

N° d'Ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V)

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé du thème :

**Etude du pouvoir antimicrobien des huiles
essentielles de Marrube blanc dans la région d'EL
BAYADH sur les souches microbiennes impliquées
dans les infections urinaire.**

Présenté par : M^{elle} Rezini Chahrazad


M^{elle} Dib Mabrouka

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de:

M ^r MARROKI. A	MCA	UDL-SBA	Présidente
M ^{me} BOUSMAHA.L	MCA	UDL-SBA	Examineur
M ^{elle} KANOUN. K	MCA	UDL-SBA	Encadreur
M ^{elle} BOUYAKOUB.N	Doctorante	UDL-SBA	Co-Encadreur

Année universitaire 2019 - 2020

Session : « 28 /09/2020.



Je tiens à remercier,

*Nous apportons toutes nos gratitude au bon Dieu
le tout puissant de nous avoir donné le courage et
l'énergie durant notre formation.*

*Notre gratitude s'adresse à **M^{me} KANOUN. K** pour son encadrement, son orientation, ses conseils et la disponibilité qu'elle nous a témoignée pour nous permettre de mener à bien ce travail.*

*Nous souhaitons témoigner nos remerciements tout aussi sincères aux membres de jury
M^r MARROKI. A et **M^{me} BOUSMAHA. L** d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.*

*Nous remercions **M^{elle} BOUYAKOUB. N** pour ses précieux conseils, sa confiance, sa patience qui ont constitué un apport considérable pour nous durant tout le déroulement de cet travail.*

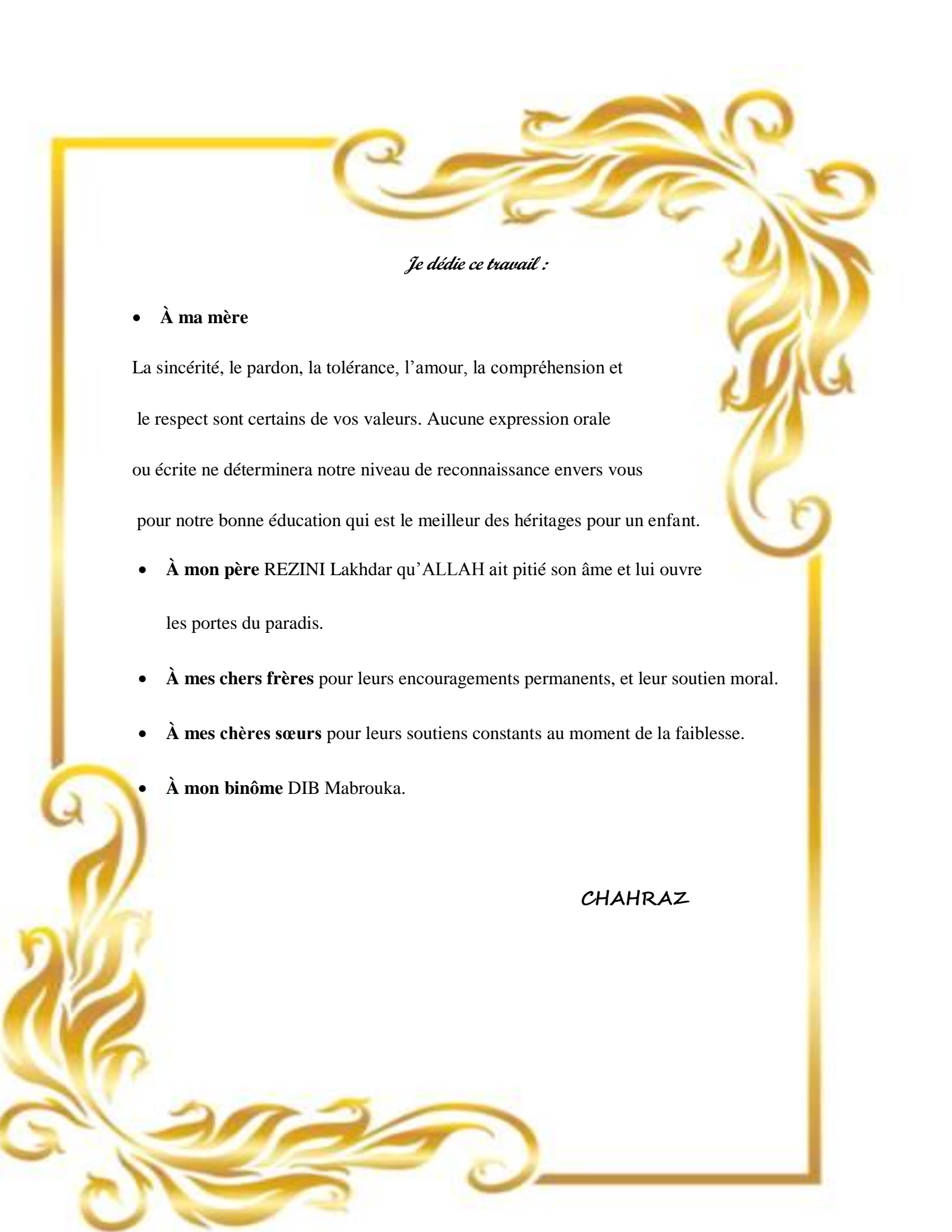
Nos remerciements s'étendent également à tous

nos enseignants durant les années des études.

***Enfin** Nous remercions tous ceux qui*

nous ont aidé de près ou

de loin à réaliser ce travail



Je dédie ce travail :

- **À ma mère**

La sincérité, le pardon, la tolérance, l'amour, la compréhension et le respect sont certains de vos valeurs. Aucune expression orale ou écrite ne déterminera notre niveau de reconnaissance envers vous pour notre bonne éducation qui est le meilleur des héritages pour un enfant.

- **À mon père** REZINI Lakhdar qu'ALLAH ait pitié son âme et lui ouvre les portes du paradis.

- **À mes chers frères** pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

- **À mes chères sœurs** pour leurs soutiens constants au moment de la faiblesse.

- **À mon binôme** DIB Mabrouka.

CHAHRAZ



Dédicace

Je dédie ce mémoire

À l'âme pure de mon père

À ma mère et mon frère

Pour leurs patiences, leurs amours, leurs soutiens et leurs encouragements

*À **mon binôme** REZINI Chahrazad.*

À toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin.

Dib Mabrouka

Résumé

Résumé

Les plantes médicinales sont utilisées depuis longtemps pour traiter de nombreuses maladies humaines, contiennent de molécules de valeur thérapeutique telle que, les huiles essentielles

Notre objectif est d'extraire les huiles essentielles, d'une plante très utilisée quotidiennement dans la plupart des régions du monde ; *Marrubium vulgare L* et tester *in-vitro* leur pouvoir antibactérien vis-à-vis des souches pathogènes responsables des infections urinaires.

L'huile essentielle issue de la partie aérienne a été extraite par l'hydro distillation, et le rendement devrait être calculé, puis l'huile obtenue sera conservée à + 4°C dans des flacons hermétiques.

Enfin les huiles essentielles de *Marrubium vulgare L* confirment l'effet inhibiteur, et présentent un spectre d'activité large selon les résultats des différents chercheurs.

Mot clés : *Marrubium vulgare L*, les huiles essentielles, l'activité antibactérienne, l'infection urinaire.

Abstract

Abstract

Medicinal plants have long been used to treat many human illnesses, and contain molecules of therapeutic value such as essential oils.

Our aim is to extract essential oils from a plant that is widely used daily in most parts of the world; *Marrubium vulgare L* and test their antibacterial power in vitro against the pathogenic strains responsible for urinary tract infections.

The essential oil from the aerial part has been extracted by hydrodistillation and the yield will be calculated.

Finally, the essential oils of *Marrubium vulgare L* confirm the inhibitory effect and present a wide spectrum of activity.

Key words: *Marrubium vulgare L*, Essential oils, antibacterial activity, urinary tract infections.

ملخص

تستخدم النباتات الطبية منذ فترة طويلة لعلاج العديد من الأمراض التي تصيب الإنسان وتحتوي على جزيئات ذات قيمة علاجية مثل الزيوت الأساسية

هدفنا هو استخراج الزيوت الأساسية من نبات يستخدم على نطاق واسع يوميًا في معظم أنحاء العالم. المربوية واختبار قوتها المضادة للبكتيريا في المختبر ضد السلالات المسببة للأمراض المسؤولة عن التهابات المسالك البولية.

تم استخلاص الزيت العطري من الجزء الجوي بالتقطير المائي وسيتم حساب العائد. التأثير المثبط وتظهر مجموعة واسعة من النشاط *Marrubium vulgare L* أخيرًا ، تؤكد الزيوت الأساسية/

الكلمات المفتاحية: *Marrubium vulgare L*, الزيوت الأساسية, التهاب المسالك البولية.

