

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1997

THESE N° 351

**LA FLORE MICROBIENNE DES PLANTES  
MEDICINALES : QUELQUES EXEMPLES DE LA  
CONTAMINATION BACTERIENNE ET FONGIQUE**

**THESE**

pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement le 17 décembre 1997

par

**Pierre BOURNIER**

né le 31 juillet 1972 à Soyaux (Charente)

**EXAMINATEURS DE LA THESE**

Madame BOSGIRAUD, Professeur.....Président

Monsieur DREYFUSS, Maître de conférences.....Juge

Madame ROUSSEAU, Maître de conférences..... Juge

Monsieur COUDERT, Maître de Stage..... ..Membre Invité



# **UNIVERSITE DE LIMOGES**

## **FACULTE DE PHARMACIE**

---

**DOYEN DE LA FACULTE:** Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

**ASSESEURS:** Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard  
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences

**PROFESSEURS:**

**BENEYTOUT** Jean-Louis      BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE

**BERNARD** Michel              PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE

**BOSGIRAUD** Claudine        BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE  
PARASITOLOGIE

**BROSSARD** Claude            PHARMACOTECHNIE

**BUXERAUD** Jacques         CHIMIE ORGANIQUE  
CHIMIE THERAPEUTIQUE

**CARDOT** Philippe            CHIMIE ANALYTIQUE

**CHULIA** Albert                PHARMACOGNOSIE

**CHULIA** Dominique         PHARMACOTECHNIE

**DELAGE** Christiane         CHIMIE GENERALE ET MINERALE

**GHESTEM** Axel                BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

**HABRIOUX** Gérard         BIOCHIMIE FONDAMENTALE

**LACHATRE** Gérard         TOXICOLOGIE

**MOESCH** Christian         HYGIENE

**OUDART** Nicole                PHARMACODYNAMIE

**SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS**

**POMMARET** Maryse

Les hommes sont comme les plantes, qui ne croissent jamais heureusement, si elles ne sont bien cultivées.

Charles de Montesquieu

A notre Président et directeur de Thèse

Madame le Professeur BOSGIRAUD,

Service de Bactériologie-Virologie-Parasitologie,

Nous tenons à vous remercier pour l'honneur que vous nous faites en présidant ce jury de thèse, pour nous avoir accueilli au sein de votre laboratoire, et pour votre aide lors de l'élaboration de notre travail.

Veillez accepter l'expression de notre profond respect.

A nos examinateurs

Monsieur DREYFUSS  
Maître de conférences,  
Service de Bactériologie-  
Virologie-Parasitologie.

Madame ROUSSEAU  
Maître de conférences,  
Service Informatique.

Monsieur COUDERT  
Pharmacien,  
Maître de stage.

Nous sommes honoré de votre participation  
à ce jury de soutenance.

Nous vous remercions pour l'honneur  
que vous nous faites en participant à ce jury.

Nous adressons nos remerciements les plus vifs :

à Madame DELEBASSE

Maître de conférences,

Service de Bactériologie-

Virologie-Parasitologie,

à Madame MOUZET,

Technicienne de laboratoire,

Service de Bactériologie-

Virologie-Parasitologie,

pour leur précieuse aide au cours de l'élaboration

de notre travail et pour leurs marques de sympathie.

A mes parents qui se sont totalement investis dans mes études,  
qu'ils voient dans cette thèse, l'expression de ma reconnaissance et  
de ma profonde affection.

A mon frère, Martial.

A mes cousins, les docteurs Bernard et Michèle ROULLET,  
à leurs trois filles Hélène, Anne et Claire qui m'ont accueilli  
et soutenu pendant toutes ces années d'études comme un fils  
et un grand frère.

A tous mes amis.



# **PLAN**

## **INTRODUCTION**

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **1. BONNES PRATIQUES DE FABRICATION**

### **2. LEGISLATION CONCERNANT LA VENTE DE PLANTES MEDICINALES A L'OFFICINE**

### **3. REGARD SUR L'ESSOR DES PLANTES MEDICINALES**

### **4. LES PLANTES MEDICINALES**

#### **4.1. LES DIFFERENTES FORMES D'UTILISATION DES PLANTES MEDICINALES**

#### **4.2. PLANTE TOTALE OU PARTIE DE PLANTE**

#### **4.3. INDICATIONS DES PLANTES MEDICINALES**

### **5. LES BACTERIES, LES LEVURES ET LES MOISSURES**

#### **5.1. ETABLISSEMENT DES NORMES MICROBIOLOGIQUES**

#### **5.2. PRINCIPAUX GERMES DECOUVERTS AU COURS D'ETUDES MICROBIOLOGIQUES**

##### **5.2.1. ASPECT QUANTITATIF**

##### **5.2.2. ASPECT QUALITATIF**

## **EXPERIMENTATION PERSONNELLE**

### **1. MATERIELS ET METHODES**

#### **1.1. MATERIELS**

##### **1.1.1. PLANTES**

##### **1.1.2. SOLUTIONS ET MILIEUX DE CULTURES**

## **1.2. METHODES**

### **1.2.1. DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES**

#### **1.2.1.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS**

#### **1.2.1.2. EXAMENS DES ECHANTILLONS**

### **1.2.2. ENSEMENCEMENT EN SURFACE EN VUE D'UNE IDENTIFICATION MICROSCOPIQUE PARTIELLE**

## **1.3. INTERPRETATION DES RESULTATS**

## **2. RESULTATS**

### **2.1. DENOMBREMENTS**

### **2.2. IDENTIFICATIONS PARTIELLES**

## **DISCUSSION**

### **1. LES BACTERIES**

### **2. LES LEVURES ET MOISSURES**

## **CONCLUSION**

## **BIBLIOGRAPHIE**

## **TABLE DES MATIERES**

## **ANNEXES**



# **INTRODUCTION**

"Phytothérapie le vert gagnant" titre le Moniteur des Pharmacies et des Laboratoires du 8 juin 1996 (19). Douze millions et demi d'unités en phytothérapie sont vendues chaque année en France. On assiste actuellement à un regain d'intérêt pour les plantes médicinales.

La Pharmacopée Française aborde le problème de la contamination microbienne des plantes médicinales d'une manière assez globale. En effet elle prescrit un " contrôle de la contamination microbienne dans des produits non obligatoirement stériles " (VIII 10), et une " qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques " (VIII 15, catégorie 4 : médicaments à base de plantes). Ce problème est à l'examen pour la Pharmacopée Européenne. On sait que les drogues végétales sont souvent fortement contaminées. FRANCK estime le nombre de germes entre  $10^3$  et  $10^8$  / g (18).

Parmi les micro-organismes véhiculés par les plantes, il faut distinguer la flore naturelle , qui va varier suivant la région d'origine, et la flore résultant de l'éventuelle contamination pendant la récolte, le séchage, le stockage ou le triage. Il s'ensuit que le nombre de micro-organismes est variable d'une drogue à l'autre, mais aussi pour une même drogue, d'un lot à l'autre (14).

La première partie de ce travail, aborde certains aspects des plantes médicinales. Nous nous sommes intéressés aux règles de production des plantes médicinales à travers les Bonnes Pratiques de Fabrication et à la législation concernant leur vente à l'officine. Les plantes médicinales sont commercialisées sous différentes formes et pour diverses indications thérapeutiques. Nous avons situé le problème de la contamination bactérienne et fongique des plantes médicinales par une étude bibliographique.

La deuxième partie de cette thèse a consisté à déterminer expérimentalement le taux de contamination bactérienne et fongique d'échantillons de plantes médicinales en vrac, destinées à des tisanes, à partir de lots issus de 4 laboratoires différents, ainsi que l'identification partielle de certains germes, levures et moisissures. Nous terminons par une interprétation et une discussion en comparant nos résultats avec ceux de la littérature.

**PREMIERE PARTIE : REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. BONNES PRATIQUES DE FABRICATION (17)

Les plantes médicinales sont récoltées dans la nature, ou le plus souvent cultivées. Des règles de bonne production sont maintenant observées. Ces règles préconisent de cueillir les plantes médicinales loin de toutes sources de pollution, de les cultiver dans des terrains appropriés, avec le minimum d'engrais et de produits phytosanitaires selon des protocoles qui en évitent la rémanence au moment de la récolte. La propreté la plus rigoureuse doit également être respectée afin de réduire la contamination bactérienne et fongique au cours de la croissance de la plante, des manipulations et du séchage, comme ultérieurement lors de toute opération de transformation (9).

Ainsi ont été définies des Bonnes Pratiques de Fabrication concernant les médicaments à base de plantes. Ces BPF (17) prescrivent des zones de stockage pour les plantes à l'état brut, non traitées, qui doivent être séparées, bien ventilées, munies d'équipements contre la pénétration d'insectes ou d'autres animaux et spécialement des rongeurs. L'attention est également portée sur la propreté et le bon entretien des zones de stockage. Au niveau des zones de production, afin d'éviter toute contamination croisée, des mesures comme l'extraction de l'air ou l'utilisation de locaux spécifiques, doivent être prises en présence de dégagements de poussières dus aux diverses opérations relatives au conditionnement des plantes (échantillonnage, pesée, mélange et transformation des plantes à l'état brut). Les spécifications concernant les matières premières à savoir le nom botanique, l'origine, la date de récolte, et la partie utilisée sont à préciser. Des essais visant à déterminer une éventuelle contamination bactérienne ou fongique sont prescrits, ainsi que la recherche des aflatoxines et les limites admises. Tout traitement destiné à réduire la contamination bactérienne ou fongique doit être documenté. Les spécifications comportant des données sur le traitement, les essais et les limites de résidus doivent être disponibles. L'identité et la qualité des médicaments à base de plantes doivent être contrôlées en conformité avec la note explicative "qualité des médicaments à base de plantes "(22). On distinguera les médicaments à base de plantes dont l'emploi fait intervenir de l'eau bouillante. Sont tolérées au maximum **10<sup>7</sup> bactéries** et **10<sup>5</sup> moisissures** par gramme de plantes. Le taux maximum d'*Escherichia coli* par gramme de plante est fixé à 10<sup>2</sup> (22).

## **2. LEGISLATION CONCERNANT LA VENTE DE PLANTES MEDICINALES A L'OFFICINE**

Le numéro 5 de l'article 1 512 du code de la santé publique (7) inclut dans le monopole pharmaceutique, les plantes médicinales inscrites à la Pharmacopée.

Ce monopole s'étend à la seule vente des plantes médicinales et non à leur culture qui demeure libre. Cependant la culture est sous réserve d'une déclaration lorsque ces plantes contiennent une substance vénéneuse appartenant à la liste I et d'une autorisation lorsqu'elles contiennent une substance vénéneuse appartenant à la liste des stupéfiants.

Le texte de cet article envisage des dérogations établies par décret. Le décret prévu (décret n ° 79-480 du 15 juin 1979) (8) autorise la vente libre de 34 plantes médicinales : bardane, bouillon blanc, bourgeon de pin, bourrache, bruyère, camomille, chiendent, cynorrhodon, eucalyptus, frêne, gentiane, guimauve, hibiscus, houblon, lavande, lierre terrestre, matricaire, mauve, mélisse, menthe, ményanthe, olivier, oranger, ortie blanche, pariétaire, pensée sauvage, pétales de rose, queues de cerise, reine des près, feuilles de rose, sureau, tilleul, verveine, violette. Ces plantes ne peuvent être vendues mélangées entre elles ou à d'autres espèces à l'exception des suivantes : tilleul, verveine, camomille, menthe, oranger, cynorrhodon, hibiscus, pour lesquelles les mélanges entre elles sont autorisés.

Rappelons qu'une plante médicinale devient un médicament lorsqu'elle est présentée pour une destination thérapeutique. Un mélange de plantes médicinales à destination curative est également un médicament.

La préparation et la vente en gros, comme la vente au détail, relèvent du monopole pharmaceutique en vertu du numéro 1 de l'article 1 512 (30).

## **3. REGARD SUR L'ESSOR DES PLANTES MEDICINALES**

Se soigner avec des plantes médicinales est-il une marque d'obscurantisme, une simple fidélité au passé ou un progrès ? C'est une évidence que la rencontre intime du monde animal avec le végétal se fait dans plusieurs circonstances courantes, spécialement au cours de l'alimentation. Dans les deux règnes on trouve les mêmes substances chimiques banales telles que les sucres, les protides et les corps gras. Ces substances conviennent à la nutrition des végétaux comme à la nôtre. Mais, outre ces constituants fondamentaux, il en existe d'autres appelées "substances secondaires" (9) dont la raison d'être reste souvent inconnue chez les plantes elles-mêmes.

Absorbées par les animaux, elles possèdent souvent des propriétés pharmacologiques qui confèrent aux plantes leur qualité médicinale.

La Pharmacognosie nom actuel de la Matière médicale a pour objet, notamment, de recenser les plantes intéressant la pharmacologie et la thérapeutique, afin de les utiliser soit directement en nature, par exemple sous forme de tisanes, soit indirectement, pour en extraire les principes actifs et parfois les modifier par hémisynthèse.

Il est remarquable qu'un pays aussi résolument tourné vers les technologies avancées que tel le Japon, mette en valeur les traditions de l'Extrême-Orient en matière de plantes. A partir de nombreux travaux scientifiques théoriques, réalisés dans les universités et les centres de recherche de l'industrie, se sont dégagées des applications pratiques qui accroissent le champ de la thérapeutique moderne. Si les médecines anciennes ne prescrivaient aux malades que des plantes, quelques organes animaux ou de rares minéraux, c'est qu'il n'existait aucune autre ressource. La chimie de synthèse ne s'est développée qu'au début du XIX<sup>ème</sup> siècle. Longtemps, les plantes ont donc été les seuls laboratoires capables de produire des molécules douées d'activités pharmacologiques. Puis les succès de la chimie organique ont peu à peu fait oublier les substances naturelles. D'abord préoccupés par des modèles fournis par les êtres vivants, les premiers chimistes, pharmaciens pour la plupart, se sont progressivement affranchis de cette tutelle pour inventer des médicaments originaux. Ainsi, entre 1904 et 1946, la cocaïne de la feuille de coca engendre-t-elle les anesthésiques locaux moins toxiques et d'un emploi plus commode. De même, l'aspirine, l'un des plus grands médicaments actuels, est-elle née des observations anciennes sur le saule et la reine des prés (4). Bientôt les chimistes eurent-ils le bonheur de proposer de puissants médicaments de synthèse, actifs sur de grandes maladies parasitaires et bactériennes. De la sorte les plantes de nos contrées, comme également celles de nombreuses autres régions du monde, semblaient appartenir à un passé vénérable certes, mais suranné.

Or, vers 1965, s'est produit un curieux phénomène de retour aux traditions anciennes et de contestation de certains aspects de la médecine moderne, malgré les découvertes récentes dont tous profitent. Parmi les raisons qui expliquent ce revirement, il est probable que les effets indésirables des médicaments sont en causes, même s'ils ont souvent été exagérés. Dans ce contexte, il est donc logique que des médications douces dites "naturelles" à base de plantes médicinales rencontrent un certain succès.

## 4. LES PLANTES MEDICINALES

Dans la Pharmacopée Française les plantes médicinales occupent une large place, par le nombre de monographies les concernant directement, mais aussi par les diverses formes de leur emploi. Elles sont utilisées soit en l'état dans les tisanes, soit sous forme de poudres ou modifiées dans diverses préparations telles que les teintures, les extraits, les huiles essentielles ou les alcoolats.

### 4.1. LES DIFFERENTES FORMES D'UTILISATION DES PLANTES MEDICINALES

Traditionnellement les plantes médicinales sont utilisées en tisanes. Les tisanes sont des préparations aqueuses de plantes médicinales entières ou de parties de celles-ci, convenablement divisées pour être plus facilement pénétrées par l'eau. Elles sont administrées à des fins thérapeutiques. Elles peuvent encore servir de boissons aux malades, ou de véhicule pour l'administration de certains médicaments. Les tisanes sont obtenues par macération, digestion, infusion, ou décoction, dans des récipients couverts, en utilisant de l'eau potable.

La macération consiste à maintenir en contact la drogue avec de l'eau potable à température ambiante, pendant une durée allant de 30 minutes à 4 heures.

La digestion consiste à maintenir en contact la drogue avec de l'eau potable à une température inférieure à celle de l'ébullition, mais supérieure à la température ambiante, pendant une durée de 1 heure à 5 heures.

La décoction consiste à maintenir en contact la drogue avec de l'eau potable à l'ébullition, pendant une durée de 15 à 30 minutes.

L'infusion consiste à verser sur la drogue de l'eau potable bouillante et à laisser ensuite refroidir.

