

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الجبالي بونعامة خميس مليانة-

Université Djilali BOUNAAMA de Khemis-Miliana



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et de Sciences de la Terre

Département de Biologie

Filière : sciences biologiques

Spécialité : Physiologie Cellulaire et Physiopathologie

Mémoire du projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

**Etude des certains activités biologiques de l'extrait de
Rosmarinus officinalis L.**

Soutenu le : 29/07/2019

Présenté par :

EZZIANE Imane & SENOUCI Fatiha

Devant les jurys composé de :

Présidente : Mme Iadaidi.A (MAA. Univ.DBKM).

Promotrice : Mme BENSEHAILA S. (MCB. Univ.DBKM).

Examineur : Mr Sahraoui T (MCB. Univ.DBKM).

2018/2019

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous tenons à remercier le Dieu tout puissant qui nous a accordé santé et courage pour mener ce travail jusqu'à son bout.

Nous tenons à remercier également notre promotrice M^{me}

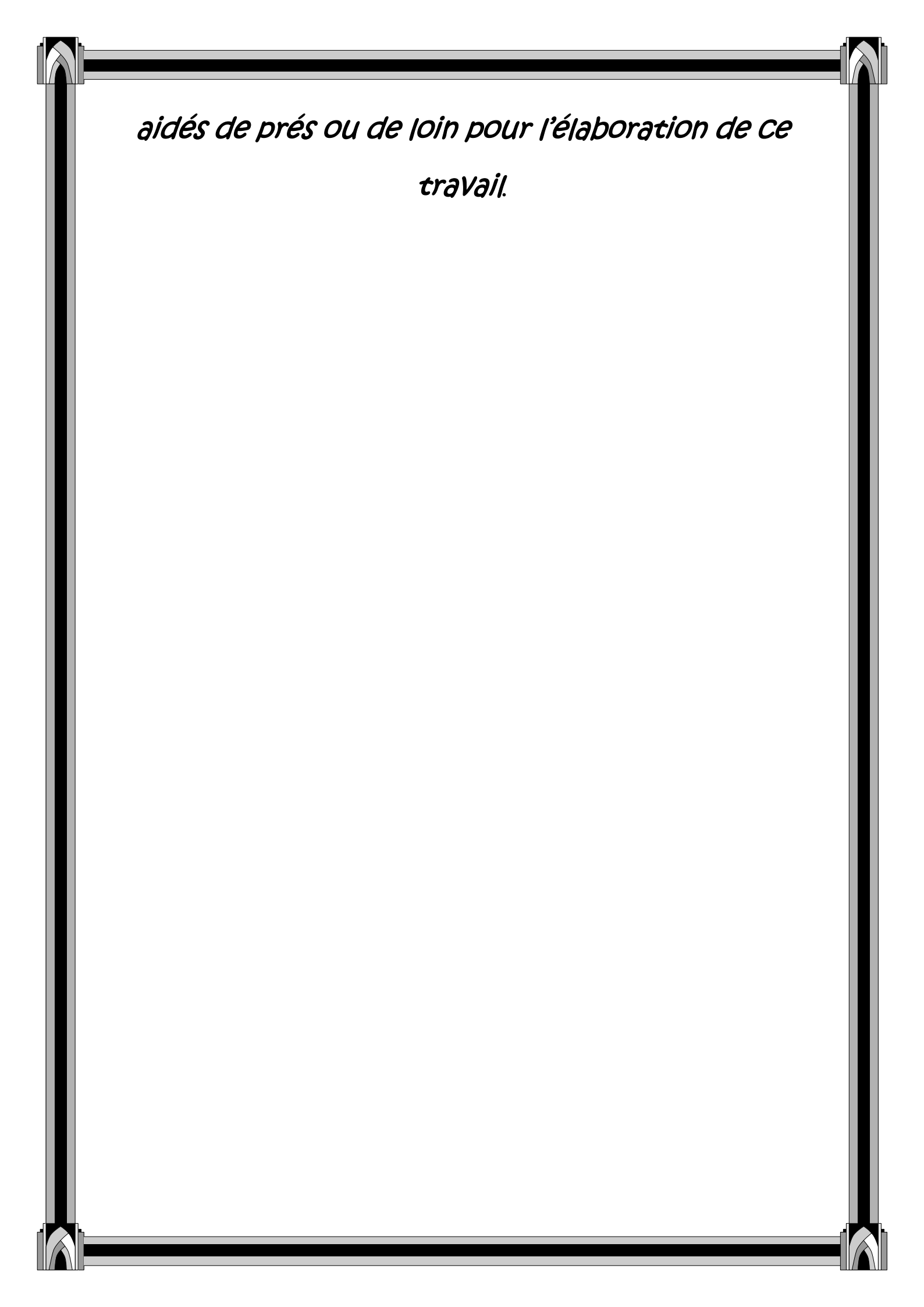
BEN SEHAILA S., qui a accepté de nous encadrer et qui nous a toujours guider dans la réalisation de ce travail.

Nous remercions M^{me} Iadidi A., d'avoir accepté de présider le jury et

Nous vifs remerciements vont également à :

Mr sahraoui T., pour avoir acceptés d'examiner notre travail.

Enfin nous remercions tous ceux qui nous ont



*aidés de près ou de loin pour l'élaboration de ce
travail.*

DÉDICACE

*À mes chers parents qui m'ont aidé à être ce que
je suis, avec tant d'amour et d'affection.*

*J'espère que ce travail soit l'expression de ma
pleine*

gratitude et de mon profond respect.

*À mes chers frères et sœurs ainsi que leurs petites
familles pour leur aide et leur soutien moral.*

*À mes grands-parents, que dieu donne long vie et
bon santé.*

*À mes chères amies, et à toute la promotion
dePCP*

2018-2019.

Imane.

DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents, pour leur amour, leur patience et leur encouragement, que Dieu les garde et les protège.

À mes grands-parents.

À mes très chers frères et mes sœurs, qui m'a toujours soutenu, encouragé et poussé à donner le meilleur de moi-même.

À mes collègues et à toute la promotion Master PCP 2018-2019, à qui je souhaite bonheur et réussite.

Ce travail n'aurait pas pu être finalisé sans la présence de ces personnes dans ma vie.

Fatiha

Sommaire

Liste des Abréviations

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Résumé

Introduction Général	1
----------------------------	---

Partie I : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Rosmarinus officinalis L.

1. Généralités sur la plante de Romarin	3
2. Définition	3
3. Description	4
4. Systématique botanique de la plante	5
5. Propriétés biologiques et pharmacologiques	5
6. Répartition géographique	6
7. Récolte du Romarin	6
8. Ecologie	7
9. Utilisation	7
10. Propriétés et usage	7

Chapitre II: Composés Phénoliques

1. Généralités	8
2. Définition des composés phénoliques	8
3. Acides phénoliques	9
4. Biosynthèse des polyphénols	9

4.1. Voie de l'acide shikimique	9
4.2. Voie de l'acide malonique	9
4.3. Flavonoïdes	10
4.4. Les tanins	10
4.5. Quinones	10
4.6. Les alcaloïdes	10
4.7. Les Coumarines.....	11
4.8. Les Terpènes	11
4.9. Les Saponines	11

Chapitre III: Stress Oxydatif et et Activité Antimicrobienne

1. Le stress oxydatif et le pouvoir antioxydant	12
1.1. Radicaux libres.....	12
1.2. Rôle des radicaux libre.....	12
1.3. Stress oxydant	12
1.4. Conséquences du stress oxydatif.....	13
1.5. Activité antioxydante	13
1.6. Mécanismes antioxydants généraux des composés phénoliques.....	13
2. L'activite Antimicrobienne.....	14
2.1. Introduction	14
2.2. Définition	15
2.3. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne.....	16
2.3.1. L'Aromatogramme	16
2.3.2. Méthode de micro-atmosphère	16

Partie Expérimental

Materiel et Methodes

1. Matériel utilisés.....	17
1.1. Matériel biologique	17

1.1.1.	Matériel végétal :.....	17
1.1.2.	Souches bactériennes testées	18
2.	Méthodes d'étude.....	18
2.1.	Récolte et séchage.....	18
2.2.	Détermination de taux d'humidité.....	18
2.3.	Extraction de la plante.....	19
2.3.1.	Macération par l'éthanol.....	19
2.3.2.	Macération par l'éthanol-eau distillée	19
2.3.3.	Conservation de l'extrait	20
2.4.	Détermination du rendement.....	20
3.	Les tests phytochimique.....	20
4.	Dosage des polyphénols totaux.....	21
5.	Evaluation de l'activité antioxydant	21
6.	Activité antibactérienne	22
6.1.	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide(CMI)....	23
6.2.	Tests antimicrobiens	23
6.2.1.	Méthode de diffusion par disque	23
6.2.2.	Méthode des puits.....	24

Chapitre V: Résultats et Discussion

1.	Taux d'humidité.....	25
2.	Rendement d'extraction	25
3.	Etude phytochimique	26
4.	Teneurs en polyphénols totaux	27
5.	Activité antioxydante	30
5.1.	Evaluation de l'activité antioxydant par diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH).....	30
6.	Activité antimicrobienne.....	31
	Conclusion.....	34

Références Bibliographiques..... 36

Annexes

Résumé

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) appartient à la famille des Lamiaceae, elle est très répandue dans les régions méditerranéennes et la plante la plus populaire en Algérie.

Le but de la présente étude est porté sur le criblage phytochimique, et détermination la teneur en polyphénols, et d'évaluer l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique et hydro-éthanolique provenant des feuilles du romarin.