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Résumé.....IV

Abstract.....IV

ملخص.....IV

Liste des abréviations.....IV

Liste des figures.....IV

Liste des tableauxIV

Introduction.....1

Partie Bibliographique

Chapitre I : *Marrubium vulgare L*

1- Les plantes médicinales..... 2

1.1. Définition des plantes médicinales.....2

1.2. Historique2

2. Généralité sur les lamiacées..... 2

3. La plante étudiée : *Marrubium vulgare L*..... 3

3.1. Généralités.....3

3.2. Définition3

3.2. Nomenclature et taxonomie (classification et nom vernaculaire).3

3.3. Distribution dans le monde4

3.4 .Description botanique4

3.5. Composition chimique4

3.6 .Usages traditionnels4

a. Usages externes5

Table des matières

Chapitre II : Les huiles essentielles

1. Définition	6
2. Les propriétés des huiles essentielles	6
3. Composition chimique	7
3.1. Composés d'origines diverses.....	7
4. Rôles des HE physiologiques et écologique	7
5. Activités biologiques des HE.....	8
5.1. Activité antimicrobienne	8
5.2. Activité antioxydants.....	8
6. Techniques d'extraction.....	9
6.1. L'hydro distillation.....	9
7. Conservation des HE.....	9
8. Domaines d'utilisations	9
8.1. En pharmacie.....	9
8.2. En cosmétologie	10
8.3. En agro-alimentaire	10

Chapitre III : Les infections urinaires

1. Définition de l'urine	11
2. Les infections urinaires	11
2.1. Les types des infections urinaires	11
2.1.1. La cystite :	11
2.1.2 L'urétrite infectieuse	11
2.1.3. La pyélonéphrite.....	12

Table des matières

2.1.4. Prostatite	12
3. Diagnostic de l'infection urinaire	12
3.1. Diagnostic par les Bandelettes urinaires.....	12
4. L'examen cytbactériologique des urines	13
4.1. Les étapes de l'examen cytbactériologique des urines	13
4.1. A. Le prélèvement.	14
2.Antibiorésistance	16
2.1.Nature des résistances aux antibiotiques	16
Partie Expérimentale	
Chapitre IV :Matériel et Méthodes.....	1
Objectif.....	17
2. Prélèvement et identification des souches pathogènes responsables des infections urinaires.....	17
2.2. Examen cytbactériologique des urines.....	17
2.2.1. Examen macroscopique.....	17
2.2.2.Examen microscopique	17
3. l'extraction des Huiles essentielles.....	20
3.1. Le matériel végétal	20
3.1.1. La zone d'étude	20
3.1.2. Récolte de la plante :	20
3.1.3 Le séchage	20
3.2. L'hydro distillation :	21
3.2.1. Mode opératoire :	21
4. Étude microbiologique	22

Table des matières

4.1. Souches bactériennes testées	22
4.2. Préparation des suspensions bactériennes :	22
4.3. Méthode d'étude de l'activité antibactérienne :	22
4.3.1. Préparation des dilutions de l'HE	22
4.3.2. Méthode de diffusion sur disque (l'aromatogramme)	23
4.3.3. Lecture de l'aromatogramme	24
Chapitre IV : Résultat et Discussion	
1. Analyse des articles	25
Conclusion	28
Référence Bibliographique	29
Annexes.....	34

Liste des abréviations

- ADH** : Arginine Dihydrolase.
- AFNOR**: Association Française de Normalisation.
- API 20E** : Analytic Profil Index 20 entérobactéries.
- DO**: Densité Optique
- E. Coli** : *Escherichia coli*.
- ECBU** : Examen Cytobactériologique des Urines.
- GN** : Gélose Nutritive.
- HE**: Huile Essentielle.
- H₂S** : Sulfure d'hydrogène.
- IU** : Infection Urinaire.
- J.C** : Jésus Christ
- LDC** : Lysine Décarboxylase.
- MH** : Milieu Mueller-Hinton
- ml**: Millilitre
- nm**: Nanomètre
- ODC** : Ornithine Décarboxylase.
- PH** : Potentiel d'hydrogène.
- TDA** : Tryptophane Désaminase.
- URE** : Urée.
- VP** : Voges-Proskauer.
- CHU** : Centre Hospitalier Universitaire.

Liste des figures

Figure.01 : <i>Marrubium vulgare. L</i> .	3
Figure .02: Appareillage utilisé pour l'hydro distillation des HE.	9
Figure. 03 : Forme topographique de types d'infection urinaire.....	12
Figure. 04 : Schéma récapitulatif des différentes étapes des l'ECBU .	13
Figure. 05: <i>Marrubium vulgare L</i> (photo prise par les étudiantes)	20
Figure. 06: Montage d'hydro distillation employé pour l'extraction de l'HE	21
Figure. 07 : Schéma représentatif l'aromatogramme.	23
Figure. 08 : Matériel utilisé au laboratoire de Microbiologie	34
Figure .09: Milieu M-H	34
Figure. 10 : Gélose nutritive.....	34
Figure. 11 : Galerie API20E	35
Figure. 12: Flacon hermétique contenant les bandelettes	36

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau. 01: La position systématique de <i>Marrubium vulgare</i> . <i>L.</i>	3
Tableau.02: Aspect des urines chez les sujets normaux et malades	11
Tableau.03: Seuil de significativité en fonction du type de bactérie	15
Tableau. 04: Les dilutions des HE utilisées	23
Tableau.05: Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i> . <i>L</i>	25
Tableau. 06: Zones d'inhibition de la croissance (mm) de souches bactériennes sur milieu M H	26
Tableau. 07: Zones d'inhibition de la croissance (mm) de souches bactériennes sur milieu Sabourand..	26
Tableau. 08: Lecture de la galerie API 20E.....	35

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité comme remèdes pour le traitement de diverses maladies, parce qu'elles contiennent des composants riches en principes thérapeutiques, ce sont les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes de la plante.

L'utilisation des huiles essentielles remonte aux plus anciennes civilisations :

Tout d'abord dans l'Orient et le Moyen-Orient, et par la suite au nord de l'Afrique et en Europe.

Dans l'histoire moderne, les vertus thérapeutiques des huiles essentielles occupent une place de plus en plus importante. Aujourd'hui, elles sont très recherchées, car elles sont généralement dotées de propriétés biologiques intéressantes.

Actuellement, l'antibiorésistance a conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales.

De notre part, nous avons choisi d'étudier l'espèce *Marrubium vulgare*. L en fixant comme principaux objectifs, l'extraction des huiles essentielles ainsi que, l'évaluation de leurs activité antimicrobienne vis-à-vis des souches pathogènes prélevées, identifiées et responsables des infections urinaires.

Notre étude est articulée autour de trois parties :

- La première est consacrée à la revue bibliographique.
- La deuxième présente les installations expérimentales et méthodes d'identifications des souches pathogènes, méthodes d'extraction des huiles essentielles et l'aromatogramme.
- La troisième illustre l'analyse des articles scientifiques.

Enfin nous clôturons ce mémoire par une conclusion qui décrit le travail réalisé.

Partie

Bibliographique

CHAPITRE I
MARRUBIUM
VULGARE L

1- Les plantes médicinales

1.1. Définition des plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des plantes dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (El Sayed, 1993). Elles sont impliquées dans différents secteurs sous formes de principes actifs, des huiles, des extraits, des solutions aqueuses ou organiques ou même telles qu'elles sont (Faraj Atiyat, 1995). Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne, ou il y'a environ 35000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales (Elqaj *et al.*, 2007).

1.2. Historique

Les plantes médicinales sont utilisées depuis longtemps pour traiter de nombreuses maladies humaines, contiennent de molécules de valeur thérapeutique, ce qui a été confirmé par la présence preuve très ancienne de l'utilisation des plantes médicinales ; le 1^{er} livre médical " Shen Nung", Ben caojing a écrit: "une étude des plantes médicinales de l'empereur " Shen Nung", vers 2900-4000 avant J.C. Les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient également les plantes traitant environ 600 comprimés d'argile 1000 plantes rapportées pour leurs propriétés curatives et plus de 800 traitements reconnus par les Egyptiens (Fouché *et al.*,2000).

2. Généralité sur les lamiacées

Les Labiées ou *Lamiaceae* constituent une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones herbacées ou légèrement ligneuses, comprennent, selon les auteurs, de 233 à 263 genres et de 6900 à 7200 espèces (Grayer *et al.*, 2003 ; Heywood *et al.*, 2007), qui se répartissent sur tout le globe. C'est une famille très importante en Algérie, représentée par 28 genres et 146 espèces.

La plupart des plantes de cette famille sont partiellement ligneuses, formant des arbustes (très rarement des arbres), c'est la famille des aromatiques utilisées tant en cuisine qu'en parfumerie ou en pharmacie ; également, comme par exemple le basilic, la bugle, l'hysope, la lavande, la marjolaine et la mélisse etc. ...).

Il s'agit d'une vaste famille, très typique du monde végétal, qui possède une importance économique due à la production des huiles essentielles et de miel (les miels de lavande et de romarin sont réputés). Cette famille est très répandue dans les régions tempérées et surtout méditerranéennes) (Guignard, 2001).

3. La plante étudiée : *Marrubium vulgare. L*

3.1. Généralités

Marrubium vulgare. L est une espèce de la famille des lamiacées (Sahpaz *et al.*, 2002). Le Marrube blanc est largement distribué dans les régions de la Méditerranée et de l'Asie et comprend environ 30 espèces, elle était déjà reconnue pour ses propriétés apaisantes contre la toux et comme antidote contre plusieurs poisons (Karioti *et al.*, 2003).

3.2. Définition

Le marrube blanc est une plante méditerranéenne, au feuillage vert gris duveteux, vivace herbacée, laineuse dans la partie inférieure ; ces feuilles sont opposées, ovales, gaufrées et à pétiole court ; ses fleurs sont blanches bilabiées et serrées les unes contre les autres à l'aisselle des feuilles supérieures (Hensel, 2009). C'est une belle plante ornementale qui mérite de retrouver une place dans nos jardins (Josy, 2012).



Figure. 01 : *Marrubium vulgare. L* (Haratymand *et al.*, 2017).

3.2. Nomenclature et taxonomie

Depuis l'Antiquité, le *Marrubium vulgare.L* est déjà reconnu pour ses propriétés curatives, il a donc été classé selon la méthode suivante :

Tableau .01 La position systématique de *Marrubium vulgare. L* (Judd *et al.*, 2002)

Règne	Végétale
Embranchement	Angiospermes
Famille	Lamiacées
Genre	Marrubium
Espèce	<i>Marrubium vulgare. L</i>

Le nom vernaculaire : Il existe des nombreuses langues et les dialectes diffèrent selon chaque pays ou région, donc les noms des choses diffèrent, mais le nom scientifique reste le séparateur.