Mais il peut être intéressant de transformer les plantes en préparations galéniques (6) (28). Citons quelques exemples :

les poudres sont obtenues par un broyage fin des drogues,

les teintures (27) résultent de l'action de l'alcool éthylique sur des poudres végétales, l'alcool pouvant avoir des titrages différents,

les extraits sont obtenus à partir de drogues végétales sèches par épuisement au moyen de solvants, puis par évaporation de la solution obtenue jusqu'à une concentration en principe actif ou une consistance convenable. Il existe différents types d'extraits ; qui sont les extraits fluides, les extraits mous, les extraits fermes et les extraits secs, presque anhydres, faciles à réduire en poudre,

les huiles essentielles ou essences sont obtenues par extraction à la vapeur d'eau des plantes dans un alambic,

les hydrolats sont constitués par les eaux de distillation après séparation des huiles essentielles par décantation. Ceux-ci sont surtout utilisés pour quelques produits particuliers : rose, laurier-cerise ou bleuet,

les alcoolats sont obtenus par distillation des principes actifs des substances végétales au contact de l'alcool,

les alcoolatures sont obtenues par macération de plantes fraîches dans l'alcool. Ce sont des produits proches des teintures, mais obtenus par traitement des plantes fraîches et non des plantes sèches,

les nébulisats sont des extraits secs, obtenus par projection du liquide d'extraction sur un disque tournant à grande vitesse en présence d'un courant d'air chaud. Les fines gouttelettes obtenues, rapidement séchées, sont ainsi privées des substances extractives. Les nébulisats sont à l'état de poudre.

les suspensions et en particulier les suspensions intégrales de plantes fraîches, encore appelées S I P F, sont obtenues par cryobroyage de la drogue végétale fraîche et conservées dans l'alcool à 30 %.

Il existe également la poudre de plante totale cryobroyée. Ce procédé consiste à pulvériser la partie active de la plante sèche en la broyant à froid sous azote liquide, à très exactement -196°C (24). Le cryobroyage évite la détérioration de nombreux principes actifs par la chaleur dégagée lors d'un broyage classique.

Ces dernières années ont vu se développer le conditionnement des plantes médicinales en gélules, correspondant à une présentation plus actuelle et plus pratique de la plante médicinale. Ces gélules sont des gélules de poudre entière, des gélules d'extraits secs tels que les lyophilisats ou les

nébulisats ou encore des gélules d'huiles essentielles.

Les formes de présentation des médicaments obtenus à partir de substances végétales sont multiples : gélules, sirops, ampoules buvables, suppositoires, comprimés et pommades.

A partir des plantes, il est encore possible de procéder à l'extraction de constituants purs, que l'on utilise ensuite comme toute substance à intérêt thérapeutique.

Bien qu'utilisée depuis des millénaires, la forme tisane reste avantageuse car les principes actifs se conservent généralement bien dans la plante séchée. En dépit de leur solubilité quelquefois très faible dans l'eau froide ou même chaude, lorsqu'ils sont isolés à l'état pur, ces principes actifs passent aisément dans la décoction ou l'infusion, du fait de phénomènes de sursolubilisation. Il suffit de goûter ou d'humer la tisane obtenue, pour constater la réalité de cette extraction aqueuse, comme de l'intégrité du contenu en essences de maintes plantes séchées.

#### 4.2. PLANTE TOTALE OU PARTIE DE PLANTE

Il est exceptionnel que la plante soit utilisée entière. Le plus souvent on ne retient qu'un ou deux organes ; dans les textes officiels, on parle alors de drogue végétale ou de partie de plante.

Ce sont par exemple :

##### Les feuilles :

Artichaut (*Cynara scolymus* ),

Boldo (*Peumus boldus* ),

Bouleau (*Betula pendula* ),

Cassis (*Ribes nigrum* ),

Cerfeuil (*Anthriscus cerefolium* ),

Citronnelle (*Cymbopogon nardus* ),

Eucalyptus (*Eucalyptus globulus* ),

Frêne (*Fraxinus excelsior* ),

Hamamélis (*Hamamelis virginiana* ),

Melisse (*Melissa officinalis* ),  
Menthe poivrée (*Mentha piperita* ),  
Menyanthe (*Menyanthes trifolia* ),  
Noyer (*Juglans regia* ),  
Olivier (*Olea europaea* ),  
Pervenche (*Vinca minor* ),  
Plantain (*Plantago major* ),  
Ronce (*Rubus fruticosus* ),  
Sauge officinale (*Salvia officinalis* ),  
Busserole (*Arctostaphylos uva ursi* ),  
Verveine odorante (*Lippia citriodora* ),  
Vigne rouge (*Vitis vinifera* ).

Les sommités fleuries, inflorescences ou fleurs :

Armoise (*Artemisia vulgaris* ),  
Arnica (*Arnica montana* ),  
Aubépine (*Crataegus monogyna* ),  
Bleuet (*Centaurea cyanus* ),  
Bouillon blanc (*Verbascum* ),  
Bourrache (*Borrago officinalis* ),  
Bruyère (*Cannula vulgaris* ),  
Camomille (*Anthemis nobilis* ),  
Centaurée (*Erythraea centaurium* ),

Chélidoine (*Chelidonium majus* ),  
Coquelicot (*Papaver rhoeas* ) (pétales),  
Erysimum (*Sisymbrium officinale* ),  
Eschscholtzia (*Eschscholtzia californica* ),  
Fumeterre (*Fumaria officinalis* ),  
Géranium robert (*Geranium robertianum* ),  
Hydrocotyle (*Hydrocotyle asiatica* ),  
Hysope (*Hyssopus officinalis* ),  
Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* ),  
Lavande (*Lavandula angustifolia* ),  
Lierre terrestre (*Glechoma hederacea* ),  
Marjolaine (*Origanum majorana* ),  
Matricaire ou Camomille romaine (*Matricaria recutita* ),  
Melilot (*Melilotus officinalis* ),  
Millefeuille (*Achillea millefolium* ),  
Millepertuis (*Hypericum perforatum* ),  
Lamier blanc ou Ortie blanche (*Lamium album* ),  
Pêcher (*Prunus persica* ),  
Pensée sauvage (*Viola tricolor* ),  
Reine des prés (*Filipendula ulmaria* ),  
Romarin (*Rosmarinus officinalis* ),  
Rose (*Rosa centifolia* ),

Sariette (*Satureja montana* ),

Serpolet (*Thymus serpyllum* ),

Soucis (*Calendula officinalis* ),

Sureau (*Sambucus nigra* ),

Thym (*Thymus vulgaris* ),

Tilleul (*Tilia platyphyllos* ),

Tussilage (*Tussilago farfara* ),

Violette (*Viola odorata* ).

Les fruits :

Anis vert (*Pimpinella anisum* ),

Badiane (*Illicium verum* ),

Carvi (*Carum carvi* ),

Coriandre (*Coriandrum sativum* ),

Cumin (*Cuminum cyminum* ),

Cynorrhodon (*Rosa canina* ) (le faux fruit),

Fenouil (*Foeniculum dulce* ),

Genièvre (*Juniperus communis* ) (cône charnu ou improprement baie),

Ispaghul (*Plantago ovata* ) (graine),

Maïs (*Zea mays* ) (le style),

Orge (*Hordeum sativum* ),

Queue de cerise (*Prunus cerasus* ) (pédoncule du fruit du griottier).

Les tiges :

Bourdaine (*Rhamnus frangula*) (écorce),

Chêne (*Quercus robur*) (écorce des jeunes branches),

Gui (*Viscum album*),

Passiflore (*Passiflora incarnata*) (tige feuillée),

Prêle (*Equisetum arvense*) (tige feuillée stérile),

Saule (*Salix alba*) (écorce de tige de 2 à 3 ans).

Les racines, les rhizomes :

Bardane (*Actium majus*),

Chicorée (*Chicorum intybus*),

Chiendent (*Agropyrum repens*),

Fraisier (*Fragaria vesca*),

Gentiane (*Gentiana lutea*),

Harpagophytum (*Harpagophytum procumbens*) (racine tubérisée),

Réglisse (*Glycyrrhiza glabra*),

Salsepareille rouge (*Smilax medica*),

Valériane (*Valeriana officinalis*).

Chez certaines plantes, plusieurs organes sont utilisés, comme par exemple :

Absinthe (*Artemisia absinthium*) (feuille et sommités fleuries),

Angélique (*Archangelica officinalis*) (souche radicante et fruit),

Bouleau (*Betula pendula*) (feuille et écorce),

Guimauve (*Althaea officinalis*) (fleur, feuille, racine),

Mauve (*Malva sylvestris*) (feuille, fleur),

Bigaradier ou Oranger bigarade (*Citrus aurantium*) (feuille, fleur, zeste),

Pissenlit (*Taraxacum officinale*) (racine, partie aérienne),

Saponaire (*Saponaria officinalis*) (souche radicante et feuille),

Séné (*Cassia senna*) (foliole et fruit).

#### 4.3. INDICATIONS DES PLANTES MEDICINALES (9)

L'annexe 1 répertorie les plantes traditionnellement utilisées pour certaines affections.

### 5. LES BACTERIES, LES LEVURES ET LES MOISSURES

Les plantes médicinales constituent une matière première susceptible d'être contaminée par des bactéries, des levures ou des moisissures. Il est donc nécessaire de contrôler la qualité microbiologique des plantes médicinales, et d'établir des normes.

#### 5.1. ETABLISSEMENT DES NORMES MICROBIOLOGIQUES

Utilisées pour préparer des infusions, des décoctions, ou absorbées après trempage, les drogues végétales se trouvent à la frontière entre les produits naturels à usage pharmaceutique et les denrées alimentaires. D'après DONY et GERARD (12), d'une manière plus générale, les préparations pharmaceutiques destinées à l'usage oral doivent satisfaire à des exigences au moins comparables à celles prévues en analyse des denrées alimentaires pour les semi-conserves.

Les normes des denrées alimentaires, qui ont servi de modèle à ces deux auteurs, sont celles proposées par BUTTIAUX et MOSSEL (5). Ces normes sont quantitativement limitées, c'est à dire qu'il faut fixer la charge microbienne acceptée pour un poids de produit donné ; elles sont spécifiques, c'est à dire qu'il faut préciser les germes qu'il convient d'exclure. Elles correspondent à un "optimum accessible". En ce qui concerne cette dernière exigence, BUTTIAUX et MOSSEL précisent que toute substance ne répondant pas par sa nature et ses conditions de transformation aux exigences indispensables pour la protection de la santé publique, ne peut être proposée à la vente. Pourtant dans certains cas, des tolérances sont acceptables si le produit s'avère non dangereux et si les matières premières et les procédés de fabrication, manipulation, emballage et stockage sont

suffisamment satisfaisants. En d'autres termes, les normes doivent être adaptées , pour chaque cas distinct aux meilleures possibilités d'obtention. Quand elles ne peuvent être obtenues en pratique, les normes sont inutiles et même dangereuses car elles favorisent les fraudes : des prétentions inaccessibles peuvent inciter les producteurs à additionner les produits finis d'antiseptiques toxiques. Dans les aliments les normes proposées sont évidemment différentes selon qu'il s'agit de conserves, de semi-conserves ou de produits périssables.

DONY et GERARD (12) estiment que les médicaments à prendre *per os* doivent au minimum répondre aux normes relatives aux semi-conserves. En s'inspirant des exigences classiques concernant les aliments prêts à l'emploi, ils proposent les normes suivantes pour les préparations à prendre *per os* :

absence de germes pathogènes tels *Pseudomonas* *Samonella* et *Shigella*, pour 1 gramme de produit,

absence de bactéries toxigènes (*Clostridium botulinum* et *Clostridium perfringens* ) pour 5 grammes de produit, et de *Staphylococcus aureus* dans 0,1 gramme de produit,

absence de germes dits "indices de souillure " appartenant à la flore intestinale, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* , même non toxigène, et *Streptococcus foecalis* , pour 1 gramme de produit,

le taux en bactéries aérobies et anaérobies saprophytes dans 1 gramme de produit fini, prêt à être administré au malade, ne doit pas excéder  $10^4$  germes par gramme. En effet ces deux auteurs estiment que lorsque le taux en germes se situe et se maintient régulièrement en deçà de la limite de  $10^4$  germes par gramme, il y a toutes les raisons de penser que les micro-organismes présents dans une préparation n'y trouvent pas et n'y trouveront plus le substrat qui leur permet de s'y multiplier.

Une étude a également été réalisée sur la contamination microbienne quantitative et qualitative des poudres d'origine végétale servant de matière première pour les médicaments et les cosmétiques (11). L'influence de cette contamination sur la qualité des cosmétiques est notamment abordée. Une norme microbiologique applicable aux cosmétiques et aux produits contenant des matières premières d'origine végétale fixe un taux limite maximum de germes revivifiables de  $10^2$  germes par gramme ou millilitre sans recherche de germes spécifiques (11).

Si on considère que les plantes médicinales entrent dans la catégorie 4 des formes pharmaceutiques à usage oral non obligatoirement stériles, définie par les rapports communs du comité des laboratoires et services officiels de contrôle des médicaments et de la section des pharmaciens de l'industrie (16), le taux limite en germes revivifiables est fixé à  $10^3$ - $10^4$  bactéries aérobies par gramme ou millilitre et à  $10^2$  levures et moisissures par gramme ou millilitre. Les limites pour les germes spécifiés sont : l'absence d'*Escherichia coli* dans 1 gramme ou 1 millilitre, dans certains cas l'absence de Salmonelles dans 1 gramme ou 1 millilitre, pour les autres Entérobactéries un taux maximum de  $10^2$  par gramme ou millilitre, l'absence de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* dans 1 gramme ou 1 millilitre.

La Pharmacopée française Xème édition (22) prescrit en ce qui concerne les médicaments à base de plantes dont l'emploi fait intervenir de l'eau bouillante, au maximum  $10^7$  bactéries et  $10^5$  moisissures et levures par gramme ou par millilitre. Elle prévoit également  $10^2$  *Escherichia coli* au maximum par gramme ou par millilitre.

Dans la pratique, notons que le laboratoire MAURICE MESSEGUE spécialisé dans l'herboristerie, se fixe comme taux limite  $5 \times 10^6$  bactéries par gramme de plante et  $5 \times 10^5$  levures et moisissures par gramme de plantes (communication personnelle).

## 5.2. PRINCIPAUX GERMES MIS EN EVIDENCE AU COURS D'ETUDES MICROBIOLOGIQUES

Les plantes médicinales véhiculent une grande diversité d'espèces bactériennes et fongiques de l'environnement.

### 5.2.1. Aspect quantitatif :

La recherche de la contamination de poudres végétales destinées à la préparation de cosmétiques, réalisée par DONY et DEVLEESCHOUWER (11), révèle que 100 % des poudres examinées contiennent plus de  $10^2$  bactéries par gramme et 97 % plus de  $10^2$  moisissures et levures par gramme. Les chiffres atteints excèdent dans la majorité des cas  $10^4$  germes par gramme.

Une étude sur la contamination microbienne d'extraits secs de plantes médicinales (26), montre que ceux-ci sont quantitativement moins contaminés que les poudres végétales; mais que le taux de

bactéries aérobies reste relativement élevé, excédant  $10^3$  bactéries par gramme dans 35 échantillons sur 82 testés (soit 42,7%). En ce qui concerne les moisissures et les levures, le taux reste inférieur à  $10^2$  UFC/g dans l'ensemble des échantillons.

FAVET (14), a réalisé une étude sur la contamination microbienne d'une vingtaine de drogues végétales. Les germes aérobies mésophiles varient entre  $10$  et  $10^7$  UFC/g avec un nombre égal ou supérieur à  $10^5$  pour 11 drogues sur 21. La fréquence des levures et moisissures varie d'une drogue à l'autre, mais leur nombre est généralement inférieur à celui des germes mésophiles d'une puissance de  $10$ . L'étude a été étendue aux infusions. Par rapport aux drogues ébouillantées, les bactéries survivantes peuvent représenter jusqu'à 30% des germes aérobies mésophiles.

### 5.2.2. Aspect qualitatif :

De nombreuses espèces microbiennes sont capables de contaminer les matières végétales à partir du milieu : germes de l'air, de l'eau, du sol, germes de la flore humaine ou animale et de la flore des plantes. Toutes les espèces, par contre, ne sont pas capables d'y survivre et encore moins de s'y multiplier. Donc les espèces que l'on retrouve régulièrement, ont en commun un certain nombre de caractères (11). Il s'agit d'espèces ubiquitaires, saprophytes ou parasites facultatifs,

espèces ayant une vitalité assez élevée, supportant la dessiccation, les variations de température et de PH,

espèces dont les besoins nutritifs sont aisément couverts (c'est à dire espèces possédant un puissant équipement enzymatique).

A partir des résultats d'études microbiologiques de trois publications : (14), (11), (26) et en utilisant la classification des bactéries, nous avons établi des comparaisons reportées dans le tableau 1 figurant à la page suivante :

### Tableau 1 : Résultats des études microbiologiques des publications (14), (11), (26)

Les pourcentages qui apparaissent dans ce tableau sont exprimés par rapport au nombre total d'échantillons de chaque expérimentation.