Le rendement des extraits éthanolique et hydro-éthanolique de romarin obtenus égal à 4,48 % et 8,16% respectivement.

En effet la teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu à l'aide de l'acide gallique utilisé comme phénol standards, Les teneurs en composés phénoliques totaux révèlent que la teneur la plus diminuée des polyphénols est constatée dans la fraction éthanolique du *Rosmarinus officinalis* ($0,66 \pm 0,21$ mg EAG/g d'Extrait) et pour l'hydro-éthanolique ($4,3 \pm 0,35$ mg EQ/g d'Extrait)

L'activité antioxydante a été évaluée par le test DPPH, Ont été démontré que l'extrait du romarin éthanolique a un pourcentage d'inhibition égal à 52,6%, et l'hydro-éthanolique est de 29,9%, les deux teneurs sont diminués.

L'activité antimicrobienne des extraits été étudiée vis-à-vis de trois souches bactériennes par la méthode des puits et des disques, concentration minimale inhibitrice (CMI).

Les bactéries testées sont plus sensibles (*E. coli*, *Pseudomonas aërogénosa* et *Staphylococcus aureus*) à l'action des extraits testés.

A la lumière de ce résultat, nous suggérons que l'utilisation du *Rosmarinus officinalis* ou de leur extrait donne une bonne activité Antioxydante dans la capacité de piégeage de radicaux libres, et dans la prévention de l'infection microbienne.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis*, activité antioxydant, antimicrobienne.

الملخص

تنتمي نبتة إكليل الجبل إلى عائلة Lamiaceae ، المنتشرة في البحر الأبيض المتوسط وتعد من بين النباتات الأكثر شعبية في الجزائر.

الغرض من هذه الدراسة يركز على الفحص الكيميائي النباتي ، وتحديد محتواها من مادة البوليفينول ، وتقييم نشاط مضادات الأكسدة والنشاط المضاد للميكروبات لمستخلص الإيثانول والهيدروإيثانول لأوراق إكليل الجبل. حصيداً مرود مستخلصات الإيثانول والهيدروإيثانول من إكليل الجبل التي تم الحصول عليها تساوي 4.48 ٪ و 8.16 ٪ على التوالي.

تم تحديد المحتوى الكلي للمركبات الفينولية باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu باستخدام حمض الغاليك المعياري المستخدم كفينول ، وتكشف محتويات مركب الفينول الكلي أن المحتوى الأكثر تناقصاً من البوليفينول موجود في الجزء الإيثانولي من *Rosmarinus officinalis* (0.66 ± 0.21 ملغ EAG / جم من المستخلص) وللهدروإيثانول (0.35 ± 4.3 ملغ مكافئ / جم من المستخلص)

تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة عن طريق اختبار DPPH ، حيث وجد أن مستخلص إكليل الجبل الإيثانولي لديه نسبة تثبيط بنسبة 52.6 ٪ ، والهيدروإيثانول هو 29.9 ٪ ، وكلاهما محتويات تقلص.

تمت دراسة النشاط المضاد للميكروبات في المستخلصات فيما يتعلق بثلاث سلالات بكتيرية باستخدام طريقة الآبار والأقراص والحد الأدنى من التركيز المثبط (MIC).

تعد البكتيريا التي تم اختبارها أكثر حساسية (*E. coli* و *Pseudomonas aerogenosa* و *Staphylococcus aureus*) لعمل المستخلصات التي تم اختبارها.

على ضوء هاته النتيجة ، نجد أن استخدام إكليل الجبل أو مستخلصه يعطي نشاطاً جيداً مضاداً للأكسدة في قدرة الكسح الجذور الحر ، وفي الوقاية من العدوى الميكروبية.

الكلمات المفتاحية : إكليل الجبل، مضادات الأكسدة، المضادات الميكروبية.

Abstract

Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) belongs to the family Lamiaceae, widespread in the Mediterranean and the most popular plant in Algeria.

The purpose of the present study is focused on phytochemical screening, determining the polyphenol content, and evaluating the antioxidant activity and antimicrobial activity of the ethanolic and hydroethanolic extract from the leaves of rosemary.

The yield of the ethanolic and hydroethanol extracts of rosemary obtained equal to 4.48% and 8.16% respectively.

In fact, the total content of phenolic compounds was determined by using the Folin-Ciocalteu reagent using standard gallic acid used as phenol. The total phenol compound contents reveal that the most diminished content of the polyphenols is found in the ethanolic fraction of *Rosmarinus officinalis* (0.66 ± 0.21 mg EAG / g of Extract) and for hydroethanol (4.3 ± 0.35 mg EQ / g of Extract)

The antioxidant activity was evaluated by the DPPH test. The ethanolic rosemary extract was found to have a percentage inhibition of 52.6%, and the hydroethanol is 29.9%, both contents are diminished.

The antimicrobial activity of the extracts was studied with respect to three bacterial strains by the wells and disks method, minimum inhibitory concentration (MIC).

The bacteria tested are more sensitive (*E. coli*, *Pseudomonas aerogenosa* and *Staphylococcus aureus*) to the action of the extracts tested.

In light of this result, we suggest that the use of *Rosmarinus officinalis* or their extract gives a good Antioxidant activity in the free radical scavenging capacity, and in the prevention of microbial infection.

Key words: *Rosmarinus officinalis*, antioxidant, antimicrobial activity.

Liste des Abréviations

Liste des Abréviations

ADN	: Acide désoxyribose nucléique
ERO	: Espèces réactives de l'oxygène
EAG	Equivalente
Mg	: Milligramme.
DPPH	: 2.2' diphényl-1-picrylhydrazyl.
CMI	: La concentration minimale inhibitrice.
UV	Ultra violet
UV	Matière sèche
MH	: Mueller Hinton.
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
DMSO	: Diméthylsulfoxyde

Liste des figures

Liste des Figures

Figures	Titre	Pages
01	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (quezel et santa., 1963).	04
02	Carte géographique représentative de région d'étude.	17
03	Teneur en humidité et en matière sèche de l'échantillon étudié.	25
04	Le Rendement d'extraction des extraits bruts de romarin.	26
05	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.	29
06	Teneurs des polyphénols totaux de chaque extrait (ethanolique et hydro-ethanolique).	30
07	Pourcentage d'inhibition de radicale DPPH de chaque extrait.	31

Liste des tableaux

Liste des Tableaux

Tableaux	Titre	Page
01	Les composés photochimiques détectés dans <i>Rosmarinus officinalis</i> de la région de Miliana.	27
02	Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique.	28
03	Diamètre des zones d'inhibition des différentes souches testées.	

Introduction Général

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire **(Lhuillier, 2007)**.

Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel.

Parmi, les 25 composés pharmaceutiques les plus vendus au monde, 12 d'entre eux sont issus de produits naturels. Cela signifie que le nombre de médicaments issus de produits naturels est supérieur à celui issus de la chimie combinatoire où plus de 10 000 molécules doivent être synthétisées puis testées afin de mener au développement d'un seul médicament.

Par conséquent, les quelques 250 à 300 000 espèces inventoriées de plantes que l'on trouve sur terre, dont seulement 5 à 15% ont fait l'objet de recherches de molécules bioactives, représentent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels.

Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques **(Bérubé-Gagnon, 2006)**.

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser **(Yano *et al.*, 2006)**.

Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme source des antioxydants, qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant **(Mata *et al.*, 2007)**.

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives **(Ferrari, 2002)**.

Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les lignanes, les terpènes et les flavonoïdes **(Bahorun, 1997)**.

Introduction Général

Les flavonoïdes constituent un groupe de produits naturels appartenant à la famille des polyphénols, largement représentés dans la quasi-totalité des plantes, faisant partie intégrante de notre nourriture quotidienne. Ils possèdent potentiellement des activités biologiques, antimicrobiennes et antioxydantes.

Le romarin (*Rosmarinus Officinalis*) fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires. C'est une herbe aromatique de la famille des *Labiées*, appréciée pour ses propriétés aromatiques, antioxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, emménagogues et anti-tumorales, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle (Atik Bekkara *et al.*, 2007).

Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydante et antimicrobiennes comme les vitamines, les caroténoïdes et les polyphénols. Il nous a semblé donc, intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche.

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante par le test de antiradicalaire par le test au DPPH et antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé des extraits bruts et leurs fractions de la plante médicinale (romarin) Cette évaluation est relié au contenu phénolique des ces extraits.

Dans la première partie, nous aborderons les différentes connaissances bibliographiques sur *Rosmarinus officinalis*, le stress oxydant et activité antimicrobienne.

Dans la partie expérimentale, nous développerons dans le premier chapitre le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour l'extraction, taux d'humidité, le rendement, le dosage colorimétrique de polyphénols, l'activité antioxydante et finalement l'activité antimicrobienne. Le deuxième chapitre sera consacré aux résultats obtenus dans notre étude.

A la lumière des résultats obtenus, différentes perspectives de recherche seront évoquées.

Synthèse Bibliographique

1. Généralités sur la plante de Romarin

La famille des lamiacées connue également sous le nom des labiées, comporte environ 258 genres pour 6900 espèces plus ou moins cosmopolites ; mais dont la plupart se concentrent dans le bassin méditerranéen tel que le thym, la lavande et le Romarin elle est divisée en deux principales sous-familles : les *Stachyoideae* et les *Ocimoideae*. Les lamiacées sont des herbacées ayant la consistance et la couleur de l'herbe, parfois sous-arbrisseaux ou ligneuses. Une grande partie de ces plantes sont aromatiques riches en l'huile essentielle d'où leur intérêt économique et médicinal. Entre autres, un grand nombre de genres de la famille des *Lamiaceae* sont des sources de terpénoïdes, flavonoïdes et iridiodes glycosylés (Ouibrahim, 2015).