- **Nom en français** : Marrube blanc (Quezel et Santa, 1962).
- **Nom scientifique** : *Marrubium vulgare. L*
- **Nom en Arabe** : Marrioua (Al Kadi, 1989).
- **Nom Marocain** : Merrîwt (Novak *et al.*, 1996).
- **Nom en Anglais** : Harehound (Quezel et Santa, 1962).

3.3. Distribution dans le monde

Le marrube est une plante connue dans de nombreux endroits du monde, car elle pousse dans presque toutes les régions d'Europe, d'Afrique du Nord et de la région méditerranéenne, ainsi qu'en Asie, et elle a été naturalisée en Amérique du Nord et du Sud (Bonnier, 1909).

3.4. Description botanique

Le Marrube est une plante herbacée, aux feuilles ovales, arrondies et souvent en forme de cœur sur des tiges dressées, avec une texture douce ou cotonneuse, ainsi que des boutons courts et des petites fleurs blanches (Quezel et Santa, 1963).

3.5. Composition chimique

On y trouve des diterpènes amers de la série furaniques et surtout des composés de lactones : marrubiine principalement et son préfuranique, la prémarrubiine, mais aussi du pérégrinol, du vulgareol, du marrubénol et du marrubiol.

Il y a également des hétérosides flavoniques du quercétol, de la lurtéoline ou de l'apigénine, mais aussi des lactoylflavones, et quelque dérivé de l'acide ursolique.

En outre il y a des tanins spécifiques des lamiacées et dérivé de l'acide hydroxycinnamique (juste à 7 %) (Acide chlorogénique, caféique, caféylquinique, mais absence d'acide rosmarinique). Toutefois la présence d'une faible quantité des HE comportant différents composés monoterpéniques (moins de 1% : α -pinène, camphène et lomonéne) (Wichtl et Anton, 2003).

3.6. Usages traditionnels

Depuis l'Antiquité, les plantes ont été utilisées comme alternative aux médicaments industriels et le Marrube est utilisé de différentes manières, notamment en le faisant bouillir pour être utilisé comme bain de bouche ou en inhalant contre le rhume et le nez qui coule, est

utilisé également comme antitussif ainsi que ,comme réducteur de fièvre (**Krasnov et al., 2009**).

a. Usages externes

- Dans certaines régions du Maroc, le marrube est mâché contre les maux de dents.
- La décoction est également employée en rinçage sur les cheveux pour les embellir et des cataplasmes de la plante, sont appliqués sur les taches de rousseur pour les éclaircir (**Dusser, 2017**).

CHAPITRE II

HUILES

ESSENTIELLES

1. Définition

Les huiles essentielles aussi appelées huiles volatiles, sont des métabolites secondaires produits par les plantes aromatiques pour combattre les infections et les parasites, elles sont synthétisées en réponse à des conditions de stress. L'organisme de normalisation AFNOR a défini les huiles essentielles comme un « produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation à sec.

Les huiles essentielles sont ensuite séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques (**Ultee *et al.*, 2002**).

Selon la Commission de la Pharmacopée Européenne, une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (**Vangelder, 2017**).

2. Propriétés des huiles essentielles

D'après (**Bruneton, 1999**) ; les HE forment un groupe très homogène caractérisé par les propriétés physiques suivantes :

- Les HE sont des substances liquides à température ambiante, elles sont incolores ou jaunes.
- Leur densité est inférieure à celle de l'eau.
- Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation.
- Elles sont solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques, mais peu solubles dans l'eau.
- Le point d'ébullition se situe entre 60° C et 240° C.
- Elles perdent rapidement leurs propriétés quand elles sont exposées à la chaleur ou même à la lumière.

3. Composition chimique

Les HE ont une composition assez complexe. On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (en C5) et comprennent les monoterpènes en (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C 20) et les triterpènes en (C 30). Ils ont la même origine métabolique. Ces terpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. En général, une HE est un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. Parmi ces composés oxygénés, on peut noter la présence d'alcools, d'esters, d'aldéhydes, de cétones, d'éther-oxydes et de carbures.

A l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives) importantes ayant conduit à admettre l'existence de races chimiques (exemple : *Thymus* à thymol, à geraniol, à carvacrol, à linalol), et parmi les nombreux constituants d'un HE, l'un domine généralement ; on l'appelle composé majoritaire. La composition chimique des HE varie encore de façon appréciable avec le milieu et la période de la végétation. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extraction ou durant la conservation (**Rhayour, 2002**).

3.1. Composés d'origines diverses

Ce sont des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles entraîna- bles par vapeur d'eau. Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras, de terpènes, les HE peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraîna- bles lors de l'hydro distillation carbure, acide (C₃ – C₁₀), produits azotés ou soufrés (**Carole, 2013**).

4. Rôles des HE physiologiques et écologique

On parle beaucoup de rôle d'HE, de nombreuses plantes produisent des HE sous forme de métabolites secondaire, mais son rôle exact dans les processus de la vie végétale est inconnu (**Rai et al., 2003**).

Certes, plusieurs effets " bénéfiques " évidents ont été décrits : protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux (**Guidah, 2003**). En phytothérapie, les HE sont utilisés pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne (**Billerbeck et al., 2002**).

Les huiles essentielles ont un rôle environnemental là où on les trouve, les terpénoïdes qui font partie de leurs principaux composants, ayant un rôle environnemental lors des réactions végétales, tels que agents allélopathiques, c'est-à-dire inhibiteurs de germination. Il participe également, par ses senteurs distinctives, à attirer les pollinisateurs (**Ceccherli et al., 2003**).

5. Activités biologiques des HE

5.1. Activité antimicrobienne

Les HE peuvent aider à combattre les infections grâce à leur pouvoir antiseptique, elles peuvent également être utilisées pour nettoyer l'air ambiant ou les systèmes de ventilation réduisant des spores microbiennes (**De billerbeck, 2007**).

La preuve scientifique de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles a peu d'efficacité contre divers agents pathogènes (y compris les bactéries et les champignons), affectant les humains, les animaux, et les plantes.

Le pouvoir antimicrobienne des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus L* (chimiotype à citral) et de *Cymbopogon nardus L* (chimiotype à citronellal / géranol) a été étudié *in vitro* sur plusieurs souches fongiques (*Microsporiumcanis*, *Conidia albicans*, *Aspergillus fumigatus*) responsables d'infection mixtes chez le chien et le chat. Les résultats ont montré une activité fongistatique très importante permettant l'usage de ces huiles à des fins vétérinaires (**Kobak et al., 2004**).

Les huiles essentielles de *Calocedrus macrolepis var. formosana* (chimiotype à α -cadinol) ont été révélées actives vis-à-vis de deux agents fongiques (*Pestalotiopsis funerea*, *Fusarium solani*) pathogènes des plantes (**Chang et al., 2008**).

5.2. Activité antioxydants

Toute substance présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, qui est capable de retarder, prévenir, neutraliser ou de réduire les dommages de l'oxydation causés par les radicaux libres dans l'organisme, et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques (**Vansant, 2004**).

6. Techniques d'extraction

6.1. L'hydro distillation

Selon (Hernandez, 2005), l'hydro distillation est la méthode la plus employée pour extraire les HE (Figure .02). Cette méthode consiste à immerger directement la partie de la plante à extraire dans l'eau chauffée, jusqu'à l'ébullition pendant 3h. L'huile essentielle s'évapore avec la vapeur d'eau. Ces dernières sont alors condensées à l'aide d'un réfrigérant.

Le distillat est ensuite récupéré dans un erlenmeyer. L'eau et les molécules aromatiques sont hétérogènes du fait de leurs différences de densité et se séparent, après décantation en une phase aqueuse et une phase organique (l'HE) (Festy, 2011).

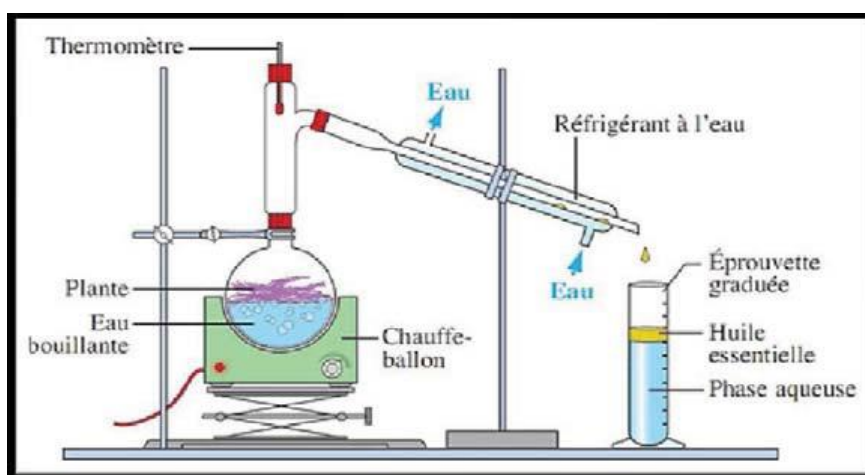


Figure. 02 : Appareillage utilisé pour l'hydro distillation des HE (Hernandez, 2005).

7. Conservation des HE

Les HE sont des substances très délicates et facilement périssables, ceux qui les rendent difficiles à entretenir. Donc, elles sont placées dans du verre teinté ou entourées avec de l'aluminium pour éviter l'exposition à la lumière (Bekhechi *et al.*, 2010).

8. Domaines d'utilisations

8.1. En pharmacie

Les médicaments à base d'HE peuvent être utilisés pour leurs actions physiologiques, notamment pour la préparation d'infusion (menthe, mélisse, verveine, camomille, et fleurs d'oranger) et sous forme de dose unique. Ils sont utilisés pour isoler certains composants (eugénol, anéthol et pinènes) dont certains peuvent avoir un bénéfice médicinal (en particulier dans le domaine des désinfectants externes). Il est à noter que la majorité des HE sont lipophiles, par conséquent, elles sont rapidement absorbées par les poumons, la peau ou le tube digestif. Il faut donc être particulièrement vigilant (Brunton, 1999).