	(14)	(11)	(26)
<b>Cocci GRAM +</b>			
Staphylocoques	<i>S. aureus</i> 10 %	<i>S. epidermidis</i> 5 %	5 % dont <i>S. aureus</i> 1 %
Streptocoques D ou enterocoques		65 %	24 %
<b>Bacilles</b>			
<b>GRAM +</b>	bactéries sporulées aérobies ou anaérobies facultatifs ( > à 50 % des germes aérobies mésophiles) dont <i>Bacillus cereus</i>	100 %	68 %
<b>Bacilles</b>			
<b>GRAM -</b>			
Entérobacteries	fréquentes, > 10 <sup>4</sup> UFC/g	85 %	16 %
* <i>Enterobacter</i>	<i>E. sakasaki</i> <i>E. agglomerans</i>	<i>E. cloacae</i> 69 % <i>E. aerogenes</i> 1 % <i>E. agglomerans</i> 78 %	<i>E. cloacae</i> 4 % <i>E. agglomerans</i> 10 % les deux 2 %
* <i>Escherichia coli</i>	15 % < à 10 <sup>2</sup> UFC/g	5 %	jamais décelé en raison du séchage
* <i>Salmonella</i>	jamais décelé	jamais décelé	jamais décelé
Pseudomonas	quelquefois mais jamais de <i>P. aeruginosa</i>	20 %	20 % mais jamais de <i>P. aeruginosa</i>
Autres	<i>Acinetobacter</i> 5 % <i>Serratia</i> 6 % <i>Citrobacter</i> 8 %		<i>Acinetobacter lwoffii</i> 1 % <i>Aeromonas hydrophyla</i> 1 %

Les entérobactéries sont très largement répandues dans les milieux extérieurs. Parmi cette famille, certaines espèces font partie de la flore normale du sol et des plantes. C'est le cas notamment d'*Enterobacter agglomerans*. Ce qui explique la fréquence et la prédominance de ce germe dans ces trois publications. En ce qui concerne les espèces témoins de contamination d'origine humaine ou animale, *Escherichia coli* est retrouvé moins fréquemment que les entérocoques. Ce fait découle de la plus grande résistance des entérocoques, à la chaleur, à la dessiccation (drying process (26)), au milieu extérieur qu'*Escherichia coli*. Il est important de préciser que les salmonelles (espèce pathogène spécifique) ne sont jamais décelées. Cette étude comparative laisse apparaître que les *Pseudomonas* sont assez peu présents. *Pseudomonas aeruginosa* n'est jamais retrouvé dans les échantillons.

La fréquence des staphylocoques est également assez faible. Les deux espèces rencontrées sont *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*.

Les bacilles à GRAM + sont abondants. Il ressort des résultats de la première étude que les bactéries sporulées représentent une fraction importante de la population bactérienne des drogues végétales. L'espèce rencontrée est *Bacillus cereus*. La thermorésistance des spores explique que ces germes soient de fréquents contaminants, particulièrement dans les drogues végétales séchées.

Donc les espèces les plus fréquemment rencontrées sont les entérocoques, les bacilles à GRAM + et les entérobactéries.

En ce qui concerne les levures et moisissures, seule la publication (14) fait état de la recherche d'*Aspergillus flavus*, dans les échantillons de plantes. Les résultats de cette publication montrent l'absence d'*Aspergillus flavus* de l'ensemble des échantillons étudiés.

**DEUXIEME PARTIE :**  
**EXPERIMENTATION**  
**PERSONNELLE**

# **1. MATERIELS ET METHODES**

## **1.1. MATERIELS**

### **1.1.1. Les plantes**

Les échantillons que nous avons étudiés, sont constitués de plantes médicinales sèches, en vrac, que quatre laboratoires ont bien voulu fournir : les laboratoires CAILLEAU, COOPER, MAURICE MESSEGUE, LPH. Parmi ces plantes, divers organes ont été testés, soit les feuilles, soit les fleurs ou les sommités fleuries, soit les fruits, soit l'écorce, soit la racine ou le rhizome. Le tableau 2, à la page suivante présente par ordre alphabétique, les plantes médicinales listées.

Tableau 2 : Plantes médicinales testées au cours de notre expérimentation

Plante	Organe utilisé	Classification	Origine géographique Ecologie	Epoque de la récolte	Constituants chimiques principaux
<b>Anis vert</b> <i>Pimpinella anisum</i>	Fruit	Apiaceae	Herbacée annuelle Plante améliorée par rapport à l'état sauvage Culture dans plusieurs pays à climat chaud et sec	Eté	Huile essentielle à l'anéthole (2 à 3%)
<b>Badiane</b> <i>Illicium verum</i>	Fruit	Magnoliceae	Petit arbre du sud de la Chine	Printemps Eté	Huile essentielle à l'anéthole
<b>Bardane</b> <i>Arctium majus</i>	Racine	Asteraceae	Herbacée bisannuelle Plante largement répartie dans les régions à climat tempéré	En première année ou en seconde avant la floraison	Polysaccharides dérivés du lévulose Substances insaturées antibactériennes
<b>Bourdaïne</b> <i>Rhamnus frangula</i>	Ecorce	Rhamnaceae	Arbuste d'Europe septentrionale et centrale Sol acide et sablonneux	Au moment de la floraison	Anthranoides
<b>Bourrache</b> <i>Borrago officinalis</i>	Sommités fleuries	Borraginaceae	Herbacée annuelle Plante largement répartie en Europe, en Afrique du nord et en Amérique du nord Jardins, terrains vagues, décombres	Printemps Eté	Sels de potassium Mucilages
<b>Camomille</b> <i>Anthemis nobilis</i>	Capitule floral	Asteraceae	Herbacée vivace, cultivée en annuelle Variété améliorée par rapport à l'espèce sauvage Terrain sablonneux Culture en Anjou et dans plusieurs pays européens	Eté	Nombreux constituants polyphénoliques (acides phénols, flavonoïdes, procyanidols, coumarines) Huile essentielle Sesquiterpènes
<b>Chiendent</b> <i>Agropyrum repens</i>	Rhizome	Poaceae	Herbacée vivace Plante largement répartie en Europe et en Asie	Du Printemps à l'Automne	Polysaccharides de la série des levulosanes Traces d'hydrocarbures insaturés
<b>Eucalyptus</b> <i>Eucalyptus globulus</i>	Feuille	Myrtaceae	Australie et maintenant nombreuse régions à climat méditerranéen Terrains recevant un apport d'eau suffisant	Toute l'année	Flavonoïdes Huile essentielle (1 à 3%) à cinéole (ou eucalyptole)
<b>Griottier</b> <i>Prunus cerasus</i>	Pédoncule de fruit	Rosaceae	A l'état sauvage, on le trouve communément dans les bois et taillis clairsemés. On le cultive en diverses variétés améliorées.	Eté	Flavonoïdes Sels de potassium

Tableau 2 suite

Plante	Organe utilisé	Classification	Origine géographique Ecologie	Epoque de la récolte	Constituants chimiques principaux
<b>Mauve</b> <i>Malva sylvestris</i>	Fleur	Malvaceae	Herbacée bisannuelle Europe Espèce nitrophile Terrains vagues et cultures Herbacée vivace	Eté	Mucilages dans tous les organes Anthocyanes dans les fleurs
<b>Menthe poivrée</b> <i>Mentha piperita</i>	Feuille	Lamiaceae	Hybride apparue à Mitcham (Grande Bretagne) au XVIII <sup>ème</sup> siècle Culture de diverses variétés améliorées	Juin Juillet et Septembre	Flavonoïdes Huile essentielle (1 à 1,7 pour 100g) riche en menthol
<b>Passiflore</b> <i>Passiflora incarnata</i>	Plante entière	Passifloraceae	Herbacée vivace grimpante, originaire d'Afrique tropicale Culture en Europe	Avant la floraison	Flavonoïdes Maltol Alcaloïdes indoliques (traces)
<b>Romarin</b> <i>Rosmarinus officinalis</i>	Sommités fleuries	Lamiaceae	Arbrisseau originaire du pourtour méditerranéen, introduit dans des régions plus septentrionales en exposition ensoleillée	Toute l'année	Acides phénols (acide labiétique) Flavonoïdes Diterpènes
<b>Thym</b> <i>Thymus vulgaris</i>	Parties aériennes fleuries	Lamiaceae	Herbacée vivace méditerranéenne Culture généralisée Rocailles ensoleillées	Eté	Flavonoïdes Triterpènes Huile essentielle
<b>Tilleul</b> <i>Tilia sylvestris</i>	Inflorescence	Tiliaceae	Arbres répandus dans toute l'Europe, largement cultivés Hybrides et variétés culturales	De Juin à Juillet selon l'altitude et les conditions climatiques	Flavonoïdes Acides phénols Huile essentielle (traces)
<b>Verveine odorante</b> <i>Lippia citriodora</i>	Feuille	Verbenaceae	Herbacée vivace originaire d'Amérique du sud, introduite dans la région méditerranéenne et en Afrique du nord	Printemps Eté	Flavonoïdes Huile essentielle (0,5 à 1g pour 100g)
<b>Vigne rouge</b> <i>Vitis vinifera</i>	Feuille	Ampelidaceae	Liane vivace Variétés dites "teinturier" à raisin noir et pulpe rouge	Fin de l'été	Acides phénols Flavonoïdes Dérivés du procyanidol Anthocyanes

### 1.1.2. Les solutions et milieux de culture

Les solutions et les milieux de culture utilisés sont ceux prescrits par la Pharmacopée Française VIII 10 : " contrôle de la contamination microbienne dans des produits non obligatoirement stériles " (23) :

-Solution tampon peptonée au chlorure de sodium PH 7 :

Phosphate monopotassique	3,56 g
Phosphate disodique dihydraté	7,23 g
Chlorure de sodium	4,30 g
Peptone de viande ou de caséine	1,0 g
Eau purifiée	1000 ml

-Milieu gélosé B (Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja) :

Peptone pancréatique de caséine	15,0 g
Peptone papaique de soja	5,0g
Chlorure de sodium	5,0 g
Gélose	15,0 g
Eau purifiée	1000 ml

-Milieu gélosé C (Milieu Sabouraud-glucosé-gélosé) :

Peptones de viande et de caséine	10,0g
Glucose monohydraté	40,0 g
Gélose	15,0 g
Eau purifiée	1000 ml

## 1.2. METHODES

### 1.2.1. Dénombrements des micro-organismes

Les différentes plantes médicinales décrites précédemment, sont destinées à être délivrées à l'officine, pour être utilisées sous forme de tisanes et correspondent donc à la monographie de la Pharmacopée Française VIII 15 (22) qui concerne les médicaments à base de plantes dont l'emploi fait intervenir de l'eau bouillante. Cette monographie préconise la méthode de dénombrement décrite dans la rubrique V 2.1.8.1 : " Dénombrement des germes aérobies viables totaux " (cf annexe 2).

#### Préparation des échantillons

Il est prescrit de dissoudre 10 g ou 10 ml du produit à examiner dans la solution tampon peptonée au chlorure de sodium PH 7, et de compléter à 100 ml avec la même solution. Dans notre cas, nous allons dissoudre 10 g de plante sèche pesés sur une balance Sartorius, dans 100 ml de la solution tampon préconisée, dans un erlenmeyer stérile et nous ajustons le PH à 7 à l'aide du PHmètre Ciba Corning. Nous réalisons ensuite une homogénéisation par agitation, pendant 1 heure, grâce à l'agitateur GFL (Gesellschaft Für Labortechnik).

#### Examens des échantillons

La méthode que nous avons choisie, est celle par dénombrement sur plaques de gélose, décrite par la Pharmacopée Française V.2.1.8.1 (cf annexe 2).

En ce qui concerne les bactéries, nous déposons dans une boîte de Pétri de 9 à 10 cm de diamètre, 1 ml d'échantillon homogénéisé avec 15 ml de milieu gélosé B liquéfié et maintenu à une température ne dépassant pas 45 ° C, puis nous homogénéisons le mélange par agitation douce de la boîte de Pétri, avant la prise en masse de la gélose. Dans certains cas, les colonies bactériennes ont envahies les boîtes de Pétri, rendant impossible tout dénombrement. Nous avons donc égalementensemencé des dilutions au 1/10<sup>ème</sup> et au 1/100<sup>ème</sup> de la solution mère homogénéisée. Par sécurité, nous avons réalisé deux ensemencements de la solution mère et de chaque dilution. L'incubation est de 5 jours à 30-35 ° C. Nous dénombrons ensuite les colonies qui se sont développées dans la masse de la gélose et en surface, à partir des boîtes de Pétri présentant le plus grand nombre de colonies, sans toutefois dépasser 300. Les résultats sont calculés en faisant la moyenne des deux dénombrements concernant la solution mère ou les dilutions et sont exprimés en UFC / g : Unité

Formant Colonie rapporté au gramme de plante sèche,.

En ce qui concerne les moisissures et les levures, nous procédons de la même manière qu'avec les bactéries, mais en utilisant le milieu gélosé C liquéfié maintenu à une température inférieure à 45°C. L'incubation est de 5 jours à 20-25 ° C. Le dénombrement et le calcul des résultats suivent le même principe qu'avec les bactéries. La seule différence est que nous lisons les boîtes de Pétri présentant 100 colonies au maximum.

### **1.2.2. Ensemencement en surface en vue d'une identification microscopique partielle**

#### Ensemencement de la solution mère en stries

Nous avons isolé les colonies par ensemencement en surface et en stries de 100 µl de la solution mère, préparée précédemment pour le dénombrement des boîtes de Pétri, sur le milieu gélosé B solidifié pour les bactéries et le milieu gélosé C solidifié pour les levures et les moisissures. Le temps d'incubation est toujours de 5 jours. La température d'incubation est de 30 à 35°C pour les bactéries et de 20 à 25 ° C pour les moisissures et les levures.

Pour chaque plante et pour chaque boîte de Pétri, nous repérons les différents types de colonies bactériennes macroscopiquement et réalisons un frottis sur une lame. Chaque frottis est ensuite coloré par coloration de GRAM (cf annexe 3) et observé au microscope, à l'objectif 100 à immersion. L'observation de chaque colonie de levures ou moisissures isolées, est basée sur sa morphologie macroscopique et microscopique. Pour la morphologie, nous avons observé au recto de la colonie : sa couleur, en sachant que celle-ci évolue avec l'âge des colonies, son aspect : colonie plate, surélevée ou colonie plane, plissée, cratériforme ou encore colonie glabre, plâtreuse, poudreuse, granuleuse, duveteuse, floconneuse. Pour la morphologie du verso sur la boîte de Pétri, nous avons observé la couleur, l'existence de crêtes ou arborisations en profondeur de la gélose, ou le pigment diffusant dans le milieu. De plus chaque colonie isolée est dilacérée dans une goutte de bleu lactique entre lame et lamelle.

### **1.3. INTERPRETATION DES RESULTATS**

Le logiciel qui a servi à l'élaboration de l'ensemble des tableaux et graphiques est EXCEL5.

## **2. RESULTATS**

La lecture des résultats, portant sur les 17 plantes pré-citées a permis de déterminer deux paramètres : le dénombrement des germes aérobies viables totaux d'une part et une identification partielle des micro-organismes par coloration.

Par mesure de discrétion, nous avons gardé l'anonymat des quatres laboratoires. Nous les avons appelés dans les différents tableaux et figures par les lettres A, B, C et D.