Le Romarin qui dit le nom rose de mer vient simplement du fait qu'il pousse spontanément au bord de la mer. C'est un arbrisseau de 50 cm à 1 mètre et plus, toujours vert, très aromatique, très rameux, très feuillé. Les fleurs sont d'un bleu pâle ou blanchâtre. Son écorce s'écaille sur les branches les plus âgées et son odeur est extrêmement odorante et tenace (Makhloufi, 2013). La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au au avril-mai (Mostefai, 2012). Selon (Mathias, 2008) le Romarin fait partie à la famille de Lamiaceae sous le nom scientifique *Rosmarinus officinalis*, la période de sa floraison est au moment de janvier et mai. Son pollen est caractérisé par la couleur blanc grisâtre.

2. Définition

Le Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) est une plante des coteaux arides Garrigues et lieux rocheux de la région méditerranéenne et même un peu plus au Sud Jusqu'aux confins sahariens depuis l'antiquité, il est employé pour améliorer et Stimuler la mémoire encore aujourd'hui en Grèce, les étudiants en font brûler dans Leurs chambres en période d'examens (Okamura et al.,1994).

3. Description

Le romarin est un arbrisseau de la famille des Lamiacées originaire des pourtours de la Méditerranée. Il possède de nombreuses vertus phytothérapeutiques, mais c'est aussi une herbe condimentaire et une plante mellifère, ainsi qu'un produit fréquemment utilisé en parfumerie. Le romarin peut atteindre jusqu'à 1,50 m de hauteur.

Il possède des feuilles persistantes sans pétiole, coriaces, légèrement enroulés aux bords, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous, avec une odeur très camphrée. Les fleurs varient du bleu pâle au violet (**Williams, 1996**).



Figure 01 : *Rosmarinus officinalis*-L (*Quézel et Santa, 1963*).

a. Autres appellations

En Algérie, Maroc et Tunisie : azir, barkella, haselban, Aklil, ikil ljabal, klile (**Bellakhdar, 2006**)

En France : Herbe-aux-courounnes, rosée de mer, rose marine, romarin des troubadours, bouquet de la vierge (**Botanica, 2011; Monod, 1978**).

Allemand: Folia Anthos, Folia Rorismarini, Encensier, Rosemary (Angl.), Rosmarinblatter, Krankkrautblatter, Kranzenkrautblatter, Rosmarein (**Botanica, 2011; Monod, 1978**).

b. Genre Romarin

Le genre *Rosmarinus* ne regroupe que trois espèces:

- ✓ *Rosmarinus Officinalis* l'espèce la plus aromatique et importante,
- ✓ *Rosmarinus eriocalix* Jord. & Fourr,
- ✓ *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath et Maire, morphologiquement très proche de *R.eriocalyx* (Bartels, 1997).

4. Systématique botanique de la plante

La systématique botanique est pour un chercheur la carte d'identification de la plante et sans cette dernière, il est très difficile d'entamer un travail de recherche. On peut résumer la systématique botanique de la plante comme suit :

Règne : Plantes

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Lamiales (Labiales)

Famille : Lamiacées

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *Rosmarinus officinalis* (Quezel et Santa, 1963)

5. Propriétés biologiques et pharmacologiques

Rosmarinus officinalis a fait l'objet de plusieurs études validant ses effets hépato protecteurs (Sotelo-Félix et al., 2002), antibactériens (Gachkar et al., 2007), anti thrombotique (Yamamoto et al., 2005), antiulcéreux (Dias et al., 2000), diurétique (Haloui et al., 2007), antioxydant (Bakiral et al., 2008), anti nociceptique (González-Trujano et al., 2007) et anti-inflammatoire (Altineir et al., 2007). Les extraits du *Rosmarinus officinalis* L. sont utilisés également pour traiter quelques désordres psychologiques comme la dépression (Heinrich et al., 2006 ; Machado et al., 2009). Il est également insecticide (Pavela, 2006; Traboulci et al., 2002; Rozman et al., 2007), et anti parasitaire (Moon et al., 2000). L'administration de l'huile essentielle de romarin par voie orale et inhalation, stimule l'activité respiratoire et locomotrice du Système nerveux central chez la souris, suggérant une action directe d'un ou plusieurs de ses constituants.

6. Répartition géographique

Plante indigène poussant spontanément dans toute l'Algérie (Quezel et Santa, 1963), le *Rosmarinus officinalis* est originaire du bassin méditerranéen (Iserin, 2001). Commun dans les maquis, les garrigues et les forêts claires, il est sub-spontané en plusieurs endroits privilégiant un sol calcaire, de faible altitude, ensoleillé et modérément sec (Schauenberg et Paris, 1977).

c. Habitat et culture

Le romarin est cultivé en méditerranée ; dans des sols drainés, au soleil (Bremness, 2002). On le cultive du début du printemps, jusqu'à l'été (Poletti, 1988).

7. Récolte du Romarin

De manière générale, la récolte d'une plante est réalisée quand les principes actifs sont à leur maximum, afin de pouvoir compter sur des effets utiles et constants. Les feuilles et tiges herbacées sont récoltées lorsque la fleur commence à se développer, 12 à 18 mois après plantation (Reclu, 2004). Les feuilles se récoltent toute l'année mais sont plus parfumées au printemps. Il faut donc les cueillir à cette période. La récolte se fait par temps chaud et sec soit deux ou trois heures après le lever du soleil quand la rosée s'est dissipée (Reclu, 2004 ; Gilly, 2005 ; Harding, 2011).

Quant aux fleurs et sommités fleuries (partie supérieure du végétal), elles sont récoltées au même moment de la journée que les feuilles quand les fleurs commencent à s'épanouir. L'odeur résidant principalement dans le calice, celui-ci doit être pris délicatement et séché. La récolte des sommités fleuries a lieu au mois de juillet (Reclu, 2004).

La récolte des parties aériennes en fleur se fait soit à la machine pour les cultures de Romarin soit à la serpette (manuellement) pour les parcelles de Romarin sauvage (Fernandez et al, 2012).

La plante rapidement séchée est passée au crible afin de n'obtenir plus que des feuilles et des fleurs (Gilly, 2005).

Afin de ne pas abîmer les plantes sauvages, les récoltes seront modestes (Scherf, 2012).

Pour le séchage des feuilles et tiges herbacées : étalées sur des châssis de toile à larges mailles ou sur de la paille bien sèche, et séchées dans une pièce exposée aux rayons du soleil. Il faut les brasser régulièrement afin que l'air pénètre uniformément. A conserver dans une

Chapitre I : *Rosmarinus officinalis* L.

pièce non humide (Reclu, 2004). Les feuilles séchées sont ensuite séparées des tiges (Scherf, 2012).

- Fleurs et sommités fleuries : espacées sur des claies garnies de papier, remuées de temps en temps, dans une pièce ensoleillée ou à l'étuve. Une fois sec, conserver le Romarin dans des bocaux ou boîtes garnis de papier et bouchés ou en petites bottes enveloppées dans du papier et gardées au sec. Conservation : environ un an (Reclu., 2004).

8. Ecologie

Le romarin est retrouvé à l'état sauvage. Il peut être cultivé. C'est la plante la plus populaire dans le bassin méditerranéen, en Algérie nous la trouvons dans les jardins, les parcs des sociétés, des écoles et les zones cultivées à l'entrée (Emberger, 1960).

Elle se trouve toujours en bordure sous forme d'une bande odorante. Les fleurs bleues s'épanouissent tout au long de l'année ce qui attire de nombreux insectes. Nous pouvons rencontrer le romarin à différentes altitudes suivant les étages bioclimatiques (Quezel et Medail, 1995).

9. Utilisation

Le *Rosmarinus officinalis* est souvent cultivé pour son huile essentielle. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique. Il est considéré utile pour contrôler l'érosion du sol (HEINRICH et al., 2006). L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires (ARNOLD et al., 1997).

10. Propriétés et usage

Le romarin est une plante méditerranéenne ayant des qualités et propriétés stimulantes, antiseptiques et insecticides. Il sert à la fabrication des parfums et fut utilisé en médecine contre les débilités de tout genre. Il calme les nerfs surtout au moment de la ménopause (Sedjelmassi, 1993).

L'activité antioxydante du romarin est connue depuis environ 30 années (Nassu et al., 2003). En raison de ses propriétés antioxydantes, le romarin est largement accepté en tant qu'épices dont l'activité antioxydante la plus élevée (Wang et al., 2008).

Chapitre II : Composés Phénoliques

1. Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement. Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (**Urquiaga et Leighton, 2000**). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) **Macheix et al., 2005**). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (**Urquiaga et Leighton, 2000**).

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (**Macheix et al., 2005**).

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (**Macheix et al., 2005**).

2. Définition des composés phénoliques

Les polyphénols (8000 composés connus) représentent un groupe de métabolites secondaires complexes, exclusivement synthétisés dans le règne végétal. Les composés phénoliques sont des dérivés aromatiques non azotés dont les cycles aromatiques sont issus du métabolisme de l'acide shikimique ou de celui d'un polyacétate. Les composés phénoliques sont divisés en plusieurs groupes (**Collin et Crouzet, 2011**).

Chapitre II : Composés Phénoliques

3. Acides phénoliques

Les phénols ou les acides phénoliques sont des petites molécules constituées d'un Noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être estérifiées, éthérifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides, ces phénols sont solubles dans les Solvants polaires, leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque (C6-C1): très présent dans le Règne végétal et de l'acide p coumarique (C6-C3): ils présentent une distribution très large dans le règne végétal (**Wichtl et Anton, 2009**).

