'origine de quelques unes des propriétés médicinales qui lui sont attribuées. Dans le domaine médical on a signalé l'action bénéfique du miel, dans certains cas de maladies de l'estomac, de l'intestin, des reins ou des voies respiratoires. Le miel aurait aussi une action fébrifuge. Il a été démontré que les

sucres du miel et plus particulièrement le fructose possèdent une action adoucissante au niveau des muqueuses du tube digestif.

L'usage externe du miel comme antiseptique sur les plaies, les blessures, les affections cutanées est connu depuis l'antiquité. Enfin des injections intraveineuses de miel déprotéiné et stérilisé ont été utilisées avec des bons résultats dans certaines affections en remplacement du sérum glucosé. Le miel injectable ne peut être employé que sur prescription médicale **(Gonnet, 1982).**

Le miel est doté de diverses propriétés thérapeutiques : antianémique, antiseptique, apéritive, béchique, digestive, diurétique, dynamique, émolliente, fébrifuge, laxative, sédative ou vicariante **(Donadieu, 1984).**

Et il existe des miels spécifiques préconisés pour différentes maladies **(Tableau I.2)**

Tableau I.2 : Propriétés plus spécifiques des miels uni-floraux **(Donadieu, 1984).**

Origine botanique	Propriétés plus spécifiques
Acacia	Régulateur intestinal
Bruyère (callune)	Antiseptique des voies urinaires et diurétique.
Châtaigner	Favorise la circulation sanguine.
Eucalyptus	Antiseptique des voies respiratoires et des voies urinaires.
Lavande	Antiseptique et anti-inflammatoire des voies respiratoires, antispasmodique.
Oranger	Antispasmodique, sédative nerveux.
Romarin	Cholagogue, cholérétique.
Sapin	Antianémique, antiseptique et anti-inflammatoire des voies respiratoires, diurétiques.
Thym	Antiseptique général.
Tilleul	Antispasmodique, sédative nerveux.
Trèfle	Dynamogénique.



Chapitre II
Les plantes médicinale

II.1. Les plantes médicinales :

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses **(Farnsworth et al, 1986**).

Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne **(Elqaj et al, 2007)**. La phytothérapie à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi "totum" plutôt que des extraits obtenus en laboratoire. Une plante entière est plus efficace que la somme de ses composants, les plantes contiennent des centaines voire des milliers de substances chimiques actives **(Iserin et al, 2001)**.

Depuis le XVIIIème siècle, des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques à partir des plantes dont l'effet est en fonction du principe actif. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels.

Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine, employée contre la malaria, ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions anti-rhumes **(Iserin et al, 2001)**.

II.1.1. Les éléments actifs des plantes (Les polyphénols):

Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contres les agressions environnementales (**Gee et Johnson, 2001)**. Les polyphénols, qui forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, sont divisés en plusieurs catégories : **les flavonoïdes** qui représentent plus de la moitié des polyphénols ; **les tanins** qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes ; **les acides phénoliques**, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables **(Dacosta, 2003)**.

II.1.2. Activité antimicrobienne des polyphénols:

Plusieurs recherches ont démontré l'effet antimicrobien des composés phénoliques. **Cowan; Hayouni et al; Athamena et al; Katalinic et al; Harikrishna et al** ont étudié le pouvoir antimicrobien d'un flavonoïde glycoside « prunine-6-O-p-coumarate » contre deux bactéries Gram positif : *Bacillus Subtilis* et *Staphylococcus albus* et deux bactéries Gram négatif : *Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*. L'un des constituants les plus importants du thé est les polyphénols. Ces derniers contiennent des agents antimicrobiens efficaces, particulièrement la catéchine **(Almajano et al, 2008)**. Beaucoup d'études ont montré le rôle que jouent ces polyphénols dans la précipitation des protéines, l'inhibition des enzymes, et l'antioxydation ; ils ont un large spectre antibactérien et peuvent inhiber la croissance de la plupart des germes pathogènes, tels que : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenese*, *Salmonella Typhimurium* **(Yi et al, 2010)**. L'activité antimicrobienne de quelques composés phénoliques et de leurs modes d'action sont récapitulés dans le **Tableau II.1**.

Tableau II.1 : Modes d'action antimicrobienne de quelques polyphénols (Khiri et Lalaoui, 2007).

Classes chimiques	Composés	Mécanismes
Phénols simples	- Catéchol - Epicatechine	- La privation de Substrat. - L'interruption des fonctions membranaires.
Acides Phénoliques Quinones	- Acide Cinnamique - Hypericin - Chrysin	- Destruction de la paroi cellulaire et désactivation des enzymes.
Flavones	- Abyssinone	- Inhibition de transcriptase reverse du HIV.
Tannins	- Ellagitannin	- Inhibition des enzymes. - Complexe avec la paroi cellulaire. - Interruption de la fonction membranaire. - Complexe avec les ions métalliques.
Coumarines	- Warfarin	- Activité antivirale

II.2.Présentation de quelques plantes médicinales:

Le Thym, le romarin, le genévrier et le laurier ont fait l'objet de notre étude. Ces plantes ont été choisies en fonction de leur emploi très fréquent en Algérie. Pour cela, une revue bibliographique sur chaque plante est présentée en ci dessous.

II.2.1 Le Thym (Fig. II.1):

II.2.1.1. Historique

Le thym a toujours accompagné la vie quotidienne de l'homme à des fins médicales, cosmétiques et culinaires. Il était parmi les premières plantes médicinales dans la région méditerranéenne, utilisé pour calmer les convulsions, pour réduire les inflammations de l'intestin et du foie, pour provoquer les règles lorsqu'elles sont défectueuses, et pour calmer les spasmes de toute nature **(Mességué, 1975)**.

Le nom thym provient du mot Grec « thymos » qui veut dire odeur, et à ce titre le thym est très largement utilisé en qualité de plante aromatique, en particulier dans la cuisine méditerranéenne en tant que condiment **(Richard et al, 1985)**. Environ 110 espèces différentes du genre Thymus se concentrent dans le bassin méditerranéen **(Jalas, 1971)**.



Figure II.1 : Photo de thym

II.2.1.2. Localisation et répartition géographique:

Le thym est une plante originaire de l'ouest des régions méditerranéennes (**Ozcan et Chalchat, 2004)** et aussi autochtone du sud d'Europe (**Takeuchi et al, 2004**). Plus précisément, le thym commun préfère un sol légèrement acide, bien drainé et rocailleux (calcaire), en plein soleil et au sec, mais la plante se développe également sur un sol alcalin filtrant, léger ou compact (d'argile et de limon) ou très poreux (sableux), un peu humide et frais. La capacité de cette plante à résister à de très forte chaleur provient de son huile essentielle qui est produite la nuit et s'évapore la journée.

Dans le monde, le thym est distribué dans le vieux continent, sur les côtes du Groenland et dans la région macaronisienne (les canaries, Madère et les Açores). C'est une plante très répandue dans le nord ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye) ainsi que dans les montagnes d'Ethiopie, les montagnes d'Arabie du sud ouest et la péninsule de Sinaï. Passant par les régions arides de l'Asie occidentale jusqu'à l'Himalaya, il peut même atteindre les limites de la région tropicale et du Japon. Dans le nord, il pousse en Sebérie et en Europe nordique. **(Jalas, 1971)**. La **Figure II.2**, montre la répartition du thym dans le monde.

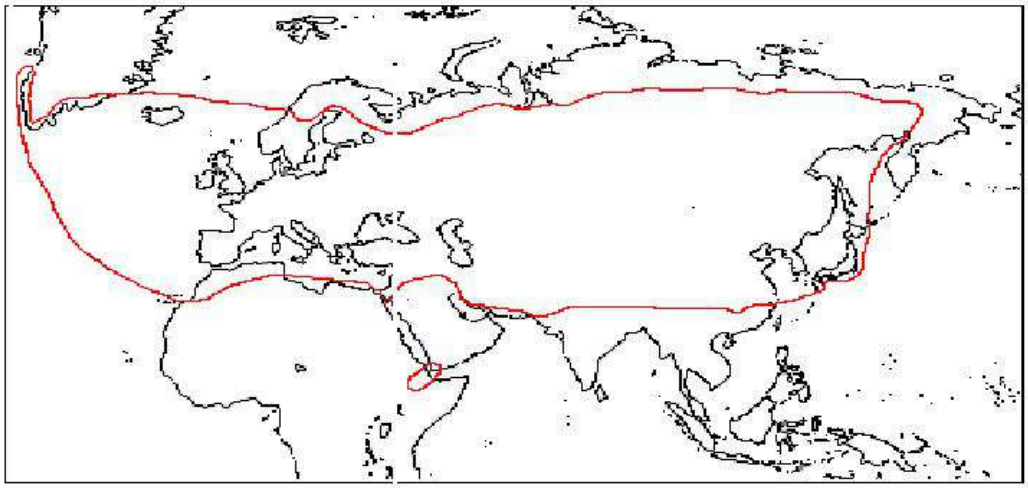


Figure II.2 : Répartition géographique du thym dans le monde (Stahl-Biskup, 2002)

Le genre Thymus inclut environ 300 espèces à travers le monde dont 11 sont localisées en Algérie et 9 d'entre elles sont endémiques **(Kabouche et al, 2005)**. Ces espèces sont réparties du Nord algérois à l'Atlas saharien, et du constantinois à l'oranais **(Tableau II.2)**.

II.2.1.3.Systématique (Tableau II.3):

Le genre thymus est l'un des huit plus importants genres de la famille des lamiaceae (Labiatae), compte tenu du nombre d'espèces qu'il comprend, bien que ce nombre varie selon le point de vue taxonomique. L'extrême variabilité et les hybridations interspécifiques, ont rendu la détermination des espèces très délicate **(Quezel et Santa, 1963)**. Si l'on choisit les critères qui minimisent la variabilité, les données disponibles rapportent 215 espèces pour le genre Thymus **(Morales, 2002)**.

Tableau II.2 : Principales localisations géographiques du thym en Algérie (Quezel et Santa, 1963).

Espèces	Localisation et caractéristique
Thymus pallescens de Noé.	Commun dans le Tell et endémique en Algérie.
Thymus capitatus L	Très rare dans le sous secteur de l'Atlas tellien.
Thymus dreatensis Batt.	Très rare dans le sous secteur du Tell constantinois et de la petite Kabylie.
Thymus numidicus Poiret.	Assez rare dans le sous secteur de l'Atlas tellien, dans le secteur du Tell constantinois et dans la petite et grande Kabylie.
Thymus guyonii de Noé.	Rare dans les hauts plateaux algérois, oranais et constantinois.
Thymus lanceolatus Desf.	Rare dans le sous secteur de l'Atlas tellien (Terni) et de l'Atlas saharien (Médéa), dans le sous secteur des hauts plateaux algérois oranais (Tiaret) et constantinois (Aumale).
Thymus pallidus Coss.	Très rare dans le sous secteur de l'Atlas saharien constantinois
Thymus glandulosis Lag.	Très rare dans le sous secteur des hauts plateaux algérois et oranais.
Thymus hirtus Willd.	Commun sauf sur le littoral.
Thymus algeriensis Boiss.et Reuter.	Très commun dans toutes les régions montagneuses et rares ailleurs.
Thymus munbyanus Desf.	Endémique dans le Nord du secteur algérois

Tableau II.3 : Classification de la plante thym

Règne	*Plantae (végétal)*
Embranchement	*Spermaphytes (phanérogame*
Sous embranchement	*Angiospermes*
Classe	*Dicotylédones*
Sous classe	*Métachlamydées (gamopétale*
Ordre	*Tubiflorales*
Sous ordre	*Verbénacées*
Famille	*Lamiaceae (Labiae)*
Sous-famille	*Stachyoideae*
Genre	*Thymus*

II.2.1.4.Description botanique de la plante (Fig. II.3):

Le thym est une plante sous-ligneuse érigée ou prostrée, odorante, il forme des touffes compactes très ramifiées qui s'élèvent à une vingtaine de centimètres au-dessus du sol. Il pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocailleux et dans les garrigues. Les feuilles du thym sont plus au moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles. Le calice quant à lui, est tubuleux à deux lèvres et la corolle est plus au moins exserte à deux lèvres aussi **(Quezel et Santa, 1963).**

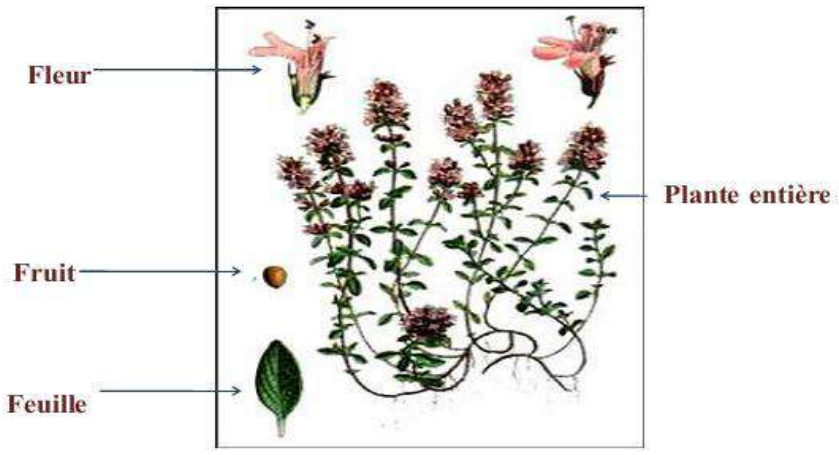


Figure II.3 : Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris* L. (Iserin, 2001).

II.2.1.5.Composition chimique:

Les principaux constituants du Thym responsables des ses différentes propriétés sont : **Les acides phénoliques, Les flavonoïdes, Les polyphénols**. De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *Thym* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection). L'hybridation facile de l'espèce mène à une grande variabilité intra-spécifique, qui affecte l'homogénéité du rendement de l'extrait et sa composition en produits chimiques (**Balladin et Headley, 1999 ; Amiot, 2005)**.

La teneur en huile essentielle de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré **(Bruneton, 1999)**. L'huile essentielle de *Thymu s* a été analysée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à une spectrométrie de masse (SM), 30 composés ont été identifiés et caractérisés, les plus abondant sont respectivement: le thymol (44,4 - 58,1 %), le p-cymene (9,1 - 18,5 %), le terpinène (6,9 - 18,0 %), le carvacrol (2,4 - 4,2 %) et le linalol (4,0 – 6,2 %). Le contenu phénolique total, les flavonoides, la catéchine, et l'anthocyanine dans l'infusion aqueuse préparée du *Thym* a été déterminé par des méthodes spectrophotométriques **(Kulišic et al, 2006)**. Le **Tableau II.4** résume les résultats.

Tableau II.4 : Composition de l'infusion aqueuse du Thym (en µg/mg d'extrait). (Kulišic et al., 2006)

Plante	Phénols totaux	flavonoïdes	Non-flavonoïdes	catéchines	anthocyanines
T. vulgaris	33.3	25.0	8.3	1.2	6.7

De nombreuses études ont confirmé que les espèces qui appartiennent à la famille des Lamiaceae sont une bonne source d'acide rosmarinique, l'identification des composés polyphénoliques dans l'infusion aqueuse de *Thymus vulgaris* par analyse HPLC a montré une présence dominante d'acide rosmarinique (17,45 mg/g = 1,7 % de la masse sèche de Thymus vulgaris) et un autre composé significatif est l'eriocitrin (1,96 mg/g) (**Kulišiü et al, 2006**). D'autres composants ont été détectés seulement en traces, l'acide caféique (0,02 mg/g) et l'acide p-hydroxybenzoique. La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence de la vitamine E (Į-tocophérol) (4,4 mg/Kg) (**Guillén et Manzanos, 1998 ; Kulišic et al, 2006**).

La méthodologie habituelle pour étudier les dérivés flavonoïdiques dans les plantes implique les extractions successives employant plus d'un solvant, plusieurs étapes de fractionnement et différentes techniques chromatographiques pour extraire, séparer, isoler, épurer et identifier les composés d'intérêt. Le **Tableau II.5** énumère les flavonoïdes trouvés dans les feuilles *Thymus* par plusieurs auteurs, en utilisant la méthodologie ci-dessus mentionné.

Tableau II.5 : Les flavonoïdes trouvés par plusieurs auteurs dans les feuilles de thym

flavonoïdes	références
-Sideritoflavone (5,3',4'-trihydroxy-6, 7,8trimethoxyflavone) **-5-desmethylnobiletine** (5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone) **-Xanthomicrol** (5,4'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone) **-5-desmethylsinensetine** (5-hydroxy-6,7, 3',4'-tetramethoxyflavone)	**Guillén et Manzanos, 1998**
-Apigénine (5,7,4'-trihydroxyflavone) **-Lutéoline** (5 ,7,3',4'_tetrahydorxyflavone) **-Quercetine** (3 ,5 ,7,3',4'_pentahydorxyflavone)	**Kulišic et al, 2006**

II.2.1.6.Utilisations des feuilles de Thym :

Thymus est une des plus populaires plantes aromatiques utilisées dans le monde entier, ces applications sont très vastes et touchent le domaine alimentaire et celui de la médecine traditionnelle (**Adwan et al, 2006**). *Thymu* est une épice intensivement cultivé en Europe et aux Etats-Unis pour l'usage culinaire dans l'assaisonnement des poissons, volailles, des potages et des légumes **(Özcan et Chalchat, 2004)**. La feuille et la sommité fleurie de *Thymus* sont traditionnellement utilisées par voie orale dans le traitement symptomatique de troubles digestifs tels que : ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructation, flatulence ainsi que dans le traitement symptomatique de la toux et de la bronchite **(Bruneton, 1999)**. Sa feuille, énumérée dans la pharmacopée de fines herbes allemandes et britannique, a été employée en tant que branchospasmolytique, expectorant et antibactérien. On dit que la tisane des feuilles de *Thymus* favorise le repos et le sommeil **(Kitajima et al, 2004)**. En usage local, elles sont traditionnellement utilisées en cas de nez bouché, de rhume, pour le traitement des petites plaies après lavage abondant, pour soulager les piqûres d'insectes et les douleurs rhumatismales, en bain de bouche pour l'hygiène buccale (**Poletti, 1988 ; Brunton, 1999)** ainsi comme additif de bain préparé par décoction qui stimule l'écoulement de sang vers la surface du corps humain, soulageant de ce fait la dépression nerveuse **(Özcan et Chalchat, 2004)**.

L'huile essentielle de *Thym* est utilisée dans les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (**Jordán et al, 2006**). Elle entre dans les formulations de diverses spécialités: pommades antiseptiques et cicatrisantes, sirops pour traitement des affections des voies respiratoires, préparation pour inhalation (**Bruneton, 1999)**.

II.2.1.7. Propriétés pharmacologiques et recherche en cours:

Les propriétés pharmacologiques de la plante *Thymus* et de ses différents extraits, en particulier l'huile essentielle et l'extrait aqueux, ont été bien étudiées. En plus de leurs nombreuses utilisations traditionnelles, la plante et ses extraits ont trouvé de nombreuses applications industrielles (principalement comme additifs alimentaires) et médicinales **(Hudaib et al, 2002)**.

Les recherches actuelles réalisées sur les effets des extraits de cette plante sur différents systèmes in vitro et in vivo ont ressorti plusieurs effets de grande importance pour la médecine, la pharmacie et l'industrie moderne, parmi les quelles:

a) Effets antioxydants :

Thymus L.se situait parmi les fines herbes séchées contenant les plus grandes capacités antioxydantes due aux phénols (thymol et carvacrol), aux flavonoides, à l'acide rosmarinique,

à l'acide caféique et à la vitamine E (**Kulišiü et al, 2006 ; Guillén et Manzanos, 1998**). Ces constituants inhibent la peroxydation lipidique induite in vitro au niveau des mitochondries et des microsomes. Ils inhibent également partiellement la production de l'anion superoxyde **(Bruneton, 1999**).

L'huile essentielle de *Thymus* a été testée pour son activité antioxydante par deux méthodes différentes : la technique de décoloration de la β-carotène et le test du DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl). Les résultats obtenus montrent que l'huile de *Thymus* témoigne d'une grande activité antioxydante in vitro (**Bouhdid et al, 2006)**.

A coté de l'huile, qui a été largement étudiée pour ses propriétés antioxydantes, l'extrait aqueux des feuilles de *Thymus* a présenté une activité antioxydante importante, et les caractéristiques antioxydantes observées n'étaient pas entièrement liées à la teneur en phénols de l'huile essentielle dans n'importe quelle méthode analytique, mais vraisemblablement fortement dépendantes de l'acide rosmarinique, composé phénolique principal dans l'extrait aqueux de *Thymus* **(Thuille et al, 2003).**

b) Effets antimicrobiens:

L'huile essentielle de thym, riche en phénols, est douée de propriétés antibactériennes mises en évidence in vitro (**Bruneton, 1999)**. L'huile essentielle de trois plantes dont *Thymus* a été testée, par **Bouhdid et al, 2006**, pour leur activité antibactérienne, l'huile de *Thymus* témoigne d'une activité antibactérienne intéressante sur les bactéries gram positives comme sur les bactéries gram négatives. En effet, une souche hautement pathogène (*L. monocytogenes*) présente une sensibilité élevée à cette huile. Des résultats similaires ont été obtenus par **Ettayebi et al, 2000**, qui ont montré que l'activité de l'huile du thym a été plus efficace contre les bactéries gram positive (*S. aureus*, *S. pyogènes* et *S. pneumoniae*) que contre les grams négative (*E. coli* et autre). D'autre part ces mêmes auteurs ont trouvé que cette grande activité de l'huile essentielle de *Thymus* est reliée au thymol qui est majoritaire dans cette huile. L'activité antibactérienne de 11 huiles essentielles de plantes aromatiques contre la souche bactérienne *Bacillus cereus* INRA L2104, microbe pathogène développé en bouillon de carotte à 16° C, a été étudiée. Une inhibition totale de la croissance des spores bactériennes a été observée pour l'agent antimicrobien de *Thymus* (**Valero et Salmerón, 2003)**. Une étude réalisée par **Giordani et al. 2008**, a ciblé l'effet antifongique des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques, dont *Thymus*, contre la levure de *Candida albicans*. La CMI est estimée de 3.71 µg/ml.

En outre, l'extrait organique entier de *Thymus* est avéré être actif contre différentes souches bactériennes, alors que l'extrait aqueux indiquait la meilleure activité contre

Helicobacter pylori (H. pylori) avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 3,5 mg/ml (**Tabak et al, 1996 ; Iserin, 2001**). L'activité améliorée de l'extrait alcoolique du thym comparée à l'aqueux peut être expliquée par la présence du thymol, un phénol alkylique qui cause la perforation des membranes bactériennes et le flux rapide des composants cytosoliques **(Thuille et al, 2003)**. De même, l'extrait acétonique de *Thymus* a montré une activité inhibitrice à une concentration de 0.5 mg/ml contre *Mycobacterium tuberculosis* (**Lall et Meyer, 1999)**. L'extrait hydrosol (extrait aqueux sans huile essentielle) de *Thymus* a été examiné pour ses effets inhibiteurs contre quatre bactéries pathogènes (*Escherichia coli*, *E. coli O157:H7*, *Staphylococcus aureus* et *Yersinia enterocolitica*). Les résultats montrent que les hydrosols de thym empêchent la croissance des quatre germes pathogènes examinés. A concentration de 50 à 75ml/100ml, ils étaient complètement prohibitif sur la croissance bactérienne dans la culture de bouillon ce qui confirme la possibilité d'employer des hydrosols de thym dans la conservation des aliments et des boissons (**Sajdiç, 2003**).

II.2.2. Le Romarin (Fig. II.4):



Figure II.4 : Photo du Romarin.

II.2.2.1.Généralités :

Le romarin est une plante des coteaux arides, garrigues et des lieux rocheux de la région méditerranéenne et même un peu plus au sud jusqu'aux confins sahariens **(Boullard, 2001)**. Depuis l'antiquité, il est employé pour améliorer et stimuler la mémoire. Encore aujourd'hui en Grèce, les étudiants en font brûler dans leurs chambres en période d'examens. Les anthropologues et les archéologues ont découvert que le romarin a été employé pour ses vertus médicinales, culinaires et cosmétiques en Egypte, en Mésopotamie, en Chine et en Inde antiques **(Stefanovits-Banyai et al, 2003)**.

II.2.2.2.Etymologie :

Le nom latin rosmarinus est habituellement interprété, comme dérivé "ros" de la rosée et "marinus" d'appartenir à la mer, bien qu'elle se développe habituellement loin de la mer. On a affirmé que cette interprétation est un produit d'étymologie traditionnelle, mais probablement le nom original est dérivé du grec "'rhops" arbuste et "myron" baume (**Heinrich et al, 2006)**.

II.2.2.3.Origine et distribution de la plante:

Le romarin se trouve dans toutes les contrées mondiales de l'Europe, plus particulièrement sur le pourtour méditerranéen, de préférence dans les lieux secs et arides, exposés au soleil, à l'état sauvage il se trouve sur des sols calcaires.

II.2.2.4.Culture :

Le romarin se cultive dans un endroit ensoleillé, dans un sol calcaire et bien drainé. Bien que ce soit une plante aimant les climats chauds, il supporte les gelées si le sol ne conserve pas l'humidité. Idéalement, ce dernier doit avoir un pH compris entre 6,5 et 7. Une légère taille au printemps après sa floraison a essentiellement pour but de lui conserver une forme harmonieuse. Il ne doit pas être rabattu trop court ; une branche de bois mort sans bourgeons ni feuilles ne formera pas de nouveaux rameaux. Son feuillage persistant et sa tenue rend propice l'utilisation de certaines variétés touffues à une utilisation en topiaire. Il se multiplie facilement au printemps ou à l'automne par bouturage ou marcottage ; plus difficilement en été par semis car sa germination est lente. Le romarin est assez résistant aux nuisibles. Il craint toutefois le rhizoctone brun en cas d'humidité trop importante (**Site 1)**

II.2.2.5.Systématique:

La classification du Romarin est détaillée en **Tableau II.6**

Tableau II.6: Systématique de *Rosmarinus officinalis*

Règne	*Plantae*
Division	*Magnoliophyta*
Classe	*Magnoliopsida*
Ordre	*Lamiales*
Famille	*Lamiaceae*
Genre	*Rosmarinus*
Espèce	*Rosmarinus officinalis*

II.2.2.6.Description botanique (Fig. II.5) :

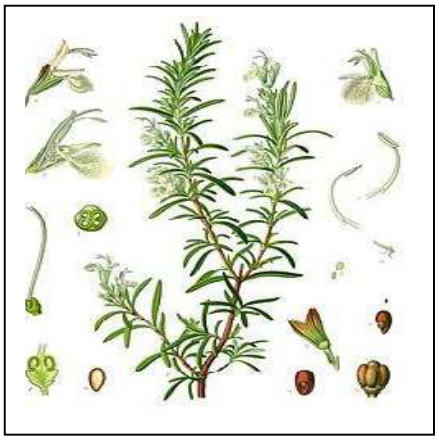


Figure II.5 : Aspects morphologiques du romarin (Site web1)

Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées, peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur, il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. La floraison commence dés le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril – mai. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches *(Rosmarinus officinalis albiflorus)*. Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base .Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tetrakène (de couleur brune) **(Fig. II.5) (Site 1)**.

II.2.2.7.Composition biochimique du romarin :

Les principaux constituants du romarin responsables des différentes propriétés sont: **Les acides phénoliques et les flavonoïdes**. L'huile essentielle du romarin (1 à 2% dans la plante) contient : de l'α-pinène (7 à 80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 38%), de l'eucalyptol (1 à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène. En plus de l'huile essentielle on trouve dans le romarin : 2 à 4% de dérivés triterpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol ; des

lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadial, des acides phénoliques , des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque ,des acides organiques: l'acide citrique, glycolique et glycérique, des stérols, de la choline, du mucilage **(Bellakhdar, 1997)** et de la résine (**Beloued, 1998**).