### **2.1. DENOMBREMENTS**

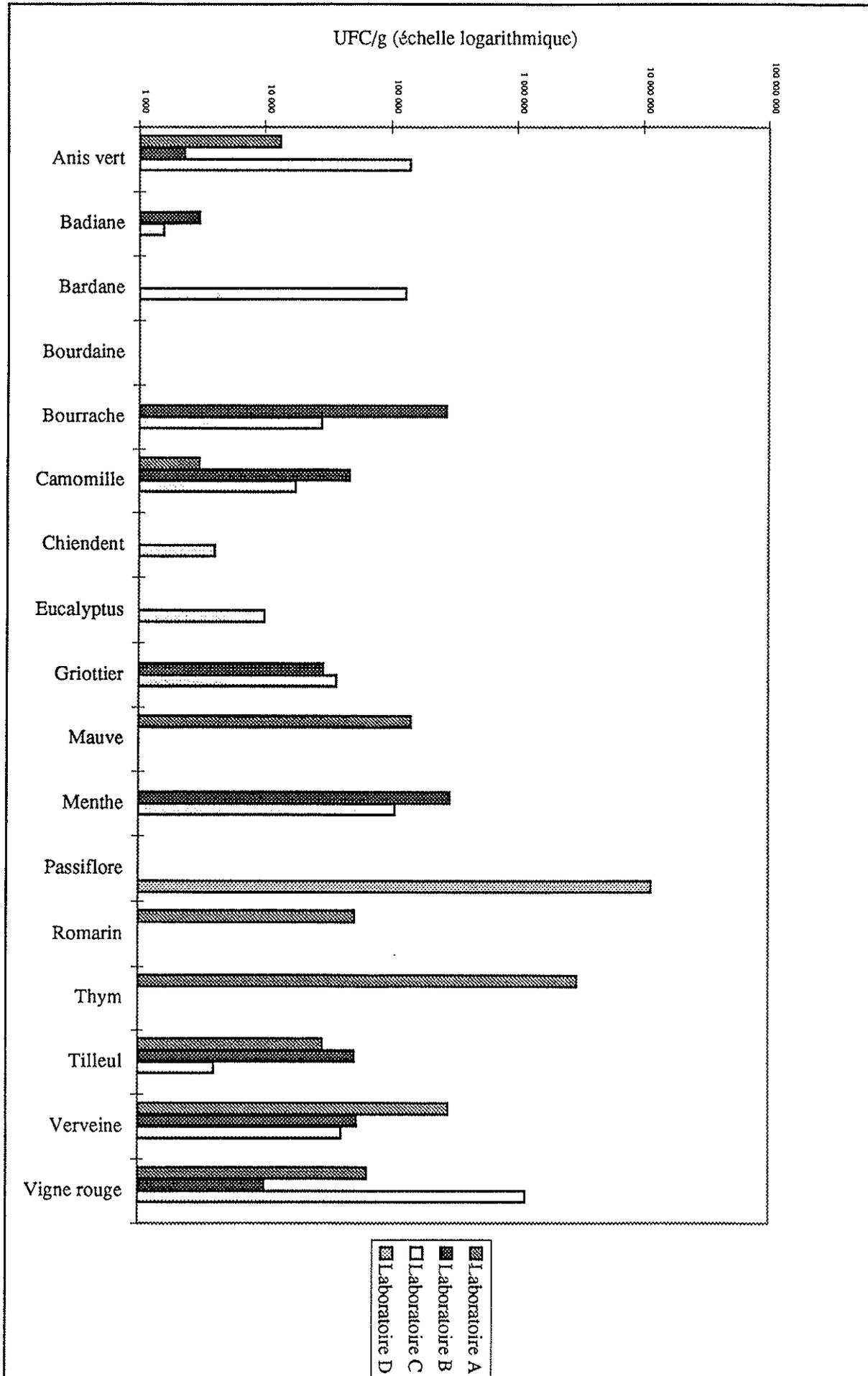
Le tableau 3 et la figure 1, répertorient le nombre de bactéries exprimées en UFC/g pour chaque plante et pour chaque laboratoire.

Sur le tableau 4 et la figure 2, apparaît le nombre de colonies de levures et moisissures pour chaque plante et pour chaque laboratoire.

### **2.2. IDENTIFICATIONS MICROSCOPIQUES PARTIELLES**

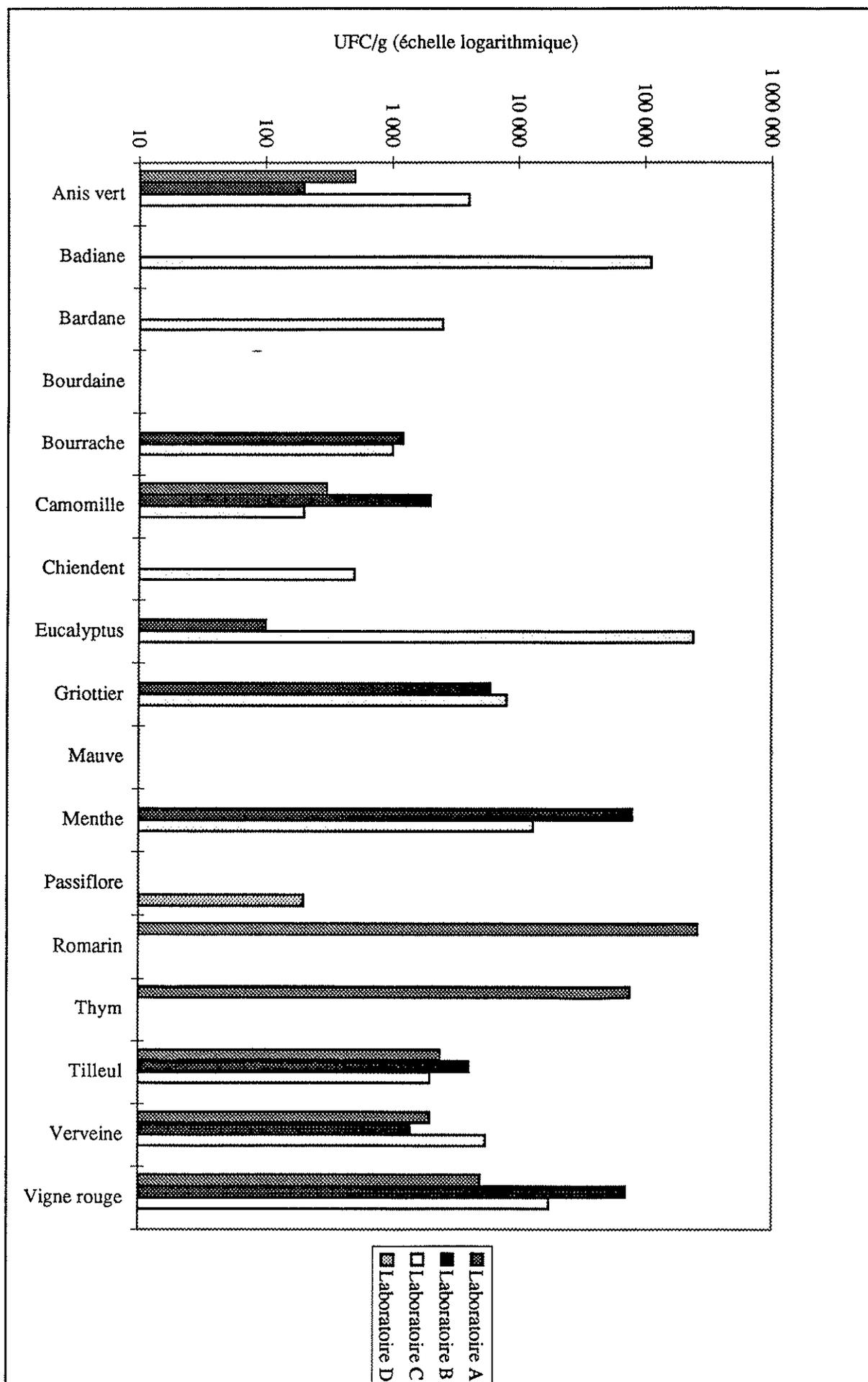
Le tableau 5, répertorie les différents types de colonies bactériennes, colorées par GRAM, par plante et par laboratoire.

Le tableau 6, répertorie les différents types de colonies de levures et moisissures, par plante et par laboratoire.



**Figure 1 : Comparaison des dénombrements de bactéries exprimés en UFC/g de plante sèche (l'échelle des dénombrements est une échelle logarithmique)**

Figure 2 : Comparaison des dénombrements de levures et moisissures en UFC/g de plante sèche (l'échelle des dénombrements est une échelle logarithmique)



**Tableau 5 : Différents types de colonies bactériennes colorées au Gram mis en évidence par plante et par laboratoire**

PLANTES	Laboratoire A	Laboratoire B	Laboratoire C	Laboratoire D
Anis vert	2C+ 1B+ 1B -	3B+	2C+ 1B+ 6B -	
Badiane		1B+	5B+	
Bardane			2B+ 3B -	
Bourdaïne				2C+ 2B -
Bourrache		3B+ 1B -	2B+ 1B -	
Camomille	2C+ 1B+ 1B -	2C+ 1B+ 1B -	2C+	
Chiendent			3C+ 1B+	
Eucalyptus		1B+ 1B -	1C+	
Griottier		1C+ 2B+	2C+	
Mauve	1 B -			
Menthe		1C+ 1B+	1C+ 2B+	
Passiflore				2B+
Romarin	1C+ 1B+			
Thym	1B+ 1B -			
Tilleul	1C+	1C+	4C+	
Verveine	1C+ 2B+	1C+ 2B+	3C+	
Vigne rouge	2C+ 1B+	2C+ 1B+	2B -	

Les C+ B+ et B - correspondent respectivement à des colonies de cocci à Gram+, de bacilles à Gram+ et de bacilles à Gram -. Par exemple 3 B+ correspond à 3 différents types de colonies de bacilles à Gram+

**Tableau 6 : Levures et genres de moisissures mis en évidence par plante et par laboratoire**

PLANTES	Laboratoire A	Laboratoire B	Laboratoire C	Laboratoire D
Anis vert	Cladosporium sp, Filamenteux sp : Monascus ruber	Mucorale : Mucor sp	Acremonium sp, Aspergillus sp, Cladosporium sp, Penicillium sp	
Badiane		rien	Aspergillus sp, Aspergillus niger	
Bardane			Penicillium sp	
Bourdaïne				Cladosporium sp
Bourrache		Levure sp	Cladosporium sp	
Camomille	Cladosporium sp, Filamenteux sp : Monascus ruber	Filamenteux sp	Acremonium sp, Drechsleria sp	
Chiendent			Aspergillus sp, Wallemia sp	
Eucalyptus		rien	Aspergillus sp, Aspergillus niger	
Griottier		Aspergillus sp, Filamenteux sp	Aspergillus niger	
Mauve	Cladosporium sp, Filamenteux sp : Monascus ruber			
Menthe		Cladosporium sp, Filamenteux sp, Levure sp	Aspergillus nidulans	
Passiflore				Aspergillus flavus, Penicillium sp
Romarin	Acremonium sp, Aspergillus niger, Cladosporium sp, Filamenteux sp : Monascus ruber, Levure sp, Penicillium sp			
Thym	Cladosporium sp, Filamenteux sp : Monascus ruber			
Tilleul	Acremonium sp, Mucorale : Mucor sp	Aspergillus sp, Levure sp	Drechsleria sp	
Verveine	Aspergillus sp, Penicillium sp, Mucorale : Mucor sp, Rhodotorula sp	Filamenteux sp	Alternaria sp, Aspergillus sp, Aspergillus niger, Penicillium sp	
Vigne rouge	Acremonium sp, Alternaria sp, Botrytis sp, Cladosporium sp, Filamenteux sp : Monascus ruber	Acremonium sp, Alternaria sp, Levure sp, Penicillium sp	Acremonium sp, Aspergillus sp, Aspergillus niger, Mucorale	

**TROISIEME PARTIE :**  
**DISCUSSION**

Dans ce travail expérimental, nous avons voulu avoir une idée de la contamination d'une certaine catégorie de médicaments qui connaissent actuellement un regain d'intérêt. En effet au cours des stages officinaux que j'ai effectués, nous nous sommes rendu compte de l'importance de la prescription des plantes médicinales au niveau du conseil à l'officine. Souvent l'effet thérapeutique d'une plante suffit pour traiter certaines symptomatologies bénignes. L'efficacité des plantes médicinales est d'ailleurs souvent sous estimée en médecine ambulatoire.

Les 17 plantes étudiées proviennent de 4 fournisseurs différents. Par mesure de confidentialité, nous les avons identifiés dans notre expérimentation par des lettres. L'échantillonnage diffère d'un laboratoire à l'autre, en fonction de ce que chacun a bien voulu nous envoyer, c'est à dire que les échantillons ont été pris au hasard. A ce titre nous formulons nos remerciements à chacun. Parmi les 17 échantillons utilisés, nous retrouvons des plantes de consommation très courante, différents organes de plantes, sauf pour la passiflore qui est représentée par la plante entière, et enfin des plantes appartenant à un grand nombre de familles botaniques.

Racine, rhizome: BARDANE, CHIENDENT

Ecorce: BOURDAINE

Feuille: EUCALYPTUS, MENTHE, VERVEINE, VIGNE-ROUGE

Fleur, sommités fleuries: BOURRACHE, CAMOMILLE, MAUVE,

parties aérienne, inflorescence ROMARIN, THYM, TILLEUL

Fruit, pédoncule du fruit: ANIS-VERT, BADIANE, GRIOTTIER

On remarque que la méthode de contrôle de la Pharmacopée Française VIII.15 ne tient pas compte de la partie commercialisée, elle est la même pour tous les organes. Nous avons choisi volontairement des plantes à l'état brut, c'est à dire stockées en vrac chez des fournisseurs avant leur mise en boîte.

La flore en micro-organismes des plantes sèches est constituée de bactéries, levures et moisissures de l'environnement. Notre étude s'est limitée à une appréciation quantitative et partiellement qualitative. La présence d'une flore ubiquitaire reflète généralement celle des plantes médicinales. Nous avons exclu de notre étude, l'identification précise des espèces bactériennes, levures et moisissures, ainsi que la recherche des micro-organismes potentiellement pathogènes.

La méthode de dénombrement utilisée, a été choisie en raison de la simplicité de sa mise en oeuvre, de manière que la répétabilité des manipulations permettent l'examen des 17 échantillons.

La Pharmacopée Française VIII.15, prévoit 2 catégories de médicaments à base de plantes : les médicaments à base de plantes dont l'emploi fait intervenir de l'eau bouillante et les autres médicaments à base de plantes. Notre contrôle concerne la première catégorie de médicaments, et donc seulement le dénombrement de germes aérobies viables totaux.

Nous avons voulu déterminer partiellement si dans chaque échantillon, il y avait une ou plusieurs sortes de bactéries, levures ou moisissures. C'est pourquoi nous avons réalisé en plus du protocole de la Pharmacopée Française, un ensemencement en surface pour repérer les différents types de colonies.

L'observation des bactéries s'est limitée à déterminer la présence de cocci GRAM + ou GRAM - et de bacilles GRAM + ou GRAM -. Peu de documents bibliographiques font état des différentes espèces de micro-organismes.

Quant aux moisissures et aux levures, certaines ont pu être identifiées directement au microscope après coloration, grâce à des critères morphologiques et anatomiques.

## **1. LES BACTERIES**

Nous avons comparé les dénombrements par plante, en fonction des différents laboratoires d'origine (cf figure 1 page 29) et comparé nos résultats avec les données bibliographiques et les normes tolérées par la Pharmacopée Française VIII.15.

Le tableau 3 page 28, illustré par la figure 1 page 29, permet de constater des écarts de contamination bactérienne, entre les différentes plantes étudiées. La plus contaminée est la passiflore et la moins contaminée est la bourdaine. Lorsque la plante est fournie par plusieurs laboratoires, nous avons établi une moyenne des dénombrements. Nous retrouvons ce même classement dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Classement des plantes suivant le niveau moyen de contamination bactérienne**

PLANTES	Moyenne du nombre de bactéries (10 <sup>3</sup> UFC/g)
Passiflore	11600
Thym	3000
Vigne rouge	415
Menthe	200
Bourrache	151.5
Mauve	144
Bardane	130
Verveine	127.33
Romarin	52
Anis vert	51.83
Griottier	33
Tilleul	28.33
Camomille	22.5
Eucalyptus	5
Chiendent	4
Badiane	2.28
Bourdaïne	0

A l'exclusion de la bourdaïne exempte de bactéries, la badiane avec  $2,28 \times 10^3$  UFC/g est la plante la moins contaminée et la passiflore avec  $1,16 \times 10^7$  UFC/g est la plante la plus contaminée. La charge bactérienne peut donc varier de façon très importante d'une plante à l'autre : il existe un rapport de 5000 entre la charge bactérienne des deux extrêmes (badiane et passiflore). Les feuilles de menthe poivrée, de verveine et de vigne-rouge font parties des échantillons les plus contaminés. Par contre les fruits d'anis-vert et de badiane, ainsi que le pédoncule du fruit du griottier, sont parmi les organes les moins contaminés. A l'exception de ces deux observations, nos résultats ne nous permettent pas d'établir de relation entre le taux de contamination bactérienne et l'organe considéré.

Nous avons voulu savoir si la charge bactérienne varie en fonction de l'origine de l'échantillon c'est à dire le laboratoire fournisseur. Sur la figure 1 page 29, pour une même plante provenant de deux ou trois laboratoires différents, nous constatons des écarts de la charge bactérienne plus ou moins importants. La lecture de cette figure montre des variations très importantes pour les échantillons d'anis vert et de vigne-rouge, plus modérées pour les échantillons de bourrache, de camomille, de tilleul et de verveine. La contamination environnante des lieux de culture, les conditions de récolte et toutes les manipulations annexes jusqu'au conditionnement final des plantes, nous permettent de supposer qu'il y a donc des fluctuations au niveau de la

contamination bactérienne des plantes médicinales.