8.2. En cosmétologie

L'utilisation des HE dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydant, tout en leur assurant leur odeur agréable (**Rhayour, 2002**).

8.3. En agro-alimentaire

En vertu de leurs propriétés pharmaceutiques et cosmétologiques, les HE sont utilisés quotidiennement en cuisine car elles sont considérées comme un arôme alimentaire, à la fois en secteur des senteurs salées et sucrées (**Fernandez et Chemat, 2012**).

CHAPITRE III
LES INFECTIONS
URINAIRES

1. Définition de l'urine

L'urine est un liquide organique de couleur jaune ambrée, d'odeur safranée acide (Zomahoun, 2004), il se compose de divers éléments, dont l'eau, les sels minéraux, la matière organique à l'état naturel (Yabifoua, 2006).

L'urine varie en couleur, en odeur et en viscosité entre une personne en bonne santé et une personne malade, et c'est ce que nous remarquons dans le (Tableau.02).

Tableau. 02 : Aspect des urines chez les sujets normaux et malades (Richet, 1988).

Aspects des urines	État normal	État pathologique
Couleur	Jaune citron plus ou moins foncé.	Jaune orange : patient fiévreux Rouge : présence d'hémoglobine. Brun verdâtre : présence de pigments biliaires. Noir : anomalie enzymatique congénitale.
Odeur	Difficile à définir	Acétonique : diabète Fétide : fièvre grave, cancer du rein et de la vessie.
Transparence	Claire	Trouble : présence de pus.
Viscosité	Légèrement supérieur à celle de l'eau.	Modification par présence de pus, protéines et graisses.

2. Les infections urinaires

On parle d'une infection urinaire en présence d'une bactérie pathogène dans l'urine (Schmiemann *et al.*, 2013).

Les infections bactériennes des voies urinaires sont le type d'infection bactérienne le plus courant (Foxman *et al.*, 2000). Elle est principalement causée par les bactéries *Enterobacteriaceae*, dont en premier lieu (*E.coli*), qui représente 70 à 80% de bactéries isolées dans l'échantillon d'urine. Les groupes les plus sensibles à l'IU sont les femmes (Baerheim *et al.*, 1999).

2.1. Les types des infections urinaires

Il existe quatre types d'infections urinaires (Figure. 03).

2.1.1. La cystite :

C'est une inflammation de la vessie, elle est causé par des bactéries (Belman, 1997).

2.1.2. L'urétrite infectieuse

Si l'infection touche uniquement l'urètre, il s'agit souvent d'infection sexuellement transmissible courante chez les hommes et les femmes (Bally *et al.*, 2008).

2.1.3. La pyélonéphrite

La pyélonéphrite aiguë est potentiellement la plus sévère des infections urinaires avec fièvre (**Brochard, 2008**).

2.1.4. Prostatite

C'est une inflammation d'origine microbienne de la glande prostatique, sa fréquence augmente avec l'âge (**Badaoui, 2012**).

La (**Figure .03**) montre la présence des types d'IU présents dans les organes internes humains.

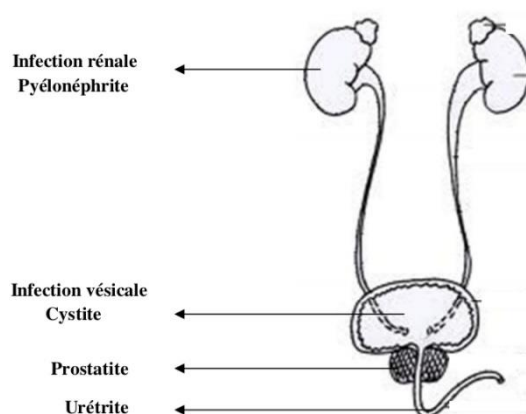


Figure. 03 : Forme topographique de types d'infection urinaire (**Moreddu, 2007**).

3. Diagnostic de l'infection urinaire

3.1. Diagnostic par les Bandelettes urinaires

C'est le premier examen facile et rapide à réaliser (**Vorkauffer, 2011**). Il permet la détection simultanément et rapidement la présence de leucocytes et de bactéries sur des urines (**Denis et al., 2011**).

La présence de leucocytes se traduit par, l'excrétion d'une enzyme, le leucocyte estérase.

Ce leucocyte estérase réagit avec la bandelette lorsque la leucocyturie est supérieure à 10/mm³ (104/ml). La mise en évidence des bactéries utilise la présence des nitrates. Seules les bactéries possédant un nitrate réductase sont capables d'élaborer des nitrites dans les urines. Il s'agit des *Entérobactéries*, responsables de la grande majorité des IU. En revanche, les Coccis à Gram positif et les bacilles à Gram négatif aérobies stricts, comme le bacille pyocyanique, sont dépourvus de cette enzyme. Pour que ces réactions se positivent correctement, il est nécessaire de laisser les urines stagner dans la vessie pendant au moins 2 à 3h (**Cavallo et al., 2003**).

4. L'examen cyto bactériologique des urines

L'ECBU est l'examen de biologie médicale le plus utilisé pour détecter une infection urinaire, en déterminant notamment la numération des hématies, des leucocytes, des bactéries et la présence ou non de cristaux et de germes dans l'urine. Ce test permet aussi l'identification des bactéries en cause, et leur sensibilité aux antibiotiques (**Bonacorsi, 2011**).

➤ Objectifs de l'examen :

La réalisation correcte d'un ECBU nécessite de répondre aux quatre objectifs suivants :

- ✓ Permet de détecter une infection urinaire.
- ✓ Connaître les principales espèces microbiennes responsables d'infection du tractus urinaires afin de mieux les identifier.
- ✓ Connaître les différents antibiotiques utilisables dans l'infection du tractus urinaires afin de composer le meilleur antibiogramme.
- ✓ Permet de contrôler l'efficacité du traitement (**Benzaid, 2016**).

4.1. Les étapes de l'examen cyto bactériologique des urines

Le test est soumis à plusieurs étapes, ces dernières sont illustrées dans le schéma suivant :

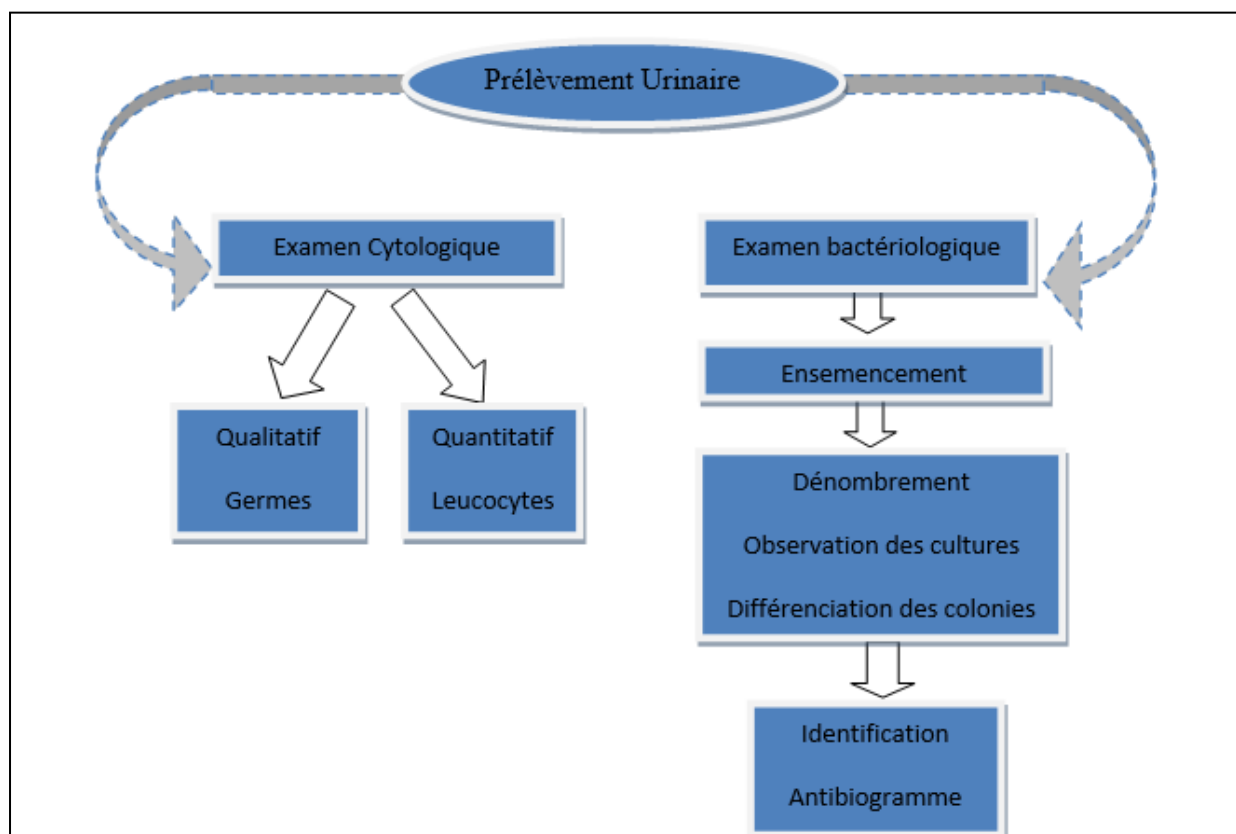


Figure.04 : Schéma récapitulatif des différentes étapes d'ECBU (**Bougattoucha et al., 2010**).