Les phénols possèdent des activités anti-inflammatoires, antiseptiques et analgésiques (Médicament d'aspirine dérivée de l'acide salicylique) (**Iserin et al., 2001**).

4. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont issus par deux grandes voies métaboliques : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate/malonate.

4.1. Voie de l'acide shikimique

Tous les composés phénoliques sont formés via la voie du shikimate, appelée également la voie de phénylpropanoïde. Ce dernier lie le métabolisme des carbohydrates à la voie de biosynthèse des composés aromatiques en conduisant à la synthèse de base, le noyau aromatique (**Hopkins, 1995**).

Dans cette voie, l'érythrose-4-phosphate et le phosphoénolpyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement. Ces derniers sont convertis en chorismates, le précurseur des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) et d'un certain nombre de métabolites secondaires indoliques et aromatiques (**Dewick, 1995**).

4.2. Voie de l'acide malonique

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl-CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes Polycétoniques, et obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (**Fleeger et Flipse, 1964**).

Chapitre II : Composés Phénoliques

4.3. Flavonoïdes

Le nom dérivé du terme en latin ; flavus= jaune. Ont une structure de C₆-C₃-C₆ à poids moléculaire faible, ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de plante à côté des chlorophylles et caroténoïdes (**Wichtl et Anton, 2009**).

Les flavonoïdes ont des sous-groupes caractérisés par la présence de deux ou plusieurs Cycles aromatiques portant une ou plusieurs groupes hydroxyles phénoliques et reliés par un pont carboné. Ils existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides (**Heller et Forkmann, 1993**).

4.4. Les tanins

Le tanin est une substance amorphe contenue dans de nombreux végétaux. Elle est employée dans la fabrication des cuirs car elle rend les peaux imputrescibles. Elle possède en outre des propriétés antiseptiques mais également antibiotiques, astringentes anti-inflammatoires, anti-diarrhéiques, hémostatiques et vasoconstrictrices (diminution du calibre des vaisseaux sanguins) (**Brian, 1993**)

4.5. Quinones

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisés par un motif 1,4-dicéto cyclohexa-2,5-diéniq (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5-diéniq (ortho-quinones) (**Bruneton, 1993**). Elles sont ubiquitaire dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (**Cowan, 1999**).

4.6. Les alcaloïdes

Le terme alcaloïde a été introduit par W.Meisner au début du 19^{ème} siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases. Ce terme est dérivé de l'arabe « Al Kaly » qui signifie la soude et de grec « Eidos » qui signifie l'aspect (**Mangambu et al., 2014**).

Les alcaloïdes sont des substances organiques le plus souvent d'origine végétale, azotées, basiques et douées à faible dose de propriétés physiologiques marquées (Belabbassi ,2012), ce sont des corps de masse moléculaire faible et de fonction basique.

Cette dernière est un facteur d'instabilité pour ces molécules qui à l'état de base et en solution, sont sensibles à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène(**Daira et al., 2016**).

Chapitre II : Composés Phénoliques

4.7. Les Coumarines

Sont de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses, Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Madhavi, 1996).

4.8. Les Terpènes

Sont des composés par l'assemblage d'un nombre entier d'unité pentacarbonée ramifiée ; le 2- méthyle- butadiène (isoprène), selon le nombre d'unité isoprénique qui les constituent, on distingue : les monoterpènes en C 10, les sesquiterpènes en C15, les diterpènes en C20 et les triterpènes en C30 (Bruneton, 1999).

4.9. Les Saponines

Les saponines sont des glycosides contenus dans les plantes qui doivent leur nom au fait qu'elles moussent lorsqu'on les mélange avec l'eau Elles sont des constituants de nombreuses plantes médicinales, elles existent sous deux formes : les stéroïdes et les triterpénoïdes (Bruneton,1999).

1. Le stress oxydatif et le pouvoir antioxydant

1.1. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un ou plusieurs électrons non appariés sur l'orbitale externe, qui lui confère une grande réactivité et une durée de vie extrêmement courte (Novelli, 1997).

L'appellation ERO inclut les radicaux libres de l'oxygène : anion superoxyde (O_2^\bullet), radical hydroxyle (OH^\bullet) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Haleng *et al.*, 2007).

1.2. Rôle des radicaux libre

Le rôle des ERO est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leurs concentrations. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment, de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Citons aussi le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'ERO pour percer la paroi membranaire de l'ovule. Les ERO deviennent «pathologiques» en activant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires ou des protéines d'adhésion. En outre, leur nature instable les rend très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies (Haleng *et al.*, 2007 ; Pham-Huy *et al.*, 2008).

1.3. Stress oxydant

Le stress oxydant peut être défini comme un déséquilibre entre les systèmes producteurs d'espèces radicalaires oxydantes et les systèmes de défense antioxydants au profit des premiers. Ceci implique la production d'espèces réactives de l'oxygène (Arous, 2014 ; Delattre *et al.*, 2005). Ce phénomène est associé à une libération massive de radicaux libres (Favier 2003).

Le stress oxydatif est à l'origine de certaines maladies. Il est souvent initié et propagé par une surproduction d' O_2^- et de H_2O_2 , et par leur conversion en de puissants oxydants dangereux pour les cellules (Favier 1997). Ce stress peut avoir diverses origines : mauvaise alimentation, phénomènes inflammatoires chroniques ou aigus et habitudes de vie inadéquates (tabagisme, Consommation excessive d'alcool, ...etc.) (Pincemail et Defraigne, 2004).

Chapitre III : Stress Oxydatif et Activité Antimicrobienne

1.4. Conséquences du stress oxydatif

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes des molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides). L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est une cible majeure des ERO. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN, mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. L'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires, induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information. Les ERO sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. Les EOR sont aussi capables découper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques (**Haleng et al., 2007**).

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant: mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés (**Favier, 2003**).

1.5. Activité antioxydante

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue deux sources d'antioxydants :

-L'une est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion Peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydants (**Haleng et al., 2007**).

-L'autre est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, glutathion et en polyphénols (**Anderson et al., 2001**).

1.6. Mécanismes antioxydants généraux des composés phénoliques

L'activité antioxydante des composés phénoliques est due à leurs propriétés redox élevées et à leur structure chimique qui peuvent être responsables de la neutralisation des

Chapitre III : Stress Oxydatif et Activité Antimicrobienne

radicaux libres (Zheng et Wang, 2001). Les groupes hydroxyles phénoliques sont des donneurs d'hydrogène. Après interaction de ces groupes avec l'espèce réactive, une forme radicalaire de l'antioxydant est produite, ayant une stabilité chimique beaucoup plus grande que le radical initial. L'interaction de ces groupes avec les électrons du cycle benzénique donne aux molécules des propriétés particulières, notamment la capacité de générer des radicaux libres où le radical est stabilisé par délocalisation (Parr et Bolwell, 2002).

La capacité antioxydante des composés phénoliques est également attribuée à leur capacité à chélater les ions métalliques impliqués dans la production des radicaux libres (Yang *et al.*, 2001).

Les structures des composés phénoliques ont souvent le potentiel d'interagir fortement avec les protéines, en raison de leurs cycles benzénoïdes hydrophobes et du potentiel de liaison hydrogène des groupes hydroxyle phénoliques. Ceci donne aux composés phénoliques la capacité d'agir en tant qu'antioxydants en raison de leur capacité à inhiber certaines enzymes impliquées dans la génération de radicaux, telles que diverses isoformes du cytochrome P450, les lipoxigénases, la cyclooxygénase et la xanthine oxydase (Cos *et al.*, 1988).

2. L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE

2.1. Introduction

La thérapie des maladies infectieuses se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Leur prescription à volonté est souvent inappropriée surtout quand il s'agit d'infections virales. L'emploi abusif et le non-respect des doses ont entraîné l'apparition de souches résistantes rendant les traitements inefficaces. A cet effet, il est nécessaire d'orienter les recherches vers de nouvelles voies thérapeutiques et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments à partir de produits du métabolisme secondaire tel que les huiles essentielles, produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, ces substances aromatisants et parfumantes Possèdent de nombreuses vertus ce qui justifie leur utilisation dans de nombreux domaines comme la parfumerie, l'industrie alimentaire, le cosmétique voir même comme agents antimicrobiens en médecine populaire. Signalons par ailleurs que de nombreux travaux récents ont mis en évidence, *in vitro*, l'activité antimicrobienne de certaines huiles essentielles ce qui a donné un grand intérêt et essor à l'aromathérapie et en industrie alimentaire (Hammer *et al.*, 1999).

Chapitre III : Stress Oxydatif et Activité Antimicrobienne

Depuis la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1929, jusqu'à nos jours les antibiotiques sont utilisés massivement contre les infections bactériennes. En raison de cette utilisation excessive, une résistance bactérienne s'est développée contre la majorité des antibiotiques (**Gopal Rao, 1999**). Staphylocoque doré résistant à la méthicilline (MRSA), les entérocoques résistant à la vancomycine et des souches résistantes de *Pseudomonas* sont des exemples de bactéries multirésistantes qui deviennent un véritable problème de santé publique. Les MRSA sont probablement les bactéries résistantes les plus communs trouvés dans les hôpitaux, responsable d'infection nosocomiale (**Grundmann et al., 2006**).

Outre la résistance aux antibiotiques, ces derniers peuvent être à l'origine d'effets néfastes sur les patients tels qu'une hypersensibilité, une immunosuppression, des réactions allergiques. Par conséquent, le développement du traitement alternatif semble être nécessaire d'où l'intérêt croissant aux pouvoirs antimicrobiens des substances biologiquement actives issues des plantes aromatiques.