A l'exception de la bourdaine et de l'échantillon d'eucalyptus du laboratoire B, dans 100% des échantillons la charge bactérienne est supérieure à  $10^3$  UFC/g. Dans environ 66% des échantillons, le nombre de bactéries est compris entre  $10^4$  et  $10^6$  UFC/g. Nous avons comparé ci-dessous nos dénombrements avec ceux de la bibliographie.

<u>Expérimentation</u> <u>personnelle</u>	<u>Publication (14)</u>	<u>Publication (11)</u>	<u>Publication (26)</u>
Nombre de bactéries	Nombre de bactéries	Nombre de bactéries	Nombre de bactéries
> $10^3$ UFC/g	> $10^5$ UFC/g	> $10^2$ UFC/g.	> $10^3$ UFC/g
dans 100%	dans 11 drogues	dans 100%	dans 35 échantillons
des échantillons.	sur 21.	des poudres.	sur 82.
Nombre de bactéries	Nombre de bactérie	Nombre de bactéries	
compris entre $10^4$	compris entre $10^1$	compris entre $10^4$	
et $10^6$ UFC/g	et $10^7$ UFC/g.	et $10^6$ UFC/g.	
dans 66% des		dans 72% des	
échantillons.		échantillons.	

Rappelons que dans la publication (14), l'expérimentation porte sur des plantes sèches conditionnées en sachets ou en vrac et que la référence bibliographique est la Pharmacopée Helvétique VII, article V. 2. 1. 8 : " contrôle de la contamination microbienne dans les produits non obligatoirement stériles ". Pour la publication (11) et (26), l'expérimentation concerne respectivement des poudres d'origine végétale servant de matière première pour la préparation de cosmétiques et des extraits secs de plante. En ce qui concerne la référence bibliographique de ces deux publications ; il s'agit du deuxième rapport commun du Comité des Laboratoires et Services Officiels de contrôle des médicaments et de la Section des Pharmaciens de l'Industrie de la F. I. P. Les résultats de notre expérimentation qui porte sur des plantes sèches en vrac, concordent avec

ceux de la bibliographie (14) (11) (26). Nous pouvons donc considérer qu'en général, le nombre de bactéries par gramme de plantes dépasse  $10^3$  UFC/g. La charge bactérienne se situe approximativement dans une fourchette allant de  $10^3$  à  $10^6$  UFC/g.

Les limites maximales prescrites par la Pharmacopée française VIII.15 (22), sont de  $10^7$  bactéries par gramme de plante et de  $10^5$  moisissures par gramme de plante. A l'exception de la passiflore, dont la charge bactérienne est de  $1,16 \times 10^7$ , les charges bactériennes de tous les échantillons étudiés sont en dessous des normes définies par la Pharmacopée Française. Ces échantillons répondent donc aux exigences réglementaires. Concernant la passiflore, le taux de contamination de l'échantillon dépasse de peu la limite maximale, ce qui ne peut être considéré comme très significativement supérieur.

Cependant les normes officielles (Arrêté du 10 mars 1988 portant sur le Contrôle de la contamination microbienne dans les plantes médicinales, publié au Journal Officiel du 24 mars 1988) portent sur les populations bactériennes par gramme de drogue. Elles ne doivent pas dépasser  $10^6$  bactéries par gramme de poids sec. Nous constatons que le texte de la Pharmacopée Française VIII.15 ne précise pas si les limites maximales prescrites, concernent des plantes fraîches ou des plantes sèches. Nous remarquons que parmi les 17 échantillons contrôlés, 3 ne répondent pas aux normes fixées par l'arrêté du Journal Officiel. L'échantillon de passiflore dépasse d'une puissance de 10 la limite maximale de  $10^6$  bactéries par gramme de poids sec. La contamination des échantillons de vigne-rouge du laboratoire C et de thym du laboratoire A, respectivement de  $1,17 \times 10^6$  et de  $3 \times 10^6$  UFC/g dépasse de peu.

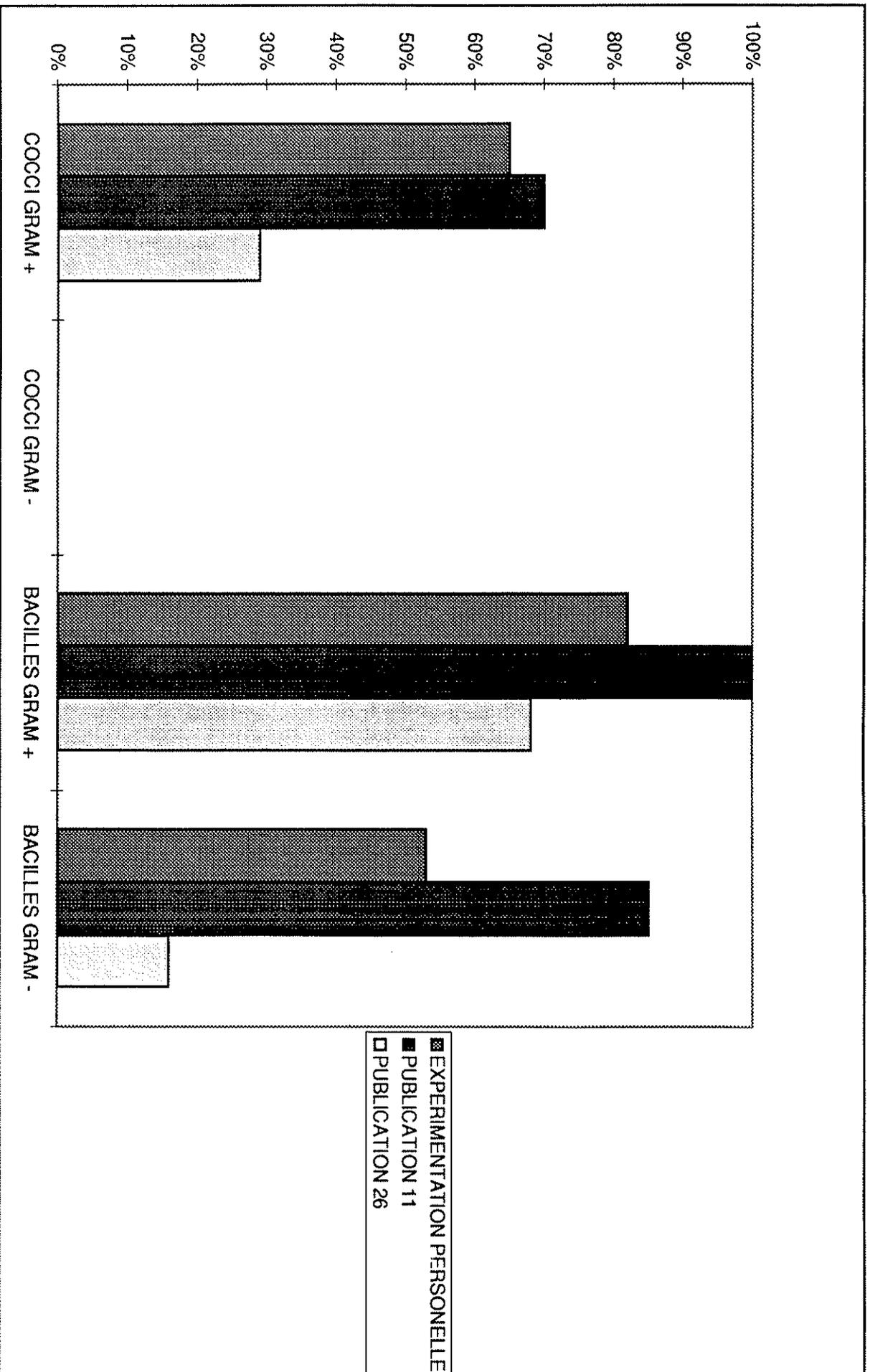
Les analyses portant sur des plantes fraîches, menées par THARREAU et ses collaborateurs (29), ont montré la présence d'une population bactérienne dont le niveau varie entre  $10^5$  et  $10^7$  bactéries par gramme de matière fraîche selon la plante, le site et la date de prélèvement. Après séchage BERNARD (2), a constaté une diminution de deux puissances de 10 des populations bactériennes. La comparaison de nos résultats à ceux de THARREAU semble conforter cette observation. Le séchage induirait donc une diminution de la contamination bactérienne des plantes médicinales.

Suite à l'aspect quantitatif de la contamination bactérienne, abordons l'aspect qualitatif. Sur les tableaux 3 et 5, page 28 et 32, nous observons que la composition de la flore bactérienne varie en fonction de la plante, de l'organe de la plante et du laboratoire fournisseur. Il n'a été décelé

aucun cocci Gram - dans l'ensemble des échantillons étudiés. La flore bactérienne comporte des cocci Gram +, des bacilles Gram + et des bacilles Gram -. Seulement deux échantillons d'anis-vert (fruit), et deux échantillons de camomille (capitule floral), véhiculent avec une grande diversité bactérienne des cocci Gram +, des bacilles Gram + et Gram -. Des cocci Gram + et des bacilles Gram +, ont été trouvés dans des échantillons de chiendent (rhizome), de griottier (pédoncule du fruit), de menthe poivrée (feuille), de romarin (sommités fleuries), de verveine odorante (feuille) et de vigne rouge (feuille). Les lots porteurs de cocci Gram + et de bacilles Gram - sont moins nombreux : bardane (racine), écorce de bourdaine, bourrache (sommités fleuries), eucalyptus (feuille) et thym (parties aériennes fleuries). Les plantes où nous n'avons détecté qu'un seul type de Gram sont : le tilleul (inflorescence) avec des cocci Gram +, la badiane (fruit) et la passiflore (plante entière) avec des bacilles Gram + et la mauve (fleur) avec des bacilles Gram -. Ces résultats traduisent donc des variations dans la flore bactérienne d'une plante à l'autre. Si nous analysons ces variations en fonction de la partie de plante utilisée, nous observons qu'il n'y a pas de relation entre l'organe et une flore particulière.

Dix échantillons viennent d'au moins deux fournisseurs différents. Ce sont : anis-vert, badiane, bourrache, camomille, eucalyptus, griottier, menthe, tilleul, verveine et vigne-rouge. Pour les 5 plantes provenant des 3 laboratoires différents : anis-vert, camomille, tilleul, verveine et vigne-rouge, nous remarquons dans le tableau 5 une grande diversité des types de colonies. En effet dans le lot d'anis vert du laboratoire C, nous isolons 9 types de colonies différents. Nous observons également que dans le lot de camomille du laboratoire C ne sont isolés que 2 types de cocci Gram +, alors que les échantillons des laboratoires A et B présentent 4 types de colonies différentes. Ceci laisse supposer que l'origine et la source d'une plante varie d'un fournisseur à l'autre. En ce qui concerne l'eucalyptus, les flores bactériennes des échantillons issus des fournisseurs B et C sont totalement différents et ne présentent aucun type bactérien en commun : cocci Gram + dans le lot du laboratoire C contre bacilles Gram + et bacilles Gram - dans le lot du laboratoire B. Par contre pour la verveine et la vigne rouge, les lots des laboratoires A et B ont une flore identique. Pour les plantes restantes : badiane, bourrache, menthe, la flore bactérienne est du même type quelque soit l'origine de l'échantillon, sans que cela laisse présager les mêmes genres ou espèces bactériennes. Ainsi la flore bactérienne fluctue d'une plante à l'autre et d'un fournisseur à l'autre. Ces variations entre lots sont imputables, à la flore naturelle véhiculée par les plantes, qui varie suivant le lieu de récolte, la méthode de récolte, le séchage, le stockage ou le triage.

Figure 3 : Proportions de chaque type bactérien dans notre expérimentation comparées à celles des publications (11) et (26)



De plus, les *Bacillus* réalisent facilement la biosynthèse de leurs constituants dans des conditions de température variables. L'optimum de température peut varier selon les espèces et s'échelonner entre 25° et 37° C ; ce qui correspond aux températures permettant le développement des bactéries mésophiles. Ces différents caractères permettent de comprendre que les *Bacillus* ont été retrouvés dans de nombreux échantillons de plantes sèches. De plus, il ne faut pas perdre de vue que les produits d'origine biologique apportent aux *Bacillus* tous les éléments nutritifs qui leur sont nécessaires et qu'en présence d'une certaine quantité d'eau libre, qui peut être fournie à un des stades de la production, on assiste à une prolifération microbienne.

La présence d'espèces anaérobies sporulées appartenant au genre *Clostridium* est moins fréquemment constatée. Certes, ce sont aussi des espèces largement distribuées dans la nature, dans l'intestin de nombreuses espèces animales et dans le sol. Elles présentent également des formes de résistance : les spores, mais par ailleurs, leurs besoins nutritifs et culturels plus stricts limitent vraisemblablement leur implantation dans la plupart des échantillons de plantes. Ainsi ce sont des germes qui requièrent généralement une série d'acides aminés, d'hydrates de carbone et de vitamines pour se développer dans les milieux artificiels (10). Leur température optimum de développement est plus régulièrement voisine de 37° C, même si certaines espèces poussent à des températures plus basses ou plus élevées. Mais enfin et surtout, l'oxygène libre inhibe leur croissance et peut même, dans certains cas, tuer les formes végétatives.

En accord avec les deux publications référencées (11) et (26), les cocci Gram - sont absents de l'ensemble des lots que nous avons analysés. Ce qui semble cohérent car ceux-ci sont essentiellement représentés par les *Neisseriaceae*, dont les genres *Branhamella* et *Neisseria* sont assez peu ou pas présents dans l'environnement. De plus l'ensemencement en surface des boîtes de Pétri exclue la présence de la flore des *Veillonella* qui sont des cocci Gram - anaérobies.

A propos des cocci Gram + et des bacilles Gram -, les résultats divergent mais nos résultats se situent entre ceux des publications (11) et (26).

Parmi les bacilles Gram -, les enterobactéries sont très largement répandues dans les milieux extérieurs (1). Ce sont des germes que l'on retrouve régulièrement dans l'intestin de l'homme et des animaux, espèces commensales ou espèces pathogènes parfois disséminées par des porteurs sains, notamment les *Salmonella*. Ce sont donc des espèces saprophytes des milieux extérieurs présentes soit sur les plantes, soit dans le sol et survivant bien dans l'eau. Bien que non sporulées, ce sont néanmoins des espèces présentant une grande vitalité. Si la plupart d'entre elles sont tuées

par un chauffage modéré, les souches fécales telles *E.Coli* semblent à cet égard moins sensibles aux températures supérieures à 37°C. Elles présentent par contre une résistance marquée à un nombre de substances antibactériennes utilisées comme désinfectants, antiseptiques ou conservateurs dans les médicaments (10). En ce qui concerne leurs exigences nutritives, elles sont très limitées. Ces espèces peuvent en effet utiliser de nombreux composés organiques comme source de carbone et d'énergie. Certaines sont capables d'assimiler l'azote sous forme d'azote ammoniacal, de nitrites ou de nitrates pour la biosynthèse de leurs composés azotés. Elles ne requièrent généralement pas de facteurs de croissance pour leur développement. Ce sont des espèces dotées d'un équipement enzymatique très développé incluant des systèmes inductibles. Et ceci est particulièrement marqué pour les *Pseudomonas*. Tous ces bacilles Gram - sont, de plus capables de se multiplier à diverses températures. Si 37° C est la température favorable aux espèces pathogènes, nombre d'espèces commensales et saprophytes vont se développer aisément à la température ambiante qui pour certaines d'entre elles correspond à la température optimale de développement. Les *Pseudomonas* peuvent croître à la température de + 4° C. Ces différents caractères permettent à nouveau de comprendre pourquoi ces différentes bactéries à Gram - ont été décelées dans les échantillons de plantes. Il faut encore considérer que la contamination des plantes, peut être massive au cours de la récolte et lors de l'entreposage. Pour les motifs donnés dans le cas des *Bacillus*, ces germes peuvent se multiplier abondamment en présence d'une quantité d'eau libre suffisante au cours de la production. Une étude sur la qualité microbiologique des plantes aromatiques, publiée dans la revue *Herbalia* de mars 1995 (25), mentionne que certaines étapes de la récolte peuvent se révéler contaminantes : c'est le cas de la coupe, du fanage et du battage en particulier lorsqu'ils sont pratiqués par temps humide. Cette étude incrimine également l'eau d'irrigation qui peut être de qualité microbiologique médiocre et donc à l'origine d'une contamination bactérienne des plantes.