4.1. A. Le prélèvement.

Le prélèvement est le premier point critique susceptible d'influer sur le résultat de l'ECBU, du fait de la présence d'une flore commensale, colonisant l'urètre et les voies génitales externes (**Benali, 2010**). Il y a des conditions particulières pour recueillir l'urine, explique le docteur romain Troalen :

- il doit être réalisé avec les premières urines du matin, ou au moins après 4 h sans uriner.
- Il faut également respecter des règles d'hygiène, pour ne pas contaminer l'urine avec des bactéries de l'extérieur.
- Recueillir l'urine ayant séjourné suffisamment longtemps.
- Analyse dans les 2h qui suivent le prélèvement (si cela n'est pas possible), si non l'échantillon doit être conservé au réfrigérateur à + 4 C° pendant au maximum 2h (**Ketz, 2016**).

4.1. B. Examen macroscopique.

L'examen macroscopique de l'urine permet d'apprécier :

- L'aspect peut être limpide, louche, trouble.
- La couleur peut être jaune pâle, ambrée, hématique ou colorée par les médicaments.
- La présence de sédiments et leur abondance donne un aspect floconneux, cristallin blanchâtre (phosphate), rouge brique (acide urique) ou rose (**Traiget, 2017**).

4.1. C. Examen microscopique.

1. Examen cytologique

On procède à une homogénéisation des urines. La numération des éléments figurés (leucocytes, hématies, cellules épithéliales, cylindres, cristaux...etc) se fait dans une cellule calibrée (**Ouedraogo, 1997**).

2. Examen bactériologique

2. 1. Bactériurie

C'est un examen qui est nécessaire en cas d'infection récurrente, qui permet une évaluation de la quantité des bactéries présentes dans l'urine, et cela est indiqué dans le (**Tableau.03**).

Tableau.03 : Seuil de significativité en fonction du type de bactérie (Bellal et Benzaid, 2016).

Espèces bactériennes	Seuil de significativité	Sexe
<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	10 ³ UFC/ml	Homme ou femme
Entérobactéries autres tel qu' <i>E. coli</i> , <i>Entérocoque</i>	10 ³ UFC/ ml	Homme
<i>Corynebacterium urealyticum</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁴ UFC/ml	Femme

2. 2. Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de diviser le monde des bactéries en deux groupes distincts Gram + et Gram -. Cette coloration est toujours réalisée en routine lors des premiers examens de produits pathologiques en bactériologie médicale ; elle permet aussi d'apprécier la pureté des souches bactériennes avant toute identification (Delarras, 2007).

2. 3. Mise en culture

Les milieux de culture diffèrent selon la nature du prélèvement et les résultats de l'examen direct. Ils peuvent être : Ordinaires, enrichis ou sélectifs. La culture quantitative des urines contribue à définir l'IU (Cavallo et Garrabé, 2003).

Les milieux de culture gélosés les plus utilisés :

- Gélose Chapman pour les *Staphylocoques*.
- Gélose Drigalski ou de Mac Conkey qui permettent la croissance des bacilles Gram négatifs, les cocci Gram positive.
- Gélose au sang additionnée d'acide nalidixique et de colistine pour la croissance des cocci Gram positives.
- Gélose Sabouraud additionnée de chloramphénicol, pour la multiplication des levures (Himi, 2016).

2.4. Identification du germe

Elle est basée sur les caractères morphologiques, cultureux, biochimiques et antigéniques du germe. Dans le cas des bacilles à Gram négatif, on utilise la galerie classique ou les galeries modernes (API 20 E) (Bah-Tassou, 2004).

2. 4. L'antibiogramme

Il permet d'étudier simultanément l'activité de plusieurs antibiotiques par rapport à une souche bactérienne. On classe ainsi, en sensibles, intermédiaires et résistantes, les bactéries, vis-à-vis de l'antibiotique (Ousseini, 2002).

2. Antibiorésistance

2.1. Nature des résistances aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques des bactéries rencontrées en milieu communautaire ou en milieu hospitalier, peut être naturelle ou acquise (De Moiy *et al.*, 2001 ; Philippon, 2008).

2.1. a. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque correspond à l'insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'un genre ou d'une espèce bactérienne (Mandell *et al.*, 2009).

2.1. b. Résistance acquise

La résistance acquise correspond à l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotique. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome qui est un phénomène rare, soit par transfert d'ADN de plasmide conjugatif (transfert de l'information génétique à d'autres bactéries par conjugaison, transduction ou transformation) ou transposons (intégration de fragments d'ADN « sauteurs » soit dans le chromosome soit dans les plasmides d'autres bactéries) (Lavigne, 2007).

CHAPITRE IV
MATÉRIEL ET
MÉTHODES

1. Objectif

L'objectif principal de notre travail était de mettre en évidence un éventuel effet antibactérien des HE de la partie aérienne de notre plante *Marrubium vulgare. L* afin de tester leur activité antibactérienne vis-à-vis des souches pathogènes responsable des infections urinaires.

2. Prélèvement et identification des souches pathogènes responsables des infections urinaires

Notre travail devrait être effectué au niveau de laboratoire central de CHU de Sidi-Bel-Abbès et au niveau du laboratoire de Microbiologie Appliquée, du Département de Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, l'Université Djillali Liabés à Sidi-Bel-Abbes.

2.1. Examen cytobactériologique des urines

2.1.1. Examen macroscopique

Cet examen consiste à observer à l'œil nu s'il y a des modifications des caractères physiques de l'urine : la couleur, l'odeur, l'aspect, et aussi la différence entre l'urine normale qui a une couleur claire, aspect jaune citron et l'urine infectée qui est troublé et de couleur plus foncée.

2.2.2. Examen microscopique

Elle doit se faire en deux étapes : un examen cytologique et un examen bactériologique

A. Examen cytologique

- **Examen qualitatif**

Cet examen doit être réalisé en déposant à l'aide d'une micropipette une goutte d'urine entre lame et lamelle.

- Examiner la lame à l'état frais sous microscope optique à l'objectif x 40.
- Observer les cellules présentes dans l'urine : des leucocytes, des hématies, des polynucléaires neutrophiles.

- **Examen quantitatif**

C'est la description des différents éléments cellulaires par :

L'état frais : l'examen de l'urine entre lame et lamelle à l'objectif (×40) permet de distinguer les éléments suivants :

- **Les leucocytes :** lorsqu'elles sont intactes puisse répondre et savoir comme des disques granuleux à l'intérieur des quels, le noyau apparait plus réfringent, lorsqu'elles sont altérées, les leucocytes ont des contours irréguliers, fripés. La présence de leucocytes dans les urines est un signe d'une réaction inflammatoire.

- **Les hématies** : La présence des hématies indique, la présence d'une lésion des muqueuses de l'appareil urinaire.
- **Les cellules épithéliales** : peuvent être observées dans les urines.
- **Les bactéries** : à l'état frais on peut observer la présence de bactéries, leur forme (cocci ou bacille) et leur mobilité.

B. Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de détecter la population bactérienne. Elle nous permet de différencier entre les bactéries Gram positive et les bactéries Gram négative, et de connaître la morphologie et le mode de regroupement de ces bactéries.

❖ Mode opératoire

La coloration de Gram devrait s'effectuée en plusieurs étapes :

- Le frottis doit être réalisé à partir d'une suspension bactérienne et fixer à la chaleur par quelques passages dans la flamme du bec Bunsen.
- La lame doit être recouverte avec du violet de Gentiane pendant une minute, puis jeter le violet de Gentiane
- La lame doit être recouverte avec du Lugol pendant une minute.
- Le lugol doit être jeté et rincer à l'eau de robinet.
- La lame doit être décolorée à l'alcool, puis stopper la décoloration par un rinçage à l'eau.
- La lame doit être recouvert avec de la Fuchine, pendant 30 secondes à 1 minute.
- La lame doit être rincée et sécher entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur.
- Le frottis doit être observé sec au microscope optique (x 100).

❖ Lecture

Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif.

En revanche, les bactéries colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif.

C. Examen bactériologique

Il repose sur la recherche bactérienne après culture afin que le biologiste puisse répondre et savoir ; si l'éventuelle présence de bactéries dans l'urine, est en rapport avec une contamination souvent urétrale ou avec une infection de l'urine vésicale.

❖ Mise en culture

C'est la seule méthode qui permet une identification des micro-organismes qui présentent dans l'urine.

❖ Choix des milieux de cultures :

Les milieux utilisés doivent permettre une numération des bactéries les plus reconnues telles que, les *Entérobactéries*, *Entérocoques*, *Staphylocoques* et les *Pseudomonas* ; pour cela, l'utilisation de la gélose nutritive (GN) est préconisée.

❖ Milieux d'isolement

On utilise souvent des milieux sélectifs tels que, la gélose lactosée au Bromo Crésol Pourpre (BCP), milieu Hektoén (milieu lactosé) et le milieu Mac Conkey, qui permettent d'inhiber les bactéries à Gram positif.

❖ Technique d'ensemencement :

- Avant l'ensemencement, l'homogénéisation de l'urine par simple agitation devrait être réalisée.
- À proximité du bec Bunsen, on devrait être prélevé verticalement à l'aide d'une anse de platine stérile une goutte d'urine.
- Une goutte des urines doit être déposée sur la gélose.
- Des stries devraient être serrées à partir du point de dépôt, jusqu'à la fin de la boîte de Pétri.
- Les boîtes Pétri étaient incubées dans l'étuve à 37C° pendant 24 h.

D. Identification biochimique

Elle est basée sur des tests biochimiques afin d'identifier les bactéries responsables de l'infection urinaire (test catalase, test oxydase, galerie API20E).

E. Antibiogramme :

L'étude de la sensibilité d'une souche bactérienne aux divers antibiotiques devrait être réalisée à l'aide d'un antibiogramme.

On devrait être réalisée l'antibiogramme par la méthode de diffusion sur milieu gélosé, le milieu qui devrait être utilisé est le milieu Muller Hinton.