2.2. Définition

Les pathologies infectieuses bactériennes entraînaient, dans la majorité des cas, la mort de l'être vivant avant la découverte des antibiotiques. Un antibiotique selon la définition de SELMAN WAKSMAN (1942) est toute substance antibactérienne. Aussi, c'est un dérivé produit par le métabolisme des microorganismes possédant une activité antibactérienne à faible concentration et n'ayant pas de toxicité pour l'hôte.

Avec la découverte de la pénicilline en 1929 par Fleming et puis d'autres antibiotiques, on est passé à l'ère des antibiotiques qui a connu un grand essor (**Gaudy et Buxeraud., 2005**).

Les antibiotiques ont été très efficaces pour le traitement de nombreuses maladies qui étaient un fléau pour le genre humain parce qu'ils provoquent une spectaculaire guérison pour des maladies autrefois considérées comme incurables. Après une longue période d'utilisation massive des antibiotiques, nous arrivons maintenant à une période plus délicate. Le monde bactérien est capable de s'adapter à une nouvelle situation écologique, y compris la présence des antibiotiques. En développant des stratégies de résistance vis-à-vis des molécules d'antibiotiques (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline), les bactéries reprennent l'avantage (**Gaudy et Bugeaud, 2005**). De ce fait, les huiles essentielles antimicrobiennes présentent une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques contre les pathologies infectieuses.

Chapitre III : Stress Oxydatif et Activité Antimicrobienne

2.3. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne

Il existe plusieurs méthodes pour tester le pouvoir antimicrobien et le choix de la méthode doit être conditionné par l'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux aqueux, leur volatilité et la nécessité de les tester à des faibles concentrations.

2.3.1. L'Aromatogramme

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques.

2.3.2. Méthode de micro-atmosphère

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boîtes de Pétri sur milieux de culture approprié. La différence réside principalement dans la position de disque imprégné en HE qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte de Pétri et peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés (Pibiri., 2006).

Partie Expérimental

Matériel Et Méthodes

Dans Notre travail on a insisté sur des études d'extraits des feuilles du *Rosmarinus officinalis* sont :

- ✓ L'étude qualitative des extraits.
- ✓ L'étude de l'activité anti oxydante.
- ✓ L'étude de l'activité anti microbienne

Ce travail est réalisé dans laboratoire de biochimie de l'université de Djilali Bounaâma de khemis-Miliana et dans laboratoire privé ZIBOUCHE.

1. Matériel utilisés

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé dans le présent travail, comporte les feuilles de plantes récoltées de la région de Miliana (*Rosmarinus officinalis*). Elle porte les coordonnées suivantes :

Région : Miliana

Altitude 400-1000 m

L'altitude 36° 17' nord

Longitude 2° 13' est



Figure 2 : Carte géographique représentative de région d'étude.

Chapitre IV : Matériel et méthodes

1.1.2. Souches bactériennes testées

Le test d'activité antibactérienne effectué au laboratoire privé de zibouche de Ain defla il s'agit de :

- **Le genre *Pseudomonas* ATCC27853 gram(-)**

Est fait de bacilles mobiles aérobies stricts, se cultive Facilement sur les milieux usuels. *Pseudomonas aeruginosa* (ou bacille pyocyanique) se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ses colonies. C'est une bactérie ubiquiste qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux.

Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et des divers animaux. Considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales(Nauciel,2000)

- ***Escherichia coli* ATCC 25922 gram(-)**

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. *Escherichia coli* est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de L'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers(Nauciel,2000).

-***Staphylococcus aureus*ATCC 25923 gram(+)**

Elle est représenté l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aigue, intoxication alimentaire, sont principalement responsables d'infections cutané-muqueuses (surinfections de plaies, abcès, furoncles) de forme ronde et touchent des personnes jeunes en bonne santé (Dworkin et falkow, 2006).

2. Méthodes d'étude

2.1. Récolte et séchage

Le romarin a été récolté au 15 mars 2019 de la région de Miliana (Wilaya de Ain Defla).a 900m d'altitude (Forêt du Zaccar).

La plante collectée a été nettoyée, séchée à température ambiante et à l'ombre pendant 3 semaines. Les feuilles ont été séparées puis stockées à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

2.2. Détermination de taux d'humidité

Peser 5 g de feuilles fraîches dans des capsules propres. Mettre ces capsules dans l'étuve à 103 °C ± 2 pendant 1 heure.

Chapitre IV : Matériel et méthodes

Laisser refroidir les capsules avant la pesée dans un dessiccateur. Répéter l'opération plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Makhloufi, 2013).

Le taux d'humidité (H %) est calculé par la formule suivante :

$$H \% = (M1 - M2 / M1) \times 100$$

Où H% : Taux d'humidité en %

M1 : Masse de l'échantillon avant séchage en g.

M2 : Masse de l'échantillon après séchage en g.

➤ Concassage et broyage

Les feuilles sèches ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique pour diminuer la taille de la matière végétale a pour objectif d'élever la surface du contact avec le solvant Utilisé.

➤ Filtration

La filtration sous vide a été fait à l'aide d'une pompe, d'un papier filtre Whatman n°1 et d'un erlenmayer.

2.3. Extraction de romarin

L'extrait a été obtenu à partir des feuilles du *Rosmarinus Officinalis* en utilisant une technique d'extraction solide-liquide par l'éthanolet par l'éthanol-eau distillée.

La macération consiste à laisser tremper une plante sèche dans un solvant approprié pendant 24 heure (Lee et Lee, 2003), Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par (Hamia et al., 2014), avec quelques modifications.

2.3.1. Macération par l'éthanol

Des quantités de 10g des feuilles broyées sont macérées dans 100ml d'éthanol puis ajouter dans un agitateur (60rpm /1min) à une température 40°c c pendant 4h, l'extrait est filtré et évaporés sous pression réduite à 40°c dans un étuve pendant 24h.

2.3.2. Macération par l'éthanol-eau distillée

Des quantités de 10g des feuilles broyées sont macérées dans 100ml d'un mélange éthanol- eau (50/50, V/V) puis ajouter dans un agitateur (60rpm /1min) à une température 40°c pendant 4h, l'extrait est filtré et évaporés sous pression réduite à 40°c dans un étuve pendant 24h.

Chapitre IV : Matériel et méthodes

2.3.3. Conservation de l'extrait

On a obtenu des extraits purs. Ces derniers ont été conservés dans un réfrigérant à température de 4°C et à l'abri de la lumière en utilisant un papier d'Aluminium qui empêche le contact de l'extrait avec la lumière.

2.4. Détermination du rendement

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du la boite pétrie plein (après évaporation) et le poids du la boite pétrie vide (avant évaporation) (Mohammedi, 2006).

$$R\% = (\text{masse d'extrait sec} / \text{masse de la matière végétale}) * 100$$

3. Les tests phytochimique

Le screening phytochimique représente l'ensemble des techniques qualitatives permettant la détermination des différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques. Les groupes phytochimique sont nombreux, mais les principaux sont les polyphénols totaux y compris les flavonoïdes, les anthocyanes, les tannins, les coumarines, les alcaloïdes, les saponosides, les stéroïdes, les stérols, les terpènes...ect(**Lendvalet al., 2002**).

- **Flavonoïdes:** 2 ml de chaque extrait a été traité avec 2 ml de 10% d'acétate de plomb la couleur vert jaunâtre indique la présence de flavonoïdes(**Harbarne, 1973**).
- **Tannins :**La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 2 ml de chaque extrait et 1 à 2 gouttes de solution de chlorure ferrique (FeCl₃) diluée à 0,1%. L'apparition d'une coloration bleu, bleu noir ou vert indique la présence des tanins(**Harborne, 1998**)
- **Quinones :** 1 ml de chaque extrait, a été traité par quelques gouttes d'une solution de soude à 1%, L'apparition d'une coloration jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones (**Oloyede., 2005**).
- **Stérols :** Dans un tube à essai introduire 5ml de l'extrait à analyser, ajouter 5ml d'anhydride acétique, 5ml de chloroforme et 1 ml d'acide sulfurique concentré dans la paroi de tube sans agiter. Laisser reposer 20 min. La formation d'un anneau rouge

Chapitre IV : Matériel et méthodes

brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et triterpènes(**Trease et Evans, 1987**).

- **Alcaloïdes** : On ajout 2 ml de réactif de Wagner (2g d'iodure de potassium KI + 1,27 g d'iode I₂ + 100 ml d'eau distiller) à 2 ml de chaque extrait. L'apparition d'un précipité blanc jaune indique la présence des alcaloïdes (**Benzahi, 2001 ; Chaouch, 2001**).
- **Sucres réducteurs** : 1 ml de chaque extrait a été traité par 1mL de réactif de Fehling (0,5 ml de réactif A et 0,5 ml de réactif B), après chauffage, la formation d'un précipité rouge brique indique la présence des sucres réducteurs(**Trease et Evans, 1987**).

4. Dosage des polyphénols totaux

Principe

Le réactif de Folin Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Boizot et Charpentier 2006 ; Ribéreau-Gayon et Gautheret 1968). La coloration bleue produite, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans le milieu réactionnel(**Ribéreau-Gayon et Gautheret, 1968 ; Boizot et Charpentier, 2006**).