Le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence des flavonoïdes, des tannins et des saponines, et l'absence des alcaloïdes détecté dans l'extrait aqueux. Les flavonoïdes détectés par la chromatographie sur couche mince (CCM) sont la quercétine et le kaemphérol **(Gonzalez-Trujano et al, 2007)**. La première application du système d'électrophorèse capillaire à détection électrochimique a permis la détection de: l'hespérétine, l'acacétine, la diosmétine, l'apigénine, la lutéoline, l'acide férulique, l'acide rosmarinique et l'acide caféique dans les extraits éthanoliques du romarin (**Peng et al, 2005)**. En 2006, **Almela et al.** Ont identifié par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), dans les extraits méthanoliques du romarin issus de différentes matières (romarin sauvage et distillé) des composés classés en trois groupes : les diterpènes, les flavonoïdes et les acides phénoliques. Les structures des diterpènes ont été reliées à l'acide carnosique. Les flavonoïdes dérivent de deux flavones apigénine et la lutéoline : genkwanine ; méthoxytectochrysine ; homoplantaginine ; scutellareine ; cirsimaritine et 6-hydroxylutéoline-7-glucoside. L'acide rosmarinique était le seul acide phénolique identifié.

II.2.2.8.Utilisation :

Le romarin est souvent cultivé pour contrôler l'érosion du sol. Son huile aromatique a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, parfums, désodorisants, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires **(Arnold et al, 1997)**.

Dans la médecine traditionnelle, ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique (**Gonzalez-Trujano et al, 2007)**. Dans le Mexique et le Guatemala, il est employé principalement comme remède de post-partum et traite également les problèmes respiratoires et les infections de la peau. En Espagne, l'huile du romarin est très populaire pour beaucoup de genres de douleur, y compris les douleurs musculaires rhumatismales et traumatiques **(Heinrich et al, 2006)**. Au Maroc, l'infusion des feuilles est utilisée comme apéritif, cholagogue, stomachique et emménagogue. En usage externe, les cataplasmes faits avec les compresses de la décoction concentrée sont appliqués comme vulnéraires. La poudre des feuilles est saupoudrée comme cicatrisant et antiseptique. La fumigation du romarin est indiquée pour calmer les maux de dents. Depuis quelques décennies, l'huile essentielle du romarin est utilisée en massage sédatif dans les

rhumatismes et la sciatique. Les feuilles séchées servent à conserver la laine de l'attaque des mites **(Bellakhdar, 1997**). En Turquie, la décoction de feuilles du romarin a été traditionnellement employée pour traiter les diabétiques (**Bakirel et al, 2008**). L'infusion des feuilles est tonique, antitussive, carminative, antiasthmatique, fébrifuge, et anti-paralytique (**Arnold et al, 1997**). On le recommande dans les asthénies, les troubles du foie, contre les dyspepsies atoniques ainsi que contre les céphalées et les migraines d'origine nerveuse, les vertiges et les troubles de mémoire (**Poletti, 1988)**. Il a été également employé en tant qu'analgésique, antiépileptique, diurétique, (**Soyal et al, 2007)**, ainsi que pour traiter l'ictère et sa fumée a été employée contre la peste **(Heinrich et al, 2006**).

II.2.2.9. Propriétés du romarin:

Cette plante est utilisée en médicine en raison de ses différentes propriétés:

- Anti spasmolytiques, diurétiques, hépato-protectrices, soulagement des désordres respiratoires **(Lemonica et al, 1996; Souza et al, 2008)**;
- Antibactériennes, antimutagéniques, antioxydantes, chémopréventives **(Ibaňez et al., 2000; Pérez et al., 2007; Wang et al., 2008)**;
- Anti-inflammatoires, anti-métastasiques **(Cheung et Tai, 2007)**;
- Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires **(Singletary et Nelshoppen., 1991)** et la prolifération des tumeurs cutanées **(Huang et al, 1994)**.
- D'autres études montrent que les composants du romarin inhibent les phases d'initiation et de promotion de la cancérogénèse **(Offord et al., 1995)**.
- Le Carnosol du romarin possède une activité antivirale contre le virus du SIDA (HIV) **(Aruoma et al., 1996)** alors que l'acide carnosique a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1 **(Paris et al., 1993)**.

a) Activité antibactérienne du romarin:

Plusieurs auteurs ont rapporté que certains composés présents dans les extraits du romarin possèdent des propriétés antibactériennes. Les effets des extraits aqueux et méthanoliques du romarin, sur la croissance de *Streptococcus sobrinus* et sur l'activité extracellulaire de l'enzyme glucosyltransférase ont été étudiés par **Tsai et al., 2007**. Les résultats ont suggéré que les extraits du romarin peuvent empêcher les lésions de la carie en inhibant la croissance du *Streptococcus sobrinus* et peuvent aussi éliminer la plaque dentaire par la suppression de l'activité de la glucosyltransférase. Afin de chercher des nouveaux antiseptiques et des agents antimicrobiens, une autre étude a été élaborée pour examiner les effets antimicrobiens des extraits et des composés isolés de certaines plantes, sur l'ensemble

de 29 bactéries et levures avec pertinence dermatologique. L'extrait du romarin obtenu par le dioxyde de carbone (CO2) supercritique, a présenté un large spectre antimicrobien. La croissance de 28 sur 29 germes a été empêchée par cet extrait. L'examination du Carnosol, acide carnosique, acide ursolique, a montré que seule l'acide carnosique a une activité antibactérienne **(Weckesser et al, 2007)**. Enfin, trois extraits commerciaux du romarin étaient actifs contre onze bactéries portées par les aliments **(Fernandez-Lopez et al, 2005**). Le *vibrio parahaemolyticus* porté par les fruits de mer infectés est inhibé par la suspension du romarin à 30 C°. **Abutbul et al., 2004** ont suggérer l'utilisation du romarin comme traitement contre les maladies causées par le *Streptococcus iniae*, la bactérie qui cause des pertes économiques significatives dans l'industrie d'aquaculture dans le monde entier.

Quand à l'huile essentielle du romarin, elle a un effet sur deux souches de *Saccharomyces* et *Escherichia coli*, tandis que la bactérie *Staphylococcus epidermis* est résistante. L'huile a empêché la réplication du plasmide métabolique (F'lac) d'*Escherichia coli* **(Schelz et al, 2006)**. Une autre étude a révélée que quatre souches d'*Escherichia coli* O157:H7 sont sensibles à la totalité des huiles essentielles testées. L'activité de l'huile essentielle du romarin était appréciable (**Moreira et al, 2005**).

II.2.3 Le Genévrier (Fig. II.6)

II.2.3.1.Historique

Le terme latin *juniperus*, est étymologiquement peu clair. Une hypothèse le ferait venir du celte *gen* « buisson », et *prus* « âcre ». Selon une autre hypothèse, le nom se composerait des mots latins '*junior*' « plus jeune » et '*parere*' « apparaître » en référence au fait que deux générations de baies existent en même temps (les plus jeunes apparaissent avant que les baies mûres tombent).

Le genévrier est une plante protectrice qui selon la tradition chrétienne, il cacha la Vierge et l'enfant Jésus des soldats de l'Hérode. Avec ses branches piquantes, il repousse les troupeaux au pâturage, l'odeur de ses baies détourne les chiens sauvages et protège les petits animaux de la forêt tels que les lièvres et les oiseaux **(Teuscher, 2005)**. Certaines espèces de genévrier peuvent vivre plus de 1000 ans **(Adams, 1999)**.



Figure II.6 : Photo du Genévrier

II.2.3.2.Localisation et répartition géographique :

Il s'agit d'une espèce méditerranéenne que l'on trouve en France (littoral méditerranéen et Alpes), dans les trois pays de l'Afrique du Nord, en Cyrénaïque. En Afrique du Nord il couvre 450.000 hectares.

Le genévrier couvre environ 290.000 hectares en Algérie. Il recule de plus en plus dans l'Atlas Saharien et sur le versant du sud du Grand-Atlas sous l'action du climat désertique ; mais surtout sous celle de l'homme et des troupeaux **(Boudy, 1952)**.

II.2.3.3.Classification (Tableau II.7)

Le genre Juniperus comprend environ 60 espèces, qui poussent dans l'hémisphère Nord. On peut citer : Juniperus chinensis, Juniperus communis, Juniperus thurifera, Juniperus phoenicea, Juniperus oxycedrus, Juniperus sabina, Juniperus virginiana et Juniperus drupacea.

Tableau II.7 : Classification botanique du Genévrier.

Règne	*Plantae*
Embranchement	*Spermatophytes*
Sous embranchement	*Gymnospermes*
Classe	*Pinopsida*
Ordre	*Pinales*
Famille	*Cupressaceae*
Genre	*Juniperus*

II.2.3.4. Description botaniques (Fig. II.7)

Les genévriers (*Juniperus sp*.) sont des arbres ou arbustes aromatiques à feuilles opposées ou verticillées en aiguille ou en écaille. Les cônes mâles sont petits, terminaux ou axillaires. Les cônes femelles sont formés d'un petit nombre d'écailles charnues plus au moins concrescentes à maturité et donnant naissance à une sorte de baie charnue. La baie du

genévrier est traditionnellement utilisée pour favoriser la digestion grâce à ses propriétés tonique et apéritive.



Figure II.7 : Aspects morphologiques du genévrier (site web 1)

II.2.3.5. Composition chimique de genévrier

Les études menées sur la composition de différentes espèces de genévrier ont montré que, celles-ci étaient majoritairement constituées de : l'α-Pinène, δ-3-carène, sabinene, α-phellandréne, limonène, linalol, piperitine et linalyl acétate **(Asili et *al*, 2008 ; Adams et *al*, 2003 ; Barrero et *al*, 2006 et Dob et *al*, 2008)**.

Dans les extraits de feuilles de genévrier on trouve généralement des hydroxycoumrines : ombelliferone, des flavonoïdes : rutine, quercitrin, isoquercitrin et des proanthocyanidines : catéchine, épicatéchine, gallocatéchin.

II.2.3.6.Effets et usages médicinaux

Le genévrier est un puissant antiseptique des voies urinaires. Remède efficace contre les cystites, il facilite le drainage mais ne doit pas être employé en cas d'insuffisance rénale. Le genévrier fortifie le système digestif, soulage les coliques et stimulel'activité de l'estomac. Par voie interne ou externe, il se révèle efficace dans le traitement des arthrites chroniques, de la goutte et des rhumatismes. En application, l'huile essentielle diluée calme les inflammations ; elle est censée favoriser le drainage des tissus sous-cutanés. Enfin, le genévrier stimule le flux menstruel. **(Larousse Encyclopédie des Plantes Médicinales, 2001).**

II.2.4. Le Laurier (Fig. II.8)



Figure II.8 : Photo du Laurier (Laurus*).*

II.2.4. 1.Generalites

Laurus., membre de la famille des lauracées qui renferme 32 genres et environ 2000-2500 espèces (**Barla et al, 2007**). *Laurus*, nom latin, d'origine celte qui veut dire «toujours vert » allusion au feuillage persistant de la plante **(Pariente, 2001)**. Les feuilles sont largement appliquées et connues comme assaisonnement et herbe médicinale depuis les périodes antiques grecs et romaine **(Demir et al, 2004).** Il est intéressant de noter que cette herbe qui était pendant longtemps employée dans la nourriture comme condiment et en médecine traditionnelle a, en fait, des propriétés qui peuvent suggérer de nouvelle application **(Ferreira et al, 2006)**.

II.2.4. 2. Origine et distribution géographique de la plante

Originaire du bassin méditerranéen, *Laurus nobilis* pousse dans les lieux humides et ombragés, mais également dans les jardins, où elle est cultivée comme condiment **(Iserin, 2001)**. Actuellement, la plante est largement cultivée dans beaucoup de pays comme plante ornementale et pour la production commerciale tels que la Turquie, l'Algérie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis Méridionaux **(Demir et al, 2004; Barla et al, 2007**).

II.2.4. 3. Systématique

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure **(Quezel et santa, 1962)** synthétisée dans le **Tableau II.8**.

Tableau II.8 : Classification botanique de *Laurus*

Règne	*Plantes*
Sous règne	*Plantes vasculaires*
Embranchement	*Spermaphytes*
Sous embranchement	*Angiospermes*
Classe	*Dicotylédones*
Sous classe	*Dialypétales*
Ordre	*Laurales*
Famille	*Lauracées*
Genre	*Laurus*
Espèce	*Laurus nobilis L.*

II.2.4. 4. Description botanique de la plante (Fig. II.9)

Laurus nobilis, Arbuste ou arbre aromatique de 2 à 10m de haut à tige droite grise dans sa partie basse et verte en haut. Ses feuilles sont alternés, coriaces, légèrement ondulées sur les bords, longues de 16 cm sur 8 cm de large, persistantes vert foncé et glacés sur leur face supérieure et plus pale en dessous. Les fleurs sont dioïques (petites fleurs mâles et femelles sur des pieds séparés), jaunes, groupées par 4 à 5 en petites ombelles. Le fruit est une petite baie ovoïde de 2cm de longueur sur 1cm de largeur, noir vernissé à maturité **(Iserin, 2001 ; Demir et al, 2004 ; Beloued, 2005)**.



Figure II.9 : Aspects morphologiques du Laurus (site web 1)

II.2.4. 5. Composition chimique

De nombreuses études ont été réalisées pour la détermination de la composition chimique des feuilles de et plusieurs ont prouvé la richesse de ses feuilles en substances actives. Par hydrodistillation les feuilles fournissent environ 10-30 ml/Kg (1-3%) d'huile essentielle **(Bruneton 1999, Demir et al, 2004**) dont les constituants majoritaires inclut : cinéol, α et β pinène, sabinène, linalol, eugénol, terpinéol, plus d'autres esters et terpenoïdes,

mais dont les proportions varient selon l'origine géographique (**Iserin 2001 ; Sayyah et al, 2002 ; Demir et al, 2004).** Les feuilles de *Laurus nobilis* contiennent aussi des flavonoïdes polaires (dérivées glycosylées de quercétine, kaempferol et de catéchine) et apolaires (quatre dérivés acylés de kaempferol) **(Fiorini et al, 1998 ; Kivçak et Mert, 2002)**, sesquiterpènes lactones, alcaloïdes d'isoquinoline **(Kivçak et Mert, 2002 ; Simie et al, 2003)**, en plus **Demo et al, 1998** et **Gómez-Coronado et al, 2004** ont montré la richesse de ses feuilles en vitamine E.

II.2.4.6. Utilisation des feuilles de *laurus*

Les feuilles de *Laurus nobilis* sont parmi les assaisonnements les plus connus dans tous les pays, elles sont généralement utilisées comme épice valable en culinaire (en potages, ragoûts, sauce,…) et aromatisant en industrie alimentaire. Cette plante a aussi des applications importantes en médecine traditionnelle et représente récemment un sujet de recherche scientifique intéressant (**Simie et al, 2003),** le laurier est principalement utilisé, par voie orale, dans le traitement symptomatique des troubles de l'appareil digestif supérieur tels que le ballonnement épigastrique, lenteur de la digestion, éructations et flatulence **(Iserin, 2001)**.
L'extrait aqueux est utilisé dans la médecine traditionnelle turque en tant qu'antihémorroïdal, antirhumatismal, diurétique et comme un antidote dans des morsures de serpent et pour le traitement du mal d'estomac **(Kivçak et Mert, 2002)**. Dans la médecine traditionnelle iranienne, les feuilles de cette plante ont été employées pour traiter l'épilepsie et le parkinsonisme **(Aqili Khorasani, 1992)**.

II.2.4. 7. Propriétés pharmacologiques et recherche en cours

a) Effets antioxydants

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques (bruts et dégraissés) des feuilles, d'écorce et des fruits de *Laurus nobilis* ont été étudiés au niveau de la peroxydation de lipide dans les liposomes, induite par le système Fe^{+2}/ascorbate et mesuré par spectrophotométrie à 533 nm. Les résultats ont montré que tous les extraits de recherche possédaient une activité antioxydante. L'extrait dégraissé des feuilles montre une inhibition plus élevée que l'extrait brut ainsi que tous les autres extraits avec un maximum d'activité (68,4%) atteint avec une plus petite quantité (2,0 mg) **(Simie et al, 2003)**. **Ferreira et al., 2006** ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits (huile essentielle, extrait éthanolique et décoction) de dix espèces de plantes médicinales dont *Laurus nobilis*, cette espèce a montré des valeurs élevées de l'activité antioxydante pour chacun des trois extraits et elle est plus haute pour les extraits polaires. Dans le laurier, l'isoquercitrin et les glycosides flavonol peuvent expliquer l'activité

exhibée. Dans une autre étude, **Demo et al, 1998** ont démontré la présence des tocophérols (vitamine E), principalement la γ- tocophérol, dans les feuilles de *Laurus nobilis* obtenue dans la fraction apolaire après extraction par l'hexane. Dans cette étude on rapporte que le contenu tocophérol est strictement corrélé avec l'activité antioxydante de l'extrait hexane des feuilles. Ces résultats préliminaires ont confirmé que l'utilisation traditionnelle des feuilles de *Laurus nobilis* dans l'industrie alimentaire est reliée non seulement à l'odeur et à l'arome plaisant, mais probablement aussi a des possibilités préservatives des substances présentes dans les feuilles et d'autres pièces de cette plante.

b) Effets fumigènes et insecticide

Récemment, il ya un intérêt croissant pour l'utilisation probable des extraits de plantes comme solution de rechange aux insecticides synthétiques. Treize huiles essentielles dont ceux de *Laurus nobilis* ont été examinées sous leurs formes de vapeur contre une espèce d'insectes attaquant les produits stockés, *Acanthoscelides obtectus* (bruche du haricot). Les résultats ont indiqués que l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* a une action répulsive, réduit la fécondité, diminue la couvaison d'oeufs, augmente la mortalité larvaire de nouveau-né et influence défavorablement l'apparition de progéniture **(Papachristos et Stamopoulos, 2002)**. Une étude similaire a été réalisée par **Erler et al, 2006**, où l'huile essentielle extraite à partir du feuillage frais de *Laurus nobilis* a été examinée pour son activité répulsive contre les femelles adultes d'une espèce de moustique (*Culex pipiens*), cette huile a montré un degré de répulsion intéressant contre ces parasites vecteurs de plusieurs maladies comme la malaria, fièvre jaune, dengue, encéphalite…etc.

De même, l'activité fumigène de certains composés qui se produisent naturellement dans les huiles essentielles des plantes aromatiques dont cinéol, eugénol et linalol, composés principales de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*, a été évalué contre trois espèces d'insectes parasites des produits entreposés (*Sitophilus oryzae, Rhyzopertha dominica* et *Tribolium castaneum*). L'activité insecticide a changé avec l'espèce d'insecte, le composé et le temps d'exposition. Les résultats ont prouvé que ces composés peuvent convenir comme fumigène en raison de leur volatilité élevée, efficacité et leur sûreté (non toxique aux humains) **(Rozman et al, 2007)**.

c) Effet anticonvulsive

L'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* a été évaluée expérimentalement pour l'activité anticonvulsive. Elle a protégé des souris contre des convulsions toniques induites par électrochoc maximal et particulièrement par pentylènetétrazol. Aux doses

d'anticonvulsivant, l'huile essentielle a produit la sédation et relâchement du cœur. Les composants suspectés responsables de cet effet sont le cinéol, eugénol et le méthyle eugénol **(Sayyah et al, 2002)**.

d) Effet cytotoxique

Les extraits *n*-hexane, éthanol et aqueux des feuilles de *Laurus nobilis* ont été testés pour leurs propriétés cytotoxiques en utilisant l'essai biologique de crevette de saumure (*Artemia salina*). Seul l'extrait *n*-hexane exhibé une activité cytotoxique contre la crevette de saumure, mais il est moins actif que l'umbelliferone et la colchicine. Dans le criblage phytochimique tous les extraits ont donné des résultats positifs pour les sesquiterpènes, les extraits éthanol et aqueux pour les alcaloïdes mais seulement l'extrait *n*-hexane était positif pour les flavonoïdes et la vitamine E. En conclusion, les glycosides flavonol pourraient être des principes actifs responsables de l'activité cytotoxique observée **(Kivçak et Mert, 2002**).
D'autres études ont réalisé l'isolement et l'identification des composés des feuilles et des fruits de *Laurus nobilis* supposés être cytotoxique. Ils ont isolés six sesquiterpènes lactone connue et un nouveau sesquiterpène le lauroxepine, ces substances actives se sont avérées fortement cytotoxiques contre la lignée cellulaire ovarienne cancéreuse A2780 **(Fang et al, 2005; Barla et al, 2007)**.

e) Effet gastroprotectif

Une seule étude a été réalisée à ce sujet par **Gurbuz et autre 2002** où cinq plantes aromatiques dont *Laurus nobilis*, sont employées traditionnellement en Turquie pour traiter le mal d'estomac. Ils ont été choisis pour déterminer leur pouvoir anti-ulcèrogène. Une décoction et un extrait méthanol ont été préparés à partir des fruits de Laurier pour déterminer leurs effets sur un modèle d'ulcère gastrique induit par l'éthanol chez des rats. Les expériences pharmacologiques et les techniques histopathologiques ont clairement montré que ces extraits administrés oralement ont significativement protégé l'estomac contre ce modèle d'ulcère.

f) Effet inhibiteur d'absorption d'alcool

L'extrait méthanolique des feuilles de *Laurus nobilis* a efficacement empêché l'élévation du taux d'éthanol dans le sang chez un rat chargé d'éthanol. Sept sesquiterpènes actifs ont été isolés en tant qu'inhibiteurs d'absorption d'alcool. En outre, le retard du vidange gastrique est probablement impliqué dans leur effet inhibiteur **(Matsuda et al, 1999; Yoshikawa et al, 2000)**. Ces sesquiterpènes ont non seulement un effet préventif efficace

pour la toxicité aiguë d'alcool mais peuvent également aider des patients à éviter l'abus d'alcool **(Yoshikawa et al, 2000)**.

g) Effet curatif de blessures

L'effet curatif de blessures de l'huile de feuille de *Laurus nobilis* a été examiné par **Khalil et al, 2007**. Une blessure en pleine épaisseur a été faite dans le secteur dorsal des souris *Mus musculus*. Les blessures ont été traitées quatre fois avec la préparation d'huile pendant deux jours successifs. Cette opération est répétée pendant plusieurs jours avec 12 h d'intervalle. Après 16 jours, les blessures ont été visuellement observées et le secteur de blessure a été mesuré, les animaux ont été sacrifiés et l'histologie du secteur de blessure est examinée. L'huile de *Laurus nobilis* a montrée une bonne activité curative des blessures.

h) Effet inhibiteur d'enzyme

Ferreira et al., 2006 ont étudié l'effet de l'huile essentielle, l'extrait éthanol et la décoction des feuilles de *Laurus nobilis* sur l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine donnant la choline et l'acétyle. La fraction éthanol a montré une valeur élevée d'inhibition d'AChE de 64% (1g/ml). *Laurus nobilis* peut aider donc traiter ou soulager des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer, puisque les drogues approuvées pour la thérapie de cette maladie agissent en contrecarrant le déficit d'acétylcholine.

e) Effet antimicrobien

Des huiles essentielles de plusieurs plantes ont été évaluées pour leur potentiel dans le control du mycète aflatoxinogènique *Aspergillus parasiticus CFR 223* et de la production d'aflatoxine. L'huile des feuilles de laurier a stimulé *in vitro* la croissance des mycéliums du mycète mais a réduit la concentration de son aflatoxine de 55.21% **(Atanda et al, 2007)**.

II.3. Méthodes d'extraction des principes actifs des plantes :

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des principes actifs végétaux, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants qui sont plus ou moins modifiés pendant les processus de préparation **(Bruneton, 1995)**.

II.3.1. Extraction aqueuse de plantes :

L'extraction aqueuse de plantes médicinales (infusion, décoction, macération…) fournit des substances solubles dans l'eau. Ces substances naturelles de la plante sont des actifs ou des précurseurs d'actifs dont les rôles sont bien identifiés en phytothérapie. Des travaux de recherches scientifiques attestent par leurs résultats que les extraits aqueux de plantes ont des propriétés intéressantes contre les microorganismes **(Tableau II.9)**.

Tableau II.9: Résultat des études sur les propriétés des extraits aqueux des plantes contre les microorganismes pathogènes.

Résultats
L'extrait aqueux des feuilles vertes de neem réduit l'infection **(Suresh et al. 1997).**
Les extraits aqueux de *Portulaca oleracea* L. à 30% réduisent la croissance radiale de *Bipolaris maydis***(Somda et al. 2003).**
L'extrait aqueux du thym indiquait la meilleure activité contre *Helicobacter pylori* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 3,5 mg/ml **(Tabak et al, 1996 ; Iserin, 2001)**
Les extraits aqueux du thym empêchent la croissance des quelques germes pathogènes examinés à des concentrations de 50 à 75ml/100ml **(Sajdiç, 2003)**
Les extraits aqueux du romarin peuvent empêcher les lésions de la carie en inhibant la croissance du *Streptococcus sobrinus* **(Tsai et al, 2007)**.

II.3.2.Extraction par solvant :

Les solvants qui permettant d'extraire les principes actifs sont : l'eau, le propylène-glycol, le butylène-glycol, la glycérine, l'alcool), les solvants seront utilisés en fonction des actifs recherchés. Dans cette méthode, les plantes sont mélangées à un solvant organique. Les molécules organiques étant solubles dans les solvants employés, il est particulièrement aisé de

séparer les constituants recherchés de leur enveloppe végétale. Des travaux de recherches scientifiques attestent par leurs résultats que les extraits par solvants de plantes ont des propriétés antibactériennes **(Tableau II.10)**. Cependant, l'inconvénient de cette méthode est en fait son principal composant : le solvant. En effet, étant donné les quantités mise en œuvre, les risques de pollution et d'inflammation ne peuvent être réduits totalement. Il arrive que des traces de solvant soient présentes dans le produit final (les molécules à extraire) ou bien dans la matière végétale après traitement.

Tableau II.10: Résultat des études sur les propriétés des extraits par solvants des plantes contre les microorganismes pathogènes.

Résultats
L'extrait acétonique de *Thymus* a montré une activité inhibitrice à une concentration de 0.5 mg/ml contre *Mycobacterium tuberculosis*(**Lall et Meyer, 1999).**
L'extrait éthanolique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence des flavonoïdes, des tannins et des saponines et a montré une activité inhibitrice vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (**Gonzalez-Trujano et al, 2007).**

II. 3.3.Extraction des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passent avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau **(Naves, 1976).** Des travaux de recherches scientifiques attestent par leurs résultats que les huiles essentielles des plantes ont des propriétés antibactériennes **(Tableau II.11)**.

Pour notre étude, nous avons choisi les méthodes d'extraction aqueuse: infusion, décoction et macération.

Tableau II.11: Résultat des études sur les propriétés des huiles essentielles des plantes contre les microorganismes pathogènes.

Résultats	**Références**
L'huile essentielle de thym, riche en phénols, est douée de propriétés antibactériennes mises en évidence in vitro.	(**Bruneton, 1999**).
L'étude a ciblé l'effet antifongique des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques, dont *Thymus*, contre la levure de Candida albicans. La CMI est estimée de 3.71 µg/ml.	**Giordani et al. 2008**
L'étude a révélée que quatre souches d'*Escherichia coli* sont sensibles à la totalité des huiles essentielles testées. L'activité de l'huile essentielle du romarin était appréciable	**(Moreira et al., 2005).**
L'huile des feuilles du laurier a stimulé in vitro la croissance des mycéliums du mycète et a réduit la concentration de son aflatoxine de 55.21%.	**(Atanda et al., 2007).**



Chapitre III
Pathogènes et agents antimicrobiens

III.1 Relation de l'homme avec le monde microbien:

Dès sa naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes au niveau son revêtement cutanéo-muqueux, de son tube digestif, de son appareil respiratoire…etc. Ces microorganismes proviennent de son milieu environnant (l'alimentation, l'eau, le sol, l'air et les poussières…).