❖ Préparation de l'inoculum

- Une colonie devrait être prélevée parfaitement isolée à l'aide d'une pipette Pasteur
- Elle devrait être conservée dans un tube à essai contenant 2.5ml d'eau physiologique stérile.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne.

❖ Ensemencement par écouvillonnage

- Un écouvillon stérile devrait être trempé dans la suspension bactérienne.
- L'écouvillon devrait être frotté sur la totalité de la surface gélosée, (Muller Hinton) sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- À la fin, l'écouvillon devrait être passé sur la périphérie de la gélose.

❖ Application des disques

- Les boîtes devraient être séchées à température ambiante.
- Les disques devraient être appliqués de papier buvard à l'aide de pince bactériologique stériles (ampicilline, streptomycine, gentamicine, colistine, acide nalidixique, association triméthoprime / sulfaméthoxazole).
- L'incubation devrait être réalisée à 35°C pendant 18 à 24h.

3. Mode d'extraction des huiles essentielles**3.1. Matériel végétal****3.1.1. Zone d'étude**

Notre zone d'étude est la région de Ghassoul, située au sud de la ville d'El Bayadh, à environ 43 km du nord de la Willaya qui traverse une zone agricole.

3.1.2. Récolte de la plante :

Les échantillons de notre plante ont été récoltés pendant le mois de Février 2020.

3.1.3. Séchage

- La plante récupérée a été lavée plusieurs fois.
- La partie aérienne récoltée a été découpée en petits morceaux et séchée à l'ombre dans un endroit bien aéré, à une température ambiante et à l'abri de la lumière, pour préserver le maximum de l'intégrité des molécules.
- Une fois séchée, les plantes sont soumises à un broyage manuel afin d'obtenir une poudre prête à l'emploi.



Figure. 05 : *Marrubium vulgare. L* fraîche (Photo originale Rezini et Dib, 2020).

3.2. L'hydro distillation :

L'hydro distillation a été effectuée par un appareil Clevenger (**Figure .06**) au niveau du laboratoire de Chimie Organique de Département de Pharmacie de l'Université Djillali Liabés de Sidi-Bel-Abbés.

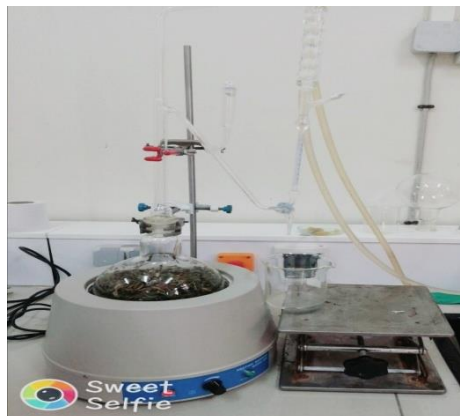


Figure. 06 : Montage d'hydro distillation employé pour l'extraction de l'HE (**Rezini et Dib, 2020**).

3.2.1. Mode opératoire :

Première étape : Préparation du matériel

- Nettoyage du système (Clevenger).
- 100g de feuilles des parties aériennes séchées de la plante étudiée ont été pesés, finement découpées dans un ballon de 1L, puis 600 ml d'eau distillée ont été ajoutés, pour éviter les débordements lors de l'ébullition à une température d'ébullition de 100°C.

Deuxième étape : l'hydro distillation

Le chauffe-ballon est placé sur un support élévateur en position haute, le système refroidissant est fixé à un support à l'aide d'une pince et à son extrémité, puis une allonge de distillation est placée.

Des clips ont été utilisés également pour maintenir assemblées les deux pièces en verre.

Faire ensuite circuler l'eau dans le réfrigérant et chauffer jusqu'à ébullition, le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon pendant 4 h.

Les vapeurs chargées d'huile essentielle et l'eau passent à travers le serpentin de refroidissement où il aura lieu la condensation puis la séparation ce qui résulte l'apparition de deux phases :

- Une phase organique : l'huile essentielle, très parfumée.
- Une phase aqueuse : (ou l'hydrolat), l'eau aromatique, légèrement parfumée ayant une densité plus élevée.

Troisième étape : la conservation de l'huile essentielle

La conservation des huiles essentielles obtenue exige certaines précautions indispensables :

- Une température adéquate.
- Conservation à l'abri de la lumière.

C'est pour cela que nous avons conservé notre HE à une température voisine de +4°C à l'abri de la lumière, enveloppée de papier d'aluminium, jusqu'à leur usage pour éviter toute dégradation.

Quatrième étape : la détermination de rendement

Le rendement de l'HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). (**Boukhatem et al., 2010**)

Le rendement est exprimé en pourcentage, il est donné par la formule suivante :

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

RHE : Rendement en huile essentielle en%. **M'** : Masse d'huile essentielle en gramme.

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en (g).

4. Étude microbiologique

4.1. Souches bactériennes testées

Les souches bactériennes qui devraient être utilisées, devraient être prélevées des urines, identifiées et conservées.

- Gram négatif : *Escherichia coli*.
- Gram positif : *Staphylococcus aureus*.

4.2. Préparation des suspensions bactériennes :

Un repiquage des souches bactériennes dans un bouillon nutritif devrait être effectué pour obtenir des cultures jeunes après incubation à 37°C pendant 18 h.

4.3. Méthode d'étude de l'activité antibactérienne :

4.3.1. Préparation des dilutions de l'HE

Pour diluer les HE, le tween 80 à 22% devrait être utilisé, puis 4 tubes de différentes concentrations devraient être préparées (25%, 50%, 75%) et le dernier qui contient l'huile pure.

Tableau 04 : Les dilutions des HE utilisées

Dilution	Quantité en μl
1 ^{ère} dilution à 25%	50 μl d'HE pure +150 μl de Tween 80
2 ^{ème} dilution à 50%	100 μl d'HE pure +100 μl de Tween 80
3 ^{ème} dilution 75%	150 μl d'HE pure +50 μl de Tween 80

4.3.2. Méthode de diffusion sur disque (l'aromatogramme)

L'évaluation de l'activité antibactérienne devrait être réalisée par la méthode de diffusion en gélose décrite par (Rhayour, 2002).

À partir d'une culture pure de 24 heures sur gélose nutritive, des suspensions de concentration équivalente au 0,5 Mc Farland ($\sim 10^8$ UFC/ml) de chacune des souches bactériennes à tester devraient être préparées.

Des disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre, qui devraient être imprégnés par un volume connu de l'huile essentielle (5, 10, 15 et 20 μl) devraient être placés à la surface d'un milieu gélosé (Agar de Muller Hinton) ; un disque imprégné d'eau distillée stérile servant de témoin négatif devrait être également déposé sur la surface de la gélose inoculée, de la même façon, un témoin positif devrait être assuré par l'utilisation d'antibiotiques appropriés.

Les boîtes de Pétri devraient être incubées par la suite à 37°C pendant 24h.

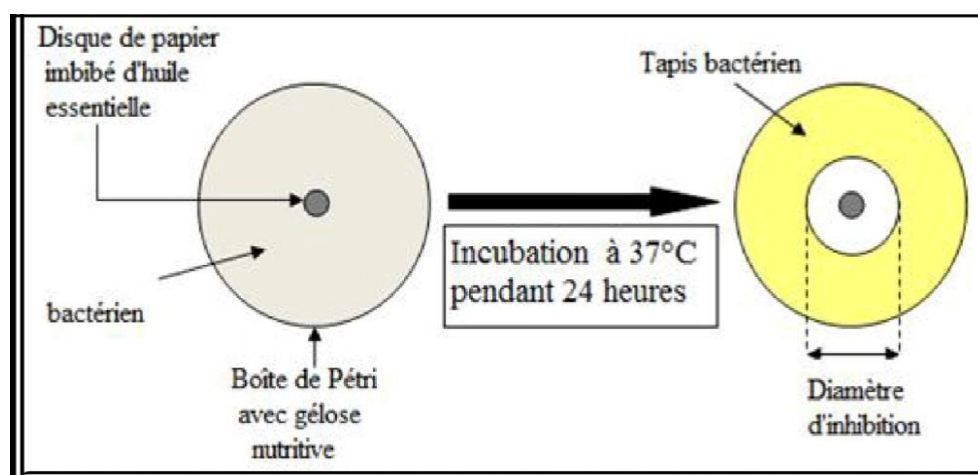


Figure. 07 : Schéma représentatif de l'aromatogramme (Rhayour, 2002).

4.3.3. Lecture de l'aromatogramme

La lecture des résultats devrait être réalisée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm. La souche ayant un diamètre :

- $D < 0.8\text{cm}$: Souches résistantes (-).
- $0.99\text{cm} \leq D \leq 1.4\text{cm}$: Souches sensibles (+).
- $1.5\text{cm} \leq D \leq 1.9\text{cm}$: Souches très sensibles (++).
- $D > 2\text{ mm}$: Souches extrêmes sensibles (+++) (**Bachiri *et al.*, 2017**).

CHAPITRE V
*RÉSULTATS ET
DISCUSSION*

1. Analyse des articles

D'après les résultats des chercheurs (**Zarai et al., 2011**), nous avons constaté que les zones d'inhibitions des HE de la plante *Marrubium vulgare. L* cultivée en Tunisie, obtenue après une hydro distillation sont définies par des diamètres allant jusqu'à 25mm pour *Staphylococcus epidermidis*.

Tableau .05 : Activité antibactérienne de l'HE de *Marrubium vulgare. L* (**Zarai et al., 2011**).