Mode opératoire

Teneur phénolique totale des extraits a été déterminée en utilisant le dosage de Folin-Ciocalteu rapporté par (Kahlkoèn et *al.*, 1999). Ont été introduits dans une fiole jaugée de 100ml, on ajoute 1,5 ml de Folin-Ciocalteu à 10% et 1,2 ml de carbonate de sodium à 7,5% avec une quantité de 40 µl de chaque extrait, la fiole est complétée avec de l'eau distillée puis 30 min avant l'absorbance à 765 nm a été mesurée par un spectrophotomètre(UV). TPC(Le contenu phénolique total) était exprimés en équivalents d'acide gallique en (mg EAG/g) de matière fraîche. L'équation de calibration pour l'acide gallique était (**E.W.C. Chan, 2008**).

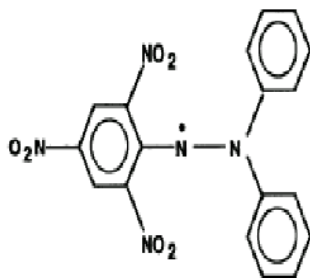
5. Evaluation de l'activité antioxydant

Pour évaluer l'effet antioxydant des extraits de la plante *Rosmarinus officinalis* en utilisant le radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

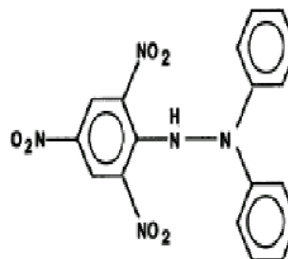
Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable utilisé pour remplacer les radicaux libres produits en réponses à des stress internes ou externes en

Chapitre IV : Matériel et méthodes

présence d'un antioxydant, la couleur violette caractéristique du DPPH est transformée en une couleur jaune (Brand *et al.*, 1995). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons, elle est mesurée à 517 nm. (Sanchez-Moreno, 2002).



Forme libre



Forme réduite

Mode opératoire

Une solution de 0.5ml de DPPH a été mélangée avec un volume de 2ml d'extrait. Après l'incubation à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 517 nm (Atoui *et al.*, 2005).

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (PI%) :

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \left[\frac{\text{Abs c} - \text{Abs e}}{\text{Abs c}} \right] \times 100$$

Abs c : Absorbance du contrôle sans extrait après 30 min

Abs e : Absorbance de l'échantillon testé après 30 min

6. Activité antimicrobienne

➤ Les milieux de cultures utilisés

Selon les méthodes utilisées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisé les milieux suivants:

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes;
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits de *Rosmarinus officinalis*.

➤ Préparation de précultures

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive et incubée pendant 24h à 37°C.

Chapitre IV : Matériel et méthodes

➤ Conservation des souches

Les souches ont été conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive) (Rožman et Jeršek, 2009).

➤ Préparation des extraits

Deux extraits ont été testés dans cette partie (éthanolique et hydro-éthanolique).

Les méthodes d'extraction sont présentées précédemment et les solutions des extraits sont été préparées dans le Diméthylsulfoxyde (DMSO).

L'activité antimicrobienne a été effectuée avec les deux extraits à une concentration de 10mg/ml (solution mère)(Al namer, 2014).

➤ Préparation des dilutions de l'extrait

Les dilutions des deux extraits ont été préparées : (1/2, 1/4 ,1/8) avec un solvant organique Diméthyle sulfoxyde (DMSO).

6.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide

La concentration minimale inhibitrice (CMI.) est la plus faible concentration des extraits qui inhibe les bactéries testées. Elle a été réalisée sur milieux liquide pour permettre de tester plusieurs souches bactériennes dans la même boîte après un temps d'incubation de 24 heures.

Elle consiste à réaliser des dilutions et les incorporer dans le milieu gélosé fondu, ensuite ensemercer les souches bactériennes à étudier après refroidissement du milieu de culture (Ca-sfm, 2013). La CMI correspondra donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité.

6.2. Tests antimicrobiens

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de la plante, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme) et Méthode des puits celle-ci permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice à partir d'une gamme de concentrations d'extrait (Gachkar *et al.*, 2006).

6.2.1. Méthode de diffusion par disque

L'activité antimicrobienne est évaluée par la méthode d'aromatogramme qui permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes *vis à vis* de l'extrait donnée. La méthode de l'aromatogramme consiste à utiliser des boites de Pétri contenant Milieu gélosé convenable(MH), déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en

Chapitre IV : Matériel et méthodes

papier Wattman de 6mm de diamètre, préalablement imprégnés de quantités connues d'extrait (50µl), sont alors placés en surface de la gélose (MH). Généralement, les micro-organismes seront classés susceptibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition (**Wilkinson., 2006**).

6.2.2. Méthode des puits

Le principe de cette technique est semblable à la méthode de disque, mais ce dernier est remplacé par un puits creusé stérilement sur la géloseensemencée (MH). L'incubation des boîtes de Pétri à la température optimale de croissance du micro-organisme permet le développement des colonies. La formation d'un halo clair autour du puits indique l'absence de la croissance microbienne dont le diamètre dépend de la sensibilité à l'extrait (**Alawa et al., 2003**).

Ces deux méthodes (des disques et des puits) sont largement employées pour l'indication qualitative de la sensibilité ou la résistance des micro-organismes. Des études plus approfondies seront nécessaires afin de pouvoir quantifier en termes de concentrations par les méthodes de dilution.

Résultats et Discussion

1. Taux d'humidité

Nos résultats qui sont représentés sur la figure3 montrent que les feuilles de la région de Miliana à un taux d'humidité de 88% qui correspondent à 12% de matière sèche (MS).

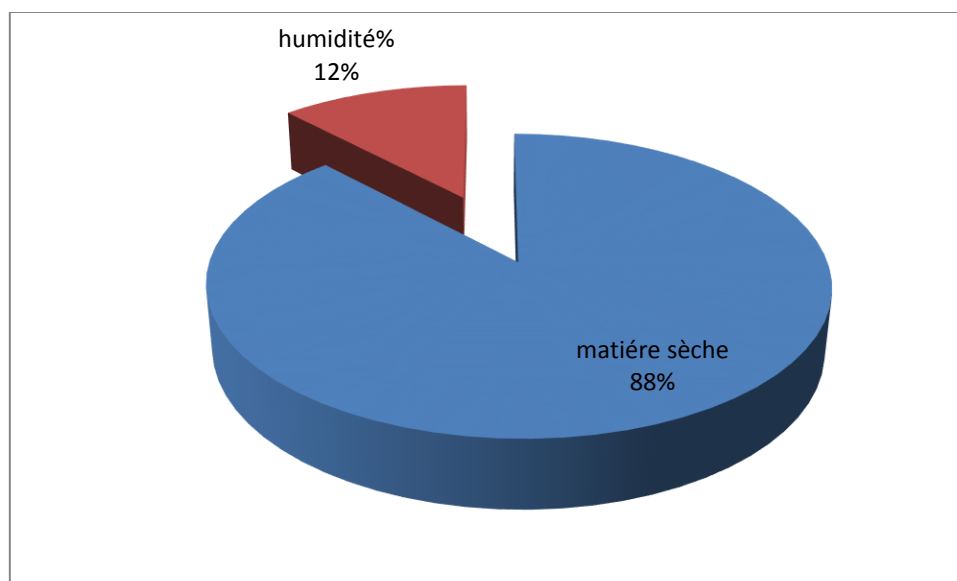


Figure03: Teneur en humidité et en matière sèche de l'échantillon étudié.

(Albu *et al.*, 2004 ; Makhloufi, 2013 ; Acourene *et al.*, 2001) ont obtenu des teneurs en eau (40%), (28,17%) , (30%) respectivement dans les feuilles du romarin, cette teneur diffère de façon remarquable avec nos résultats .

La différence des teneurs de nos échantillons en eau comparées à celles de travaux antérieurs, peuvent être dues à certains facteurs écologiques, varie selon la localisation géographique l'âge de la plante, la période du cycle végétatif, ou même à des facteurs génétiques (Albu *et al.*, 2004).

2. Rendement d'extraction

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré des rendements d'extraction de romarin important : 4.48% et 8.16% dans les solvants (éthanolique et hydro-éthanolique), respectivement. Ces résultats montrent que l'extrait hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis* présente un rendement élève par rapport a celui de l'extrait éthanolique.

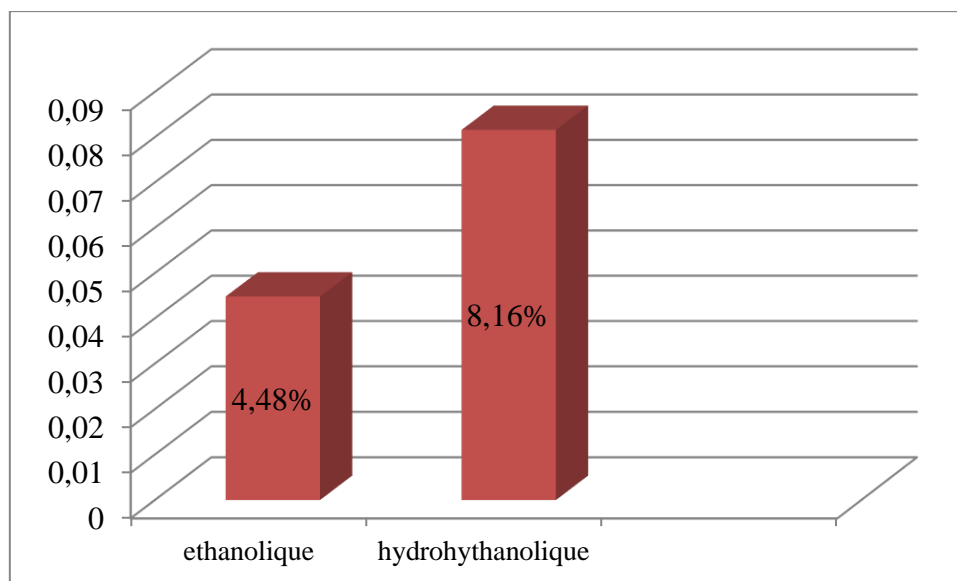


Figure4 :le rendement d'extraction des extraits bruts de romarin.