En effet, l'eau contient en suspension des microorganismes très divers. Le plus souvent, se sont des bactéries ayant une origine commune avec le sol (***Streptomyces*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*…)** ou avec les matières fécales de l'homme et des animaux (Entérobactéries, Entérocoques…). Les moisissures sont également présentes, (***Aspergillus*, *Rhizopus*, *Botrytis*…) (Bourgeois et *al*, 1996)**

La contamination microbienne atmosphérique est surtout constituée par des bactéries, des moisissures (***Aspergillus*, *Penicillium***…) et plus rarement des levures (***Torulopsis*)**. Parmi les bactéries prédominent les sporulées et les ***Micrococcus*** ; les germes pathogènes sont le plus fréquemment absents **(Bourgeois et *al*, 1996).**

Les germes les plus fréquents dans l'alimentation d'origine animale sont ***Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* et *Candida***. Les légumes sont également porteurs de bactéries (***Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas***). Des microorganismes du tube digestif et des muqueuses des animaux peuvent contaminer les viandes après abattage éviscération et découpe. Se sont essentiellement des Entérobactéries (***Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*…**) et des ***Enterococcus*** qui sont minoritaires dans l'intestin, mais ont des capacités d'adaptation qui leur permettent de coloniser les produits organiques et en particulier les aliments **(Bourgeois et *al*, 1996).**

Il est donc inévitable que l'homme ne se contamine pas avec ces microorganismes. Le contact avec des pathogènes peut ainsi créer des infections nécessitant l'emploi d'agents antimicrobiens.

Dans notre études, nous avons utilisé deux souches bactériennes (*Staphylococcus aureus et E. coli*) afin d'évaluer l'effet inhibiteurs du miel et des extraits de plante.

III.1.1. Staphylococcus aureus :

a) Caractéristiques générales :

Staphylococcus aureus est une bactérie omniprésente chez l'homme, les animaux ainsi que dans l'aliment. Le nom de « *Staphylococcus* » a été attribué en 1882 à un regroupement de cocci causant un grand nombre de maladies pyogènes chez l'humain. Ces bactéries ont été isolées et analysées par le chirurgien écossais Sir Alexander Ogston en 1880. Il fut démontré que les microorganismes dérivés de pus prélevés d'un abcès humain provoquaient

les mêmes symptômes et les lésions pyogènes chez une souris. De plus, il a remédié à la maladie en inactivant les *Staphylocoques* par des traitements thermiques et au phénol. Le genre *Staphylococcus* a été séparé de celui de *Micrococcus* par Evans en 1957. Ces deux organismes donnent des colonies opaques, blanches, orange ou jaune sur gélose au sang. Tout les deux sont des bactéries à Gram positif et catalase positive. Cependant, ils sont physiologiquement distincts de par leur capacité à croître en condition anaérobique et à fermenter le glucose. En effet, le genre *Staphylococcus* est capable de fermenter le glucose et de produire de l'acide lactique sous conditions anaérobiques contrairement au métabolisme respiratoire aérobique strict du genre *Micrococcus*. *S. aureus* est l'espèce de staphylocoque la plus pathogène aussi bien chez l'homme que chez les animaux. Ce staphylocoque est non-mobile et se présente en coques de 0,5 à 1,5 pm de diamètre associés en paires ou en grappes

(Carbonnelle et al, 1987)

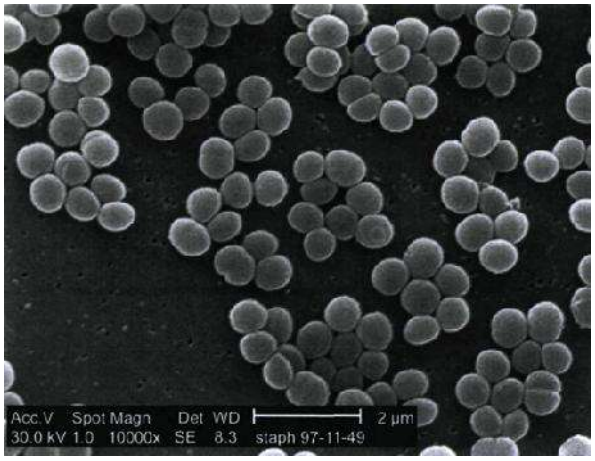


Figure III.1 : *Staphylococcus aureus* observée en microscopie électronique à balayage (lynn el Haddad, 2010).

C'est une bactérie anaérobie facultative, mésophile, ayant une température optimale de croissance à 37 °C. Sa tolérance à de grands intervalles de température, de pH et aux concentrations élevées de chlorure de sodium (jusqu'à 20 %) la diffère des autres bactéries et favorise sa croissance et sa propagation dans plusieurs milieux et environnements. Les bactéries composant cette espèce sont chimioorganotrophes et donc, elles ont besoin de sources organiques pour produire de l'énergie. Elles fermentent aussi plusieurs sucres tels que le fructose, le glucose, le galactose, le mannose, ou bien des alcools comme le mannitol ou encore des acides organiques tels l'acétate et des acides aminés comme l'arginine. **(lynn el Haddad, 2010**).

b) Caractères biochimiques :

Les caractères biochimiques de *S aureus* sont cités sur le **tableau III.1**. Ces caractères permettent, en plus des caractères culturaux et microscopiques, son identification.

Tableau III.1: Caractères biochimiques de *S aureus.*

(Jean Figarella et Guy Leyral, 2001)

Caractères positifs (+)	Caractères négatifs (-)	Caractères variables (v)
-Catalase. -Fermentation du glucose - Sensibilité à novobiocine. - Sensibilité au lysosyme (C=25 µg dm^{-3}). - Récepteur au fibrinogène. - Coagulose libre. - DNAse thermorésistante. - protéine A. - Nitrate réductase. - PAL (phosphatase alcaline). - Uréase. - β-Glucosidase. - Dégradation de mannose. - Dégradation de maltose. - Dégradation de lactose. - Dégradation de trehalose. - Dégradation de mannitol. - Dégradation de saccharose.	-O D C -β-galactosidase - Oxydase - Sensibilité à la Bacitracine (C= 40 mUIdm^{-3})	-Dégradation de turanose

c) Staphylocoque doré et infections :

Bien qu'elle soit souvent retrouvée chez l'Homme, cette espèce ne provoque pas toujours d'infections. Elle peut engendrer des infections cutanées (furoncles, folliculites, panaris, impétigo…) ou des muqueuses (otites, conjonctivites…) pouvant mener à des septicémies. Elle est aussi responsable d'infections nosocomiales, d'intoxications alimentaires

et sa résistance aux antibiotiques est parfois un grand problème pour le traitement des patients.

Le staphylocoque doré synthétise diverses toxines: des hémolysines, la leucodicine, des entérotoxines, la toxine du choc toxique staphylococcique ou TSST-1 (dont la présence est accompagnée par fièvre supérieure à 39°C, hypotension artérielle, érythrodermie, qui provoque la mort de 10 % des malades) et des exfoliatines. **(Site web 3)**

III.1.2.Escherichia coli :

a) Caractéristiques générales

Escherichia coli est une bactérie découverte par Thomas Escerich en 1855 **(Site web 7)**. Elle appartient à la famille des entérobactéries **(Lavergne E, 1969)**, il s'agit d'un genre bactérien dans lequel on ne trouve qu'une seule espèce, mais il existe plus de 1000 types antigéniques **(Site web 7)**.

Bâtonnets, assez courts (2 à 3 µm X 0.7µm). Isolés, groupés par deux ou plus rarement en amas. Les *Escherichia* peuvent apparaître sous forme cocobacillaires ou filamenteuses dans les vieilles cultures. La mobilité est très réduite due à une ciliature péritriche. Parfois capsulés (Antigène A) **(Site web 7).** *E coli* est gram négatif **(Lavergne E, 1969)**.

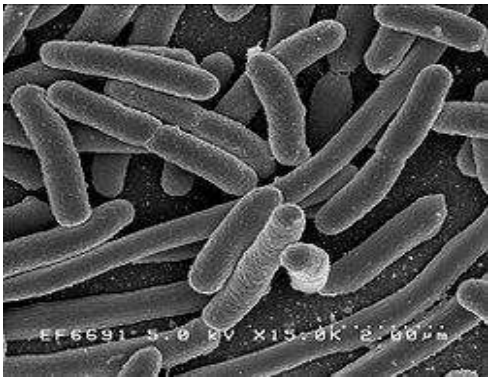


Figure III.2: *Escherichia coli* observée en microscopie électronique à balayage (Site web 4)

Sa culture est très facile avec une grande tolérance aux variations du pH, le pH optimum est 7.5. La température optimale est de 37°C mais elle pousse entre 15°C et 45°C **(Site web 7).**

E coli est une bactérie prototrophe: elle se multiplie sur un milieu minimum. Elle est donc capable grâce à son système enzymatique de synthétiser à partir du glucose et des autres éléments de base du milieu, toutes les substances dont elle a besoin: Elle a un potentiel de transformation extraordinaire **(Boulahbal F, 1993)**. L'Hektoen est le milieu sélectif d' *E coli*.

b) Caractères biochimiques:

E coli est aero- anaerobie **(Lavergne E, 1969)**. Ses caractères biochimiques se résument sur le **tableau III.2**.

Tableau III.2: Caractères biochimiques d'*E coli*. (Jean Figarella et Guy Leyral, 2001)

Caractères positifs (+)	Caractères négatifs (-)	Caractères variables (v)
*Dégradation de lactose *Dégradation de glucose *Dégradation du mannitol *ONPG *LDC *RM *Production du gaz *Production d'indole (Tryptophanase)	* ADH * Citrate de simmons (citrate perméase) * H_2S *Dégradation de l'urée (uréase) *TDA *VP *Gélatinase *DNAse	*ODC *Dégradation du saccharose

c) Pathogénicité :

Si ce germe est généralement bienfaisant pour l'organisme, il peut aussi exercer un pouvoir pathogène: il est responsable d'infection urinaires, de suppuration diverses (pulmonaires, digestives, méningées) et de septicémies. Certaines variétés d'*E coli* sont également à l'origine des diarrhées infectieuses du nourrisson **(Lavergne E, 1969).**

Lorsqu' *E. coli* est responsable d'une diarrhée aiguë, on peut le classer selon quatre pathotypes; Entéropathogène (EPEC), Entéroenvahisseur (Entéroinvasifs – EIEC), Entérohémorragiques (EHEC) et Entérotoxinogène (ETEC). Les souches se caractérisent par la capacité de produire une entérotoxine dont l'action sur les entérocytes perturbe les fonctions d'absorption normalement assurées par la muqueuse intestinale. Ces microorganismes peuvent être présents dans certains aliments, comme la viande de boeuf hachée **(Site web 7)**

III.2 Agents antimicrobiens :

III.2.1. Les antibiotiques :

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement

sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques **(Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995)**.

La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments **(Billing et Sherman, 1998)**.

III.2.2. Les extraits végétaux :

Produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, les huiles essentielles sont toujours utilisées comme substances aromatisantes et parfumantes en parfumerie, industries alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire et en aromathérapie **(Baudoux, 2000)**. Différentes études récentes ont confirmé, in vitro, l'activité antimicrobienne de diverses huiles essentielles **(Hili et al, 1997 ; Billing et Sherman, 1998)**.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement fonction de leur composition chimique, en particulier de leurs composés volatils majeurs. En effet, l'activité antimicrobienne remarquable de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est en relation avec sa teneur élevée en thymol (un composé phénolique) qui est réputé avoir une très grande action antimicrobienne (**Ettayebi et al, 2000 ; Ultee et al, 2000 ; Friedman et al, 2002 ; Chun et al, 2005)**.

Les extraits végétaux (Extraits aqueux, huileux, Extraits organiques …) obtenus par différentes méthodes d'extractions ont aussi de remarquable pouvoir antimicrobiens. Leurs polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis- à -vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésives microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire **(Cowan, 1999)**.

III.2.3. Les miels :

Le miel contient des substances antibactériennes auxquelles on a donné le nom global d'inhibine. L'action antibactérienne du miel est certainement à l'origine de quelques unes des propriétés médicinales qui lui sont attribuées.

La propriété antiseptique du miel provient de plusieurs facteurs : sa grande concentration en sucre, son pH, ses antibiotiques, ses composées phénoliques et des autres

composées. Le miel, avec un pH situé entre 3,2 et 4,5, représente un milieu acide. La croissance de plusieurs microorganismes est inhibée par ce bas pH. La concentration en sucre et l'acidité perdent rapidement leur pouvoir de préservation lorsque le miel est dilué. Toutefois, ce dernier conserve, jusqu'à un certain ordre de dilution, ses propriétés antibactériennes.

Ces substances semblent varier en concentration d'un miel à l'autre. Des études scientifiques sur ces substances seront nécessaires pour connaître avec certitude la nature de tous les agents antimicrobiens du miel. L'utilisation du miel comme remède est toutefois limitée aux plaies cutanées et à certains troubles gastriques. Dès que le miel est trop dilué, son pouvoir antiseptique s'affaiblie **(Lavie, 1963).**

III.2.4. Action d'une substance antimicrobienne (Fig III .3):

L'action d'une substance à effet antibactérien sur une souche aboutit à deux états possibles :

* L'arrêt de la multiplication: c'est l'effet bactériostatique. Le plus souvent, il suffit d'obtenir l'effet thérapeutique escompté, les germes restant seront éliminés par les moyens de défense de l'organisme.

* La destruction des bactéries : c'est l'effet bactéricide qui aboutit à la lyse bactérienne. Ces deux effets peuvent être étudiés au laboratoire **(site 5)**.

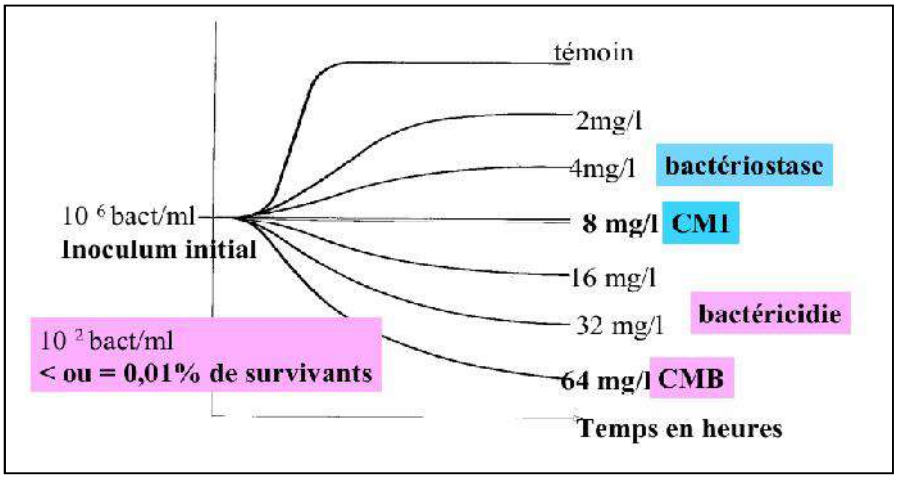


Figure III.3 : Courbe de croissance en présence d'antibiotiques (site 5).

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice: La plus petite concentration d'une substance qui a une activité antibactérienne inhibant toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet **bactériostatique** de la substance.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide : La plus petite concentration d'une substance qui a une activité antibactérienne laissant 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet **bactéricide** de la substance **(Site 4).**

III.2.5. Techniques d'étude de l'effet antimicrobien

III.2.5.1. Méthodes de détermination de la CMI

Deux méthodes différentes sont employées pour la détermination de la CMI:

a) La méthode de dilution en milieu liquide (Guezlane et al, 2008) :

Elle consiste à préparer une série de tubes à hémolyse avec le même volume d' milieu de culture liquide à différentes concentrations de la substance à tester. Exemple : 0,5 mg/l, 1mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16 mg/l avec un tube témoin de croissance de la souche à tester. Enfin on ensemence ces tubes avec le même inoculum. La galerie ainsi préparée sera incubée à 37°C pendant 18 heures. La CMI de l'antibiotique à tester correspond au premier tube dans lequel aucune croissance n'est visible à l'œil nu **(Fig.III.4)**.

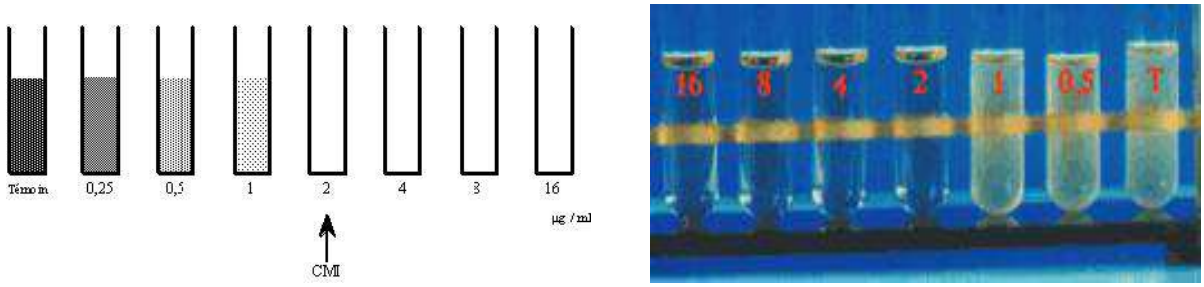


Figure. III.4 : Exemple de détermination de la CMI en milieu liquide. (Guezlane et al, 2008)

b) Détermination de la CMI par dilution en milieu solide (Guezlane et al, 2008) :

La substance antibactérienne est incorporée, à différentes concentrations, dans un milieu gélose coulé dans une série de boites de pétri. Les ensemencements des bactéries sont effectués en stries à la surface de la gélose. La concentration minimale inhibitrice est la première concentration inhibant complètement la croissance.

c) Technique de diffusion en gélose (Guezlane et al, 2008):

Les techniques de dilution constituent d'excellentes méthodes de mesure des effets bactériostatiques, mais en pratique de routine leur exécution est complexe, pour cela on utilise plus couramment une méthode plus rapide qui est la méthode de diffusion en gélose : méthode facile et aussi la plus répandue. En routine ce test est appelé antibiogramme.

La méthode consiste à déposer à la surface de la gélose coulée dans une boite de pétri, et ensemencée avec le germe à étudier, des disques de papier buvard préalablement imprégnés de la substance antibactérienne et séchés. Ces disques sont chargés d'une quantité déterminée de la substance à tester . Chaque substance diffuse au sein de la gélose à partir du disque et y détermine des gradients de concentration inversement

proportionnelles à la distance du disque. Après 24 heures d'incubation, les boites sont examinées. Les disques sont entourés d'une zone d'inhibition dont le diamètre permet de mesurer la C M I. La culture s'arrête là où existe une concentration de substance égale à la CM I **(Fig. III.5)**.

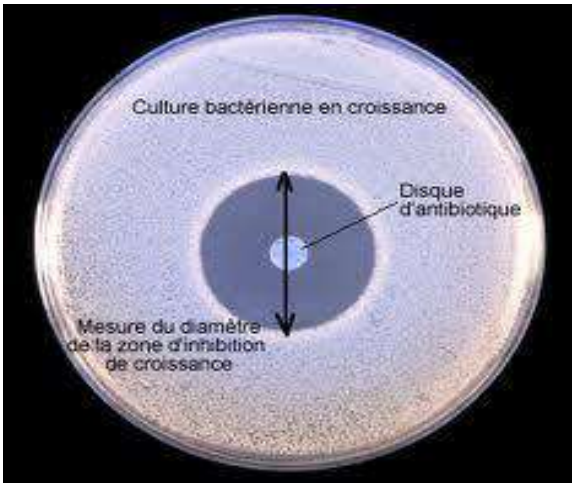


Figure III.5 : Méthode de diffusion en milieu solide (Guezlane et al, 2008)

III.2.5.2.Méthode de Détermination de la concentration minimale bactéricide (C.M.B)

La CMB est déterminée selon le protocole suivant :

- dilution de la substance à étudier en milieu liquide de « Mueller-Hinton » (selon le protocole de détermination de la CMI par dilution en milieu liquide) ;
- Après 24 h :
  - lecture de la CMI;
  - dénombrement bactérien dans l'inoculum de départ ;
  - repiquage des tubes sans croissance visible en vu d'un dénombrement;
- Après 24 h : dénombrement bactérien des tubes repiqués et comparaison avec l'inoculum de départ. **(Guezlane et al, 2008)**


Partie expérimentale


Chapitre IV
Matériels et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'hygiène d'eau de la direction de la santé publique (DSP), wilaya de Médéa et du Hall technologique de l'université "Yahia Fares" de Médéa.

IV.1. Matériels:

IV.1.1 Matériels biologiques:

IV.1.1.1. Miels (Fig. IV.1) :

a) Miel de Jujubier (Sedra): Le miel de Jujubier est issu de l'arbre de Jujubier sauvage, de couleur plutôt sombre, d'un goût prononcé et d'une saveur agréable.

b) Miel d'Euphorbe (Lebaïna) : Le miel d'euphorbe en provenance des fleurs de l'Euphorbe cactoïde, d'une couleur plus claire, d'un gout unique épicé. Idéal pour calmer les maux de gorges



Figure IV.1 : Présentation des échantillons de miels étudiés.

IV.1.1.2. Souches bactériennes:

Les souches microbiennes testées ont été fournies par le laboratoire d'hygiène d'eau. Il s'agit d'isolats cliniques responsables d'infections nosocomiales. Ainsi, nous avons retenu les espèces suivantes : *E. coli, Staphylococcus aureus*.

* *E. coli* est une entérobactérie Gram- isolée sur le milieu **Hektoen (Fig. IV.2 ; A)** qui inhibe la croissance des bactéries Gram+. Elle est identifiée par la galerie miniaturisée API 20E.

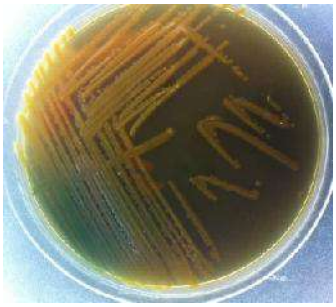
A  **B** 

Figure IV.2: A: *E. coli* isolé sur Hektoen, B: *Staphylococcus aureus* isolé sur Chapman.

* *Staphylococcus aureus* est un cocci Gram+ isolé sur le milieu **Chapman (Fig. IV.2 ; B)**, caractérisé par sa forte teneur en NaCl qui inhibe la croissance des bactéries Gram–. Cette bactérie est identifiée par la galerie classique.

IV.1.1.3. Les plantes: Quatre genres de plantes ont été utilisés: *Thym*, *Laurier, genévrier et romarin.* Ces plantes ont été récoltées fraiches au niveau de la région de Médéa, en avril 2012. L'identification botanique des quatre espèces a été réalisée par Dr……., laboratoire de botanique, département d'agronomie, université *EL-Hadj Lakhdar*, Batna. Il s'agit des espèces suivantes : *Thymus lanceolatus* Desf*; Rosmarinus officinalis;* Juniperus oxycedrus*; Laurus nobilis.*

IV1.2. Matériels non biologiques:

IV.1.2.1 Solutions, Produits et Milieux:

- Solutions étalons de pH(s) connus pour l'étalonnage du pH-mètre,
- Méthanol,
- Ethanol,
- Liqueur de Fehling,
- Solution de sulfate ferrique 0.1 M à 10% (V/V) de H_2SO_4,
- Solution de permanganate de potassium 0.1 M,
- KBr (pour spectroscopie),
- Gélose Chapman pour l'isolement des *Staphylocoques*,
- Gélose Hektoen pour l'isolement des entérobactéries,
- Gélose de conservation en tubes,
- Solution de violet de gentiane,
- Solution de Lugol,
- Solution de Fushine,
- Huile à immersion,
- Huile de paraffine stérile,
- H_2O_2 à 10 V,
- Disques d'oxydase,
- Milieux pour la recherche des décarboxylases (ADH, LDC, ODC),
- Milieu urée indole,
- Perchlorure de fer,
- Réactif de Kovacs,
- Disques d'ONPG,
- Milieu « Citrate de Simmons »,

- Milieu « TSI »,
- Milieu « Mannitol mobilité »,
- Milieu « Clark et Lubs »,
- Rouge de méthyle,
- Solution à 6% d'alphanaphtol dans de l'alcool à 90° (Réactif VP1).
- Solution de NaOH 4N (Réactif VP2).
- Galerie API 20.
- Eau physiologique stérile,
- Eau distillée stérile,
- HCl,
- NaOH,
- Désinfectants (eau de javel, alcool…).

IV.1.2.2. Petits matériel et verrerie:

a) Verrerie : Béchers, Burettes, Eprouvettes, Ballons, Erlenmeyers, Entonnoirs, mortier, verres de montres et spatules, pipettes, Tubes en verre.

b) Matériels microbiologiques: Lames et lamelles, Pipettes pasteurs, Pinces en acier, Anse de platine, Bec bunsen, Micropipettes à volume réglables, Compresses stériles, Boites de pétrie en plastique, Disques en papier filtre stériles, Autres: Papier filtre, Thermomètre, règle, marqueur.

IV.1.2.3Grands matériels:

- Balance analytiques (Type: Sartorius),
- PH-mètres (Types: HANNA instruments),
- Réfractomètre (Type: exacta+optech),
- Chauffe ballon,
- Spectrophotomètre IR (Type: Shimadzu) à transformée de fourier (FTIR),
- Etuve 37°C (Type: Memmert),
- Bains marie (Types: Gel et Jouan),
- Four pasteur (Type: JUMO),
- Agitateur (Type : Heidolph),
- Microscopes optiques (Types: Optech et Leica-cme).

IV.2. Méthodes:

IV.2.1. Identification des souches utilisées:

IV.2.1.1. Principe général (Lavergne E, 1969).

La tâche essentielle du bactériologiste est de reconnaître, d'identifier les microbes qu'il peut rencontrer. Pour y parvenir, il est nécessaire d'obtenir une culture de ces microbes, à partir de laquelle sera effectué, dans un ordre déterminé, un certain nombre de recherches qui précisent les caractères morphologiques de germes, ses caractères tinctoriaux, culturaux, biochimiques, antigéniques, son pouvoir pathogène éventuel. Ce n'est qu'après ce long cheminement qu'un nom pourra être donné à ce germe. L'identification d'une bactérie n'est donc pas obtenue d'emblée par un simple examen microscopique, mais à la suite de tous ces tests, menés d'une façon très systématique. *C'est un principe fondamental*.

L'identification bactérienne ne doit être envisagée qu'à partir d'une souche dûment isolée et purifiée. Rien ne peut être entrepris sur un mélange de bactéries. *C'est le second principe* sur lequel repose l'identification. On peut donc utiliser des milieux sélectifs pour séparer la bactérie à identifier. Ces deux étapes préliminaires indispensables (mise en culture et séparation) étant réalisés, il est alors possible d'entreprendre l'identification de la bactérie. L'étude des caractères morphologiques du germe permet de savoir s'il appartient au groupe des cocci, des bacilles ou des bactéries spiralées, de connaître également s'il possède ou non une spore, une capsule, des granulations, des cils (et de préciser leur implantation à la surface de la cellule), en bref d'établir une fiche signalétique de son aspect extérieur. La recherche de ses affinités tinctoriales, c'est-à-dire de la façon dont il prend ou non certains colorants (Gram,…) complète cette enquête.