Enfin, parmi les cocci Gram +, notons que la présence de staphylocoques et notamment de *Saphylococcus. aureus* a rarement été signalée (10). Les staphylocoques sont aussi des germes largement distribués dans la nature. Ce sont des hôtes de la flore normale de l'homme et des animaux. Chez l'homme, on le trouve dans le nez, sur la peau et dans l'intestin. Ils sont aussi présents dans l'air, dans l'eau et dans les milieux extérieurs. Même si on les trouve dans les milieux extérieurs, ils restent tributaires de l'environnement humain et animal. Ce sont aussi des germes d'une grande vitalité, classés parmi les plus résistants des espèces non sporulées. Ils supportent bien la dessiccation, les milieux hypertoniques à forte concentration saline. Ils sont sensibles à la chaleur bien qu'ils ne soient pas tués à 50° C après 30 minutes. Bien que pouvant être

particulièrement résistants à la pénicilline et à d'autres antibiotiques, ils sont plus sensibles aux agents antimicrobiens chimiques utilisés de façon courante dans la fabrication ou la conservation des médicaments que les bacilles à Gram - susmentionnés. Par ailleurs, tout en se développant au laboratoire sur des milieux non enrichis, ils n'ont pas l'aptitude qu'ont les bacilles Gram - d'utiliser les substrats organiques les plus variés comme source de carbone et d'énergie. En ce qui concerne leurs autres caractères culturels, les staphylocoques, espèces aérobies-anaérobies, ne se développent que partiellement à 37° C. On conçoit donc que les staphylocoques survivent et s'implantent moins facilement que les *Bacillus* et que les bacilles à Gram - Entérobactéries et *Pseudomonas* dans les lots de plantes médicinales. Les autres cocci à Gram + que l'on rencontre plus fréquemment sont les entérocoques. Parmi les entérocoques les espèces le plus souvent isolées sont : *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* et *E. avium*. Les entérocoques sont très souvent rencontrés à l'état commensal (15). Outre le tube digestif, ils peuvent coloniser les voies urogénitales. Ils survivent dans le milieu extérieur où leur présence est considérée comme un indice de contamination fécale.

## 2. LES LEVURES ET MOISSISSURES

Nous avons comparé les dénombrements par plante, en fonction des différents laboratoires d'origine (cf figure 2 page 31), et comparé nos résultats avec les normes tolérées par la Pharmacopée Française VIII.15..

Le tableau 4 et la figure 2, page 30 et 31, révèlent des variations de la charge fongique d'une plante à l'autre. Comme pour les bactéries, nous avons établi un classement, de la plante la plus contaminée à la plante la moins contaminée : cf tableau 9.

**Tableau 9 : Classement des plantes suivant le niveau moyen de contamination par les levures et moisissures**

<b>PLANTES</b>	<b>Moyenne du nombre de levures et moisissures (<math>10^2</math> UFC/g)</b>
<b>Romarin</b>	2600
<b>Eucalyptus</b>	1200.5
<b>Thym</b>	760
<b>Badiane</b>	550
<b>Menthe</b>	460
<b>Vigne rouge</b>	308.33
<b>Griottier</b>	70
<b>Verveine</b>	29.66
<b>Tilleul</b>	28.33
<b>Bardane</b>	25
<b>Anis vert</b>	15.66
<b>Bourrache</b>	11
<b>Camomille</b>	8.33
<b>Chiendent</b>	5
<b>Passiflore</b>	2
<b>Bourdaïne</b>	0
<b>Mauve</b>	0

La charge fongique des plantes les plus contaminées, dépasse  $10^5$  germes par gramme : il s'agit du romarin (sommités fleuries) avec  $2,6 \times 10^5$  UFC/g et des feuilles d'eucalyptus avec  $1,2 \times 10^5$  UFC/g. Quatre échantillons contiennent entre  $10^4$  et  $10^5$  germes par gramme ; ce sont le thym (parties aériennes fleuries), le fruit de la badiane, les feuilles de menthe poivrée et de vigne rouge. Le taux de contamination le plus fréquent est compris entre  $10^3$  et  $10^4$  micro-organismes par gramme. Il concerne le griottier (pédoncule du fruit), les feuilles de verveine, l'inflorescence du tilleul, la racine de bardane, le fruit de l'anis vert et la bourrache (sommités fleuries). A l'exception de la bourdaïne et de la mauve dont les charges fongiques sont nulles, les échantillons les moins contaminés renferment entre 200 et 1000 UFC/g. Il s'agit de la camomille (capitule floral), du rhizome de chiendent et de la passiflore (plante entière) qui avec 200 UFC/g est l'échantillon le moins contaminé. Ces résultats expriment donc des variations importantes de la charge fongique

suivant la plante étudiée. Il existe un rapport de 1300 entre la charge fongique maximale et la charge fongique minimale. Cette amplitude est environ 5 fois plus faible que celle constatée pour les bactéries, qui est de 5000. Les variations de la charge bactérienne sont donc plus sensibles que celles de la charge fongique. A l'exception de la racine de bardane et du rhizome de chiendent qui présentent un taux de contamination assez faible, ces observations ne permettent pas d'établir de lien entre la charge fongique dans un organe et dans un autre, ni entre deux parties de plante.

Nous avons voulu savoir si la charge fongique varie en fonction de l'origine de l'échantillon, c'est à dire le laboratoire fournisseur. Selon la figure 2 page 31, pour une même plante provenant de deux ou trois laboratoires différents, nous constatons des écarts de la charge fongique plus ou moins importants. La lecture de cette figure montre des variations très significatives pour les échantillons d'eucalyptus, assez significatives pour les échantillons d'anis-vert et de camomille. La contamination environnante des lieux de culture, les conditions de récolte et toutes les manipulations annexes jusqu'au conditionnement final des plantes, nous permettent de supposer qu'il y a donc des fluctuations au niveau de la contamination fongique des plantes médicinales.

Si nous comparons la figure 1 page 29 et la figure 2 page 31, nous constatons que pour une même plante, les variations de la charge fongique en fonction du laboratoire d'origine, sont plus sensibles que celles de la charge bactérienne.

A l'exception de l'échantillon de badiane du laboratoire B, de la bourdaine du laboratoire D et de la mauve du laboratoire A, dans 100% des échantillons la charge fongique est supérieure à  $10^2$  UFC/g. Dans environ 22% des échantillons, la charge fongique est comprise entre  $10^2$  et  $10^3$  UFC/g, dans 44% des échantillons entre  $10^3$  et  $10^4$  UFC/g, dans 15,5% des échantillons entre  $10^4$  et  $10^5$  UFC/g et dans 9,5% des échantillons entre  $10^5$  et  $10^6$  UFC/g.

Trois lots de plantes ne répondent pas aux exigences de la Pharmacopée Française. Leurs charges fongiques dépassent la limite maximale prescrite de  $10^5$  levures ou moisissures par gramme de plante. La contamination des lots de badiane et d'eucalyptus du laboratoire C, ainsi que le lot de romarin du laboratoire A, est environ 3 fois supérieure à cette limite. Concernant la badiane, le taux de contamination de l'échantillon à  $1,1 \times 10^5$  UFC/g, dépasse de peu la limite maximale, ce qui ne peut être considéré comme très significativement supérieur.

A l'exception des échantillons d'eucalyptus et de badiane du laboratoire C et de romarin du laboratoire A, nous constatons que globalement la charge fongique de notre expérimentation se situe dans une fourchette allant de  $10^2$  à  $10^5$  UFC/g. Les publications (14) et (11) font respectivement état d'un nombre de levures et moisissures compris entre  $10^2$  et  $10^5$  UFC/g, dans 76% et 88% des cas. Nos résultats sont donc cohérents avec ceux de ces publications. FAVET (14) précise qu'en général les dénombrements de levures et moisissures sont inférieurs d'une puissance de 10 à ceux des bactéries. Nos observations semblent vérifier cette constatation.

Après l'aspect quantitatif de la contamination des plantes par les levures et moisissures, abordons l'aspect qualitatif. Les tableaux 4 et 6, page 30 et 33, permettent de mettre en évidence que la flore fongique diffère de façon très significative suivant l'origine des échantillons. Nous observons également que certaines espèces sont plus fréquemment rencontrées suivant l'origine de l'échantillon, et cela quelle que soit la plante. En effet des *Cladosporium* et *Monascus ruber* ont été décelés conjointement dans la quasi totalité des échantillons issus du laboratoire A, soit dans 6 échantillons sur 8. Des *Aspergillus* sont très fréquemment mis en évidence dans les lots issus du laboratoire C : dans 8 échantillons sur 12. Nous répertorions dans le tableau 10 ci-dessous les proportions des levures et de chaque type de moisissures mises en évidence au cours de notre expérimentation.

**Tableau 10 : Proportions des levures et moisissures mis en évidence au cours de notre expérimentation**

Levures et types de moisissures	Nombre d'échantillons contaminés
<i>Acremonium sp</i>	6
<i>Alternaria sp</i>	3
<i>Aspergillus sp</i> dont 6 <i>A. niger</i>	17
1 <i>A. flavus</i>	
1 <i>A. nidulans</i>	
<i>Botrytis sp</i>	1
<i>Cladosporium sp</i>	10
<i>Dreschlera sp</i>	2
Filamenteux sp dont 6 <i>Monascus ruber</i>	10
Levures	5
Mucorales sp dont 2 <i>Mucor</i>	4
<i>Penicillium sp</i>	7
<i>Rhodotorula sp</i>	1
<i>Wallemia sp</i>	1

Les micro-organismes les plus fréquemment rencontrés sont donc les *Aspergillus*, les *Cladosporium* et les filamenteux. Les *Aspergillus* sont des contaminants très communs, polyphages, parfois pathogènes pour l'homme, les animaux et les végétaux et susceptibles de produire des métabolites toxiques. En effet la présence d'*A. flavus*, espèce qui élabore divers

antibiotiques et des composés très toxiques et carcinogènes comme les aflatoxines (3), est à signaler dans un échantillon.

Les *Cladosporium* sont mondialement répandus. Ce genre groupe environ 35 espèces parasites de végétaux ou saprophytes très communs. Quatre espèces sont particulièrement impliquées dans des problèmes de contamination et de biodétérioration : *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *C. resinae* et *C. sphaerospermum*. Il est important de préciser que les *Cladosporium* sont allergisants et peuvent provoquer de graves problèmes chez les immunodéprimés.

Parmi les filamenteux, l'espèce *Monascus ruber* est très répandue, présente dans le sol et notamment au niveau du riz, des graines, des produits laitiers et carnés.

Nous observons également que les levures sont assez peu présentes dans les échantillons de notre expérimentation, seulement dans 5 cas. Parmi les levures, les *Candida* vivent dans les conditions naturelles en saprophytes d'un organisme-hôte (homme ou animal). A l'exception de *Candida albicans* exceptionnellement isolé en dehors du corps humain ou animal (13), les autres espèces de *Candida* ont été également retrouvés dans la nature (air, fruits ou légumes en cours de décomposition, céréales et produits laitiers).

Les *Penicillium* sont des champignons très communs, polyphages et responsables de nombreuses dégradations ; ils sont présents dans 7 échantillons.

Les *Alternaria*, trouvés dans 3 échantillons, sont des champignons cosmopolites et saprophytes communs sur de nombreuses plantes.

Remarquons également la présence de *Botrytis* dans un échantillon. Dans ce genre, l'espèce *B. cinerea* est très largement répandue, saprophyte ou parasite d'un grand nombre de végétaux et nuisible aux fruits et légumes lors du transport ou du stockage ; c'est l'agent de la "pourriture noble" favorable à la vinification liquoreuse des vins blancs de Bordeaux.

Du fait de leur existence dans l'environnement, la présence de ces champignons dans nos échantillons de plantes n'a rien d'étonnant. Seule la forte proportion d'*Aspergillus*, de *Cladosporium*, de filamenteux et la présence d'*A. flavus*, sont à souligner. FAVET (14), qui s'est intéressé à la recherche d'*A. flavus* lors de son expérimentation, a constaté l'absence de cette espèce parmi la vingtaine de drogues végétales étudiées.

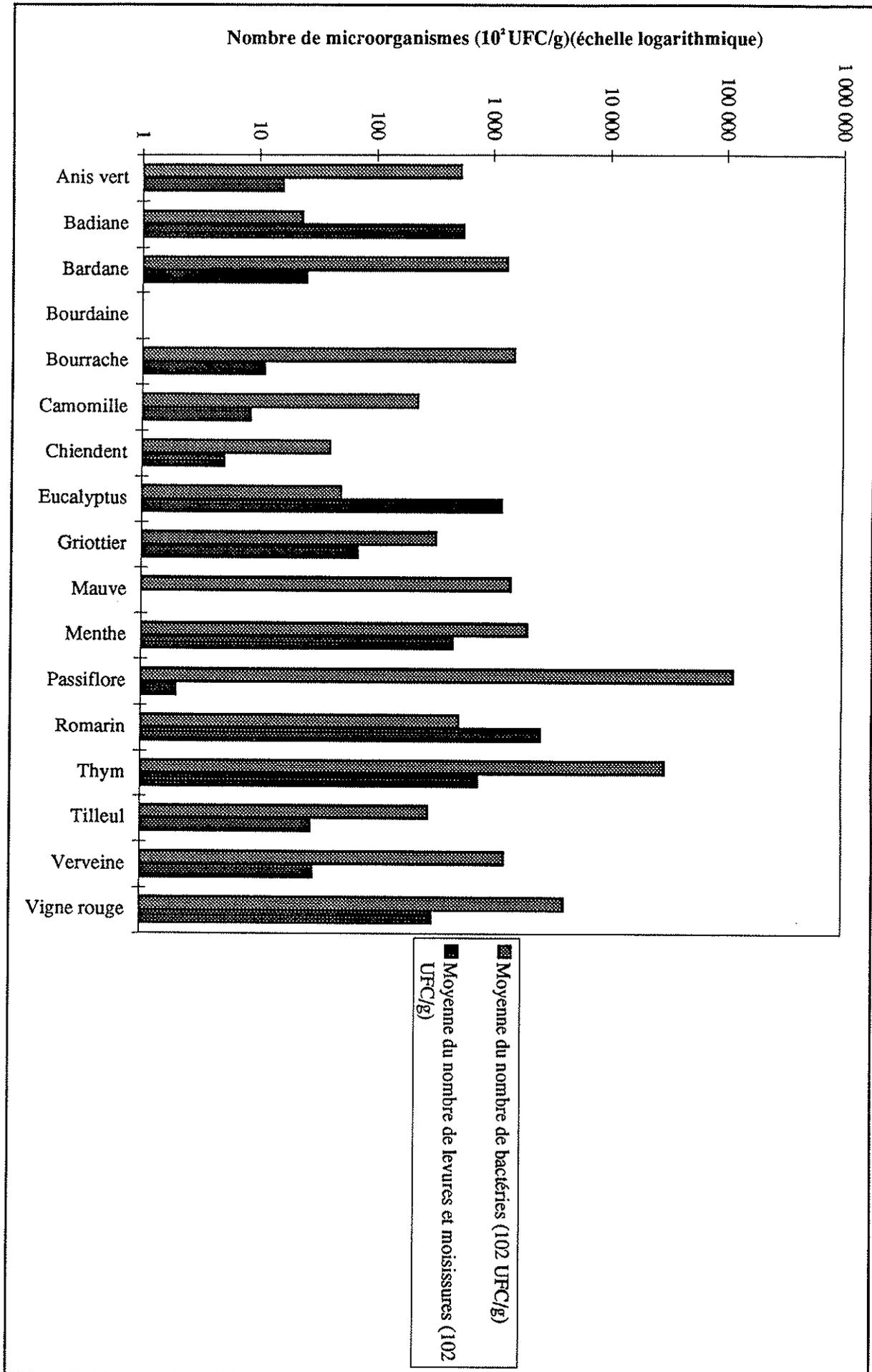


Figure 4 : Comparaison de la charge bactérienne et de la charge fongique pour chaque plante ( $10^2$  UFC/g) (l'échelle des dénombrements est une échelle logarithmique)

# **CONCLUSION**

Notre étude, nous a permis de constater des lacunes concernant le domaine d'application des normes de contamination bactérienne et fongique de la Pharmacopée Française vis à vis des plantes médicinales. Le texte différencie seulement les médicaments à base de plantes dont l'emploi fait intervenir de l'eau bouillante et les autres médicaments à base de plantes. Hormis cette distinction, les normes s'appliquent à toutes les formes de plantes, qu'il s'agisse de plantes fraîches ou de plantes sèches. Le problème du conditionnement n'est pas abordé. Les textes ne tiennent pas compte des différentes formes d'utilisation des plantes médicinales. Cette situation pose le problème de la validité des contrôles lorsque les échantillons ne sont pas de même nature.

Nos résultats révèlent des variations de la charge et de la flore bactérienne en fonction de l'échantillon et de son origine. Ces fluctuations s'expliquent par la diversité du contexte bactérien suivant le lieu de récolte et par l'éventuelle contamination lors de la récolte et au cours des différentes étapes du conditionnement des plantes ou pendant leur conservation. Les taux de contamination inférieurs à  $10^7$  UFC/g, nous permettent de valider la conformité de l'ensemble des échantillons étudiés aux regards des obligations réglementaires de la Pharmacopée Française. D'un point de vue qualitatif, la flore bactérienne des lots étudiés se compose majoritairement de bacilles Gram + (82%), puis de cocci Gram + (65%) et de bacilles Gram - (53%).