Le rendement d'extrait éthanolique (4.48%) en comparant avec d'autres chercheurs est élevé par rapport à (**Hilan et al.,2006** ; **Atik Bekkara et al .,2007** ; **Boutabia,2016** ; **Belkhodja et al.,2016**)qui ont enregistrés des rendements de (1,52% ;0,8% ; 2.3% et 1.29)respectivement.

Ce dernier est inférieur a ce qui trouvé par (**Menaceur, 2011** ; **Kamal Fadili et al.,2015** ; **Bendif Hamdi, 2017**), dont il sont enregistrés des rendements d'extraction dans le solvant éthanolique de : 13.6% ;20.55% et 19.6% respectivement.

Notre résultat est très bas par rapport à rendement obtenus par (**Mata et al., 2007**) qui ont trouvés un rendement de 51.1% avec l'extrait hydro-éthanolique.

Cette différence pourrait être expliquée par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en terme de rendement et qualité de l'extrait. Le climat, la zone géographique, l'organe de la plante utilisé, la période de séchage...etc. ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements de l'extrait (**Vekiari et al., 2002** ; **Kelen et Tepe,2008**).

3. Etude phytochimique

Les résultats des tests phytochimique sur d'extraits de *Rosmarinus officinalis* (éthanolique et hydro-éthanolique) indiquent la présence des composés suivants : les Flavonoïdes, les tanins, les Quinones et les alcaloïdes et l'absence des Stéroïls et Sucres réducteurs. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant:

Chapitre V : Résultat et discussion

Tableau 2: Les composés phytochimique détectés dans *Rosmarinus officinalis* de la région de Miliana.

Métabolite Secondaire	Réactifs	Ethanolique	Hydro-éthanolique
Flavonoïdes	Acétate de plomb	+	+
Tannins	FeCl ₃	+	+
Quinones	Solution de soude	+	+
Stérols	Anhydride acétique H ₂ SO ₄	-	-
Alcaloïdes	Wagner	+	+
Sucres réducteurs	Fehling	-	-

(+) présence ; (-) absence.

Selon (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2007 ; Fadili *et al.*, 2015) le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique et hydro-éthanolique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence des flavonoïdes, des tannins et l'absence des sucres réducteurs.

Selon (Makhloufi, 2013), le test photochimique indique la présence des alcaloïdes, Quinones et absence des stérols.

4. Teneurs en polyphénols totaux

Les analyses quantitatives des phénols totaux, est déterminé à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage exprimé en mg équivalent d'acide gallique.

Les valeurs moyennes de la concentration en polyphénols totaux des feuilles Sèche de la plante sont représentées dans le tableau 04 calculées à partir des valeurs des absorbances à une longueur d'onde de 765nm.

Chapitre V : Résultat et discussion

Les quantités de polyphénols correspondantes ont été rapportées en équivalent d'un milligramme de l'étalon utilisé et déterminées par l'équation $y = ax + b$.

Tableau 03: Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique.

Concentration (mg/ml)	Absorbance
0,03	0,128
0,06	0,245
0,09	0,370
0,12	0,463
0,15	0,598
0,18	0,662
0,21	0,816

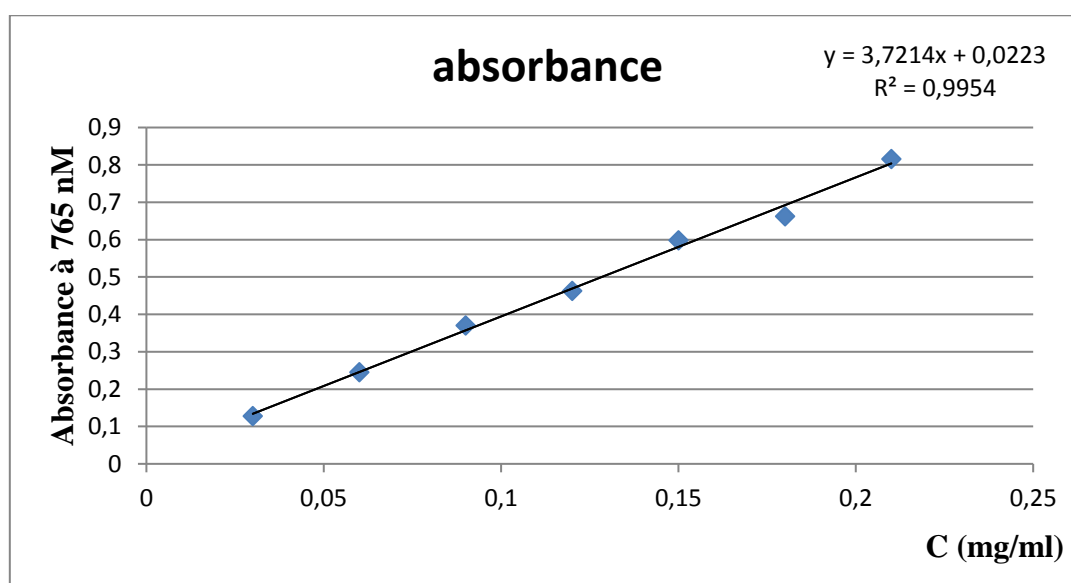


Figure05 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Chapitre V : Résultat et discussion

La teneur en polyphénols totaux le plus élevé a été enregistré par l'extrait hydro-éthanolique avec une teneur de $4.3 \pm 0,35$ mg EAG /g d'extrait par un pour a l'extrait éthanolique ($0.66 \pm 0,21$ mg EAG /g d'extrait).

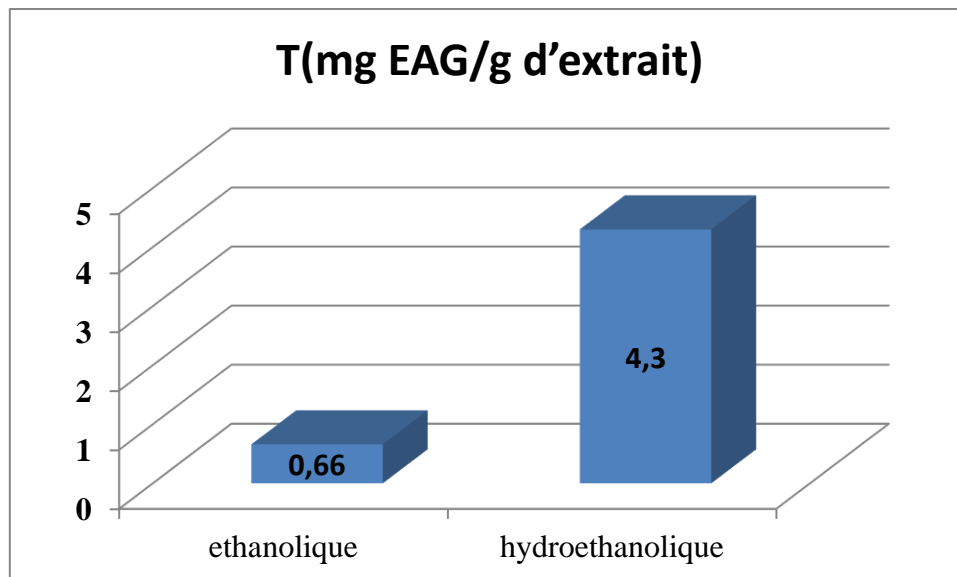


Figure06:teneurs des polyphénols totaux de chaque extrait (éthanolique et hydro-éthanolique).

La teneur en polyphénols totaux de notre plante *Rosmarinus officinalis* de l'extrait éthanolique (0.66 mg EAG/g) est inférieur à celle obtenus par (Aneta et al., 2007) avec une valeur de (1.71 ± 0.02 mg/g) et (Menaceur,2011)(195.24 mg EAG/g) , (Stephanovits et al.,2003) ($128,976 \pm 9,257$ mg EAG/g.), (Yesil-Celiktas O et al.,2007) ($70,3$ et $147,3$ mg EAG/g.) ,(Tavassoli et al .,2011)(4.99 ± 0.054), (Muchuweti et al.,2007)($10,83$ mg EAG/g) et (Erkan et al.,2008) (162 mg EAG/g).

La teneur de l'extrait hydro-hythanolique ($4.3 \pm 0,35$) du romarin est inférieur à celle de (Tawaha et al.,2007) (39.1 ± 3.6 mg EAG/g).

La variation en teneurs obtenues peut être due à certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (Podsdek, 2007 ; Falleh et al.,2008).

5. Activité antioxydante

5.1. Evaluation de l'activité antioxydant par diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH)

L'activité antiradicalaire de nos extrait éthanolique 52.6% est supérieur par un pour a l'extrait hydro-éthanolique 29.9%.