Les propriétés culturales vont renseigner sur le mode de vie de la bactérie:

- La température de développement optimum;
- La croissance en aérobiose ou anaérobiose;
- La rapidité plus ou moins grande de reproductions;
- L'aspect de la culture en liquide (culture trouble, homogène ou granuleuse), ou en milieu solide (grosseur, forme, aspect, pigmentation des colonies).

Enfin, l'étude des propriétés biochimiques permet de connaître l'équipement enzymatique du germe.

En général, à la suite de toutes ces épreuves, il est possible d'attribuer à la bactérie un nom d'espèce: une seule variété de germe possédant à la fois tous les caractères morphologiques, tinctoriaux, culturaux et biochimiques ainsi déterminées.

Cependant, dans certain cas, il existe à l'intérieur d'une même espèce plusieurs variétés différentes, chacune d'entre elles étant distinctes des autres par ses seuls caractères

antigéniques. L'étude de ces antigènes, réalisée à l'aide de sérum de références, permettra alors de porter le diagnostique de type sérologique, c'est-à-dire, au sein de l'espèce envisagée.

Enfin, il peut être intéressant, et même indispensable, de rechercher le pouvoir pathogène de la bactérie vis-à-vis de différents animaux de laboratoire. Que le germe secret une toxine active, ou qu'il agisse par son pouvoir de multiplication dans l'organisme animal, une maladie caractéristique par ses symptômes est engendrée à la suite de l'inoculation.

Sur la base de ce principe, nous avons réalisé pour chaque souche:

- Une étude macroscopique.
- Une étude microscopique.
- Une étude des propriétés biochimiques.

IV.2.1.2. Etude macroscopique (Guezlane et al, 2008): C'est l'étude de l'aspect des colonies microbiennes effectuées sur milieu solide, chaque genre présente un aspect de colonies caractéristiques qui est souvent différent de l'aspect des colonies d'un autre genre.

A partir des boites de Chapman et d'Hektoen ayant servies à l'isolement des souches réactivées nous avons noté des observations concernant l'aspect macroscopique des colonies:

- La forme (rondes, irrégulières, dentelés,…),
- La dimension (le diamètre),
- Le chromo genèse (la couleur),
- L'opacité (opaques, transparentes, translucides),
- L'élévation (bombées, plates, creuses),
- L'aspect de la surface (lisses, rugueuses, muqueuses..),
- L'odeur (si une odeur caractéristique existe).

IV.2.1.3. Etude microscopique (Guezlane et al, 2008) : Comprend deux observations microscopiques :

- Observation à l'état frais.
- Observation après une double coloration.

1]. Observation à l'état frais: Elle permet une observation des bactéries vivantes en absence de toute fixation ou coloration, la détermination de la morphologie sommaire des bactéries et de savoir si elles sont mobiles ou non (parfois voir les spores si elles existent).

Technique:

- Nettoyer une lame.

- Déposer des gouttes d'eau physiologique au centre de la lame.
- A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, prélever une parcelle de la culture et l'étaler dans l'eau physiologique.
- Placer une lamelle.
- Examiner avec tous les objectifs.

2]. Observation après une double coloration : (La coloration de Gram) : Elle permet de déterminer la morphologie des germes, la présence ou l'absence des spores qui apparaissent incolores et réfringentes avec leur position dans la cellule. La coloration Gram a un rôle taxonomique, elle permet aussi de distinguer entre deux types de bactéries :

☒ Bactéries $Gram^-$.

☒ Bactéries $Gram^+$.

Principe :

La différenciation des bactéries : $Gram^+$ et $Gram^-$ se fait selon leur coloration :

☒ **les bactéries $Gram^-$:** se colorent en rose.

☒ **les bactéries $Gram^+$:** se colorent en violet.

Cette coloration est due à la différence de structure pariétale :

☒ **les Bactéries $Gram^-$:** possèdent une paroi mince de structure stratifiée constituée :

1- d'une couche phospholipidique dite membrane externe.

2- d'un lipopolysaccharide (LPS).

3- d'une lipoprotéine assurant la liaison entre la membrane externe et le peptidoglycane et conférant une certaine solidité à l'ensemble.

☒ **les bactéries $Gram^+$:** possèdent une paroi épaisse homogène, l'élément structural de base est le peptidoglycane.

1) Les cellules **$Gram^-$** et **$Gram^+$** absorbent le colorant primaire (Violet de Gentiane), car ce dernier établit une liaison ionique avec les constituants de la membrane cellulaire.
2) L'ajoute le Lugol qui pénètre dans les deux types de cellules et forme un complexe : Violet de Gentiane- Lugol.
3) L'alcool ajouté à la $3^{ème}$ étape définit la différence entre les bactéries **$Gram^-$** et **$Gram^+$** :

   ✱ Dans les cellules **$Gram^-$** l'alcool passe facilement à travers la paroi et dissout le complexe : Violet de Gentiane- Lugol et l'élimine ; la cellule bactérienne devient dans ce cas incolore.

   ✱ Dans les cellules **$Gram^+$** l'alcool pénètre difficilement et la cellule reste colorée en Violet.

4) On ajoute un deuxième colorant « la Fushine » de coloration rose. La Fushine pénètre dans la cellule Gram$^-$ qui était incolore et devient alors rose; les Gram$^+$ reste toujours colorées en violet.

Technique :

- Etaler, sécher puis fixer l'échantillon à examiner sur une lame.
- Recouvrir la préparation avec le Violet de Gentiane; on laisse agir 1 mn 30 s à 2 mn.
- Rejeter le Violet de Gentiane et recouvrir la préparation avec la solution de Lugol ; on laisse agir 45 secondes.
- Rejeter le Lugol, recouvrir à nouveau la préparation avec le Lugol; laisser agir 45 secondes.
- Verser l'alcool 95°sur la préparation; laisser 30s.
- Rincer à l'eau.
- Recolorer avec la Fushine pendant 2 mn.
- Laver à l'eau, sécher.
- Examiner à l'immersion (G : X 100).

***Lecture*:**

- **Gram$^+$** : Violets ; elles gardent leur coloration.
- **Gram$^-$** : Décolorées par l'alcool et teintées par la Fushine et apparaissent colorées en rose.
- **Les spores** : Incolores et réfringentes.

IV.2.1.4. Etude des propriétés biochimique des microorganismes:

L'identification biochimique des deux souches repose sur la révélation de certains aspects particulièrement stables et significatifs du métabolisme des familles, des genres ou des espèces étudiées.

1] Recherche de la Catalase (Marchal, 1982) :

But : Elle a pour but la classification des bactéries selon leur type respiratoire.

Principe: La catalase est une enzyme qui empêche l'accumulation du H_2O_2 dont l'action serait létale pour la cellule bactérienne. Cette enzyme catalyse la réaction suivante :

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2\uparrow$$

L'oxygène libéré se dégage sous forme gazeuse. En générale toutes les bactéries aérobies sont Cat $^+$. Les bactéries anaérobies sont Cat$^-$. La présence du H_2O_2 est due à la réaction suivante:

$$\mathbf{2\ O^- + 2\ H^+ \longrightarrow H_2\ O_2}$$

L'oxygène réduit O^- résulte de l'oxygène moléculaire – l'accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire chez les bactéries aérobies – après avoir reçu 2 électrons.

***Technique* :**

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes.
- Déposer un peu de la culture à étudier prélevée sur milieu solide.

Lecture:

- Bactérie Cat^+ : on observe un dégagement immédiat de bulles gazeuses.

2]. Recherche de l'oxydase (Marchal, 1982) :

But : L'intérêt de ce test est la mise en évidence d'une enzyme de la chaîne respiratoire qui est le cytochrome oxydase.

Principe : le cytochrome oxydase ou phenylène- diamine- oxydase est la dernière enzyme de la chaîne respiratoire, elle agit sur l'oxalate en donnant une semi quinone rouge qui s'oxyde rapidement en donnant une couleur noir ou violette.

Technique :

- Placer un disque d'oxydase sur une lame. (**NB :** ces disques sont des papiers filtres imbibés d'un réactif qui est l'oxalate de N-di (Tétra-méthylparaphénylène – diamine).
- Imbiber le disque avec de l'eau distillée.
- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une parcelle de la culture et la déposer sur le disque.

Lecture:

- La présence de l'oxydase se manifeste par une coloration noire ou violette.
- Pas de coloration $\Rightarrow$ Réaction - $\Rightarrow$ Absence d'oxydase.

3]. Recherche des décarboxylases (Marchal, 1982) :

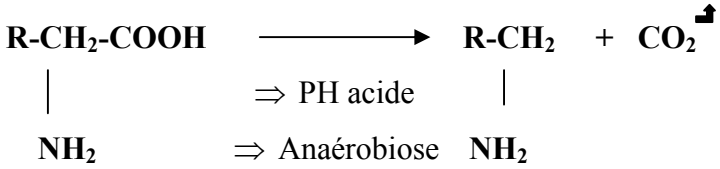
*** <u>ADH</u>: Arginine dihydrolase.**

*** <u>ODC</u>: Ornithine décarboxylase.**

*** <u>LDC</u>: Lysine décarboxylase.**

But : La mise en évidence ou la recherche des décarboxylases spécifiques aux monoacides diaminés.

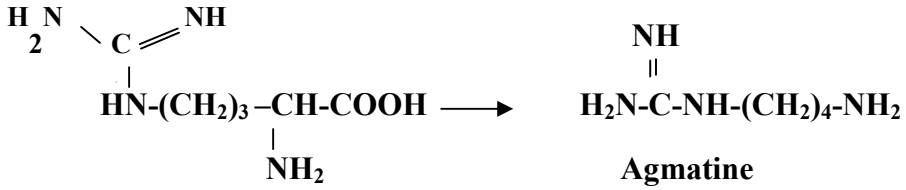
Principe: Certaines bactéries possèdent des enzymes de transformation des aminoacides en formant l'amine correspondante + CO_2. Qui sont libérés selon la formule globale suivante :



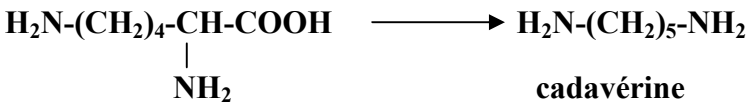
- Pour l'ornithine, la décarboxylation aboutit à la formation de putrescine:



- Pour l'arginine, sa décarboxylation conduit à la formation de l'agmatine:



- Pour la lysine, sa décarboxylation conduit à la formation de la cadavérine :



Les amines formée alcalinise le milieu de culture et amène à un virage de l'indicateur de couleur.

Technique :

- A partir d'une culture en gélose de 18 h à 24 h faire une suspension en eau physiologique.
- Introduire dans chaque tube 5 gouttes de cette suspension :

  Tube –0- : Glucose sans AA.

  Tube –1- : Glucose + Arginine.

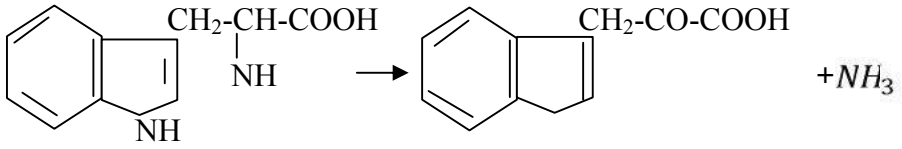
  Tube –2- : Glucose + Ornithine.

  Tube –3- : Glucose + Lysine.
- Recouvrir la surface avec de l'huile de paraffine (ou vaseline) stérile.
- Placer à l'étude à 37°c pendant 18 à 24 h.
- ***Lecture :*** Le tube témoin qui été au départ rose violet devient jaune par acidification du milieu, on déduit que la souche à identifier a fermenté le glucose. Pour les autres tubes contenant les AA :
- si la coloration reste jaune cela veut dire que la souche ne produit pas de décarboxylase donc cette coloration est due seulement à la fermentation du glucose.

- si la coloration devient rose violacée ou rouge, cela veut dire que le pH est devenu alcalin après dégradation de l'AA. Au début, le milieu devient jaune : donc il y a acidification du milieu due à l'attaque du glucose en anaérobiose (créée par l'huile de paraffine) ; le milieu acide est favorable à la production de l'enzyme puis dégradation de l'AA et alcalinisation du milieu qui prend une coloration rose violacée.

4]. Recherche d'une Tryptophane désaminase (Marchal, 1982) :

Principe : Le tryptophane désaminase agit sur le Tryptophane en donnant l'acide indole-pyruvique qui donne avec le perchlorure de fer une coloration brune.



L- Tryptophane Acide Indole-Pyruvique

Technique :

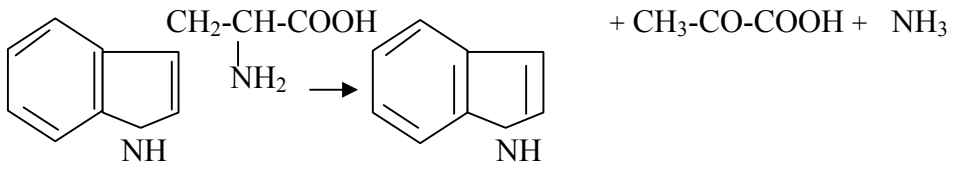
- Ensemencer :
  - -Soit un milieu urée-indole, avec une suspension épaisse de bactéries isolées
  - -Soit un tube d'eau peptonée.
- Incuber : 2h à 24h (maximum) pour le milieu urée-indole. 18h à 24h pour l'eau peptonée.
- Ajouter deux gouttes de perchlorure de fer.

Lecture :

- Bactérie TDA + : coloration brun – rouge avec présence fréquente d'un précipité.
- Bactérie TDA- : coloration jaune orangée

5]. Recherche d'une Tryptophanase (Marchal, 1982) :

Principe : Certaine bactérie dégradent le tryptophane en indole grâce à une Tryptophanase :



Tryptophane Indole

Technique :

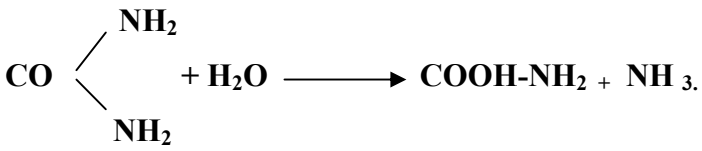
- La culture est effectuée sur des milieux riches en Tryptophane, et exempte d'indole préformé. La production d'indole est inhibée par la présence de glucose et de nitrites d'où l'importance du choix d'un milieu d'étude ne contenant ni de glucose, ni de nitrates, exemple: «milieu urée-indole"; c'est le milieu que nous avons utilisé.
- Ajouter quelques gouttes de réactif de Kovacs, après 24h, à une suspension dense en « milieu urée-indole » ou à une culture en eau peptonée.
- Agiter, laisser le réactif remonter en surface.

Lecture : Elle est immédiate:

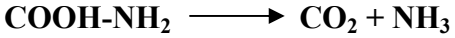
- Réaction indole positive : anneau en surface rouge vermillon.
- Réaction indole négative : anneau brunâtre (teinte du réactif).

6]. Mise en évidence d'une uréase (Marchal, 1982) :

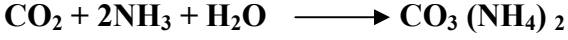
Principe: Toutes les bactéries hydrolysent l'urée:



Seule, une uréase très active aboutit finalement à la réaction :



Le CO_2 et le NH_3 se combinent donnant du carbonate d'ammonium :



Le carbonate d'ammonium formé alcalinise les milieux. La recherche d'une uréase consiste donc à constater l'alcalinisation d'un milieu contenant l'urée. Dans un milieu tamponné, seules les bactéries à uréase suffisamment active qui donnent une réaction positive.

Technique :

- Réaliser à partir d'une culture sur gélose nutritive, une suspension aussi dense que possible des bactéries à étudier dans 0.5ml de milieu urée-indole.
- Incuber à l'étuve ou de préférence au bain-marie à 37°C.

Lecture : Il est important de noter la rapidité du virage de la couleur (parfois immédiat) qui présente un intérêt diagnostique.

- Résultat uréase + : virage de la couleur de l'indicateur coloré du jaune orangé au rouge violacé ou au rose rouge.
- Résultat uréase - : pas de changement de la coloration ou virage au jaune citrin.

7]. Recherche de l'ONPG hydrolase (βGalactosidase) (Marchal, 1982) :

But : Le but de ce test est d'étudier l'existence d'une Galactosida/se chez la bactérie, donc la possibilité de fermenter le lactose.

Principe : Certaines bactéries possèdent une enzyme intracellulaire (E) capable de scinder la molécule de lactose en glucose plus galactose (exemple : La β Galactosidase). Le test ONPG (**O**rtho-**N**itro**p**hényl- β-D **G**alactopyranoside) est une méthode simple et rapide qui permet de rechercher directement l'enzyme (E) et par suite de distinguer les bactéries potentiellement Lactose (+) des bactéries Lactose (-). Son principe repose sur le faite que comme le lactose, l'ONPG, un composé incolore, est scindé par l'enzyme E en libérant de l'**O**rtho**n**itro**p**hénol, composé jaune.

Technique :

- Dans un volume allant de 0.5 à 2 ml d'eau distillée stérile, ensemencer un inoculum dense ; agiter puis déposer grâce à une pince stérile un disque d'ONPG.
- Incuber à 37°C de 30 mn à 24 h.

***Lecture* :**

Réaction + : coloration jaune citron.

Réaction - : incolore.

8]. L'assimilation du citrate comme seule source de carbone (Marchale, 1982):

Principe : Le milieu citrate de simmons ne se compose que d'une seule source de carbone qui est : le citrate de sodium, seules les bactéries capables d'utiliser l'ion citrate comme seule source de carbone peut s'y développer, cette croissance s'accompagne d'une alcalinisation du milieu, ce qui entraîne un changement de la teinte du milieu du vert au bleu vert.

Technique :

- Ensemencer le milieu citrate de simmons en surface par des stries longitudinales à partir de colonies isolées en milieu solide.
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18h à 24h.

Lecture:

- Citrate + : Culture abondante ; si la culture s'accompagne d'une alcalinisation du milieu, l'indicateur coloré vire au bleu vert.
- Citrate - : pas de culture, pas de virage du milieu.

9]. Etude du pouvoir glucidolytique: L'assimilation du Glucose, Saccharose et Lactose (Marchal, 1982) :

Principe : Le TSI est un milieu tris-glucidique qui permet de confirmer la fermentation du glucose (avec ou sans production de gaz) et d'étudier l'attaque du lactose et le saccharose. Le rouge de Phénol est un indicateur coloré dont la couleur change avec l'acidification du milieu lors de l'attaque des sucres constitutifs du milieu. Dans le culot (en anaérobiose relative), le glucose est toujours attaqué par voie fermentaire avec ou sans production de gaz. Sur la pente (en aérobiose), le glucose est attaquée surtout par voie oxydative. Vue que sa quantité est faible (1g/l), l'acidification de la pente est donc faible. Seule une souche lactose et/ou saccharose positive qui peut acidifier le pH de la pente suite à l'attaque de ces sucres qui se trouvent en quantités plus importantes (10g/l). Par ailleurs, la réduction du thiosulfate en anaérobiose se traduit par la formation du sulfure de fer (FeS) (de couleur noir) en présence du citrate ferrique.

Technique : Ensemencer la surface abondamment, puis le culot par piqûre. Ne pas visser le tube hermétiquement.

Lecture :

- Culture Glucose- positive (fermente le glucose): Culot jaune.
- Culture Glucose- négative (ne fermente pas le glucose): culot rouge.
- Culture Lactose et /ou Saccharose-positive (dégrade le lactose et /ou saccharose): pente jaune.
- Culture Lactose et Saccharose-négative: (ne dégrade pas le Lactose et le Saccharose): pente rouge.
- Culture H_2S –positive: noircissement du milieu dans la zone joignant la pente et le culot. Dans le cas de dégagement très abondant, toute la partie inférieure du tube peut être noircie.
- Culture gaz –positive: bulle dans la masse du milieu ou contre les parois ou poche gazeuse décollant le culot, repoussant même la totalité du milieu vers le haut du tube.

10]. Assimilation des autres glucides (Xylose, Mannose, Arabinose, Maltose…)(Marchal, 1982) :

Elle se base sur le même principe qui est le virage de l'indicateur coloré après la dégradation du sucre testé utilisé comme seule source de carbone et d'énergie.

11]. L'assimilation du mannitol (un alcool) (Marchal, 1982) :

Même principe que celui de l'assimilation des sucres : Le mannitol est utilisé dans le milieu Mannitol- mobilité comme seule source de carbone et d'énergie avec le rouge de phénol comme indicateur coloré. Le virage de la couleur indique que le sucre est attaqué :

- soit par voie fermentaire, si le virage se situe au fond du tube ;
- soit par voie oxydative, si le virage se situe juste au dessous de la surface.

Ce milieu indique aussi la mobilité par évaluation de la diffusion des colonies dans ce milieu semis- solide.

12]. Les Types fermentaire : exemple test RM ou VP (Marchale, 1982) :

But : Le but de ces deux test est de rechercher la voie emprunté lors de la fermentation du glucose qui peut être soit la voie des acides mixte (qui se caractérise par la production de plusieurs acides différents : acide acétique, acide pyruvique, acide lactique, acide formique…) ou la voie du 2.3 butanediol dont le produit final est l'acétoïne.

Principes : Pour la voie des acides mixtes, la production des acides acidifie le milieu, cette acidification est révélée par le rouge de méthyle. La zone de virage de cet indicateur est basse: virage au rouge à un pH inférieur ou égal à 5, au jaune à un pH supérieur ou égale à 5.8. Le pH dans le cas de la fermentation acide mixte est très faible et se situe dans la zone ou le rouge de méthyle est rouge. Pour la voie du 2.3 butanediol, cette méthode est beaucoup plus spécifique. L'acétylméthylcarbinol (AMC, ou acétoïne) donne une coloration rouge en milieu très oxygénée en présence d'une base forte (oxydation en diacétyl):

$$CH_3\text{-}CHOH\text{-}CO\text{-}CH_3 \longrightarrow CH_3\text{-}CO\text{-}CO\text{-}CH_3$$

Techniques :

- Ensemencer 5 ml du milieu Clark et Lubs avec le germe à étudier.
- Incuber à 37°c 24h à 48h.

Lecture :

Pour le test RM :

- Prélever 2 ml du milieu et les transvaser dans un autre tube.
- Y verser 1 à 2 gouttes d'une solution de rouge de méthyle :
  - ☒ Réaction RM+ : teinte rouge.
  - ☒ Réaction RM- : teinte jaune.

Pour le test VP (test de Voges–Proskauer):

- 1ml de milieu est additionné de 0.5ml d'une solution à 6% d'alpha- naphtol dans de l'alcool à 90° et de 0.5ml d'une solution aqueuse de la soude 4N (Réactifs: VP1+VP2).
- Agiter, puis laisser 15mn:
  ☒ Réaction VP+ : coloration rouge (oxydation en diacetyl).
  ☒ Réaction VP- : coloration des réactifs + le milieu.

13]. Systèmes d'identification des Enterobacteriaceae (API 20) (Site 9) :

Principe : La galerie API 20 comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de la lecture **(Annexe 1)**.

Inoculation de la galerie :

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette :

  -Pour les tests CIT, VP et GEL, remplir le tube et la cupule.

  -Pour les autres tubes, remplir uniquement les tubes.

  -Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H_2S, UREE, créer une anaérobiose en remplissant leur cupule par de l'huile de paraffine.
- Incuber à 37°C pendant 18-24 heures.

Lecture de la galerie: Après incubation, la lecture de la galerie se fait en se référant au tableau de lecture **(Annexe 2).**

- Noter toutes les réactions spontanées et révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs:

  -Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une coloration marron-rougeâtre indique une réaction positive.

  -Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une coloration rose ou rouge indique une réaction positive.

  -Test VP: ajouter 1 goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre 15 min. Une coloration rose ou rouge indique une réaction positive.

IV2.2. Etude du miel:

IV.2.2.1. Caractérisation physicochimiques:

a) La densité : La densité d'un liquide est le rapport de sa masse volumique à la masse volumique de l'eau.

$$\mathbf{d}_{miel} = \rho_{miel} / \rho_{eau} \text{ ..... (1)}$$

Ou :

- d: la densité.
- ρ_{miel} : la masse volumique du miel en g/cm^3 : $\rho_{miel} = m_{miel} / V_{miel}$ **.....(2)**
- ρ_{eau} : la masse volumique de l'eau en g/cm^3 : $\rho_{eau} = m_{eau} / V_{eau}$**.....(3)**
- m: la masse en g.
- V: le volume en cm^3.

Technique: 5 ml de miel (à 40°C) est pesé à l'aide d'une balance analytique, la masse volumique et la densité sont ensuite calculées.

b) Le pH (Fig. IV.3): Le pH (ou potentiel hydrogène) est défini comme le cologarithme de la concentration en ions H^+ dans une solution. Pour le miel, c'est un indice de la « réactivité acide » du produit. Le miel est mis en solution à 10 % dans l'eau distillée. Il suffit de plonger la pointe de l'électrode dans le liquide, la valeur du pH s'affiche au potentiomètre au centième d'unité. Le pH-mètre doit être étalonné avant son utilisation à l'aide des solutions tampons (de 7 et 4 par exemple).



Figure IV.3: Le pH-mètre utilisé

c) Mesure de la teneur en eau: La mesure de la teneur en eau se fait au moyen d'un refractomètre **(Fig. IV.4)**. Le miel à analyser doit être parfaitement liquide. La goutte de miel est déposée puis répartie en couche mince sur la platine du prisme d'un réfractomètre (nettoyé par du méthanol ou de l'éthanol et séché). La lecture est faite à travers l'oculaire au niveau de la ligne horizontale de partage entre une zone claire et une zone obscure. Cette ligne coupe une échelle verticale graduée directement en indice de réfraction dans le miel. La température du prisme est notée. En se rapportant au tableau de **Chataway, 1982 (Annexe 3)**, nous obtenons le pourcentage d'eau correspondant à l'indice de réfraction à 20°c.



Figure IV.4: Refractomètre.

d) Dosage des sucres réducteurs par la méthode de Bertrand (Site 8): En milieu alcalin et à chaud, les oses et les osides réducteurs ont la propriété de réduire la liqueur de Fehling contenant l'ion cuivrique (Cu^{2+}) à l'état d'oxyde cuivreux Cu_2O (Cu^{+}) dont la quantité est proportionnelle à la quantité des sucres réducteurs selon l'équation générale:

$$RCHO + 2CuO + HOK \rightarrow RCOOK + Cu_2O + H_2O \quad \text{..... (4)}$$

Précipité rouge brique

La quantité des sucres réducteurs est déterminée par la quantité de Cu_2O formée. L'oxyde cuivreux est traité par du sulfate ferrique ($Fe_2(SO_4)_3$) qui est réduit à l'état de sulfate ferreux ($FeSO_4$) d'après la réaction:

$$Cu_2O + Fe_2(SO_4)_3 + H_2SO_4 \rightarrow 2CuSO_4 + 2FeSO_4 + H_2O \quad \text{..... (5)}$$

Le sulfate ferreux, qui est proportionnel à la quantité de Cu_2O, est dosé par une solution de permanganate de potassium ($KMnO_4$) selon l'équation suivante:

$$2KMnO_4 + 10FeSO_4 + 8H_2SO_4 \rightarrow K_2SO_4 + 2MnSO_4 + 5Fe_2(SO_4)_3 + 8H_2O \text{...(6)}$$

Afin de calculer la masse du cuivre isolé; on utilise la procédure suivante:

D'après l'équation (4) : $n_{FeSO_4} = 5 * n_{KMnO_4}$

D'après l'équation (3) : $n_{Cu_2O} = (1/2) * n_{FeSO_4}$

D'après l'équation (2) : $n_{RCHO} = n_{Cu_2O}$

Donc: $n_{RCHO} = (1/2) * 5 * n_{KMnO_4} = (1/2) * 5 * C_{KMnO_4} * V_{KMnO_4}$ (n=C*V).