Les souches	DD	CI ₅₀	CMI
Souches bactérienne Gram +			
<i>Staphylococcus aureus</i> 1327	12 ,0±0,5	2500±50	>1100,00
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	25 ,2±0,3	2200±50	>590,00
<i>Micrococcus luteus</i>	12,0±0,5	1120±50	>560,00
<i>Enterococcus faecalis</i>	9,6±1,0	1140±10	>680,00
<i>Enterobacter cloacae</i>	13,8±0,6	1500±90	>670,00
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	18±1,0	2600±80	>1150,00
<i>Bacillus subtilis</i>	13,2±1,0	2130±50	>890,00
<i>Bacillus cereus</i>	6,6±0,4	2113±40	>950,00
Souches bactérienne Gram-			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NS	NS	NS
27853	NS	NS	NS
<i>Klebsielle pneumoniae</i>	NS	NS	NS
OMS24			
<i>Escherchia coli</i> 25922			

Par ailleurs, les travaux de (**Abadi et Hassani et al., 2013**), en Algérie ont déduit que ,les souches bactériennes testées comme (*Klebsielle pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*), ont possédé des diamètres d'inhibitions dans l'ordre suivant : 11, 10, 24 et 22 mm avec un rendement d'huile essentielle de la plante *Marrubium vulgare. L* obtenue par hydro distillation, de 0 ,04%.

Nous avons analysé d'article, qui représente l'étude de l'activité antibactérienne des flavonoïdes d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare. L*, récoltées au moment de la floraison de la region de Chafia Wilaya d'El Tarf (**Abadi et Hassani et al., 2013**).

Cette étude consiste à déterminer l'activité antibactérienne de l'extrait flavonique des feuilles vis-à-vis des souches pathogènes pour l'homme.

Certains chercheurs (**Boutlelis Djahra et al., 2011**) ont montré que, le rendement de l'extrait flavonique des feuilles de *Marrubium vulgare L*, était de 0.59g ,ce qui correspond à un pourcentage de 5.9% .Ils ont utilisés la méthode de diffusion des disques . Dans cette étude, les chercheures ont choisi des souches bactériennes pour tester : *E. coli* 1554, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus*.

Les résultats des différents tests antibactériens réalisés sur les deux milieux de cultures (MH et Sabourand) sont regroupés dans les (**Tableaux .06 et 07**).

Tableau .06 : Zones d'inhibition de la croissance (mm) de souches bactériennes sur milieu Mueller-Hinton (**Boutlelis Djahra et al., 2011**).

Souches testées	Milieu Mueller-Hinton		
	Flv	Flv1/2	Flv 1/4
<i>E. coli 1554</i>	40	38	38
<i>P.aeruginosa ATCC 27853</i>	30	34	40
<i>Staphylococcus aureus</i>	00	12	14

Tableau .07: Zones d'inhibition de la croissance (mm) de souches bactériennes sur milieu Sabourand (**Boutlelis Djahra et al., 2011**).

Souches testées	Milieu Mueller-Hinton.		
	Flv	Flv1/2	Flv 1/4
<i>E. coli 1554</i>	00	02	04
<i>P.aeruginosa ATCC 27853</i>	34	40	42
<i>Staphylococcus aureus</i>	00	04	06

Remarque :

Flv : flavonoïdes non diluées

Flv 1/2, 1/4 : flavonoïdes diluée

D'après les (Tableaux 06 et 07), il y a une grande hétérogénéité dans les résultats obtenus, l'effet antibactérien est plus ou moins important selon la nature de la souche tester.

En ce qui concerne la souche *E. coli 1554* cultivée sur milieu Sabouraud, affiche une grande résistance à l'effet des flavonoïdes (00 mm). Cette résistance est moins prononcée sur milieu MH (40 mm).

La souche *P.aeruginosa ATCC 27853* a montré des zones d'inhibitions de (30 à 40 mm) de diamètres sur MH et de (34 à 42 mm) sur Sabourand. Le pouvoir antibactérien de l'extrait sur MH est assez semblable à celui provoqué par l'antibiotique.

La souche *Staphylococcus aureus* elle semble très résistante aux flavonoïdes purs (00 mm), mais plus sensibles aux autres dilutions (12 et 14 mm sur MH, 4 et 6 mm sur Sabouraud).

Les extraits flavonoïques de *Marrubium vulgare*, ont une activité antimicrobienne satisfaisante envers des souches étudiées. La souche *P.aeruginosa* ATCC 27853 est la plus sensible lorsqu'elle est mise à l'action de ces flavonoïdes sur Sabouraud et MH. Cependant, la souche *E. coli* 1554 est la plus résistante sur milieu Sabouraud que sur MH. Le *Staphylococcus aureus* a fait preuve d'une grande performance du point de vue résistance.

.

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possèdent des propriétés biologiques très importantes, qui rencontrées dans de nombreuses applications, dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie et cosmétologie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

La région méditerranéenne a été le centre principal pour la domestication et la culture des lamiacées ; une des familles les plus répandus dans le règne végétal.

La plante *Marrubium Vulgare* .L est d'une importance en thérapie, est utilisée en médecine traditionnelle, vue les composés actifs contenus dans l'extrait brut.

Les huiles essentielles et les extraits d'hydrolats produits par les plantes aromatiques sont devenus des ressources végétales qui contribuent à une meilleure gestion et protection des ressources alimentaires.

L'infection urinaire demeure partout dans le monde une pathologie très fréquente, c'est l'un des principaux motifs de consultation, d'explorations microbiologiques et de prescription des antibiotiques avec pour cette dernière, les conséquences sur le cout des soins et du développement de résistances bactériennes.

Les résultats des différents chercheurs obtenus *in-vitro* confirme l'activité antibactérienne des HE vis-à-vis des souches pathogènes.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

A

Abdilia M., Chebbour A.H., 2012. Etude des huiles essentielles de la plante menthe piperita et tester eur effets sur un modèle biologique des infusoires. Mémoire de master : Université Constantine 1.

Al kadi ., 1989 .Usage des quelques plantes dans la médecine populaire en libie. Vol 1-2.

B

Bachiri L., Bammou M., Echchegadda G., Ibjibijen J., El Rhaffari L., Haloui Z., Nassiri L., 2017. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux espèces de Lavande .*Lavandula Dentata Spp. Dentata et Lavandula Pedunculata Spp.Pedunculata* , European Scientifie Journal July, 13 :p.1857-7431.

Badaoui R., 2012. Profil épidémiologique de l'infection urinaire infantile à l'hôpital Ibn Sina. These pour le diplôme du docteur en médecine : Faculté de médecine de pharmacie, Université Mohammed V Rabat , P :110 .

Baerheim A., Digranes A., et Hunskaar S., 1999 . Are résistance patters in uropathogens published by microbiological laboratories valid for general practie APMIS 107, P : 676-680.

Bah -Tassou B., 2004 .«Aspects épidémiologique et bactériologique desinfection urinaires chez le sujet diabétique dans le service de médecine interne au centre hospitalier universitaire Yalgado Ouedraogo. Thèse pour l'obtention du grade de doctore en pharmacie : Université d'Ouagadougou Burkinafaso, P :107

Bally F., et Troillet N., 2008. Urétrite ; Sion, Institut Central des Hopitaux Valaisans (ICHV), Vol, 10, P : 02 .

Banacorisi, S. 2007 : *Bactériologie médicale*. Paris.

Bekhechi, C. Abdelouahid, D. 2010. Les huiles essentielles. Office des publications universitaires.

Belarras C., 2007 . Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de control sanitaire , Tec & Doc Lavoisier, P : 476 .

Bellakhdar J., 1997 . Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires la pharmacopée marocaine traditionnelle .IBS Press , PP: 340-341.

Bellal M., et Benzaid H., 2016 .«Bandelettes réactives et infection urinaires. Mémoire présente en vue de l'obtention du diplôme de Master : Biochimie Moleculaire et Santé.Universite des Frères Mentouri Constantine, p:19.

Belman A.B., 1997. Commentary on Urinar tract infections in girls : the cost-effectiveness of currently recommended in vestigative routines. Ped. Nephrol,11, 180-181 .

BENALI H., 2010 .«Frequence et antibioresistance des germes responsable des infections urinaires a l'hopital provincial de nador.» These pour l'obtention du doctorat en pharmacie :Université Mohammad V Faculte de Medecine et Pharmacie-RABAT.

Billerbeck V.G., Roques C., Vanière P., Marquier P., 2002. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles publication scientifique revue Hygiènes. N°3.

Références Bibliographique

Bonnier G ., 1909 . La Végétation de la France, Flore complète. Tome 09. Ed : Suisse et Belgique. Paris, PP : 25-26.

Bougattouch Y., Boudelaa W., 2010. L'examen cyto bactériologique des urines. mémoire de fin étude en vue de l'obtention d'un diplômé d'état en laboratoire : Ministère de la Santé de la Population et Réforme Hospitalière Ecole de Formation Paramédicale de Skikda.

Brochard K., 2008. Les infections urinaires chez l'enfant et l'adulte. Leucocyturie .Item 93. Toulouse, pp : 1-7.

Brunton J ., 1999 . Pharmacognosie phytochimie plant médicale. 3^{ème} édition, Tec & Doc et EM inter, P : 1120.

C

Carole Minker., 2013 . 200 plantes qui vous veulent du bien. Franc. P : 120-214.

Cavallo J.D., Garrabé E., 2002 . Outils du diagnostic biologique des infections urinaires nosocomiales, analyse critique : vol 33, P : 447-456.

Ceccherlli P., Curini M., Marcotullio M., Madruzzo G., 2003. Journal of Natural Product Cirad. Inhibition de la germination et de la croissance chez les semences de végétaux. Tortuoside, a new natural coumarin glucoside from ses elitortuosum, pp : 53.

D

De Billerbeck V.G., 2007. Huiles essentielles et bactéries résistant aux antibiotique, pharmacognosie. Phytothérapie. PP : 249-253.

De Moiy D, JD ., Cavallo, P Weber., et R Faber. 2001. «Détection et surveillance épidémiologique des résistances bactériennes aux antibiotique en milieu communautaire.» *Dossier scientifique: Bactériologie; Revue Française des laboratoire, P: 335.*

Denis F ., M.C Ploy., C Martin, E Binger., et R Quentin. , 2011 . *Bactériologie médicale.* paris: 2eme Edition.