En ce qui concerne les levures et moisissures, nos résultats révèlent des variations de la charge et de la flore fongique en fonction de l'échantillon et de son origine. Ces résultats nous permettent également de vérifier que les dénombrements de levures et moisissures sont inférieurs d'une puissance de 10 à ceux des bactéries.

De plus il apparaît que la flore fongique diffère de façon très significative suivant l'origine des échantillons. Nous observons en effet que certaines espèces sont plus fréquemment rencontrées suivant l'origine de l'échantillon, et cela quelque soit la plante : les *Cladosporium* et *Monascus ruber* sont plus fréquents dans les échantillons issus du laboratoire A, ainsi que les *Aspergillus* dans les lots issus du laboratoire C. Ces observations laisse supposer une contamination au niveau du laboratoire, soit au cours des opérations de conditionnement ou lors du stockage. Il est important de souligner la forte présence d'*Aspergillus*, de *Cladosporium*, de Filamenteux et en raison de sa toxicité, la présence d'*A. flavus*. Contrairement aux bactéries, la Pharmacopée Française ne prescrit pas la recherche de levures et moisissures spécifiées, tels que *C. albicans* ou *A. flavus* dont le pouvoir pathogène ne fait pas de doute. Nous pouvons également ajouter que la plupart des publications relatives à la contamination microbienne des médicaments en général et des plantes

médicinales en particulier, aborde le sujet de la contamination par les levures et moisissures de façon assez succincte. Cette mésestimation du risque de contamination des plantes médicinales par les levures et moisissures, aboutit à des résultats hors normes.

Nous terminerons en rappelant que dans un contexte de restriction des dépenses de santé, la phytothérapie présentant un intérêt thérapeutique dans les affections bénignes, s'inscrit dans la politique de développement de la médication familiale. Dans un souci de santé publique, il serait donc intéressant de reconsidérer et d'approfondir le problème de la contamination bactérienne et fongique des plantes médicinales.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- 1 - AVRIL J.L., DABERNATH H., DENIS F., MONTEIL H. Bactériologie clinique. Paris, Ellipse, 1988. 506p.
- 2 - BERNARD J. Contamination microbiologique des plantes médicinales. Les actualités pharmaceutiques, 1983, 196, 32-34.
- 3 - BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GUY P., LARPENT J.P., VEAU P. Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. Paris, Masson, 1985. 364p. (Biotechnologies)
- 4 - BRIARD C. En 1897 Félix Hoffmann découvre l'aspirine. Le Moniteur des Pharmacies et Laboratoires, 1997, 2198. 36-38.
- 5 - BUTTIAUX R., MOSSEL D.A. L'analyse bactériologique des produits alimentaires périssables et conservés. Ann. Inst. Pasteur, 1957, 9, 138-175.
- 6 - CHIRACHE P. Les plantes médicinales et le public. Th. Univ., Pharm., Paris V, 1988.
- 7 - Article l 512 : n°5. Code de la santé publique. 12e éd. Paris, Dalloz, 1997.
- 8 - Décret n° 79-480 du 15 Juin 1979 relatif à la vente au public des plantes médicinales inscrites à la Pharmacopée Française. Code de la santé publique. 12e éd. Paris, Dalloz, 1997.
- 9 - DELAVEAU P. Cent précieuses plantes médicinales. Paris, Louis Pariente pour les Laboratoires Monot, 1992. 37p.
- 10 - DONY J. Contrôles microbiologiques des formes non obligatoirement stériles. Rev. Inst. Pasteur de Lyon, 1978, 11, 569-591.
- 11 - DONY J., DEVLEESCHOUWER MJ. Contamination microbienne des produits bruts d'origine végétale : incidence pour les préparations cosmétiques. J. Pharm. Belg., 1989, 44, 6, 411-419.
- 12 - DONY J., GERARD P. La contamination microbienne des médicaments et l'établissement des normes de qualité bactériologique. J. Mond. Pharm., 1968, 11, 1, 19-28.

13 - Direction médicale et documentation des laboratoires Squibb. Les candidoses. Paris, Maffiotti, 1965. 139p.

14 - FAVET J. Etude de la contamination microbienne d'une vingtaine de drogues végétales. Pharm. Acta. Helv., 1992, **67**, 250-258.

15 - FERRON A. Bactériologie médicale : à l'usage des étudiants en médecine par les professeurs de bactériologie médicale. 14e éd. La Madeleine, C et R, 1992. 472p.

16 - F. I. P. Pureté microbiologique des formes pharmaceutiques non obligatoirement stériles. Rapport commun du Comité des Laboratoires et Services Officiels de Contrôle des Médicaments et de la section des Pharmaciens de l'Industrie, F. I. P. 1er rapport : J. Mond. Pharm., 1972, **15**, 88-100. 2ème rapport : Pharm. Acta. Helv, 1975, **50**, 285-292.

17 - France. Ministère des affaires sociales de la santé et de la ville, Direction générale de la santé, Agence du Médicament. Bonnes Pratiques de Fabrication. 5e éd. Paris, Direction des journaux officiels, 1995. 151p.

18 - FRANCK B. Mikroorganismen in Drogen, Der mikrobiologische Status von Drogen und Drogezubereitungen und seine Beurteilung. Dtsch. Apoth. Ztg., 1989, 129 Jahrg. Nr. 13, 30.3 : p. 617-623.

19 - LE MASSON S., FALLET C. Phytothérapie : le vert gagnant. Le Moniteur des Pharmacies et des Laboratoires, 1996, 2171. 20-29.

20 - MESSEGUE M. Mon herbier de santé. Paris, Robert Laffont, 1975. 333p.

21 - MOSSEL D.A., BECHET J., LAMBION R. La prévention des infections et toxi-infections alimentaires. Coop. Ed. pour les Industries Alimentaires, Ceria, Bruxelles, 1962.

22 - Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques : Médicaments à base de plantes dont l'emploi fait intervenir de l'eau bouillante. 10e éd. Pharmacopée Française VIII. 15., 1996.

- 23 - Contrôle de la contamination microbienne dans des produits non obligatoirement stériles : Solution et milieux de culture recommandés. 10e éd. Pharmacopée Française VIII. 10., 1986.
- 24 - Pour réussir votre santé : Guide pratique de Phytothérapie. Nice, Romart , 1995. 64p.
- 25 - Institut technique interprofessionnel des plantes à parfum, médicinales et aromatiques. Qualité microbiologique des plantes aromatiques : une étude approfondie réalisée sur menthe poivrée et estragon français, tout au long de l'itinéraire de production et élaboration. *Herbalia* , 1995, 3, 8-9.
- 26 - REMILI H., BOUSSARD P., DEVLEESCHOUWER M. Microbiological quality of spray-dried pharmaceutical plant extracts. *Eur. J. Pharma. Sci.* , 1994, 1, 265-268.
- 27 - ROQUIER D. Principales formes d'utilisation des plantes. *Les actualités pharmaceutiques*, 1990, Août, 62-63.
- 28 - SALOMON PY. Les formes galéniques, les différentes formes. *Le Moniteur des pharmacies et des Laboratoires*, 1990, septembre, 28-30.
- 29 - THARREAU D., GAINARD JL., LUISETTI J., BARRAUD GIBON C. Présence d'une microflore bactérienne abondante et variée à la surface de trois plantes aromatiques et médicinales . *Herba Gallica*, 1992, 2, 79-89.
- 30 - TISSEYRE BERRY M. L'étendue du monopole pharmaceutique : les produits et objets définis par l'article L 512 . *Abrégé de législation et de déontologie pharmaceutiques*. 3e éd. Paris, Masson, 1983.

# **TABLE DES MATIERES**

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>3</b>
1. BONNES PRATIQUES DE FABRICATION.....	4
2. LEGISLATION CONCERNANT LA VENTE DE PLANTES MEDICINALES A L'OFFICINE.....	5
3. REGARD SUR L'ESSOR DES PLANTES MEDICINALES.....	5
4. LES PLANTES MEDICINALES.....	7
4.1. LES DIFFERENTES FORMES D'UTILISATION DES PLANTES MEDICINALES.....	7
4.2. PLANTE TOTALE OU PARTIE DE PLANTE.....	9
4.3. INDICATIONS DES PLANTES MEDICINALES.....	14
5. LES BACTERIES, LES LEVURES ET LES MOISSURES.....	14
5.1. ETABLISSEMENT DES NORMES MICROBIOLOGIQUES.....	14
5.2. PRINCIPAUX GERMES DECOUVERTS AU COURS D'ETUDES MICROBIOLOGIQUES.....	16
5.2.1. ASPECT QUANTITATIF.....	16
5.2.2. ASPECT QUALITATIF.....	17
<b>EXPERIMENTATION PERSONNELLE.....</b>	<b>20</b>
1. MATERIELS ET METHODES.....	21
1.1. MATERIELS.....	21
1.1.1. PLANTES.....	21
1.1.2. SOLUTIONS ET MILIEUX DE CULTURES.....	24

1.2. METHODES.....	25
1.2.1. DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES.....	25
1.2.1.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS.....	25
1.2.1.2. EXAMENS DES ECHANTILLONS.....	25
1.2.2. ENSEMENCEMENT EN SURFACE EN VUE D'UNE IDENTIFICATION MICROSCOPIQUE PARTIELLE.....	26
1.3. INTERPRETATION DES RESULTATS.....	26
2. RESULTATS.....	27
2.1. DENOMBREMENTS.....	27
2.2. IDENTIFICATIONS PARTIELLES.....	27
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>34</b>
1. LES BACTERIES.....	36
2. LES LEVURES ET MOISSURES.....	45
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>56</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>60</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>63</b>

# **ANNEXES**

## Annexe 1

### PLANTES TRADITIONNELLEMENT UTILISÉES

Pour réduire la nervosité des adultes, notamment en cas de perception exagérée des battements cardiaques (palpitations) après que toute maladie cardiaque a été écartée.

Dans les manifestations de la fragilité des petits vaisseaux de la peau.

- par voie orale
- par usage local

En vue de diminuer les sensations de jambes lourdes ou les désagréments des hémorroïdes.

- par voie orale
- en usage local

Pour le nettoyage des petites plaies après lavage abondant (à l'eau et au savon) et élimination des souillures.

- application locale

En cas d'acné modérée, en application locale à l'aide d'une compresse ou d'un coton.

Dans les démangeaisons et desquamations du cuir chevelu avec pellicules.

- en application locale

En usage local comme traitement d'appoint adoucissant et pour calmer les démangeaisons des affections de la peau, en cas de crevasses, écorchures, gerçures et contre les piqûres d'insectes.

- en application locale à l'aide d'une compresse ou d'un coton

Contre les coups de soleil, les brûlures superficielles et peu étendues, les érythèmes fessiers.

- en application locale à l'aide d'une compresse ou d'un coton

Aubépine, Coquelicot, Passiflore.

Mélilot, Vigne rouge.  
Arnica, Hydrocotyle, Viburnum.

Cassis, Ronce, Hamamélis,  
Mélilot, Vigne rouge.  
Hydrocotyle.

Ronce, Serpolet, Thym,  
Lavande, Sarriette.

Pensée, Bardane.

Noyer, Ortie blanche.

Mauve, Bardane, Bleuet,  
Camomille, Guimauve,  
Millepertuis, Noyer, Plantain,  
Souci, Tilleul, Matricaire,  
Hydrocotyle, Violette,  
Millefeuille.

Arnica, Souci, Lavande,  
Millepertuis, Hydrocotyle.

## PLANTES TRADITIONNELLEMENT UTILISÉES

<p>Pour faciliter la digestion.</p>	<p>Coriandre, Matricaire, Mélisse, Menthe, Verveine, Angélique, Anis vert, Badiane, Camomille, Carvi, Sauge, Fenouil, Romarin, Sarriette, Serpolet, Thym, Marjolaine, Réglisse, Chicorée, Millefeuille.</p>
<p>Pour calmer les douleurs abdominales d'origine digestive.</p>	<p>Angélique, Mauve, Anis vert, Menthe, Badiane, Camomille, Carvi, Coriandre, Guimauve, Pensée, Mélisse, Millefeuille.</p>
<p>Pour faciliter les fonctions d'élimination de l'organisme.</p>	<p>Mais, Menthe, Artichaut, Bardane, Boldo, Bouleau, Chiendent, Romarin, Cassis, Fumeterre, Pissenlit, Prêle, Reine des Prés, Sureau, Olivier, Queue de cerise (Griottier), Chicorée, Ortie blanche, Fenouil.</p>
<p>Dans les diarrhées légères.</p>	<p>Aigremoine, Fraisier, Géranium, Ronce, Noyer.</p>
<p>Dans les règles douloureuses.</p>	<p>Armoise, Absinthe.</p>
<p>Pour faciliter l'élimination de la bile et faciliter la digestion.</p>	<p>Artichaut, Boldo, Romarin, Fumeterre, Chicorée.</p>
<p>Dans les troubles fonctionnels digestifs attribués à une origine hépatique.</p>	<p>Menthe.</p>
<p>En cas de fièvre légère et de grippe.</p>	<p>Reine des Prés.</p>
<p>Pour stimuler l'appétit.</p>	<p>Absinthe, Centaurée, Genièvre, Gentiane, Matricaire, Ményanthe, Oranger bigarade (Bigaradier), Armoise.</p>

## PLANTES TRADITIONNELLEMENT UTILISÉES

Dans les états de fatigue passagers

Karkadé, Cynorrhodon.

Pour faciliter la perte de poids, en complément de mesures diététiques.

Cassis, Chiendent, Frêne, Fucus, Maïs, Prêle, Sureau, Chicorée.

Pour faciliter la prise de poids.

Centaurée, Karkadé, Ményanthe, Oranger bigarade (Bigaradier), Cynorrhodon.

En cas de douleurs (maux de tête, douleurs dentaires).

Reine des Prés, Saule.

Pour réduire la nervosité des adultes et des enfants, notamment en cas de troubles du sommeil.

Aubépine, Coquelicot, Eschscholtzia, Lavande, Mélisse, Passiflore, Tilleul, Valériane, Oranger bigarade (Bigaradier), Verveine.

En cas d'irritation ou de gêne oculaire due à des causes diverses (atmosphère enfumée, effort visuel soutenu, bains de mer ou de piscine, etc.).  
- en lavage ou bain oculaire

Matricaire, Bleuet, Camomille, Plantain.

Dans les toux bénignes occasionnelles.  
Attention : si la toux persiste, consulter le médecin.  
- par voie orale

Bouillon blanc, Coquelicot, Erysimum, Guimauve, Lierre, Mauve, Pensée, Serpolet, Thym, Violette, Marrube, Réglisse, Pin.

Au cours des affections bronchiques aiguës bénignes.  
- par voie orale

Erysimum, Eucalyptus, Hysope, Lierre, Pin, Bourrache, Marrube, Marjolaine.

En cas de nez bouché, de rhume  
- par inhalation.

Eucalyptus, Marjolaine, Sarriette.

## PLANTES TRADITIONNELLEMENT UTILISÉES

Dans les manifestations articulaires douloureuses, tendinites, foulures.

– par voie orale

– en frictions locales

Frêne, Harpagophytum, Saule,  
Reine des Prés, Cassis.

Cassis, Harpagophytum, Saule,  
Reine des Prés.

Pour le soulagement temporaire des maux de gorge et/ou des enrrouements passagers : en gargarisme

Guimauve, Mauve, Pin, Ronce,  
Bouillon blanc, Fraisier,  
Camomille, Matricaire,  
Réglisse, Erysimum, Serpolet,  
Thym.

En bains de bouche, pour hygiène buccale.

Aigremoine, Bouillon blanc,  
Thym, Romarin, Camomille,  
Géranium, Lavande,  
Marjolaine, Pensée, Sarriette,  
Sauge, Serpolet.

Pour faciliter l'élimination rénale de l'eau.

Artichaut, Bouleau, Cassis,  
Chiendent, Frêne, Prêle,  
Genièvre, Mais, Pissenlit,  
Reine des Prés, Sureau,  
Bourrache, Bruyère (Callune),  
Olivier, Queue de cerise  
(Griottier), Uva Ursi  
(Busserole), Chicorée,  
Ortie blanche.

Comme adjuvant dans le traitement des infections urinaires bénignes.

Genièvre, Uva Ursi (Busserole).

## Annexe 2

CONTAMINATION MICROBIENNE

V.2.1.8.