Mode opératoire:

1].Réduction de la liqueur de Fehling:

- Peser une masse de miel à l'aide d'une balance analytique.

- Pour chaque type de miel mettre dans un ballon:
  * 80 ml de la liqueur de Fehling.
  * L'échantillon de miel pesé.
  * 20ml d'eau distillée.
- Agiter le mélange jusqu'à la dissolution totale du miel.
- Dans un chauffe-ballon, porter le mélange à l'ébullition pendant exactement trois minutes.

2].Isolement du cuivre formé:

- Refroidir, transvaser le mélange dans un erlenmeyer et laisser décanter le précipité.
- Enlever le surnageant en entraînant le moins possible le précipité.
- Faire des lavages du précipité à l'eau distillée bouillante jusqu'à ce que le surnageant bleu devient clair. Le précipité ne doit pas être en contact avec l'air (risque du réoxydation de Cu_2O).
- Filtrer afin d'obtenir tout le précipité sur le papier filtre.

3].Dosage du cuivre:

- Dissoudre le précipité dans 85 ml de solution de sulfate ferrique acide 0.1M.
- Titrer avec une solution de permanganate de potassium 0.1M jusqu'à l'obtention d'une coloration rose pâle stable 10 à 20 secondes et noter le volume de $KMnO_4$ correspondant.

e) Etablissement des spectres infrarouge: Les spectres IR sont largement utilisés pour identifier certains caractères structuraux dans les molécules. En effet, certains groupes d'atomes ont des fréquences (en réalité, il s'agit du nombre d'onde $\bar{\nu}$) bien caractérisées qui apparaissent toujours dans la même région du spectre. La fréquence ou la longueur d'onde d'adsorption dépend des masses relatives des atomes, de la constante de force des liaisons ainsi que de la géométrie des atomes. C'est cette absorption caractéristique qui permet de caractériser la substance étudiée (inconnue) en utilisant les règles de sélection. L'étude comparative du spectre de la substance étudiée et ceux bien connus permet ainsi de tirer la conclusion concernant la structure de la molécule. **(Silversteinet al, 2004).**

Mode opératoire:

Mettre 0,5 à 1,5 mg du miel avec 100 mg de KBr dans un mortier. Le mélange est broyé très finement. Remplir le moule de poudre, placer le piston et le tourner quelquefois pour que la poudre soit bien répartie

Avant le pressage, évacuer le moule sous vide (élimination des bulles d'air) puis presser à haute pression. Arrêter le vide, aérer le moule, lâcher la pression et sortir la pastille et la mettre sur le dispositif de fixation prévu à cet effet.

Placer la pastille dans le spectrophotomètre (IR) et établir le spectre entre 4000 et 400cm^{-1}.

IV.2.2.2. Etudes de l'activité antibactérienne du miel:

Dans cette partie, nous avons ciblé:

- La détermination de la CMI pour chaque type de miel contre chaque souche bactérienne en utilisant la méthode de diffusion sur gélose,
- Etude de l'influence de la température sur l'activité antibactérienne du miel d'Euphorbe et de Jujubier contre S*taphylococcus aureus*.
- Etude de l'influence du pH sur l'activité antibactérienne de chacun des deux types de miel précédents contre la même bactérie.

a) Détermination de la CMI:

1]. Préparation des dilutions des miels: Pour entamer l'étude de l'effet antimicrobien du miel, nous avons préparé plusieurs dilutions pour chaque variété de miel. Les dilutions sont 75% (3/4), 50% (1/2), 33.33% (1/3), 25 (1/4) et 16.67%(1/6).



Figure IV.5 : Les différentes dilutions du miel.

2]. Méthode de diffusion sur gélose: C'est une méthode qualitative permettant de tester l'existence de l'activité antimicrobienne, qui se traduit par la formation d'une zone d'inhibition autour du disque contenant la substance à tester.

Mode opératoire:

- Préparation de la suspension: prélever à l'aide d'une pipette pasteur une colonie pure et bien isolée et la décharger dans un tube contenant 3 ml d'eau physiologique stérile.
- Ensemencement des boites: ensemencer une boite de Pétri stérile coulée précédemment par le milieu Muller-Hinton en utilisant un écouvillon trompé dans la suspension de la souche à tester, de façon à couvrir toute la surface **(Fig. IV.6)**.

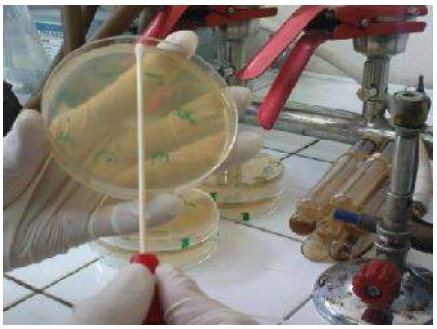


Figure IV.6 : Ensemencement du milieu Muller-Hinton par la souche à tester.

- Application des disques: à l'aide d'une pince stérile, placer cinq disques en papier de 9 mm de diamètre sur chaque milieu précédemment ensemencé en nappe.

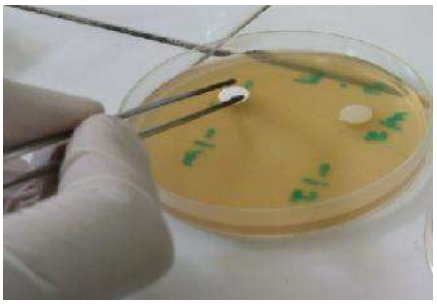


Figure IV.7: Application des disques

- Dépôt du miel dilué: à l'aide d'une micropipette munie d'un embout stérile, déposer 50µl d'une dilution du miel sur un disque **(Fig. IV.7)**. Chaque disque porte une dilution.

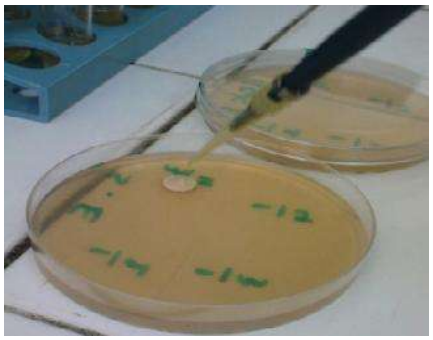


Figure IV.8 : Dépôt du miel dilué

- Incubation : les boites sont incubées 18 à 24 heures à 37C°.
- Lecture: elle consiste à mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition en millimètre à l'aide d'une règle à l'extérieure de la boite.

b) Etude de l'influence de la température:

Technique:

- Pour chaque type de miel, remplir 5 tubes à essai par 3ml du miel.
- Chaque tube à essai est utilisé pour un seul traitement à une température donnée : 40°C; 55°C; 70°C; 85°C et 95°C.
- A chaque température donnée, régler le bain marie et attendre sa stabilisation, ensuite y mettre le tube correspondant à cette température de façon que le niveau d'eau soit supérieur au niveau du miel - pendant 15 minutes.
- Ajouter à chaque tube 1 ml d'eau distillée stérile et bien homogénéiser les dilutions obtenues (75%).
- Réaliser un ensemencement en nappe de la souche de *Staphylococcus aureus* sur le milieu Muller-Hinton.
- Placer cinq disques de papier et déposer sur chacun d'eux 50 µl d'un seul miel dilué à 75% et traité à une température donnée.
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18h à 24h.
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

c) Etude de l'influence du pH:

Technique:

- Préparer dans chaque tube à essai une dilution du miel à 75% (v/v) avec de l'eau distillée stérile.
- Mesurer le pH de la dilution en utilisant le pH-mètre.
- Ajuster le pH de chaque dilution à une valeur donnée en utilisant du HCl ou du NaOH dilués de façon à ne pas affecter le volume totale de la dilution.
- Réaliser un ensemencement en nappe de la souche de *Staphylococcus aureus* sur le milieu Muller-Hinton**.**
- Placer les disques de papier sur le milieu ensemencé et déposer sur chacun d'eux 50 µl du miel dilué dont le pH est ajusté à une valeur donnée.
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18h à 24h.
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

Remarque: Les deux types de miels sont testés avec la même suspension bactérienne.

IV.2.3. Effet antibactérienne des plantes :

IV.2.3.1 Préparation des extraits :

Trois méthodes d'extraction simples ont été retenues pour tester l'effet antimicrobien des plantes (Thym, Genévrier, Laurier, Romarin) à fin de sélectionner la meilleure méthode (infusion, décoction et macération).

a)Extraction par infusion:

-Peser 4g de plante.

-Faire bouillir 40ml d'eau distillée.

-Verser l'eau bouillante sur la plante et laisser infuser pendant 10minute.

-Filtrer à l'aide d'un papier filtre, transférez dans un tube en verre et étiqueter.

b) Extraction par décoction:

-Dans un ballon mettez 4g de plante avec 40ml d'eau distillée et laisser bouillir à 100°C dans une chauffe ballon pendant 10 min.

-Filtrer à l'aide d'un papier filtre, transférez dans un tube en verre et étiqueter.

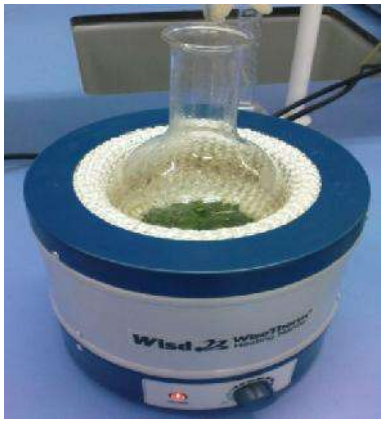


Figure IV. 9: Décoction dans un chauffe-ballon.

c) Macération à chaud :

-Mélanger 4g de plante avec 40ml d'eau dans un erlenmeyer et mettre au bain marie à 100°C.

-Portez l'eau à l'ébullition et laisser macérer 2 heures.

-Filtrer à l'aide d'un papier filtre, transférez dans tube en verre et étiqueter.

IV.2.3.2. Effet antibactérien des extraits: Optimisation de la méthode d'extraction et le genre botanique:

L'étude de l'effet antibactérien résultant des extraits obtenus par les trois méthodes d'extraction des quatre plantes « fraiches » a été réalisée. Dans cette partie, nous visant le

choix de la méthode d'extraction optimale ainsi que le choix du genre donnant un extrait à effet antibactérien le plus élevé.

Mode opératoire :

1] Préparation de la suspension: Prélever à l'aide d'une pipette pasteur une colonie pure et bien isolée et la décharger dans un tube contenant 3 ml d'eau physiologie stérile.

2] Ensemencement des boites: Prendre une boites de Pétri stérile coulée précédemment par le milieu Muller-Hinton et l'ensemencer par un écouvillon trompé dans la suspension de la souche à tester, de façon à couvrir toute la surface.

3] Application des disques : À l'aide d'une pince stérile, placer 4 disques en papier de 9 mm de diamètre sur le milieu précédemment ensemencé en nappe,

4] Dépôt de l'extrait: À l'aide d'une micropipette réglée à 50µl et munie d'un embout stérile, déposer 50µl de chaque extrait de plante sur un disque. Pour cela trois boites de Pétri ont été envisagées, chaque boite correspond à une méthode d'extraction et porte quatre disques correspondant aux extraits des quatre plantes.

5] Incubation : Les boites sont incubées 18 à 24 heures à 37C°.

6] Lecture : La lecture consiste à mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition en millimètre à l'aide d'une règle à l'extérieure de la boite.

IV.2.3.3. Choix de la nature de plante :

Dans cette étape, nous avons ciblé l'optimisation de l'état de la plante choisie précédemment (sèche ou fraiche), et ce en comparant leurs effets antibactériens correspondants en utilisant la méthode d'extraction optimisée dans les mêmes conditions.

a) Mesure de la teneur en eau :

Le taux d'humidité, dans deux échantillons (sec et frais) de la plante sélectionnée a été déterminé. Pour cela, nous avons suivi le procédé de dessiccation à une température de 105°C dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'un poids constant **(Linden et Lorient, 1994)**. Le taux d'humidité est calculé ainsi :

$$T\% = \frac{x-y}{x} * 100 \ldots\ldots\ldots\ldots (7)$$

Ou :

T% : Taux d'humidité exprimé en pourcentage (%)

x : Masse initiale de l'échantillon;

y : Masse finale de l'échantillon après déshydratation;

b) Etude de l'effet antibactérien des échantillons secs et frais:

- Réaliser une extraction par décoction de la plante fraiche et sèche avec la même masse de la matière végétale (2g) (sans tenir compte de la teneure en eau) et avec le même volume d'eau (20ml).
- Réaliser un ensemencement en nappe de *Staphylococcus aureus* sur Muller-Hinton.
- Placer deux disques de papier et déposer sur chacun d'eux 50 µl d'un extrait.
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

IV.2.3.4. Optimisation du rapport Masse/Volume (Fig. IV.10):

Le rapport masse de la matière végétale sur le volume d'eau distillée ayant servis à l'extraction a été optimisé. Pour cela, nous avons préparé par décoction des extraits de la plante sélectionnée à déférentes teneures en matière végétale: 1g/100ml ; 2g/100ml ; 4g/100ml ; 6g/100ml ; 8g/100ml ; 10g/100ml ; 15g/100ml ; 20g/100ml ; 24g/100ml ; 28g/100ml ; 30g/100ml, 36g/100ml.



Figure IV.10 : Les extraits de plantes à différentes teneures en matière végétale.

-Réaliser un ensemencement en nappe de *Staphylococcus aureus* sur Muller-Hinton.

-Placer les disques de papier et déposer sur chacun d'eux 50 µl d'un extrait préparé à une teneure donnée.

-Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24heures.

- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

IV.2.3.5. Influence du pH sur l'effet antibactérien de l'extrait:

Technique:

- Préparer un extrait de plantes par décoction (20g de plante dans 100ml d'eau distillé) (Teneure optimisée précédement). Mesurer le pH résultant en utilisant le pH-mètre.
- Répartir l'extrait en plusieurs échantillons.
- Ajuster le pH de chaque échantillons à valeur donnée par du HCl ou NaOH dilués.
- Réaliser un ensemencement en nappe de *Staphylococcus aureus* sur Muller-Hinton**.**
- Placer les disques en papier sur le milieu ensemencé et déposer sur chacun d'eux 50 µl d'extrait à un pH donné.
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition.

IV.2.3.6.Détermination de CMI de l'extrait.

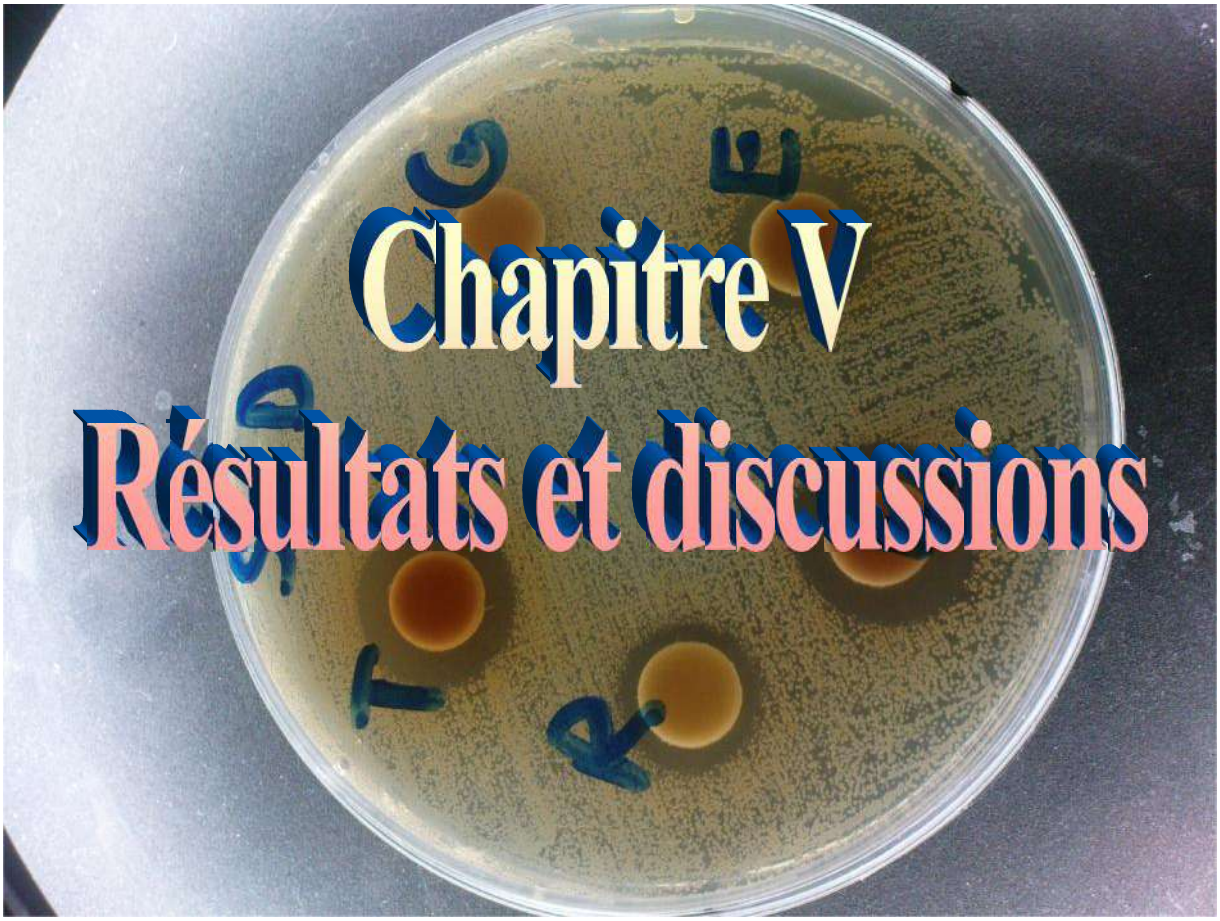
Dans cette partie la concentration minimale inhibitrice de notre extrait optimisé a été estimée. Pour cela, nous avons suivi le protocole suivant :

- Préparer des dilutions de l'extrait: 100%, 75% (3/4), 50% (1/2), 33.33% (1/3), 25% (1/4).
- Réaliser un ensemencement en nappe de *Staphylococcus aureus* sur Muller-Hinton.
- Placer 5 disques en papier et déposer sur chacun d'eux 50 µl d'une dilution donnée.
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24heures.
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibitions.

IV.2.4. Etudes de l'activité antibactérienne d'une association Miel-Extrait de plantes:

Cette partie cible la mise en évidence de l'effet synergique des composants d'une association Miel-Extrait de plante. Pour cela, nous avons préparé plusieurs dilutions des deux miels étudiés dans l'extrait de plante sélectionnée préparé dans les conditions optimisées : 75%(3/4), 66.6%(2/3), 50%(1/2), 33.33%(1/3), 25 (1/4).

- Réaliser un ensemencement en nappe de *Staphylococcus aureus* sur Muller-Hinton.
- Placer 5 disques en papier et déposer sur chacun d'eux 50 µl d'une dilution donnée.
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24heures.
- Mesurer les diamètres des zones d'inhibitions.



Chapitre V

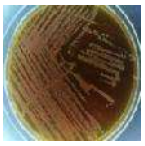
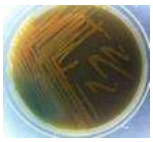
Résultats et discussions

V.1. Identification des souches bactériennes:

V.1.1. Etude macroscopique:

Les observations qui concernent l'aspect des colonies sur leurs milieux sélectifs sont représentées sur le **Tableau V.1**.

Tableau V.1: Caractères macroscopiques des bactéries isolées sur leurs milieux sélectifs.

	Forme	**Dimension (mm)**	**Chromo-genèse**	**Opacité**	**Elévation**	**Aspect de la surface**
S aureus  sur Chapman	Circulaire à bord régulier	Punctiforme	dorée	Opaque	Bombée	Lisse
E coli  sur Hektoen	Circulaire à bord régulier	2 à 3 mm	Jaune orangée	Opaque	Bombée	Lisse

V.1.2. Etude microscopique:

V.1.2.1. Observation à l'état frais:

***E coli*:** Bacilles aux extrémités arrondies (coccobacilles), regroupés deux par deux (diplo-bacilles) et parfois en amas. Mobilité +.

***S aureus*:** Cocci, ils apparaissent le plus souvent en amas dit « grappes de raisin », immobile.

V.1.2.2. Observation après une double coloration (Coloration de Gram):

* ***E coli*** : coloration rose ⇒ Gram négatif.

* ***S aureus*** : coloration violette ⇒ Gram positif.

Le gram nous confirme une fois de plus les autres critères microscopiques ainsi que l'absence des spores. Il s'agit donc de souches asporulées.

V.1.3. Identification biochimiques:

V.1.3.1. *E. coli :*

Les résultats obtenus pour l'identification biochimique d'*E. coli* par la galerie moderne API 20E sont représentés sur le **Tableau V.2** et la **Figure V.1**.

Tableau V.2: Résultats de l'identification biochimique d'*E. coli* par API 20

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	-	+	-	+	-	-	-	-	+



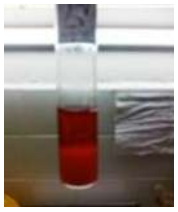
Figure V.1: Résultats de l'API 20E d'*E. coli*

V.1.3.2 *S. aureus :*

Les résultats obtenus pour la galerie classique sont représentés sur le **Tableau V.3.**

En comparant nos résultats avec les données théoriques sur ces espèces bactériennes **(Annexe 2, 4)**, nous pouvons dire que l'ensemble des caractères biochimiques convergent vers les espèces: ***Staphylococcus aureus*** et ***Escherichia coli.*** L'identification des souches fournies est donc confirmée.

Tableau V.3: Résultats de l'identification biochimique de *S. aureus*.

Tests	Résultats	Tests	Résultats
Catalase	Présence de bulles gazeuses : Cat+	**TDA** 	Milieu rouge brun avec précipité : TDA +
Oxydase	Pas de coloration noir: Oxy-	**IND** 	Formation d'un anneau rouge : Indole +
ONPG 	Milieu transparent: ONPG -	**TSI** 	Glu+ (culot jaune) Lac et/ou Sac + (pente jaune) Gaz- (Pas de poches de gaz) H2S – (pas de noircissement du milieu).
ADH / LCD/ODC 	Milieu jaune: Décarboxylase -	**Assimilation du mannitol** 	Milieu jaune : Mannitol+
CIT 	Milieu Vert sans croissance CIT-	**VP** 	Coloration du milieu + réactifs :VP-
UREE 	Milieu rouge violacé : +	**RM** 	Teinte jaune :RM--

V.2. Etude du miel:

V.2.1. Analyses physico-chimiques:

V.2.1.1. La densité:

Le **Tableau V.4** résume les différentes données expérimentales qui ont permis de calculer la densité des deux types de miel. Nous remarquons ainsi que la densité des échantillons de miel analysés est de 1.42.

Tableau V.4: Valeurs de la densité des échantillons de miel.

Echantillon	m(g)	v (ml)	ρ (g/ml)	d
Eau distillée	**4.77**	**5**	**0.95**	**1**
Miel de Jujubier	**6.76**	**5**	**1.35**	**1.42**
Miel d'Euphorbe	**6.73**	**5**	**1.35**	**1.42**

D'après **Henni, 1997** la densité des miels algériens varie entre 1,4221 et 1,4328. **Louveaux, 1985** indique que les variations de la densité des miels proviennent surtout des variations de la teneur en eau. Plus un miel est riche en eau, moins il est dense.

V.2.1.2. Le pH :

Les résultats issus de cette analyse nous donnent une indication sur la réaction acide des miels analysés. Les valeurs du pH sont présentées sur le **Tableau V.5**.

Tableau V.5 : pH des miels.

Miel	pH	T (°C)
Miel de Jujubier	6	26
Miel d'Euphorbe	4.2	30

Comme le montre le **Tableau V.5,** le pH de nos miels est inclue dans la norme décrite par (**Bogdanov et al, 2004**). Sa valeur varie en général entre 3,5 et 5,5; elle est due à la présence des acides organiques. D'autre part, on note que les deux variétés de miel ont un pH acide et que le miel d'Euphorbe est le plus acide (pH=4.2).

Le pH acide de miel est un facteur antibactérien pour les bactéries qui ne tolèrent pas des pH acides, donc le miel d'Euphorbe pourrait avoir une activité antibactérienne plus prononcée que celle du miel de Jujubier.

Selon **Schweitzer, 2005** les miels de nectar, très acides, ont un pH compris entre 3,5 et 4,5. Les miels de miellats, moins acides, ont un pH supérieur à 4,5. Nous pouvons donc se prononcer sur l'origine des miels utilisés : le miel d'Euphorbe (pH=4.2) pourrait être issu du nectar et le miel de Jujubier (p=6) issu du miellat.

V.2.1.3. La teneur en eau

L'indice de réfraction et la teneur en eau (selon la table de Chataway, **Annexe 3**) des deux échantillons sont répertoriés dans le **Tableau V.6**:

Tableau V.6: Pourcentages d'eau dans les deux types de miels

Miel	Indice de réfraction	Pourcentage d'eau
Miel de Jujubier	**1.5020**	**13.8**
Miel d'Euphorbe	**1.5025**	**13.6**

Les deux types de miel présentent des teneurs en eau très proches, ceci concorde bien avec leurs densités identiques. A partir du **Tableau V.6**, nous déduisons que les résultats sont en accord avec les normes décrites par **Jean-Prost, 1987** pour l'indice de réfraction (1.47 à 1.50). En effet, l'indice de réfraction du miel est d'autant plus élevé que sa teneur en eau est plus basse **(Gonnet, 1982)**. De plus, l'indice de réfraction nous renseigne sur la composition chimique du miel, plus l'indice de réfraction est fort, plus le miel est riche en matières sèches **(Jean-Prost, 1987).**

D'après le **CETAM, 2002** cité par **AMRAOUI** et **DROUI, 2005**, l'humidité est un paramètre de qualité, car la teneur en eau conditionne l'avenir du miel: cristallisation et fermentation. Le risque de fermentation est d'autant plus élevé que la teneur en eau est grande.

V.2.1.4. Dosage des sucres réducteurs:

Il faut noter que les sucres réducteurs représentent la catégorie la plus dominante dans la composition des hydrates de carbones du miel. Leurs dosages nous donnent une appréciation de l'osmolarité des différents miels. Les résultats du dosage des sucres réducteurs sont indiqués sur le **Tableau V.7**.

Tableau V.7: Quantité des sucres réducteurs dans les miels.

Miel	V_{KMnO_4} (ml)	n_{RCHO} (mol)/g de miel
Euphorbe	**14.6**	**7.3***
Jujubier	**11.2**	**5.6***

Selon ces résultats, le miel d'Euphorbe est le plus concentré en sucres réducteurs que le miel de Jujubier. En général, lorsque la teneur en sucres augmente la pression osmotique augmente ce qui provoque une diminution de la croissance bactérienne. Au-delà d'une certaine concentration de sucre la croissance est bloquée sauf pour les microorganismes osmophiles.

V.2.1.5. Spectrophotométrie IR:

Les résultats obtenus sont représentés sur les **Figures V.2** et **V.3**. Afin de faciliter l'interprétation des spectres, nous avons résumé les données tirées sur le **Tableau V.8**.