DUSSER LAUGE N. , 2017 . «Etude de plantes medicinales du MAGHREB: usage traditionnel et etude phytochimique.» These pour le diplome d'etat de docteur en pharmcie, Universite toulouse paul sabatier facutle des pharmaceutique, MAGHREB, P:99.

E

El Sayde haykle M ., 1993. Plantes médicinales et aromatiques 2^{ème} édition, installation connaissances d'Alexandrie, P : 13-134.

Elqaj M ., Ahami A ., et Belghayti D. ,2007 . La phytothérapie comme alterative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires . Journée scientifique" ressources naturelles et antibiotiques " .Maroc.

F

Faraj Atiyat A., 1995 . *Plantes médicinales et aromatiques dans le monde arabe l'agriculture et la fabrication de plantes médicinales dans le monde arabe.* Institution arabe pour les études et publication.

Fernandez X., et Chemat F., 2012. La chimie des huiles essentielles. Ed. Vuibert. P : 274.

Références Bibliographique

Festy D., 2011 .les huiles essentielles ça marche avec 78 formules à commander en pharmacie, LEDUC.S EDITION. Pp : 22-26, ISBN : 978-2-84899-316-4.

Fouché J.G., Marquet A.,Hambuckers A.,2000 .Les plantes médicinales,de la plante au médicament .Observatoire du Monde des plantes Sart-Tilman.

Foxman B., Barlow R., D'Arcy H., Gillespie B., et Soble J.D., 2002 .Urinary tract infection : self-reported incidence and associated costs. Ann Epidemiol 2010, P : 509-515.

G

Grayer RJ ., et al : «Leaf flavonoid glycosides as chemosystematic characters in Ocimum.» *Biochem Syst Ecol.*, 2003.

Guignard J, L., 2001 . *Biochimie végétal*. 2éme Ed. Paris: de L'abrégé Dunod.

H

Haratymand W., Weryszko-Chmielewska E., 2017. Ultrastructural and histochemical analysis of glandular trichomes of *Marrubium Vulgare L* (Lamiaceae). *Flora*, 231, p:11-20.

Hensel, W., 2009. *Quelle est cette plante médicinale*. Vigot.

Hernandez-Ochoa, L.R., 2005.Substitution de solvants et matières de synthèse par combiné "Solvant/Actif". D'origine végétale. Thèse de doctorat. Institut National Polytechniques de Toulouse. France.

J

Josy, Marty Dufaut., 2012. «Les plantes aromatiques et médicinales.» *Amazon*, P:86-87.

Judd W, S, S Campbell C., A Kellogg E., et P Steven., 2002 . *Botanique systématique:une perspective phylogénétique*. 1er Ed. paris er bruxelles .

K

Karioti A., Skaltsa H., Heilmann J., et Stecher O., 2003. Acytaled flavonoid and phenylethanoid glycosides form *Marrubium velutinum*.*Phytochemistry* , pp: 655-660.

Ketz F. ,2016.infections urinaires hautes aux urgences : incidence et facteurs associés au bon diagnostic. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine : DES de médecine générale. Université paris Diderot-paris 7, p 49.

Kobak Sandak Rayaud, C.Y.A. Nenonene Mille J., Chaumont J.P., 2004. Activités antimicrobienne d'huiles essentielles de trois cymbopogonsp. Africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie, *Annales de Médecine Vétérinaire*, 148.

Krasnov E., Raldugin V., and Avdeeva EY., 2009. Medicinal plants. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 43(11) :613-614.

L

Lavigne J., 2007. Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. Faculté de Médecine Montpellier-Nimes.

M

Mandell G.L., Bennet, J.E., Dolin R., Mandell D.B., 2009 .Principles and practice of infectious diseases. Sixième édition, Elsevier, Churchill, Livingstone éditeurs, USA. Edition en ligne, <http://www.ppidon-line.com>.

Moreddu F., 2007 . Le conseil associé a une demande spontanée, volume 2, France. P : 144 .

N

Novak I., Buzas G., Minker E., Kolfai M., et Szendrei, K. *Planta med* .1966, 14, p : 57.

O

Ouedraogo P., 1997 . Etude des agents pathogènes des infections de tractus urinaire, These pour l'obtention du doctorat en médecine : Faculté des sciences de la sante ; Universite de Ouagadougou Burkina Faso.P :90.

Ousseini K.F., 2002 .Etude de l'infection chez l'enfant malnutri dans le service de pédiatrie a l'hôpital national de Niamey au Niger : These pour obtenir le drade de docteur en médecine. Université de Bamako. Faculté de médecine de pharmacie et d'odonto-stomatologie .P : 61.

Q

Quezel F., et Santa S.,1963 . Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol.1-2, 801-802, Ed.CNRC, Paris France .

R

Rai M., Acharya D., Wadegaonkar P., 2003 .Plant derived-antimycotics : Potential of acteraceo plants in : plant-derived-antimycotics : current trends and future prospects.Haworth press, york, Iondin, oxford.

Rhayour K., 2002.Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *E.col*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah. P : 107.

Richet G., 1988 . Néphrologie, Edition Ellipses, Paris, P : 211-227.

S

Sahpaz S., Garbacki N., Tits M., Bailleul F.J., 2002 . *Ethnopharmacol* 97(3) p :389-392

Schmiemann G., Kniehl E., Gebhardt K., Matejezyk M., et Hummers-Pradier M., 2010 .The diagnosis of urinary tract infection : a systematic review. *Dtsch, Arzteblatt Int* .P : 107 -361.

T

Traiget D., et Y Touati., 2017 . «Etude bactériologique des infections urinaires chez l'enfant et le nourrisson au laboratoire de microbiologie du CHU Tlemcen.» Memoire de fin d'etudes pour l'obtention du diplome de docteur en pharmacie, Universite Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, P 81.

U

Uitee A ., M.H.J.Bennik ., et R Moezelaar. , 2002 . *The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus Applied and environmental -microbiologie.* Vol. 68.

V

VANGELDER V., 2017 . «Etude de plantes medicinales du Maghreb : Usages traditionnels et etude phytochimiques.» These pour le diplome d'etat de docteur en pharmacie, Universite de Lille 2 Faculté de science pharmaceutiques et biologiques, P7.

Vansant G ., 2004. Radicaux libres et antioxydants, principes de base. Ed Institut Danone.

Vorkauffer S., 2011. Les infections urinaires communautaires bactériennes de l'adulte : prise en charge diagnostiques et thérapeutique, Faculté de médecine, Université Henri Poincaré Nancy 1.P :104.

W

Wichtl K., Anton R ., 2003 .Plantes thérapeutiques : Traditions, Pratique officinale, Sciences et thérapeutique 2^{ème} Ed : TEC & DOC. Paris. PP : 1-364.

Y

Yabifoua A.R. , 2006 . Profil antibiotypique des bactéries responsables d'infection urinaire communautaire. These d'etat de docteur en pharmacie . Université de Bamako. Faculté de médecine de pharmacie et d'odonto-stomatologie , Mali, P : 131 .

Z

Zomahoun C., 2004. Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de bactériologie du CHU, Hubert Koutoukou Maga de cotonou. These de docteur en pharmacie, Faculté de médecine de pharmacie et d'odonto-stomatologie, Université Mali, P : 107 .

Annexes

1. Matériel utilisé au laboratoire microbiologie

- Microscope optique
- Lames et lamelles
- Pipettes Pasteur
- Anse de platine
- Bec bunsen
- Coloration et réactifs
- Milieux de culture



Figure. 08 : Matériel utilisé au laboratoire Microbiologie.

2. Composition des milieux de culture utilisés en microbiologie

- Muller Hinton (géluse)

- Infusion de viande de bœuf 300,0 ml
- Peptone de caséine 17,5 g
- Amidon de maïs 1,5 g
- Agar 17,0 g
- PH=7,4



Figure. 09 : milieu M-H.

- Géluse nutritive

- Extrait de viande de bœuf 01g
- Extrait de levure 02g
- Peptone 05g
- Chlorure de sodium 05g
- Géluse 15g
- PH 7,4



Figure. 10 : Géluse nutritive.

Annexes

Tableau .08: Lecture de la galerie API 20E.

Tube	Réaction		commentaire
	Positive	Négative	
ONPG	Jaune	Incolore	Une couleur jaune pâle est considéré comme une réaction négative.
ADH	Rouge ou Orange	Jaune	/
LDC	Rouge ou Orange	Jaune	/
ODC	Rouge ou Orange	Jaune	/
CIT	Turquoise ou bleu foncé	Vert pale ou jaune	La lecture se fait dans la partie supérieure de la cupule (en aérobie).
H ₂ S	Dépôt noir	Aucun dépôt noir	/
URE	Rouge ou orange	Jaune	/
TDA	Brun-rouge	Jaune	Ajouter 1 goutte de chlorure de fer à 10%. Lire immédiatement la réaction.
IND	Anneau rouge	Jaune	Ajouter 1 goutte du réactif de Kovaks. Lire immédiatement la réaction.
VP	Rose foncé ou rouge	Incolore ou rose pale	Ajoute 1 goutte de KOH à 40% PUIS 1 goutte d'halphanaphthol à 6%. Lire la réaction après 10 minutes.
GEL	Diffusion du pigment	Aucune diffusion, incolore	La répartition des particules solides à travers la cupule doit être considérée comme une réaction négative.
GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA	Jaune	Bleu ou bleu-vert	La fermentation de sucres commence dans la partie la plus anaérobie de microtube (partie inférieure). Il faut lire ces réactions à partir de la base de la cupule vers le haut. Une couleur jaune au fond indique une réaction positive



Figure. 11 : Galerie API20E.



Figure. 12 : Flacon hermétique contenant les bandelettes.