### V.2.1.8. CONTRÔLE DE LA CONTAMINATION MICROBIENNE DANS DES PRODUITS NON OBLIGATOIREMENT STÉRILES <sup>(1)</sup>

#### V.2.1.8.1. DÉNOMBREMENT DES GERMES AÉROBIES VIABLES TOTAUX

Effectuez le dénombrement des germes aérobies viables totaux par filtration sur membrane, par dénombrement en plaque ou en série de dilutions selon les indications données.

Réalisez le dénombrement des germes aérobies viables totaux dans des conditions qui permettent d'éviter tout risque de contamination accidentelle du produit au cours de l'essai. Les précautions prises ne doivent pas avoir d'effet sur les microorganismes qui peuvent être mis en évidence par cet essai.

Sauf indication contraire, prélevez et traitez un échantillon de 10 g ou de 10 ml avec les précautions décrites ci-dessus. Afin d'obtenir la quantité requise, mélangez plusieurs prélèvements effectués au hasard dans la masse du produit ou sur un nombre suffisant de récipients. Selon la nature du produit à examiner, diluez-le, dissolvez-le, mettez-le en suspension ou préparez une émulsion dans un liquide approprié. Si le produit possède des propriétés antimicrobiennes, celles-ci doivent être annihilées par dilution, neutralisation ou filtration.

Procédez à des séries de dilutions appropriées afin d'obtenir un nombre d'unités, formant des colonies, compris dans les limites recommandées pour la méthode à utiliser.

#### **Préparation de l'échantillon**

*Produits hydrosolubles.* — Préparez une solution ou une dilution de 10 g ou de 10 ml du produit à examiner dans la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0 (VIII.10) ou dans tout autre liquide approprié qui n'exerce aucune activité antimicrobienne dans les conditions de l'essai et complétez à 100 ml <sup>(2)</sup> avec le même liquide. Si nécessaire, ajustez le pH à 7 environ.

*Produits de nature non lipidique insolubles dans l'eau.* — Préparez une suspension de 10 g ou de 10 ml du produit à examiner dans la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0 ou dans tout autre liquide approprié qui n'exerce aucune activité antimicrobienne dans les conditions de l'essai et complétez à 100 ml <sup>(2)</sup> avec le même liquide. Si

(1) Les milieux de culture recommandés sont décrits à l'Annexe VIII.10.

(2) En raison des propriétés de certains produits, il peut être nécessaire d'utiliser des volumes plus grands.

nécessaire, divisez le produit et homogénéisez la suspension par un moyen mécanique. Ajoutez un agent tensioactif approprié tel que le polysorbate 80 à la concentration de 0,1 pour cent *m/V* pour faciliter la mise en suspension de substances difficilement mouillables. Si nécessaire, ajustez le pH à 7 environ.

*Produits de nature lipidique.* — Homogénéisez 10 g ou 10 ml du produit à examiner avec 5 g de polysorbate 20 ou 80 chauffés si nécessaire à une température ne dépassant pas 40 °C <sup>(1)</sup>. Mélangez soigneusement en maintenant cette température au bain-marie ou à l'étuve. Ajoutez 85 ml de solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0 chauffée si nécessaire à une température ne dépassant pas 40 °C. Maintenez cette température pendant le minimum de temps nécessaire à la formation d'une émulsion, sans dépasser 30 min. Si nécessaire, ajustez le pH à 7 environ.

#### Examen de l'échantillon

*Filtration sur membrane.* — Utilisez des membranes filtrantes ayant un diamètre nominal de pores de 0,45 µm au maximum et dont l'efficacité à retenir les bactéries a été établie. Par exemple, les membranes de nitrate de cellulose sont utilisées pour les solutions aqueuses, huileuses ou faiblement alcooliques, celles d'acétate de cellulose pour les solutions fortement alcooliques.

La méthode décrite ci-dessous correspond à l'emploi de membranes d'un diamètre de 50 mm environ. Si des membranes d'un diamètre différent sont utilisées, les volumes des liquides pour dilution et lavage doivent être modifiés en conséquence. L'appareil de filtration et la membrane doivent être stérilisés par des moyens appropriés. L'appareil doit être tel que la solution à examiner puisse être introduite et filtrée dans des conditions d'asepsie et doit permettre l'enlèvement de la membrane pour la transférer dans les milieux de culture. Utilisez deux membranes retenant les bactéries et transvasez sur chacune d'elles 10 ml ou la quantité de l'échantillon dilué correspondant à 1 g du produit à examiner, puis filtrez immédiatement. Si nécessaire, diluez l'échantillon préparé conformément aux instructions indiquées ci-dessus de façon à obtenir un nombre présumé de 10 à 100 colonies. Lavez chaque membrane à 3 reprises au moins en filtrant chaque fois 100 ml environ d'un liquide approprié, tel que la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0. Si l'échantillon est constitué par un produit de nature lipidique, utilisez un diluant qui peut contenir un agent tensioactif tel que le polysorbate 20 ou 80. Déposez la membrane destinée

(1) Exceptionnellement, il peut être nécessaire de chauffer jusqu'à une température de 45 °C pendant un minimum de temps.

principalement au dénombrement des bactéries à la surface d'une plaque de milieu gélosé B et l'autre membrane, destinée principalement au dénombrement des moisissures et levures, à la surface d'une plaque de milieu gélosé C. Faites incuber la plaque de milieu B à 30-35 °C et la plaque de milieu C à 20-25 °C pendant 5 jours, à moins qu'un délai plus court ne permette d'obtenir un dénombrement plus fiable. Dénombez les colonies qui se sont développées. Calculez le nombre de microorganismes par gramme ou par millilitre du produit à examiner en précisant si nécessaire le nombre de bactéries d'une part et celui des moisissures et levures d'autre part.

#### *Dénombrement sur plaques de gélose*

Bactéries. — Utilisez:

- des boîtes de Pétri d'un diamètre de 9 cm à 10 cm et introduisez dans chacune d'elles un mélange de 1 ml de l'échantillon préparé pour l'essai et de 15 ml environ de milieu gélosé B liquéfié dont la température n'est pas supérieure à 45 °C,
- ou des boîtes de Pétri d'un même diamètre contenant le milieu solidifié et étalez sur la plaque l'échantillon préparé pour l'essai.

Si nécessaire, diluez l'échantillon d'après les indications données afin d'obtenir un nombre présumé de 300 colonies au maximum. Préparez ainsi 2 boîtes de Pétri au moins avec la même dilution. Faites incuber à 30-35 °C pendant 5 jours à moins qu'un délai plus court ne permette d'obtenir un dénombrement plus fiable. Dénombez ensuite les colonies qui se sont développées. Calculez les résultats en utilisant les plaques qui présentent le plus grand nombre de colonies et en considérant que 300 colonies représentent le maximum pour une évaluation satisfaisante.

Moisissures et levures. — Utilisez:

- des boîtes de Pétri d'un diamètre de 9 cm à 10 cm et introduisez dans chacune d'elles un mélange de 1 ml de l'échantillon préparé pour l'essai et de 15 ml environ de milieu gélosé C liquéfié, dont la température n'est pas supérieure à 45 °C,
- ou des boîtes de Pétri d'un même diamètre contenant le milieu solidifié et étalez sur la plaque l'échantillon préparé pour l'essai.

Si nécessaire, diluez l'échantillon d'après les indications données afin d'obtenir un nombre présumé de 100 colonies au maximum. Préparez ainsi 2 boîtes de Pétri au moins avec la même dilution. Faites incuber à 20-25 °C pendant 5 jours à moins qu'un délai plus court ne permette d'obtenir un dénombrement plus fiable. Dénombez les colonies qui se sont développées. Calculez les résultats en utilisant les plaques qui présentent 100 colonies au maximum.

*Dénombrement en séries de dilutions.* — Préparez une série de 12 tubes contenant chacun 9 ml à 10 ml de milieu liquide A. A chacun des 3 premiers tubes, ajoutez 1 ml de l'échantillon dissous, homogénéisé ou dilué à 1:10 comme indiqué ci-dessus. A chacun des 3 tubes suivants, ajoutez 1 ml d'une dilution de l'échantillon à 1:100. A chacun des 3 tubes suivants, ajoutez 1 ml d'une dilution à 1:1 000. A chacun des 3 derniers tubes, ajoutez 1 ml du liquide de dilution. Faites incuber tous les tubes à 30-35 °C pendant 5 jours au moins. Les 3 derniers tubes ne doivent présenter aucune croissance microbienne. Si, en raison de la nature du produit à examiner, la lecture des résultats est difficile ou incertaine, préparez une subculture en milieu liquide ou en milieu solide et procédez à la lecture des résultats après une nouvelle période d'incubation. Déterminez le nombre le plus probable de microorganismes par gramme ou par millilitre du produit à examiner d'après le Tableau I ci-après.

**Contrôle de l'efficacité des milieux et contrôle de la validité de la méthode de dénombrement des germes**

Si nécessaire, opérez comme suit: dans des tubes contenant le milieu liquide A, ensemencez séparément les souches de microorganismes de référence indiquées ci-après. Faites incuber à 30-35 °C pendant 18 h à 24 h. Dans le cas de *Candida albicans*, faites incuber à 20-25 °C pendant 48 h.

<i>Staphylococcus aureus</i>	telle que ATCC 6538 P (NCIB 8625, CIP 53.156)
	ou ATCC 6538 (NCIB 9518, CIP 4.83)
<i>Bacillus subtilis</i>	telle que ATCC 6633 (NCIB 8054, CIP 52.62)
<i>Escherichia coli</i>	telle que ATCC 8739 (NCIB 8545, CIP 53.126)
<i>Candida albicans</i>	telle que ATCC 2091 (CIP 1180.79)
	ou ATCC 10231 (NCPF 3179, CIP 48.72).

Diluez une partie de chaque culture avec la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0 afin d'obtenir des suspensions témoins contenant environ 100 microorganismes viables par millilitre.

Utilisez séparément comme suspensions témoins les suspensions de chaque microorganisme dans l'évaluation des méthodes de dénombrement des germes, si nécessaire, en présence et en l'absence du produit à examiner.

La méthode appliquée doit permettre d'obtenir, pour chaque microorganisme de référence, un nombre de colonies qui peut différer du nombre calculé pour l'inoculum, par un facteur de 10 au plus. Afin de contrôler la stérilité des milieux et du liquide de dilution et l'efficacité de la méthode d'asepsie appliquée, effectuez le dénombrement des germes aérobies viables totaux en utilisant la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0 stérile comme préparation d'essai. Il ne doit se produire aucune croissance microbienne dans cette préparation.

Effectuez un prélèvement sur chaque culture et diluez-le dans la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0 afin d'obtenir des suspensions témoins contenant 1 000 microorganismes cultivables environ par millilitre. Mélangez des volumes égaux de chaque suspension et utilisez 0,4 ml (correspondant approximativement à 100 microorganismes de chaque souche) comme inoculum dans la recherche d'*E. coli*, des salmonelles, de *P. aeruginosa* et de *S. aureus*, si nécessaire en présence et en l'absence du produit à examiner. La méthode utilisée doit permettre la détection du microorganisme recherché.

TABLEAU I

*Nombre le plus probable de microorganismes*

Nombre de tubes dans lesquels une croissance microbienne a été observée dans chaque groupe correspondant à la quantité indiquée du produit à examiner			Nombre le plus probable de microorganismes par gramme ou par millilitre
100 mg ou 0,1 ml par tube	10 mg ou 0,01 ml par tube	1 mg ou 0,001 ml par tube	
3 3 3 3	3 3 3 3	3 2 1 0	> 1 100 1 100 500 200
3 3 3 3	2 2 2 2	3 2 1 0	290 210 150 90
3 3 3 3	1 1 1 1	3 2 1 0	160 120 70 40
3 3 3 3	0 0 0 0	3 2 1 0	95 60 40 23

Si, dans la première colonne, le nombre des tubes dans lesquels une croissance a été observée est égal ou inférieur à 2, le nombre le plus probable de microorganismes par gramme ou par millilitre est susceptible d'être inférieur à 100.

#### Interprétation des résultats

Lorsqu'une limite est prescrite dans une monographie, elle doit être interprétée comme suit:  $10^2$  microorganismes, limite maximale d'acceptation:  $5 \times 10^2$ ;  $10^3$  microorganismes, limite maximale d'acceptation:  $5 \times 10^3$ , et ainsi de suite.

## Annexe 3

# Examen des bactéries après coloration de GRAM

## 1. Préparation d'un frottis

Les lames doivent être parfaitement propres et dégraissées.

### 1. 1. Etalement

Suivant le produit examiné, le mode opératoire est différent :

#### - Culture en milieu liquide

Déposer une goutte avec l'öse ou la pipette Pasteur. Etaler le plus possible sur toute la lame. Sécher.

#### - Culture en milieu solide

Déposer sur la lame propre une petite goutte d'eau. Emulsionner la colonie bactérienne prélevée avec l'öse ou la pipette Pasteur puis étaler le plus possible sur toute la lame. Sécher. C'est cette technique, que nous avons utilisé lors de l'expérimentation.

### 1. 2. Fixation

Le frottis lorsqu'il est fixé ne présente plus de danger de contamination.

Deux possibilités :

- Fixation à l'alcool : Recouvrir le frottis quelques minutes avec de l'alcool, rejeter l'excès de liquide et laisser sécher.

- Fixation à la chaleur : Passer le frottis au dessus de la flamme du bec bunsen une demi seconde, sans trop le chauffer, plusieurs fois de suite. C'est cette technique, que nous avons utilisé lors de l'expérimentation.

## 2. Coloration de GRAM

Technique de coloration selon Hücker

- Sur le frottis fixé, déposer le filtrât de cristal violet de façon à inonder la lame, durant 1 minute

- Rincer à l'eau

- Recouvrir de lugol pendant 30 secondes
- Décolorer à l'alcool quelques secondes
- Rincer à l'eau
- Inonder avec la safranine quelques secondes
- Rincer à l'eau
- Sécher

La coloration de Gram est une coloration différentielle basée sur la perméabilité sélective plus grande de la paroi des bactéries Gram négatif à l'alcool. Elle se déroule en trois temps :

Dans un premier temps on réalise un complexe colorant soluble dans l'alcool (cristal violet-lugol) qui colore.

Ensuite intervient la décoloration par alcool qui traverse bien la paroi des bactéries Gram négatif et qui dissout le complexe colorant. Chez les bactéries Gram positif, leur paroi ne laisse pas pénétrer l'alcool.

A l'issue de ce traitement par l'alcool, on se trouve en présence de deux types de bactéries :

- le premier pour lequel l'action de l'alcool a éliminé la coloration avec le violet cristal, ce qui laisse les bactéries complètement décolorées ;
- le second qui laisse persister des bactéries colorées en violet.

Intervient le troisième temps qui consiste en une courte contre coloration par la safranine. Seules les bactéries décolorées par l'alcool fixent le colorant. Elles apparaîtront rouge-rose.

Observer au microscope à l'objectif 100 avec une goutte d'huile à immersion et à pleine lumière.

Les bactéries colorées en rouge-rose par la safranine sont appelées Gram négatif.

Les bactéries colorées en violet par le cristal violet sont dites Gram positif.

BON A IMPRIMER N° 51

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

---

# LA FLORE MICROBIENNE DES PLANTES MEDICINALES : QUELQUES EXEMPLES DE LA CONTAMINATION BACTERIENNE ET FONGIQUE

Par Pierre BOURNIER

---

Devant le regain d'intérêt que connaît actuellement la phytothérapie, nous avons abordé le problème de la flore bactérienne et fongique des plantes médicinales, en s'appuyant sur les prescriptions de la Pharmacopée Française VIII. 15. 10<sup>e</sup> édition.

Notre travail porte sur 32 échantillons de plantes médicinales, issues de 4 laboratoires différents et s'articule autour du dénombrement et de l'identification partielle de germes aérobies viables totaux. Nos résultats montrent que la charge bactérienne de ces lots de plantes se situe entre  $10^3$  et  $10^6$  UFC/g de plante sèche. Dans 82% des échantillons nous avons mis en évidence des Bacilles Gram +, dans 65% des Cocci Gram + et dans 53% des Bacilles Gram -. En ce qui concerne les levures et moisissures, la charge fongique oscille entre  $10^2$  et  $10^5$  UFC/g. Notons la forte proportion d'*Aspergillus*, de *Cladosporium*, de filamenteux et soulignons la présence d'*A. flavus* dans un échantillon.

Cette étude révèle également des lacunes concernant le domaine d'application des normes de contamination bactérienne et fongique de la Pharmacopée Française vis à vis des plantes médicinales et permet de constater la mésestimation dans la littérature du risque de contamination par les levures et moisissures qui aboutit à des résultats hors normes. Dans un souci de santé publique, il serait donc intéressant de reconsidérer et d'approfondir le problème de la contamination bactérienne et fongique des plantes médicinales.

---

Mots clés : Plantes. Médicinales. Sèches. Contamination. Bactéries. Levures. Moisissures.

---