Les deux types de miel présentent des bandes caractéristiques des composés arômatiques (C-H aromatique et C=C arômatique). L'appartenance de ces composés est donc très probable. Un nombre très important de composés organiques arômatiques doués d'activité antibactérienne a été identifié dans des extraits de miel. Parmi ces composés nous pouvons citer:

- L'acide syringique (l'acide 3,5 dimethoxy4- hydroxy benzoïque**) (Russel et Molan**, **1988**),
- L'acide méthyle syringique (methyl 3,5 diméthoxy4-hydroxybenzoate) **(Russel et Molan**, **1988**)
- Des flavonoïdes et des acides phénoliques (pinocembrin, pinobanksin) **[Bogdanov, 1989**, **Weston, 2000).**
- Acide caféique et acide ferulique **(Wanden, 1998)**, acide vanillique, cinnamique et acide benzoïque) **[Weston, 2000, Weston, 1999)**.

Les absorbances enregistrées pour les deux types de miels sont très proches pour toutes les bandes observées. Ce ci ne nous permet pas de juger quand à la richesse d'un type par rapport à autre.

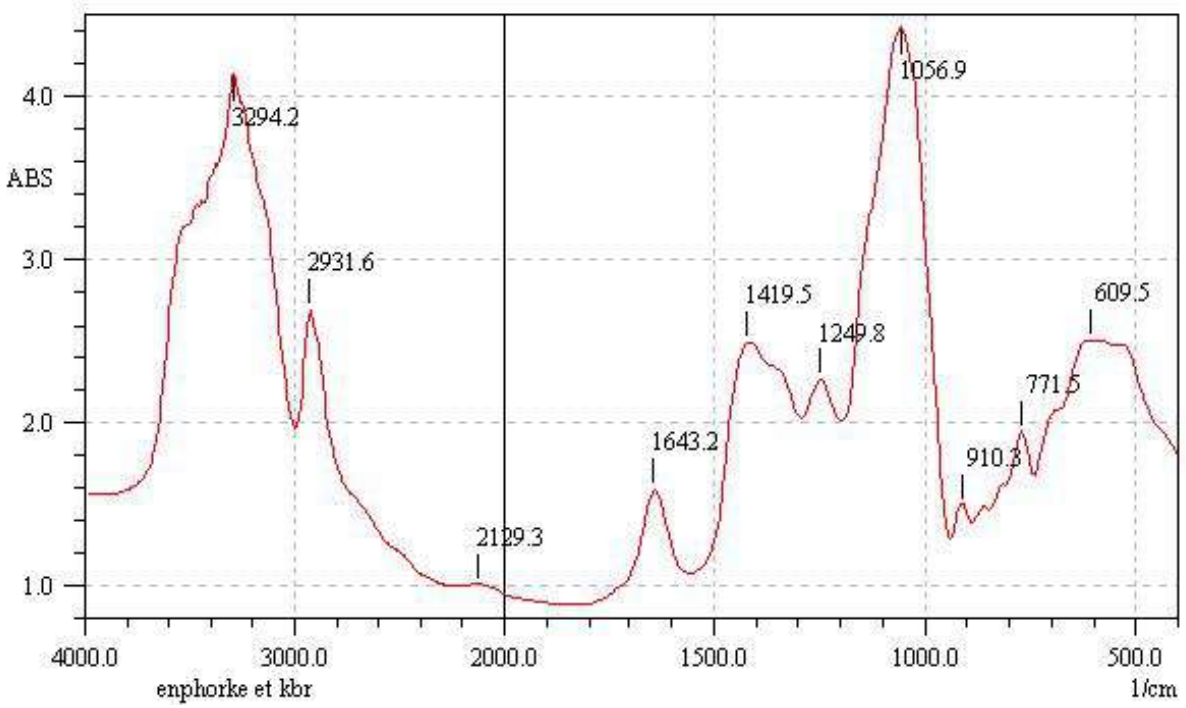


Figure V.2: Spectre IR du miel d'Euphorbe

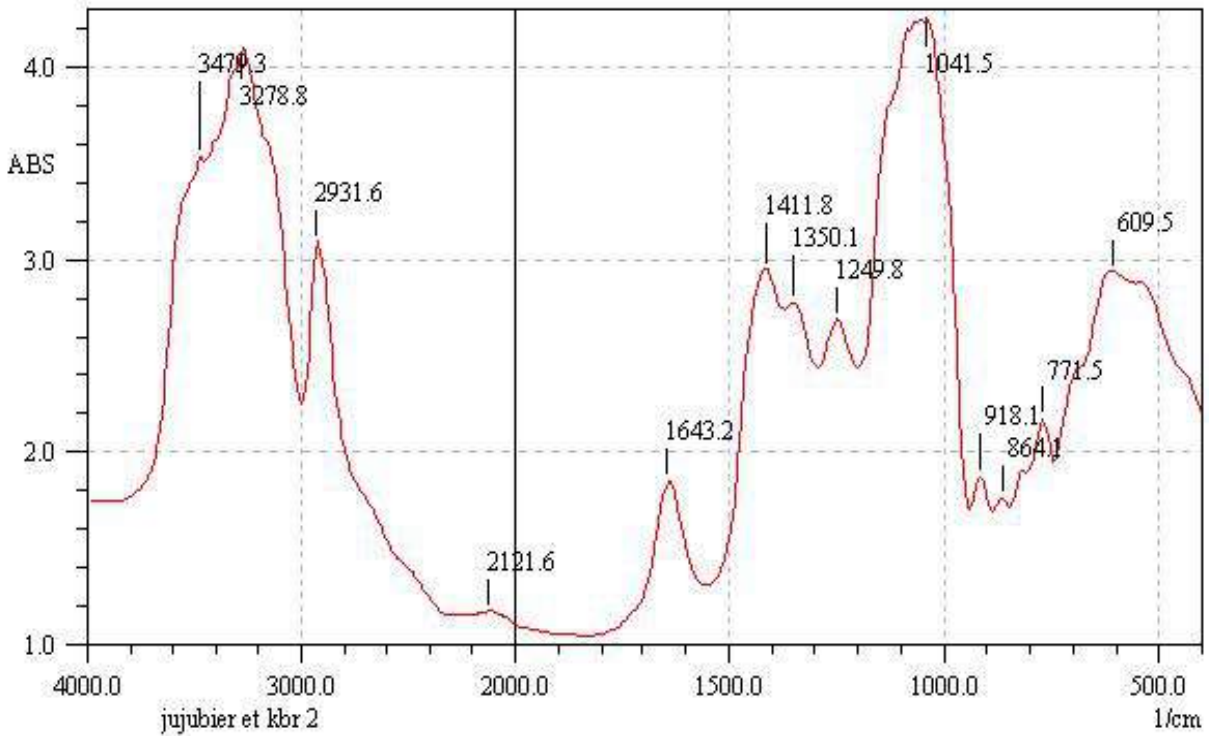


Figure V.3 : Spectre IR du miel de Jujubier

Tableau V.8 : Données tirées à partir des spectres IR des miels

Pic (cm^{-1})	Liaisons	Domaine spectral (cm^{-1}) (Site 10), (Silverstein RM, 1998)	Origine probable
3479.3 (J) 3294.2 (E)	O-H	3600-3400 ^{VE}	- Alcool (glucides) ou - Phénols (acides phénoliques)
2931.6 (J) 2931.6 (E)	C-H	* 3000-2800 $\rightarrow$-CH_2 - 2925^{VEA} $\rightarrow$-CH_2 - 2850 ^{VES} $\rightarrow$-C-H 2890^{VE} * 3080-3030 ^{VE} pour C-H arômatique	-Origine diverse (glucides, protéines…) - Composés arômatiques; exemple: Acides phénoliques
2121.6 (J) 2129.3 (E)	C ≡ C	2150-2100 ^{VE}	Alcynes
1643.2 (J) 1643.2 (E)	C=C arômatique	[1600-1500] ^{VE}: généralement à 1645	Composés arômatiques (acides phénoliques)
1041.5 (J) 1056.9 (E)	C-O	[1300-1000]^{VE} : *1050 *1100	- Alcools primaires (CH_2 O glucides) - Alcools secondaires (-C- des glucides) | OH
Plusieurs pics entre 918 et 771.5 (J, E).	C-H arômatique	[900-700] ^{VD} dans le plan. Les bandes sont caractéristiques du type de substitution	Composés arômatiques: - Acides phénoliques - Cycle benzène de : *l'acide syringique *méthyle syringate
609.5(J) 609.5 (E)	≡ C-H C-Cl	600-800^{VE} 600-700	- Composés halogénés (Chloré) -Alcyne

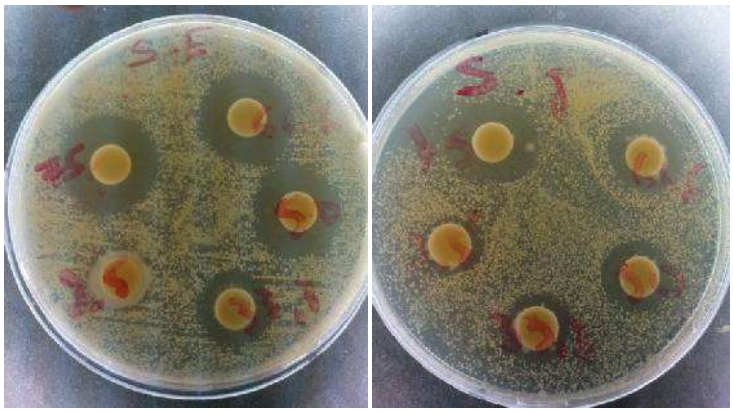
VE: vibration d'élongation**; VD:** vibration de déformation**; VEA:** vibration d'élongation asymétrique**; VES:** vibration d'élongation symétrique**.**

V.2.2. Activité antibactérienne du miel:

V.2.2.1. Détermination de la CMI:

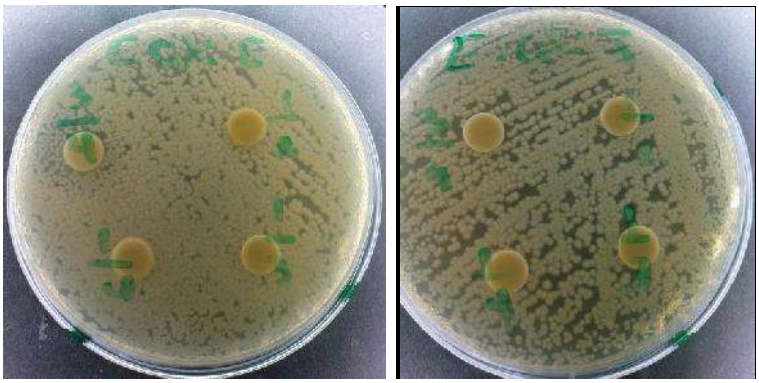
L'évaluation de l'activité antimicrobienne du miel est basée sur les mesures des diamètres en (mm) des zones d'inhibition obtenues pour les différentes dilutions des miels.

(**Fig. V.4, 5**). Les résultats sont résumés sur le **Tableau V.9** et la **Figure V.6**. Nous pouvons ainsi déduire la CMI des miels étudiés vis-à-vis des deux genres bactériens **(Tableau V.10)**.



Euphorbe **Jujubier**

Figure V.4: Effet antibactérien des miels sur *Staphylococcus aureus*



Euphorbe **Jujubier**

Figure V.5 : Effet antibactérien des miels sur *E. Coli*

Tableau V.9: Diamètres d'inhibition (mm) obtenus pour les dilutions des miels.

	Staphylococcus aureus		***E. Coli***	
	Miel d'Euphorbe	**Miel de Jujubier**	**Miel d'Euphorbe**	**Miel de Jujubier**
75% (3/4)	23	20	_	_
50% (1/2)	21	18	_	_
33.33% (1/3)	20	16	_	_
25 % (1/4)	16	14	_	_
16.67% (1/6)	_	_	_	_

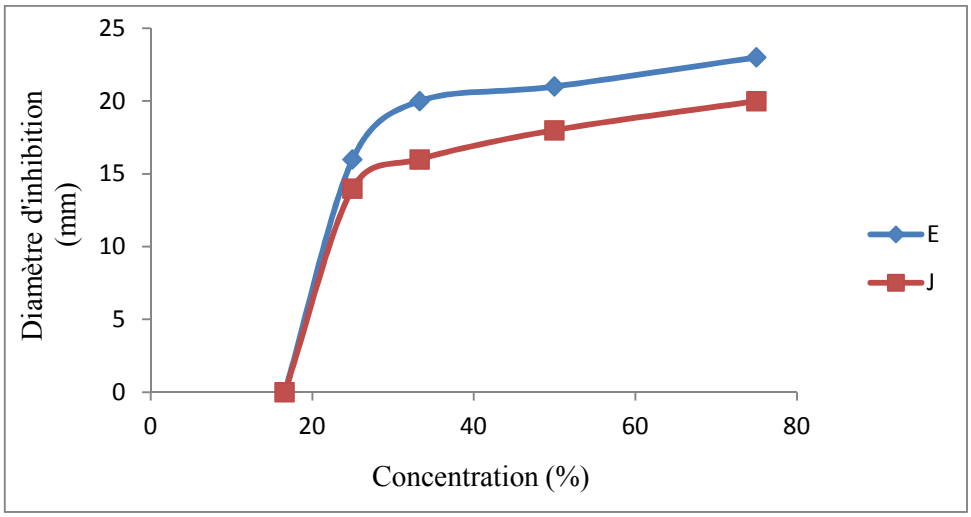


Figure V.6 : Effet inhibiteur des miels sur *Staphylococcus aureus*.

Tableau V.10 : CMI des miels sur les deux souches bactériennes.

	Staphylococcus aureus		***E. Coli***	
Miel	**Euphorbe**	**Jujubier**	**Euphorbe**	**Jujubier**
CMI	**[16.67%-25%]**	**[16.67%-25%]**	**>75% (Probable)**	**>75% (Probable)**

Il faut noter que dans la limite de nos conditions expérimentales (concentration maximale du miel testé est 75%, le volume d'essai est de 50µl) nous n'avons pas obtenu un effet contre *E. Coli* pour les deux variétés de miel. D'après les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne, nous pouvons constater ce qui suit:

- L'effet antibactérien du miel est plus important avec les échantillons peu dilués, il diminue avec les dilutions successives jusqu'à la dilution correspondant à la concentration minimale d'inhibition.
- *Staphylococcus aureus* est sensible à l'action inhibitrice des deux échantillons de miel naturel, avec des différences d'un type à un autre. Plus la CMI est petite; plus le miel est actif. Les deux miels présentent des CMI proches mais avec des zones d'inhibition différentes. Ces dernières sont plus grandes pour le miel d'Euphorbe, il est donc le plus efficace.
- Nous constatons aussi que l'action du miel naturel sur les souches testées varie d'une part selon l'échantillon du miel mais d'autre part selon la souche microbienne. Plus la CMI est petite; plus la bactérie est sensible. *Staphyloccocus aureus* est moyennement sensible à l'effet des deux types de miel. Alors que *E. coli* peut être considérée comme étant relativement résistante aux deux types. Nous pensons que l'action du miel naturel sur les microorganismes dépend de la structure de la paroi de la cellule cible, puisque nos

échantillons de miel possèdent un effet inhibiteur sur les bactéries à Gram+ et non sur les bactéries à Gram-. Nos résultats ne corroborent pas avec ceux de **Kebaili**, 2005 qui a enregistré un effet antibactérien de trois types de miel (Forêt; Oranger; Carline) sur *E. Coli* de collection et isolée (CMI la plus importante est 50%-75% enregistrée pour le miel d'Oranger). Cependant, la même étude a signalé que *S. aureus* est plus sensible que *E. coli* vis-à-vis de ces miels. Mais il faut signaler que nos résultats sont en parfaite conformité avec une étude récente réalisée en parallèle que la notre au laboratoire de microbiologie, SAIDAL, Médéa. En utilisant des volumes tests plus importants (200µl des dilutions de miel remplis dans des puits creusés dans le milieu), 20 variétés de miel ont été testées sur *E. Coli* sans effet antimicrobien. Ceci nous laisse poser une interrogation soit sur la qualité de conservation des miels mis en vente ou sur la possibilité d'adaptation de ce genre aux inhibines naturels.

L'activité antibactérienne du miel est due à plusieurs facteurs :

- Les pH des deux types de miels (PH_E=4.2, PH_J=6) sont bas alors que le pH optimum pour *E coli* et *S aureus* est 7.5. La tolérance importante d' *E coli* aux variations du pH explique sa résistance par apport à *S aureus*, le pH minimum pour sa croissance est de 4.3 (**Peiffer, 2000).**
- D'autre part, les miels à tester sont des solutions concentrées en sucres. Leur teneur en eau est comprise entre 13.6% et 13.8%. Le miel agit ainsi d'une manière osmotique et absorbe l'eau vitale des agents pathogènes (**Bogdanov et Blumer, 2001).**
- Il y a aussi les facteurs phytochimiques qui ont une activité antibactérienne comme: les alcools benzyliques **(Molan, 1992),** les acides phénoliques et les flavonoïdes **(Almahdi et Kamaruddin, 2003)**.

L'étude des caractères physicochimiques des deux types de miel nous a montré que le miel d'Euphorbe est le plus acide, le plus concentré, et il est riche en composés aromatiques (d'origine probable phytochimique). Il présente donc plus d'activité.

V.2.2.2. Etude de l'influence de la température:

Les résultats relevés par la mesure des diamètres des zones d'inhibition des deux types de miel (d'Euphorbe et de Jujubier à une dilution de 75%) en fonction de la température du traitement sur *S aureus* sont regroupés dans le **Tableau V.11 (Fig. V.7, Fig. V.8)**.

Tableau V.11 : Diamètres d'inhibition (mm) de *S. aureus* obtenus pour les miels dilués à 75% et traités à des températures différentes.

	Sans chauffage (26-30°C) (Moyenne de 28°C)	40°C	55°C	70°C	85°C	90°C
Miel d'Euphorbe	23	17	15	14	_	_
Miel de Jujubier	20	15	14	13	_	_



Euphorbe **Jujubier**

Figure V.7 : Zones d'inhibition de *S aureus* obtenues pour les deux types de miel dilués à 75% et traités à des températures différentes.

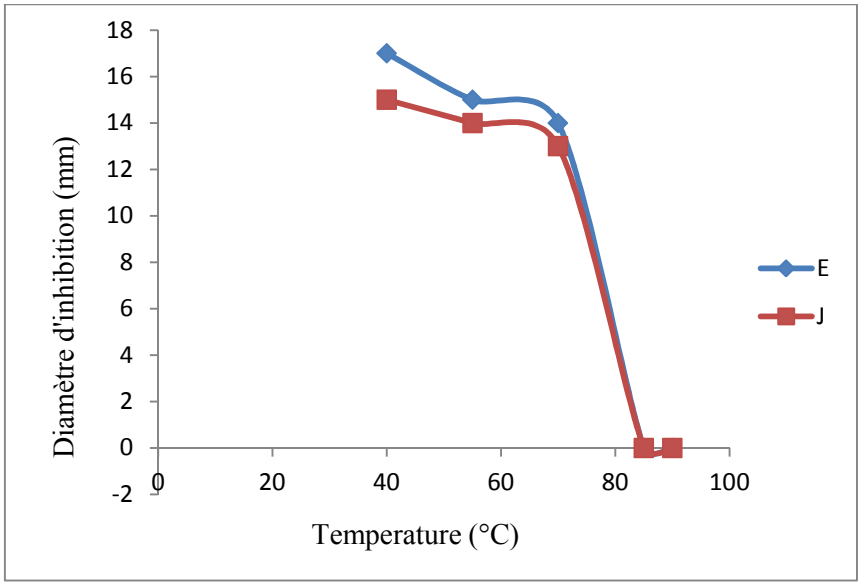


Figure V.8: Variation des zones d'inhibition de *S aureus* obtenues pour les deux types de miel en fonction de la température du traitement.

D'après ces résultats, il apparaît que les diamètres des zones d'inhibition décroissent avec l'augmentation de la température du traitement pour les deux types de miel. Selon **(Tosi et al, 2007)**, les changements dans l'activité antibactérienne est peut être due à la modification de l'activité enzymatique. A partir d'une température situé dans l'intervalle [70°C à 85°C], la dégradation totale de l'activité antibactérienne du miel est peut être due à la dénaturation de quelques substances antibactérienne thermolabiles ainsi à la dénaturation de l'enzyme "glucose-oxydase" qui produit l'eau oxygénée. Selon (**Descottes**, **2004**), la valeur antibiotique du miel est attribuée à l'inhibée, qui est une enzyme très fragile à la chaleur et à la lumière ; il affirme que pour conserver l'activité de cette enzyme il ne faut pas dépasser 80°C pendant de 30 minutes.

V.2.2.3 Etude de l'influence du pH:

Les diamètres des zones d'inhibition de *S aureus* enregistrées pour les deux types de miel (Euphorbe et Jujubier à une dilution de 75%) en fonction du pH sont présentés sur le **Tableau V.12 (Fig. V.9, Fig. V.10)**.

Tableau V.12: Diamètres des zones d'inhibition de *S. aureus* obtenues pour le miel d'Euphorbe et de Jujubier (dilués à 75%) traités à des pH différents.

pH	1.93	2.85	3.75	4.2	7.14	9.7
Euphorbe	0	14	16	17	17	17
pH	2	3.96	6	7.7	9.1	10
Jujubier	0	12	13	13	13	13

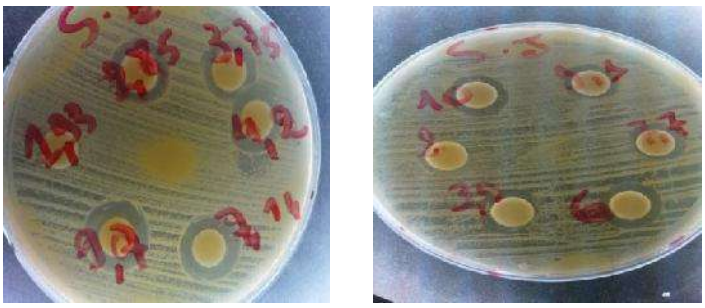


Figure V.9 : Zones d'inhibition de *S. aureus* obtenues pour le miel d'Euphorbe et de Jujubier (dilués à 75%) traités à des pH différents.

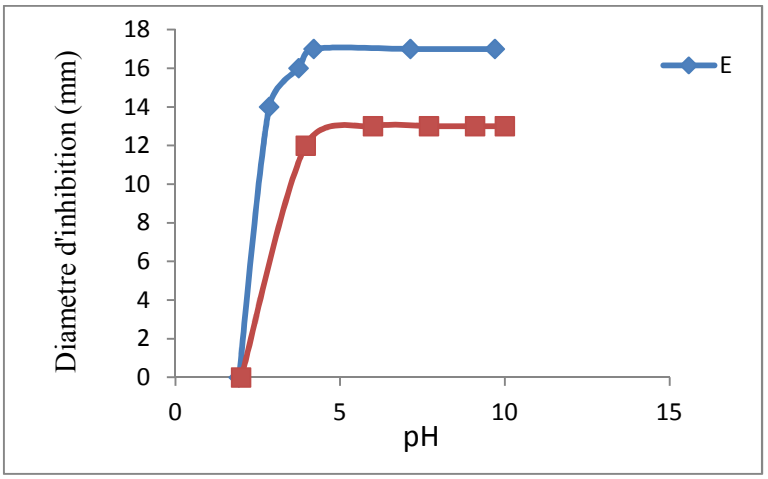


Figure V.10 : Influence du pH sur l'activité antibactérienne du miel d'Euphorbe et de Jujubier.

En variant le pH du miel, nous traçons un Schéma complet d'inhibition enzymatique :

- Au pH bas (1,9 - 2), les deux miels n'inhibent pas la croissance de *S aureus*. Ce ci est dû à la dénaturation de l'enzyme responsable de la production de l'eau oxygénée: la glucose oxydase,
- L'activité du miel d'Euphorbe augmente à partir du pH=2.85 jusqu'à atteinte du maximum à pH=4.2,
- L'activité de miel de Jujubier augmente à partir du pH=3.96 jusqu'à atteinte du maximum à pH=6,
- En fin, l'activité se stabilise à partir du pH=4.2 pour le miel d'Euphorbe et pH=6 pour le miel de Jujubier. c'est les pH natif des deux miels,

A partir de ces observations, nous pouvons confirmer que le mode d'action des miels de d'Euphorbe et Jujubier est indépendant de l'effet osmotique puisqu'à pH de 2 où l'activité oxydase est nulle, l'effet osmotique est absent (pas de zone d'inhibition). A pH=4 et 6 ces miels agissent très peu par effet de leur acidité. Le pH dans ce cas constitue un facteur favorisant l'activité enzymatique du glucose Oxydase : enzyme productrice de l'eau oxygénée.

V.3. Etudes des extraits de plantes:

La méthode des antibiogrammes est la technique choisie pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits étudiés. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des extrait à l'intérieur d'une boîte de Pétri, dans un milieu nutritif solide. Pour cela, nous avons testé les deux souches: *S. aureus* et *E. coli* isolées et identifiées au laboratoire.

L'activité antimicrobienne des extraits est évaluée en fonction du diamètre (mm) des zones d'inhibitions de la croissance microbienne (**Deans et Ritchie, 1987, Sivropoulou et *al.*,**

1996, Smith-Palmer et *al*., 1998, Dorman et Deans, 2000, Lis-Balchin et *al*., 2000, Faleiro et *al*., 2003, Kunle et *al*., 2003). L'estimation de l'activité antimicrobienne des extrait des plantes est basée sur une échelle de mesure mise en place par **Meena et Sethi, 1994** et **Ela et *al*, 1996**. Ils ont classé le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 04 classes :

1. Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28 mm;
2. Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 16 et 28 mm ;
3. Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 10 et 16 mm ;
4. Non inhibitrice lorsque le diamètre d'inhibition est inférieur à 10 mm.

Selon **Valero** et **Salmeron, 2003** et **Pibiri, 2005**, il est difficile de faire une comparaison entre les résultats obtenus avec ceux rapportés par la littérature en raison des problèmes suivants:

- Nature du matériel végétal (l'espèce, extrait ou l'HE, origine géographique, altitude, saison de cueillette) ;
- Procédé d'extraction ;
- Niveau de pureté du produit final et sa conservation ;
- Nature des souches testées ;
- Méthodes utilisées pour estimer l'activité antimicrobienne;
- Milieux de culture employés (milieu synthétique ou naturel).

V.3.1. Effet antibactérien des extraits: choix de la méthode d'extraction et le genre botanique:

Nous avons testé l'activité antibactérienne de quatre extraits de plantes fraiches préparés par les trois méthodes d'extraction (macération, décoction et infusion). Les zones d'inhibitions des sont résumées dans le **Tableau V.13 et Figure V.11**.

Tableau V.13: Les zones d'inhibitions (mm) des souches avec les différents extraits.

	S aureus			***E. coli***		
	Macération	**Décoction**	**Infusion**	**Macération**	**Décoction**	**Infusion**
Thym	12	15	13	-	-	-
Genévrier	11	-	-	-	-	-
Laurier	-	16	-	-	-	-
romarin	-	13	-	-	-	-

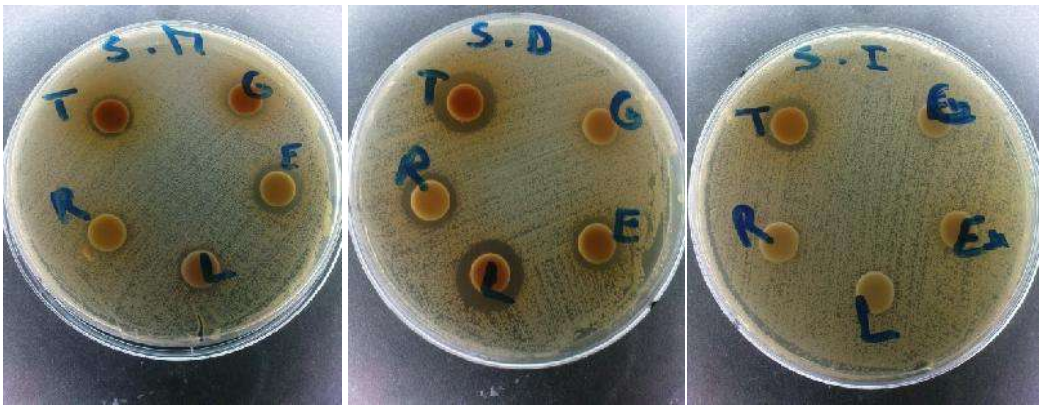


Figure V.11: Effet des différents extraits de plante sur *S aureus.*

D'après ces résultats, il apparaît que:

- *Staphylococcus aureus* est sensible à l'action inhibitrice des 4 échantillons de plantes naturelle, avec des différences d'un type à un autre. *E. coli* exprime une fois de plus une résistance vis-à-vis de tous les extraits testés.
- L'effet antibactérien des extraits est plus important avec la méthode d'extraction par décoction. Cependant, pour le Genévrier, la seule méthode d'extraction qui a permis de faire apparaitre son effet antibactérien est la macération.
- l'extrait du laurier est le plus efficace donnant le diamètre d'inhibition le plus important, suivie de celui du Thym puis celui du Romarin.

D'après **Rojas et al., 1992; Marjorie, 1999,** l'activité antimicrobienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits, (en particulier thymol et carvacrol), les flavonoïde et les triterpénoïdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyle libres, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs. La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes. L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait **(Essawi et Srour, 2000)**.

En conclusion, l'action des extraits naturelle sur la souche testée varie d'une part selon la nature de la plante (composition chimique) et d'autre part selon la méthode d'extraction. Nous choisissons pour la suite de notre travail la décoction comme méthode d'extraction et le laurier comme la meilleure plante à effet antibactérien.

V.3.2. choix de la nature de la plante :

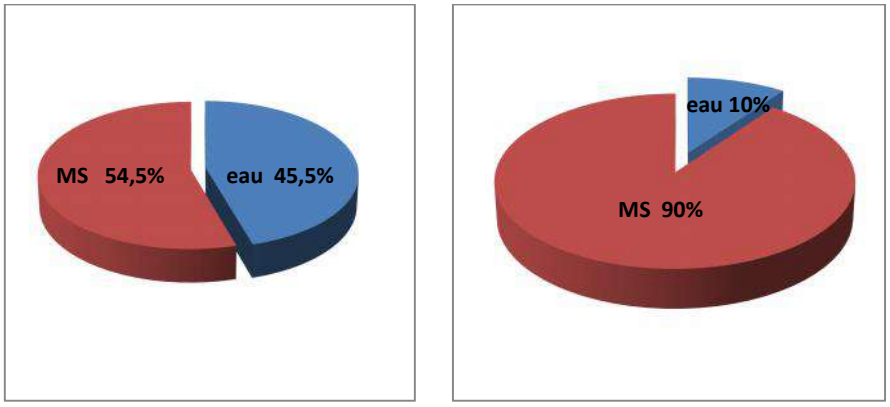
Nous rappelons que le but de cette partie est de choisir le mode d'utilisation du laurier : sec ou frais ? En utilisant la décoction comme méthode d'extraction.

V.3.2.1. Mesure de la teneur en eau:

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 % **(Paris et Moyse, 1965)**. Nous avons utilisé la méthode pondérale pour déterminer la teneur en eau dans du laurier frais et sec. C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve. Les résultats de cette analyse ont révélé un taux d'humidité 45.5% pour le laurier frais et 10% pour le laurier sec **(Tableau V.14)**.

Tableau V.14 : la teneur en eau des feuilles sèches et fraiche du laurier.

	Laurier frais	Laurier sec
X(g)	2	2
y(g)	1.0876	1.8072
T (%)	45.5	10



Laurier frais **Laurier sec**

Figure V.12 : Teneur en eau des feuilles sèches et fraiche de laurier.

V.3.2.2. Etude de l'effet antibactérien des échantillons secs et frais:

Nous avons testé l'activité antibactérienne des extraits de la plante fraiche et sèche préparés dans les mêmes conditions et avec la même masse de matière végétale (en tenir compte de la teneure en eau). Les diamètres d'inhibition obtenus sont représentés sur le **Tableau V.15** et la **Figure V.13**.

Tableau V.15: Diamètre d'inhibition (mm) de *S. aureus* pour le Laurier sec et frais.

	D=18 mm
	D=12 mm



Figure V.13 : Effet inhibiteur de *S. aureus* obtenus pour des extraits de plante fraiche et sèche préparés par décoction.

D'après ces résultats, il apparaît que:

- Les deux extraits ont réagi positivement sur la souche microbienne testée.
- la plante fraiche est douée de propriétés antibactériennes très appréciée. En plus, la plante sèche montre aussi une certains activité inhibitrice de la croissance microbienne mais moins intéressante. Pour la suite de notre travail, nous choisissons donc la plante fraiche.

V.3.3. Optimisation du rapport Masse/Volume (m/v):

Nous avons testé l'activité antibactérienne des extraits de plante fraiche préparé à différents rapport masse /volume afin d'optimiser le rapport optimale à partir duquel l'effet antibactérien est maximal. Ceci nous évite le gaspillage dû à l'utilisation de la matière végétale en surplus. Les diamètres (en mm) des zones d'inhibition en fonction de concentration de l'extrait de la plante sont indiqués sur le **Tableau V.16** et **Figures V.14**, **V.15**.

Tableau V.16 : Diamètres d'inhibition (en mm) de *S. aureus* obtenus pour les extraits du laurier frais préparés par décoction à différents rapport m/v.

Rapport m/v (g/ml)	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.15	0.2	0.24	0.28	0.3	0.36
Diamètre d'inhibition (mm)	0	0	0	0	11	12	12	14	12	12	13	13

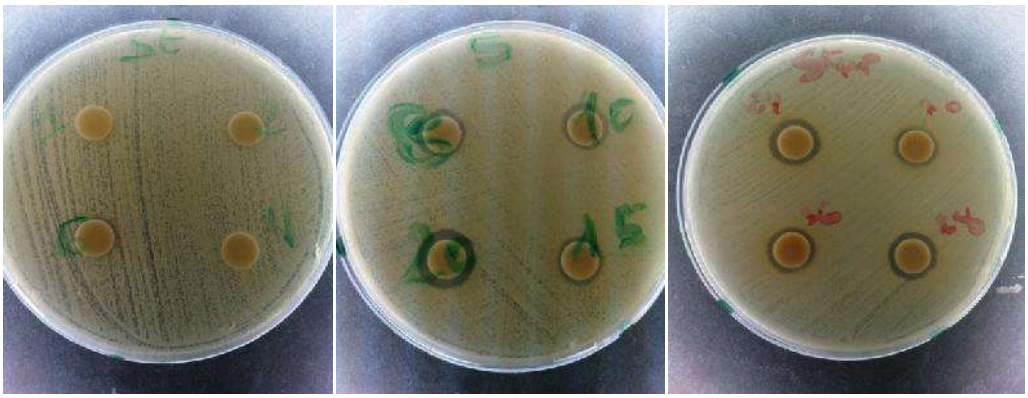


Figure V.14 : Effet inhibiteur des extraits du Laurier frais préparés par décoction à différents rapports m/v (souche : *S. aureus*).

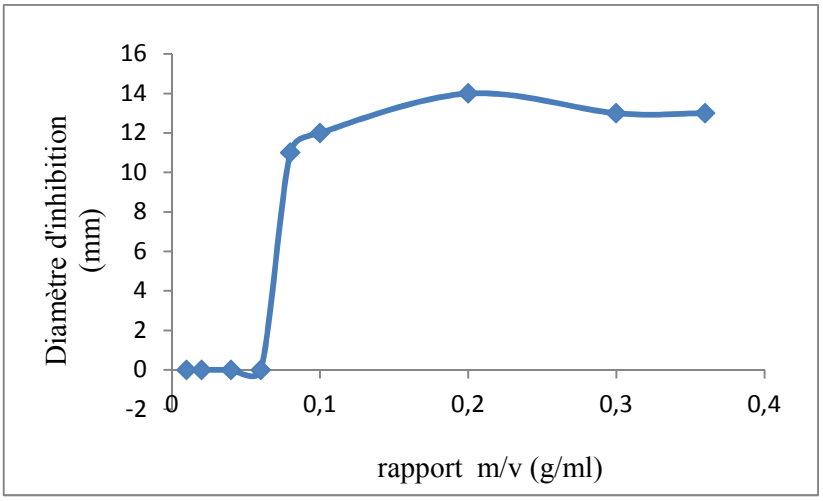


Figure V.15 : **Influence du rapport m/v sur l'activité antibactérienne de l'extrait du laurier frais préparé par décoction.**

D'après ces résultats, il apparaît que:

➢ *Staphylocoques aureus* est sensible à l'action inhibitrice des extraits de plantes avec des différences d'une concentration à une autre.

➢ L'effet antibactérien des extraits augmente avec l'augmentation du rapport m/v dans un intervalle situé entre 0.08g/ml et 0.2g/ml qui possède un effet antibactérienne le plus important. La variation de dosage de principe actif explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits de plante. A partir d'un rapport de 0,2g/l, l'effet antibactérien est stable. Il est donc inutile d'ajouter plus de matière végétale puisque cela n'améliore pas l'effet de l'extrait. En conclusion, le rapport de 0.2g/ml est retenu pour la suite de notre travail.

V.3.4. Influence du pH:

Afin d'optimiser le pH, nous avons testé l'activité antibactérienne des extraits du laurier frais dans les conditions déjà optimisées à différents pH. Les diamètres (en mm) des zones d'inhibition obtenus aux différents pH testés sont indiqués sur le **Tableau V.17 (Fig. V.16 et V.17)**.

Tableau V.17 : Diamètres d'inhibition (mm) de *S. aureus* pour les extraits de Laurier frais à différents pH.

pH	1.83	2.78	4.2	6.3	7.53	8.92	9.58
Zone d'inhibition (mm)	11	12	13	14	15	13	13



Figure V.16: Effet inhibiteur des extraits de Laurier frais à différents pH sur *Staphylococcus aureus.*

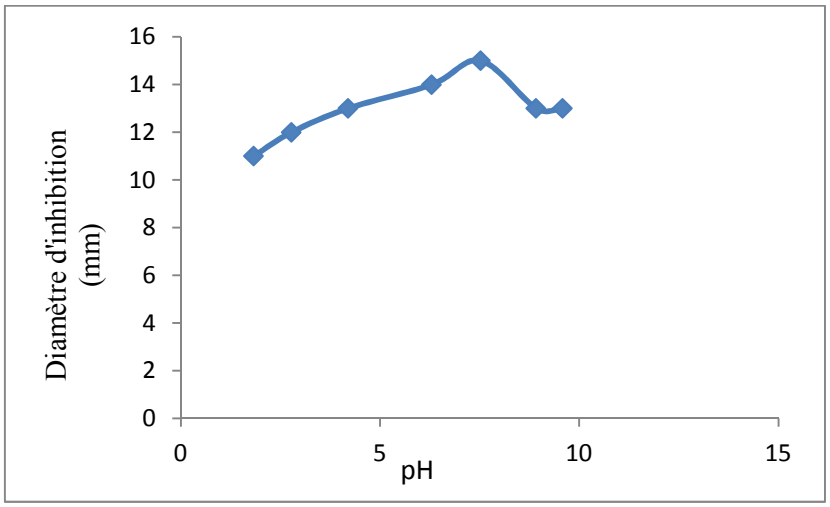


Figure V.17: Influence du pH sur l'activité antibactérienne de l'extrait de Laurier frais.

Selon **Hottey et Patel, 2005**, à pH bas, l'hydrophobicité de certain extraits de plantes augmente ce qui leur permet de se dissoudre facilement dans la phase lipidique de la membrane bactérienne.

D'après ces résultats, il apparaît que :

- *Staphylocoques aureus* est sensible à l'action inhibitrice des extraits de plantes avec des différences d'un pH à un autre.
- L'effet antibactérien des extraits augmente avec l'augmentation de pH jusqu'à pH égale 7.53 qui possède l'effet antibactérien le plus important, puis l'activité diminue au delà du pH=7.53. Le pH influe sur les principes actifs de l'extrait de plantes, ce qui explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne. Un pH=7.5 est l'optimum retenu.

V.3.5. Détermination de CMI de l'extrait du Laurier frais :

Nous avons étudié le pouvoir antibactérien des extraits de plantes par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton). Les résultats obtenus sont représentés sur le **Tableau V.18** et **Figures V.18** et **V.19**. Il faut noter que dans cette partie, nous avons refais le test d'inhibition pour *E. coli* dans les conditions optimisées afin de se prononcer réellement sur sa résistance. Il faut noter aussi que toutes les dilutions ont présenté un pH dans la zone optimale.

Tableau V.18: Diamètres des zones d'inhibition des deux bactéries (mm) pour les différentes dilutions des extraits du laurier frais préparé dans les conditions optimisées.

Concentrations (%)		**100%**	**75%**	**50%**	**33.33%**	**25%**
Diamètre (mm)	***S. aureus***	18	16	14	12	0
	E. coli	0	0	0	0	0

$CMI_{S.\ aureus}$ = [25%-33.33%].



S. aureus ***E. coli***

Figure V.18: Effet antibactérien de l'extrait du Laurier frais préparé dans les conditions optimisées.

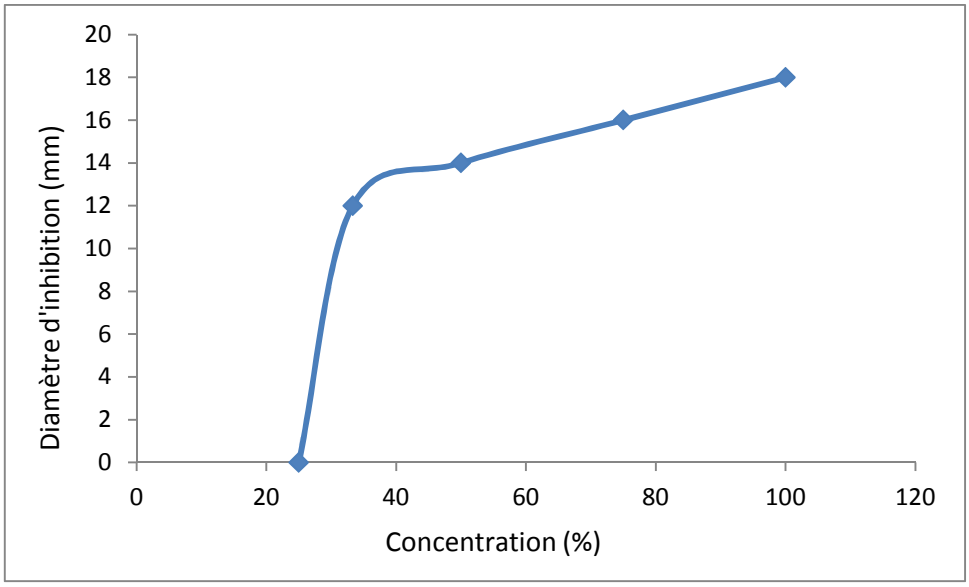


Figure V.19: Effet inhibiteur des dilutions d'extraits du Laurier frais sur *S. aureus*.

Selon **Chang et al, 2001** et **Oussalah et al, 2007**, le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes est en relation directe avec plusieurs paramètres à savoir :

- La nature des composés majoritaires;
- Concentration de ces composés;
- Nature et structure des groupements fonctionnels;
- L'interaction probable entre les différents constituants (synergie).

D'après ces résultats, il apparaît que:

- Nous n'avons pas trouvé un effet antibactérien contre *E. Coli*.
- *Staphylocoques aureus* est sensible à l'action inhibitrice de l'extrait du Laurier.
- Le **Tableau V.18** ainsi que les **Figures V.18** et **V.19** montrent clairement la diminution du diamètre des zones d'inhibition correspondant à une diminution de la concentration de l'extrait appliquée (100%, 75%, 50%, 33.3% et 25%). On observe aussi de larges écarts dans les diamètres des zones d'inhibitions obtenues.
- La CMI estimée dans les conditions optimisées est située entre 25% et 33.3% ce qui correspond à un rapport m/v de 0,05 g/ml-0,066 g/ml.

V.4. Etudes de l'activité antibactérienne d'une association Miel-Extrait de plantes:

Nous avons étudié le pouvoir antibactérien des dilutions de deux miels (Euphorbe et Jujubier) dans l'extrait de laurier frais sur *Staphylococcus aureus* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton). Les diamètres (en mm) des zones d'inhibition sont indiqués sur le **Tableau V.19** et **Figure V.20**.

Tableau V.19: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de *Staphylococcus aureus* obtenus pour les dilutions des miels dans l'extrait du Laurier frais préparé dans les conditions optimisées.

% de miel	**75%**	**66.6%**	**50%**	**33.3%**	**25%**
% en extrait	**25%**	**33.3%**	**50%**	**66.6%**	**75%**
E+L	28	26	26	20	20
J+L	32	28	26	22	26



Figure V.20: Effet des dilutions des miels dans l'extrait du Laurier frais sur *Staphylococcus aureus*

D'après ces résultats, il apparaît que :

- *Staphylocoques aureus* est sensible à l'action inhibitrice des dilutions de miels avec des différences d'une dilution à une autre et d'un type de miel à un autre.
- l'activité antibactérienne des dilutions des miels dans l'extraits du Laurier frais est plus d'importante que l'activité antibactérienne des dilutions des miels dans l'eau (**Tableau V.9**).
- inversement, l'activité antibactérienne des dilutions de l'extrait du Laurier dans les deux miels est plus d'importante que l'activité antibactérienne des dilutions de l'extrait dans l'eau (**Tableau V.18**).
- Les dilutions de miel de Jujubier dans l'extrait sont plus actives que celles du miel d'Euphorbe: un cas contraire à ce qui a été observé pour les dilutions de ces miels dans l'eau.

Le couplage des miels étudiés avec l'extrait du Laurier frais provoque une activité inhibitrice très important à cause des interactions (synergie) entre les différents constituants du Laurier et miel ce qui explique donc l'augmentation des zones d'inhibition. La synergie avec le miel de Jujubier est plus marquée.


Conclusion

Conclusion

Le miel et les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Cette étude a ciblé les propriétés antibactériennes de deux types de miel et quartes plantes, très fréquemment employées en Algérie.

Au terme de ce travail, l'étude des paramètres physico-chimiques du miel montrent que les deux miels (Euphorbe et Jujubier) présentent des teneurs en eau inférieures à 17% défavorables à la fermentation. Des pH acides ont été enregistrés alestant de l'origine nectaire du miel d'Euphorbe alors que le miellat pourrait être à l'origine du miel de jujubier. Le pH acide joue un rôle dans l'effet antimicrobien. De plus les miels étudiés sont très riche en sucres réducteur (avec un taux plus élevé pour le miel d'Euphorbe), leurs densités est en accord avec les normes. L'analyse au spectrophotomètre IR a montré leur richesse en composés aromatiques. Ces derniers influencent l'effet antimicrobien.

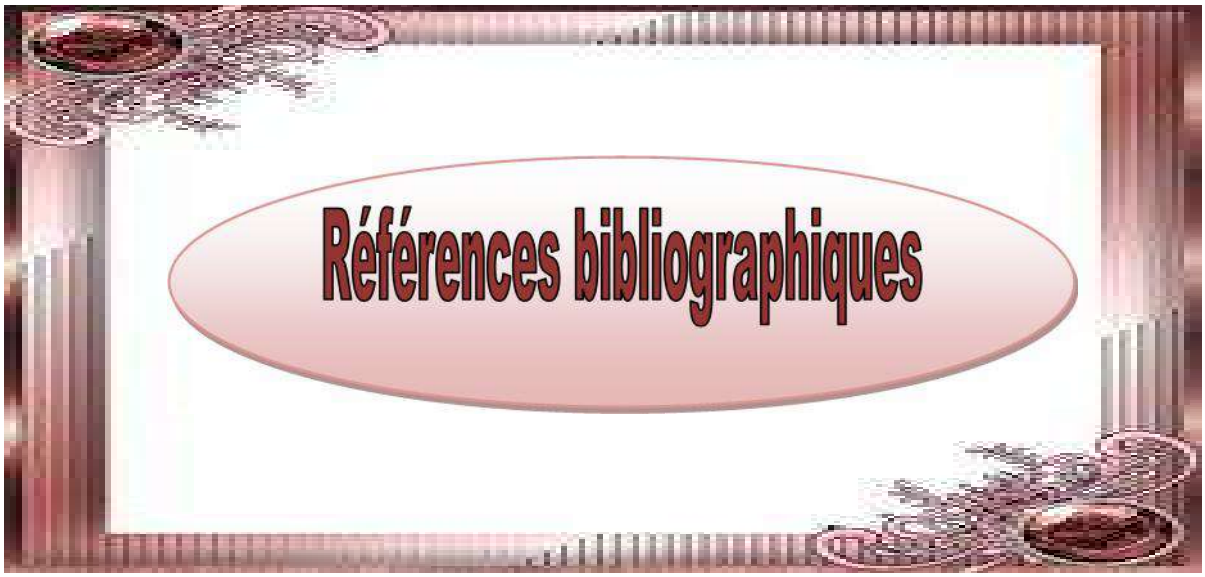
Au regard des résultats obtenus dans la partie microbiologique, le miel inhibe effectivement la croissance bactérienne des Gram (+) (*Staphylococcus aureus)*. Par contre, dans la limite de nos conditions expérimentales (concentration maximale du miel testé est 75%, le volume d'essai est de 50µl), nous n'avons pas trouvé un effet sur les bactéries Gram (-) (*Escherichia coli)*. Le miel d'euphorbe s'est révélé le plus actif que le miel de jujubier.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antibactérien des extraits de plantes préparés par trois méthodes d'extraction simples (macération, décoction et infusion) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, les résultats microbiologiques ont montré que le laurier frais extrait par décoction enregistre l'effet antibactérien le plus important avec une concentration de 0.2g/ml, à un pH neutre. Sa CMI est situé entre 25% et 33.3%.

Afin d'améliorer l'activité antibactérienne des miels et de l'extrait choisi, nous avons mené un couplage entre ces deux composants. Suivant les résultats que nous avons obtenus expérimentalement, nous pouvons dire que le couplage des miels avec l'extrait du Laurier frais révèle une activité inhibitrice très importante à cause des interactions (synergie) entre leurs constituants. L'effet synergique apparait plus avec le miel de Jujubier.

A la suite de ces résultats, il serait donc intéressant de mener une enquête détaillée sur les fractions démontrant l'activité antibactérienne in vitro, en vue d'identifier les composés responsable de cette activité.

En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement active. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence. De plus, la recherche d'association plus complexe à effet plus important est souhaitée dans le future proche.


Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- **Abutbul. S, Golan-Goldhirsh. A, Barazani. O, Zilberg. D, (2004)**.Use of Rosmarinus officinalis as a treatment against Streptococcus iniae in tilapia (Oreochromis sp). Aquaculture. **238**: 97-105.
- **Adams R.P, 1999**. Systematics of Juniperus section Juniperus based on leaf essential Oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). Biochemical Systematics and Ecology. **28**: 515-528.
- **Adams. R.P, Mumba. E, James. S, Pandey. R, Gauquelin. T, (2003)**. Geographic variation in the leaf oils and DNA fingerprints (RAPDs) of Juniperus thurifera from Morocco and Europe. J. Essent. Oil Res. **15**: 148-154.
- **Adwan. G, Abu-Shanab. B, Adwan. K, Abu-Shanab. F, (2009).** Antibacterial effects of Nutraceutical Plants Growing in Palestine on Pseudomonas aeruginosa Turk. J. Biol. **30**: 239-242.
- **Alexandra rossant, (2011)**. le miel, un compose complexe aux propriétés surprenantes : thèse pour le diplôme d'etat de docteur en pharmacie. faculte de pharmacie. universite de limoges, France.
- **Almahdi. MA, Kamaruddin. MY**, **2003**. Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. Turk J Med Sci. **33**:229- 236.
- **Almajano. MP, Rosa. C, Angel. LJ, (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions Food Chemistry. **108**: 55–63.
- **Aqili khorasani. M.S, (1992)**. Variation in the essential oil composition of Laurus Nobilis L. of different crowth stages cultivated in Iran.J.basic and applied sciences. **5**: 624-630
- **Arnold. N, Valentini. G, Bellomaria. B, Laouer. H, (1997).** Comparative study of the essential oils from Rosmarinus eriocalyx Jordan & Fourr. From Algeria and R. officinallis L. from other countries. J.essent.Oil Res. **9**: 167-175.
- **Asili. J, Emami .S.A, Rahimizadeh. M, Fazly-Bazzaz. B.S, Hassanzadeh M.K, 2008.** Chemical and Antimicrobial Studies of Juniperus communis subsp. hemisphaerica and Juniperus oblonga essential oil. J. Essential Oil bearing plants, **11**: 96-105.

- **Atanda. O, Akpan. I, Oluwafemi. F, (2007).** The potential of some spice essential oil in the control of A. parasiticus CFR 223 and aflatoscin production, Food Control **18**: 601-607.
- **Athamena. S, Chalghem. I, Kassah-Laouar. A, Laroui. S, Khebri. S, (2010).** Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de Cuminum cyminum L. Lebanese Science Journal.**11**:69-81.
- **Bakirel. T, Bakirel. U, Ustuner Keles. O, Gunes Ulgen. S, Yardibi. H, (2008).** In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus officinalis) in alloxan-diabetic rabbits. J Ethnopharmacol. **116**: 64-73.
- **Balladin.D.A, Headley. O, (1999)**. Evaluation of solar dried thyme (Thymus vulgaris Linné) herlos. Renewable Energy. **17:** 523-531.
- **Barla. A, Topçu. G, Öksüz. S, Tümen. G, Kingston. D.G.I, (2007).** Identification of cytotoxic sesquiterpènes from Laurus nobilis I. Food chemistry.**104**: 1487-1484.
- **Barrero. A.F, Herrador. M, Arteaga. P, Quílez del Moral. J.F, 2006**. Chemical composition of the Essential Oil from the leaves of Juniperus phoenicea L.from North Africa. Journal of Essential Oil Research. **18**:168-169.
- **Bellakhdar. J, (1997**). La pharmacopée marocaine traditionnelle.(Ed) Ibis Press. Paris.
- **Beloued. A, (1998**). Plantes médicinales d'Algérie. 2ème Edition. (Ed) Office des publications universitaires. Alger.
- **Beloued. A, (2005**) Plantes médicinales d'Algérie. (Ed) Office des publications universitaires. Alger.
- **Bogdanov. S, Reider. K, Rjegg. M**, **(1989)**. "Determination of pinocembrin in honey using HPLC". J. Apic. Res. **28**:55- 57.
- **Bogdanov. S, Blumer. P, (2001)**. "Propriétés antibiotiques naturelles du miel". RSA. **98**: 107- 114.
- **Bogdanov. S, Ruoff. K, Oddo. PL, (2004).** Physicochemical methods for the characterisation of unifloral honeys .apidologie. **35**:16-17.
- **Bogdanov. S, K. Bieri, P. Gallmann, (2005).** Miels monofloraux suisses. Centre de recherches apicoles. Station de recherches en production animale et laitière.**23** :55-57.
- **Boudy.P, (1952)**. Guide du forestier en Afrique du Nord. (Ed) La Maison Rustique, Paris.
- **Bouhdid. S, Idaomar. M, Zhiri. A, Bouhdid. D, Skali. N, Abrini. J, (2006)**.Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial

activities. Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrés Intrntional de biochimies, Agadir. 324-327.

- **Boulahbal. F, (1993).** "Microbiologie S_1 clinique". (Ed) Office des publications universitaires. Alger.
- **Boullard. B, (2001**) Plantes médicinales du monde réalités et croyances. (Ed) ESTEM Paris.
- **Bourgeois. C, Mescle. J, Zucca. J, (1996).** Microbiologie alimentaire : Aspect Microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed. Tec. Et Doc., Paris.
- **Bruneau. E, (2002).** Les produits de la ruche. In Le traité rustica de l'apiculture. Paris, Rustica : 354-384.
- **Bruneton. J, (1999).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème Ed Tec&Doc. Paris.Renewable Energy**. 17**: 523-531.
- **Carbonnelle. F, Denis. A, Marmonier. G, (1987).** Pinon and R. Vargues "Bactériologie Medicale. Techniques Usuelles". (Ed) ISBN 285334276 X. SIMEP, Paris.
- CD Encarta 2005.
- **Clement. H**, (**2002)**. *Guide des miels*. Rustica Paris.
- **Cowan. M, (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews. **12**. 564-582.
- **Dacosta. Y, (2003).** Les phytonutriments bioactifs. (Ed) Yves Dacosta. Paris.
- **Demir. V, Guhan. T, Yagcioglu. A, Ddegirmencioglu. A, (2004)**. Mathematical modeling and the Determination of some Quality Paramaters of Air-dried Bay leaves. Biosystems Engineering.**88**:325-335.
- **Demo. A, Petrakis. C, Kefalas. P, Bosliou. D, (1998)**. Nutrient antioxidant in some herbs and Mediterranean plans leaves. Food Research international. **31**: 351-354.
- **Descottcs. B, (2004).** Le miel comme agent cicatrisant, Thèse de doctorat en médecine, université Toulouse III-Paul SABAT1ER, Limoges.France.
- **Dob. T, Dahmane. D, Chelghoum. C, (2008)**. Chemical Composition of the Essential Oil of Juniperus phoenicea L. from Algeria. Journal of Essential Oil Research. **20**:15-20.
- **Donadieu .Y, (1978).** le miel thérapeutique. 2^{éme} Ed Maloine S.A .Paris.
- **Donadieu. Y, (1984).** Le miel thérapeutique naturel. ^{3e} édition Maloine S.A. Paris.
- **Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D. 2007**. La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

- **Erler. F, Ulug. I, Yalankaya. B, (2006)**. Repellent activity of five essentiel oils against Cubx pipiens.Fitoterapia.**77**: 491-494.
- **Essawi. T, Srour. M, (2000)**. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J.Ethnopharm.* **70:** 343-349.
- **Farnsworth. N**. **R, Akerele. O, Bingel. A, Soejarto. D, Guo. Z, (1986)**. Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé. **64**: 159-164.
- **Fernandez-Lopez. J, Zhi. N, Aleson-Carbonell. L, Perez-Alvarez. J, Kuri. V, (2005)** Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. Meat Science. **69**: 371-380.
- **Ferreira. A**, **Proença. C, Serralheiro. M, Araújo. M, (2006).** The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. J.Ethnopharmacology.**108**: 31-37.
- **Fiorini. C**, **David. B, Fourastét. I, Vercauteren. J, (1998).** Acylated Kaempferol glycosides from Laurus nobilis leaves, J. Phtochemistry.**47**: 821-824.
- **Gee. J.M, Johnson. I.T, (2001).** Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. Current Medicinal Chemistry. **8**: 1-182.
- **Gómez-Coronado. D, Ibañez. E, Rupêrez. F, Barbas. C, (2004).** Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin. J chromatography.**1054**: 227-233
- **Gonnet. M, (1982)**, Le miel ; composition, propriétés, conservation. INRA station expérimentale d'apiculture. **20**: 1-18.
- **Gonnet. M, Vache. G, (1985**). Le gout de miel. Ed. UNAF, Paris.
- **Gonzalez-Trujano**. **M, Pena. E, Martinez. A, Moreno. J, Guevara-Fefer. P, Deciga-Campos. M, Lopez-Munoz. F, (2007).** Evaluation of the antinociceptive effect of Rosmarinus officinalis L. using three different experimental models in rodents. J Ethnopharmacol. **111**: 476-482.
- **Guerzou. M.N, NADJI. N,** (**2002)**.'' étude comparative entre quelques miels locaux et autres importes : thèse pour le diplôme d'Ingénieur d'état en Agronomie '' Université Ziane Achour de Djelfa – Algérie.
- **Guezlane-Tebibel.N, Kahlouche.B, Athmani- Guemouri.S** (**2008) .**"Microbioligie, Travaux Pratiques" . (Ed) Office des publications universitaires. Alger.
- **Guiraud. J, (2003).** Microbiologie Alimentaire. Ed. Dunod, Paris.

- **Gürbüz, Üstün. O, Yeúilada. E, Sezik. E, Akyürek. N, (2002)** In vivo gastroprotective effects of five Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions, J. Ethnopharmacolog. **83**: 241-244.
- **Harikrishna. D, Appa-Rao , Probhakar. MC, (2004).** Pharmacogical investigation of purinin-6-p-coumarate: A flavonoïd glycoside. Indian J Pharmacol. **36**:244-250
- **Hayouni EA, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts. Food Chemistry. **105:**1126–1134.
- **Heinrich. M, Kufer.J**, **Leonti. M, Pardo-de-Santayana. M, (2006)** Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. Ethnopharmacol. **107**: 157-160.
- **Huchet. E**, **Coustel. J, Guinot. L, (1996**). Les constituants chimiques du miel. Méthode d'analyse chimique. Département de science et l'aliment. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire. France.
- **Iserin. P, (2001**) Encyclopédie des plantes médicinales. 2ème Ed. Larousse. Londres.
- **Jean. Figarella et Guy. Leyral, (2001)**. "Microbiologie technique". 2ème édition Jean-Noel Joffin Layral. France.
- **Jean-Prost. P, (1987).** L'apiculture. Connaître l'abeille .conduire le rucher. 6éme édition Lavoisier. France.
- **.Jordán. M.J**, **Martíneez. R.M, Goodner. K.L, Baldwin. E.A, Stomayor. J.A,(2006).** Seasonl Variation of Thymus vulgaris L. essential oils composition. Industrial Crops and products **24:** 253-263.
- **Katalinic. V**, **Mozina. S, Skroza. D, Generalic. I, Abramovic. H, Miloš. M, Ljubenkov. I, Piskernik. S, Pezo. I, Terpinc. P, Boban, (2010)**. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 Vitis vinifera varieties grown in Dalmatia (Croatia). Food Chemistry. **119**:715-723.
- **Khalil. E, Afifi. F, Al-Hussaini. M, (2007)**. Evaluation of the Wond healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (Musmusculus). J. Ethnopharmacology. **109**: 104-112.
- **Khenfer A et Fettal M, (2001):** le miel. . Ministère de l'agriculture .direction de la formation de la recherche et de la vulgarisation.23p.

- **Khiri F, Lalaoui B. (2007)**. Activité antimicrobienne des polyphénols le cas d'extrait d'Arbutus unedo. Thèse pour le diplôme d'ingénieur d'état en Contrôle de Qualité et Analyse. , Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Abderrahmane Mira de Bejaia. Algerie.
- **Kitajima. J**., **Ishikawa. T, Urabe. A, Satoh. M, (2004).** Monoterpenoids and their glycosides from the leaf of thyme. Phytochemistry. **65**: 3279-3287.
- **Kivçak. B, Mert. T, (2002).** Preliminary evaluation of cytotoxic properties ofLaurus nobilis leaf extracts. Fitoterapia. **73**: 242-243.
- **KLOFT. W, (1968).** Les insectes producteurs de miellat**,** in Traité biologique de l'abeille, Tome 3. Edition Masson de Cie, Paris.
- **Kosar. M, Dorman. H.J.D, Hiltunen. R, (2005).** Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. Food Chem. **91**: 525-533.
- **Kulšic. T, Dragovic-Uzelac. V, Miloš. M, (2006)**. Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. Food Technol. Biotechnol. **44**: 485-492.

  Lall. N, Meyer. J, (1999). In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of Mycobacterium tuberculosis by diospyrin, isolated from Euclea natalensis. J Ethnopharmacology **78**:213-216.
- **Larousse,** (**2001),** Encyclopedia of Médicinal Plants. (2nd Edition) Copyright. Dorling Kindersiey Limited, Londres.
- **Lavergne. E, (1969)**. "Les bactéries". (Ed) PUF/QUE SAIS-JE. France.
- **Lavie. P, (1963) :** l'identification des substances antibactériennes présentes dans le miel. (Ed) CR. Acad Sc. France.
- **Louveaux. J, (1968).** Composition propriété et technologie du miel. Les produits de la ruche in traitée de biologie de l'abeille. Tome 03.Ed Masson et Cie. France.
- **Louveaux. J, Maurizio. A et Vorwohl. G, (1970)**, Les méthodes de la mélisso-palynologie, commission internationale de botanique apicole de l'U.I.S.B.
- **Louveaux. J, (1985**) : Les abeilles et leur élevage. (Ed) Opida. paris.
- **Luis. J, Martin Perez. R, Valdes Gonzalez. F, (2007)**. UV-B radiation e.ects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. Food Chem. **101**:1211-1215.

- **Lynn EL Haddad**, (**2010).** Caracterisation des phages de staphylococcus a ureus. Mémoire présenté dans le cadre du programme de maîtrise en Microbiologie pour l'obtention du grade de Maîtrise des Sciences (M. Sc.). Faculté des études supérieures de l'Université Laval. Québec.
- **(Marchale, (1982)."**Milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries", Edition Doin, Paris.
- **Marchenay. P et Berard,** (**2007)**. L. L'homme, l'abeille et le miel. (Ed) Borée. Paris.
- **Marjorie.M, (1999**) Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews. 564-582.
- **Matsuda H., Shimoda H., Uemura T., Yoshikawa M., (1999)**, Preventive effect of sesquiterpenes from Bay leaf on blood ethanol elevation in ethanol-loaded Rat, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. **9**: 212-216.
- **Mau. J**, **Huang. P, Huang. S, (2004).** Antioxydant properties of methanolic extracts from two kinds of Antrodia camphorata mycelia. Food Chemistry. **86**: 25-31.
- **Mazrou, Keltouma, 2008.**''l'effet de la température sur l'évolution de l'HMF dans les miels algériens. Thèse Pour l'obtention du Diplôme de magister En Biochimie Appliquée'' Université ibn khaldoun –Tiaret. Algerie.
- **Molan. PC, (1992).** "The antibacterial activity of honey. 1. The nature of antibacterial activity". Bee World, **73**: 5- 28.
- **Morales. R, (2002).** The history, botany and taxonomy of the genus Thymus. In : Thyme : the genus Thymus. Ed. Taylor & Francis, London.
- **Moreira. M.R**., **Ponce. A, Del Valle. C, Roura. S, (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT. **38**: 565-570.
- **Naves. Y, (1976).** Technologie des Parfums naturels. Ed. Masson, Paris.
- **Okamura. N**, **Haraguchi. H, Hashimoto. K, Yagi. A, (1994)**. Flavonoids in Rosmarinus officinalis leaves. Phytochemistry. **37**: 1463-1466.
- **Özcan. M et Chalcha. J, (2004**). Aroma profile of Thymus vulgaris L growing wild in Turkey. Bulgarian journal of plant physiology. **30**: 68-73.
- **Papachristos. D.P, Stamopoulos. D, (2002).** Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on Acanthoscelides obtecus (Say) (Coloptera: Bruchidae), J. Stored products Research. **38**: 117-128.
- **Pariente. L, (2001)** Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris

- **Peng. Y**, **Yuan. J, Liu. F, Ye. J, (2005).** Determination of active components in rosemary by capillaryelectrophoresis with electrochemical detection. J Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **39**: 431-437.
- **Poletti. A, (1988).** Fleurs et plantes médicinales. 2ème Ed. Delachaux & Nistlé S. A. Suisse.
- **Quezel. P et Santa. S, (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. (Ed) C.N.R.S. Algerie.
- **Rojas. A, Hernandez. L, Pereda-Miranda. R, Mata. R, (1992).** Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. J. Ethnopharmacology. **35:**275-283.
- **Rozman. V**, **Kalinovic. I, Korunic. K, (2007)**. Toxicity of naturally occurring compousds of Lamiaceae and Lauraceae to three strored-product inscts, Journal of Stored products Research. **43**: 349-355.
- **Russel. KM, Molan. PC, Wilkims et al**, **(1988)**. "The identification of some antibacterial constituents of New Zealand manuka honey". J. Agric. Food. Chem, **38**:10-13.
- **Sagdiç. O, (2003)** Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. Lebensm.-Wiss. U.-Technol. **36**: 467-473.
- **Sayyah. M**, **Valizadeh. J, Kamalinejad. M, (2002)**. Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of Laurus nobilis against pentylenetetrazole. Phytomedicine. **9** : 212-216.
- **Schelz. Z**., **Molnar. J, Hohmann. J, (2006)**. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. Fitoterapia. **77**: 279-285.
- **Schweitzer P, (2005a).** encore des miels hors normes. Revue l'abeille de France N°917 .laboratoire d'analyse et d'écologie apicole.
- **Silverstein.R.M., Basler Morill .G.C, (1998).** Identification spectrométrique de composés organiques, 5ème Ed. DeBoeck Université. Paris.
- **Signorini R., (1978):** Le miel source de vie. (Ed) retz. Paris
- **Simie. M, Kundakoviü. T, Kovaþeviü. N, (2003).** Preliminary assay on the antioxidant activity of Laurus nobilis extracts. Fitoterapia.**74**: 613-61
- **Site internet :**

Site 1: http://apisite.online.fr/miel6a.htm

Site 2 :http://fr.wikipedia.org/wiki/Romarin

Site 3 : http://www.futura-sciences.com/fr/definition/t/medecine 2/d/staphylocoque-dore_7886/

Site 4: http://doc-fab.over-blog.com/article-gurken-kann-todlich-sein-75404486.html

Site 5: www.medecine.ups-tlse.fr/.../Evaluation_activite_antibiotiques.pdf

Site 6: www.exchem.fr/introduction_a_extraction.htm

Site 7 : http://www.liste-hygiene.org/ESCHE.html

Site 8 :http://stl-bjb.ac-dijon.fr/bioch/bbertand.htm

Site 9 : www.pro-analise.com.br/files/uploads/catalogos/20100_20160.pdf

Site 10: www.science-en- ligne.com/lic/chimie/chi_exp/spectro/ir.htm

- **Sousa. A, Ferreira. ICFR, Calhelha. R, Andrade. RPB, Valentao. P, Seabra. R, Estevinho. L, Bentao. A and Pereira. JA, (2006).** Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olive 'alcaparra'. Bioorganic & Medicinal Chemistry. **14**:8533-8538.
- **Soyal. D, Jindal. A, Singh. I, Goyal. P.K, (2007)**. Modulation of radiation-induced biochemical alterations in mice by rosemary (Rosemarinus officinalis) extract. Phytomedicine.**14**: 701-705.
- **Stefanovits-Banyai**. **E, Tulok. M.H, Hegedus. A, Renner. C, Szollosi Varga. I, (2003)**. Antioxidant effect of various rosemary (Rosmarinus officinalis L.) clones+. Acta Biologica Szegediensis. **47**:111-113.
- **Tabak. M**, **Armon. R, Potasman. I, Neeman. I, (1996).** Invetro inhibition of Helécobacter pylori by extracts of thyme. J. Appl. Bacteriol. **8:** 667-672.
- **Takeuchi. H**, **Lu Z. G et Fujita. T, (2004**). New monoterpenes glycoside from the aerial parts of Thyme (Thymus vulgaris L). Bioscience, biotechnology and biochemistry. **68**: 1113-1134.
- **Teuscher. E, Anton. R, Lobstein. A, (2005**). Plantes aromatiques. Epices, aromates condiments et huiles essentielles. Lavoisier, Ed. Tec & Doc, Paris.
- **Thuille. N, Fille. M, Nagl. M, (2003)**. Bactericidal activity of herbal extracts. Int. J. Hug. Environ. Health. **206**: 217-221.
- **Tosi. E, Martinet. R, Ortega. M, Lucero. H, (2007)**« Honey diastase activity modified by heating » Food Chemistry. **106** :883–887,
- **Valero. M, Salmerón. M, (2003).** Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus creus in tyndallized cravot broth. Inter. J. Food Microbiology **85**: 73-81.

- **Weckesser. S, Engel. K, Simon-Haarhaus. B, Wittmer. A, Pelz. K, Schempp. C**, (**2007).** Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. Phytomedicine.
- **Weston. RJ, Mitchell. KR, Allen. KL**, (**1999)**. "Antibacterial phenolic component of New Zealand honey". Food Chemistry. **64**: 295- 301**.**
- **Weston. RJ, Brocklebank. LK, Lu. Y**, (**2000)**. "Identification and quantitative levels of antibiotical components of some New Zealand honeys". Food chemistry, **70**:427- 35.
- **Yi. SM,** Zhu**. JL, Fu. LL, Li. JR. (2010).** Tea polyphénols inhibit Pseudomonas aeruginosa through damage to the cell membrane. International Journal of Food Microbiology.144: 111-117.
- **Yoshikawa. M, Shimoda. H, Uemura. T ET autre, (2000).** Alcohol absorption inhibitors from Bay leaf (Laurus nobilis): Structure-Requirements of Sesquitrpenes for the activity. Bioorganic & Medicial chemistry **8**: 2071-2077**.**


Annexes

Annexes 1

Tableau de lecture (API 20)(site)

Tests	Substrats	Réactions/enzymes	Résultats	
			Négatif	**Positif**
ONPG	Ortho-nitro-phényl-galactoside	Beta- galactosidase	incolore	jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	jaune	Rouge/orangé
LCD	Lysine	Lysine décarboxylase	jaune	orangé
ODC	Ornithine	ornithine décarboxylase	jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation de citrate	Vert pâle /jaune	Bleu-vert/vert
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	jaune	Rouge/orangé
TDA	tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA/immédiat	
			jaune	Marron foncé
IND	tryptophane	production d'indole	IND/2 mn maxi	
			jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoine	VP1+VP1/10mn	
			incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de kohn	Gelatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
MEL	Melobiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
OX	Sur papier filtre	Cytochrome-oxydase	OX/ 5-6 mn	
			Incolore	Anneau violet
NO3-NO2	Tube GLU	Production de NO2 Réduction au stade N2	NIT 1 NIT 2/ 2-3 mn	
			jaune	rouge
			Zn	
			rouge	jaune
MOB	(API M) (microscope)	Mobilité	immobile	mobile
MAC	Milieu de MacConkey	Culture sur	absence	présence
OF	Glucose (API OF)	Fermentation : sous huile oxydation : àl'air	Vert vert	Jaune jaune
CAT		Possession d'une catalase	H2O2 / 1-2 mn	
			Pas de bulles	bulles

Annexes 2

Tableau de lecture (API 20)(site)

Uréase	Indole	ONPG	H2S	Citrate	Germe Espèce
_	_	_	_		*nombreux germes possibles dont :* *shigella spp* *salmpnella spp*
			+	+	*salmpnella spp*
				_	*salmpnella cholerae suis*
		+	_	+ou-	*Hafnia alvei*
				+	*Enterrobacter cloacae* *Serratia marcecens*
			+	+	*Citrobacter freundii* *Salmoneella arizonae*
				_	*Salmoneella arizonae*
	+	_	+	_	*Edwarsiella*
			_	+	*Providencia*
				_	*shigella spp*
		+	_	_	*Escherichia coli*
				+	*Citrobacter diversus*
+	_	_	+	+	*Proteus mirabilis (TDA+)*
		+	_	+	*Klebsiella pneumoniae*
			_	_	*yersinia*
	+	_	_		*TDA+ providencia, morganella* *TDA- yersinia*
				_	*Morganella morganii(TDA+)*
		+	+	+/-	*Proteus vulgaris* *Yersinia (citrate-)*
			_	+	*Yersinia* *Klebsiella*

Annexes 3

Table de CHATAWAY (Gonnet, 1982)

Indice de réfraction à 20°C	Pourcentage réel d'eau	Indice de réfraction à 20°C	Pourcentage réel d'eau
1.5041	13.0	1.4910	18.2
1.0535	13.2	1.4905	18.4
1.5030	13.4	1.4900	18.6
1.5025	13.6	1.4895	18.8
1.5020	13.8	1.4890	19.0
1.5015	14.0	1.4885	19.2
1.5010	14.2	1.4880	19.4
1.5005	14.4	1.4876	19.6
1.5000	14.6	1.4871	19.8
1.4995	14.8	1.4866	20.0
1.4990	15.0	1.4862	20.2
1.4985	15.2	1.4858	20.4
1.4980	15.4	1.4853	20.6
1.4975	15.6	1.4849	20.8
1.4970	15.8	1.4844	21.0
1.4965	16.0	1.4829	21.5
1.4960	16.2	1.4815	22.0
1.4955	16.4	1.4802	22.5
1.4950	16.6	1.4789	23.0
1.4945	16.8	1.4777	23.5
1.4940	17.0	1.4764	24.0
1.4935	17.2	1.4752	24.5
1.4930	17.4	1.4739	25.0
1.4925	17.6	1.4726	25.5
1.4920	17.8	1.4714	26.0
1.4915	18.0	1.4702	26.5

Annexes 4 (Jean Figarella et Guy Leyral, 2001)

ID 32 STAPH V2.0	URE	ADH	ODC	ESC	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	RAF	NIT	VP	BGAL	ArgA	PAL	PYRA	NOVO	SAC	NAG	TUR	ARA	BGUR	RIB	CEL
Staphylococcus arlettae	0	0	1	100	100	[illegible]	[illegible]	100	100	100	[illegible]	[illegible]	0	0	[illegible]	0	5	0	[illegible]	100	0	[illegible]	100	99	99	0
Staphylococcus aureus	[illegible]	82	0	0	100	100	100	100	95	99	94	2	96	97	1	1	99	[illegible]	1	98	98	84	3	0	1	0
Staphylococcus auricularis	0	[illegible]	0	0	100	100	0	[illegible]	0	0	0	0	[illegible]	0	0	100	0	12	0	[illegible]	0	1	0	0	0	0
Staphylococcus capitis	10	[illegible]	0	0	97	100	86	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]	1	88	81	0	1	5	3	7	[illegible]	0	0	0	0	7	0
Staphylococcus caprae	[illegible]	99	0	0	100	99	100	[illegible]	83	75	[illegible]	0	99	87	0	0	91	[illegible]	0	0	0	1	0	0	0	0
Staphylococcus carnosus	0	100	0	0	100	100	99	0	100	90	100	0	100	0	100	0	99	[illegible]	1	0	[illegible]	0	0	0	0	0
Staphylococcus chromogenes	92	99	0	0	99	100	99	[illegible]	95	95	11	1	100	1	14	0	88	[illegible]	0	99	[illegible]	11	0	0	84	0
Staphylococcus cohnii ssp cohnii	1	0	0	0	97	100	21	83	1	90	75	0	5	75	1	0	20	1	92	0	8	1	0	5	4	0
Staphylococcus cohnii ssp urealyticum	99	0	0	1	100	100	90	99	75	100	99	0	1	[illegible]	[illegible]	0	75	75	99	0	75	0	0	99	1	0
Staphylococcus epidermidis 1	94	1	1	1	100	99	[illegible]	100	79	0	0	0	[illegible]	97	1	0	94	1	2	98	1	87	0	0	1	1
Staphylococcus epidermidis 2	86	20	13	1	100	100	[illegible]	100	[illegible]	0	0	0	90	95	1	0	6	1	1	99	9	[illegible]	0	0	1	1
Staphylococcus equorum	98	0	0	[illegible]	98	100	94	95	75	95	98	0	100	0	[illegible]	0	20	0	82	100	[illegible]	1	[illegible]	100	10	4
Staphylococcus gallinarum	100	0	0	99	100	100	100	[illegible]	96	96	86	100	1	[illegible]	[illegible]	0	100	4	[illegible]	100	100	86	100	99	1	86
Staphylococcus haemolyticus	1	91	0	1	100	77	1	100	80	97	[illegible]	0	89	95	1	0	3	98	1	99	94	[illegible]	1	[illegible]	18	0
Staphylococcus hominis 1	92	6	0	1	100	99	1	100	[illegible]	89	5	0	92	93	0	0	1	5	5	91	[illegible]	93	1	1	7	0
Staphylococcus hominis 2	81	[illegible]	0	1	100	99	75	100	94	98	1	0	94	99	0	0	94	1	6	99	13	99	1	0	6	0
Staphylococcus hyicus	[illegible]	100	0	0	100	100	100	0	96	100	0	0	100	4	0	0	100	1	0	99	99	1	1	96	96	0
Staphylococcus intermedius	99	[illegible]	0	0	100	100	100	100	99	94	[illegible]	0	99	18	99	1	99	88	1	99	100	3	1	0	99	0
Staphylococcus kloosii	[illegible]	0	0	1	99	100	0	[illegible]	89	96	5	0	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]	[illegible]	98	5	5	0	[illegible]	[illegible]	[illegible]	0
Staphylococcus lentus	7	0	0	100	100	99	100	85	99	100	100	100	5	1	0	[illegible]	[illegible]	10	[illegible]	100	80	[illegible]	[illegible]	0	[illegible]	100
Staphylococcus lugdunensis	[illegible]	1	100	0	100	99	94	38	[illegible]	94	1	0	99	99	1	0	1	99	1	100	76	1	0	0	1	0
Staphylococcus saprophyticus	97	0	0	0	99	99	0	100	93	100	84	0	4	99	93	0	4	[illegible]	93	99	[illegible]	85	0	1	0	0
Staphylococcus schleiferi	0	97	0	0	100	80	100	0	3	[illegible]	0	0	89	97	[illegible]	0	100	[illegible]	0	0	[illegible]	0	0	0	0	0
Staphylococcus sciuri	0	0	0	100	100	100	100	99	[illegible]	95	100	0	99	1	1	0	[illegible]	0	[illegible]	86	82	75	[illegible]	[illegible]	80	75
Staphylococcus simulans	90	99	0	0	100	100	[illegible]	8	97	97	0	0	95	18	79	0	2	82	5	94	90	0	1	[illegible]	21	1
Staphylococcus warneri	94	[illegible]	0	0	99	99	14	98	19	93	[illegible]	0	[illegible]	92	0	0	0	1	4	100	10	[illegible]	0	1	[illegible]	16	0
Staphylococcus xylosus	85	0	0	[illegible]	100	100	76	90	88	90	89	1	89	[illegible]	88	0	83	[illegible]	85	99	89	[illegible]	[illegible]	89	19	10
Stomatococcus mucilaginosus	8	0	0	[illegible]	92	100	100	1	92	0	0	100	100	25	92	[illegible]	75	8	92	0	92	8	0	8	0	0
Aerococcus viridans	0	0	0	[illegible]	100	100	100	78	90	[illegible]	[illegible]	0	18	0	0	0	[illegible]	[illegible]	100	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	4
Dermacoccus nishinomiyaensis	0	10	0	1	10	0	0	0	10	1	0	0	0	1	0	0	0	[illegible]	10	0	0	0	0	[illegible]	0	0
Kocuria kristinae	0	0	0	0	100	100	100	87	20	99	0	0	0	13	20	7	7	93	[illegible]	0	0	0	0	[illegible]	0	0
Kocuria rosea	[illegible]	0	0	0	1	[illegible]	0	0	0	0	0	100	0	1	[illegible]	0	0	0	0	0	0	0	[illegible]	[illegible]	0	0
Kocuria varians	100	0	0	0	100	[illegible]	0	0	20	0	0	80	0	90	0	0	10	0	1	0	0	0	[illegible]	[illegible]	0	0
Micrococcus luteus	[illegible]	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0	1	92	10	[illegible]	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micrococcus lylae	0	11	0	1	0	11	0	0	0	1	0	0	11	0	1	0	[illegible]	0	0	11	11	0	0	0	0	0