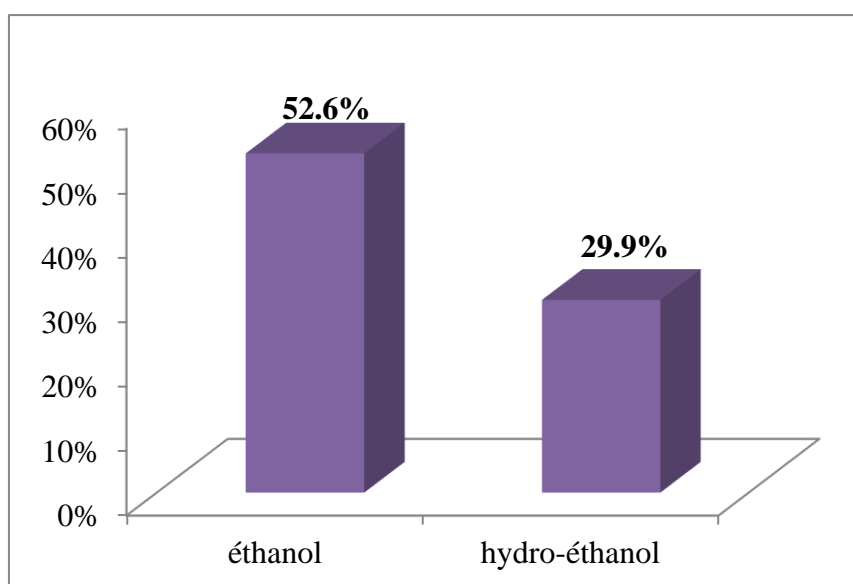


Figure 07 : pourcentage d'inhibition de radicaux DPPH de chaque extrait.

Les résultats d'inhibition de radicaux DPPH obtenus sont inférieurs aux ceux de (**Turkmen *et al.*,2007 ;Bendif et Hamdi, 2017**)qui ont trouvés des valeurs de 96,18%et 57,96% avec l'extrait éthanolique.

Selon le valeur qui se trouvé par (**Kasparaviciene *et al.*,2013**) (80%) avec l'extrait hydro-éthanolique est supérieur par rapport à notre résultat(29.9%).

Ceci peut être due à plusieurs facteurs tels que : la méthode d'extraction, la nature des composés phénolique des extraits, la teneur en composé phénoliques totaux, le lieu et le période de cueillette de la plante (**Stefanovits-bányai *et al.*, 2003**).

Ces résultats sont varier nombreux facteurs externes tels que les conditions climatiques de la région de la collecte ainsi que la période de collecte des échantillons qui influencent fortement l'état physiologique de la plante.

Chapitre V : Résultat et discussion

6. Activité antimicrobienne

Les extraits éthanoliques et hydro-éthanolique ont été évalués pour l'activité antimicrobienne contre les bactéries (*E. coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*).

Les souches *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* possèdent un potentiel de résistance contre l'action antibactérienne des 2 extraits du romarin comme se présenté dans le tableau suivant (**annexe I**):

Tableau 04 :Diamètre des zones d'inhibition des différentes souches testées.

Souches Bactériennes	Diamètres de la zone d'inhibition (mm)							
	Les dilutions de l'extrait du romarin							
	Extrait éthanolique			Extrait hydro-éthanolique				
	1	1/2	1/4	1/8	1	1/2	1/4	1/8
<i>E. coli</i>	10	7	3	2	7	5	4	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	7	6	4	8	7	5	4
<i>Staphylococcusau reus</i>	10	8	6	4	9	7	5	4

L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par (**ponce et al.,2003**).Ils ont classé les diamètres de zones d'inhibition (D) de la croissance Bactérienne en 4 classes :

- .Extrêmement sensible +++ : plus de 20mm
- .Très sensibles ++ : de 15mm à 19mm
- .Sensibles + : 7 mm à 14mm
- .Nom sensibles - : moins de 6mm.

- Selon les résultats de l'effet de l'extrait éthanolique du romarin on remarque :

Escherichia coli donne un diamètre de zone d'inhibition de 10mm pour la solution mère ; 7mm avec la dilution 1/2, 3 mm avec la dilution 1/4, et 2 mm avec la dilution 1/8.

Chapitre V : Résultat et discussion

Donc *Escherichia coli* est sensible(+) pour la solution mère et première dilution (1/2) et résistance (-) dans les deux dernières dilutions (1/4,1/8).

Pseudomonas aeruginosa donne un diamètre de zone d'inhibition de 10mm pour la solution mère ; 7 mm avec la dilution 1/2, 6mm avec la dilution 1/4, et 4mm avec la dilution 1/8. Donc *Pseudomonas aeruginosa* est sensible(+) pour la solution mère et les dilutions de 1/2, 1/4et résistance(-) dans la dernière dilution (1/8).

Staphylococcus aureus donne un diamètre de zone d'inhibition de 10mm dans la solution mère ; 8 mm avec la dilution 1/2 ; 6 mm avec la dilution 1/4, et 4 mm avec la dilution 1/8. Donc *Staphylococcus aureus* est sensible(+) pour la solution mère et les dilutions de 1/2, 1/4 et résistance(-) dans la dilution 1/8.

- Avec l'extrait hydro-éthanolique :

Escherichia coli donne un diamètre de zone d'inhibition de 7 mm avec la dilution 1/2 de 5mm ; 4mm avec la dilution 1/4 et 3mm avec la dilution 1/8. Donc *Escherichia coli* est sensible(+) pour la solution mère seulement et résistance(-) dans les restes dilutions (1/2, 1/4, 1/8).

Pseudomonas aeruginosa présente un diamètre de zone d'inhibition de 8mm de la solution mère ; la dilution 1/2 de 7mm ; 5mm avec la dilution 1/4 et 4mm avec la dilution 1/8. De ce fait *Pseudomonas aeruginosa* est sensible(+) pour la solution mère et la première dilution (1/2) et résistance(-) dans les autres dilutions (1/4,1/8).

Staphylococcus aureus donne un diamètre de zone d'inhibition de 9 mm dans la solution mère ; la dilution 1/2 de 7 mm ; 5mm avec la dilution 1/4 et 4mm avec la dilution 1/8. Donc *Staphylococcus aureus* est sensible(+) pour la dilution1/2et la solution mère et résistance(-) dans les dilutions 1/4, 1/8.

Le pouvoir antimicrobien selon la méthode de contact direct révèle que l'extrait éthanolique de *R. officinalis* a montré une activité contre la plupart des bactéries testées, et la concentration minimale inhibitrice (CMI) de 1/8 de dilution n'a aucun fait sur les bactéries testé, pour la solution mère (concentration plus élevé) et dilutions de 1/2;1/4 données des zones d'inhibition.

Chapitre V : Résultat et discussion

Pour l'extrait hydro-éthanolique ont été remarqué la sensibilité(+) dans la solution mère (concentration plus élevée) et dans la première dilution (1/2) par contre n'a aucun zone d'inhibition dans les autres dilutions (1/4 ; 1/8).

Cette étude ont été confirmée par (Ijaz *et al.*, 2010 ; Sthéfane *et al.*,2014 ;Boutabia *et al.*,2016 ;MOUAS *et al.*,2017 ;Ayadi *et al.*,2011),Ont observé un effet antimicrobienne du romarin pour l'extrait éthanolique.

Plusieurs travaux ont mis en évidence la sensibilité des bactéries sur l'extrait hydro-éthanolique (Falleh *et al.*,2008 ; Hayouni *et al.*, 2007 ; Turkmen *et al.*, 2007; Koné *et al.*, 2004 ; Ayadi *et al.* , 2011 ;Gachkar *et al.*, 2006).

Par contre (Al-marir, 2014 ; KhaledIbraheem, 2013) pour l'extrait éthanolique et pour l'extrait hydro-éthanolique (Fernanda *et al.*,2013)ils ont dit que l'extrait de romarin n'a aucun fait sur les bactéries testées .

De cette étude analytique d'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits Éthanolique et hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis* ressort que:

- ✓ Les souches bactériennes (*E. coli* ; *P. aeruginosa* et *S. aureus*) étudiées sont sensible à ces extraits.
- ✓ Cette sensibilité est différente selon les souches. Les souches sont très sensibles, les souches sont moyennement sensibles et les souches sont moins sensibles.
- ✓ L'extrait éthanolique du *Rosmarinus officinalis* est plus actif que l'extrait hydro-éthanolique.

Conclusion

Conclusion

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation des Antioxydants et des antimicrobiens naturels. De nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes. Ce travail nous a permis d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique et hydro-éthanolique et l'activité antimicrobienne de *Rosmarinus officinalis*.

On peut conclure que :

Elle a permis de mettre en évidence à travers un criblage phytochimique la présence des tanins, des flavonoïdes, des Quinones et des alcaloïdes. Tandis que les substances de Stérols et Sucres réducteurs. Sont totalement absentes dans toutes les extraits.

Le rendement d'extraction par l'éthanol et l'hydro-éthanol dans les feuilles de romarin a un pourcentage de 4.48% ; 8.16% respectivement.

Le dosage quantitatif des phénols totaux les deux extraits (éthanoliques et hydro-éthanolique) a révélé que le romarin contient 0.66 mg EAG/gd'extrait ; 4.3 mg EAG/gd'extrait respectivement.

L'activité antioxydante des extraits, a été déterminée par la méthode DPPH avec des pourcentages d'inhibition de $29.9 \pm 0,39\%$ l'extrait hydro-éthanolique et de $52.6 \pm 0,29\%$ l'extrait éthanolique.

L'activité antimicrobienne des extraits du romarin a été évaluée sur Trois souches bactériennes (*Pseudomonas Aeruginosa* ; *E. coli* ; *Staphylococcus aureus*) par la méthode des puits et des disques. Les résultats obtenus tout au long de ce test ont montré que les extraits du romarin ont une activité bactérienne contre un certain nombre de bactérie.

En perspective dans le cadre de valoriser ces résultats, il est intéressant de :

- Mener une étude plus approfondie pour isoler, purifier, et identifier les molécules responsables de l'activité antioxydant et antimicrobiennes
- Etudier les mécanismes d'action des composés phénoliques impliqués dans les activités précédentes *in vivo*.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Abdullah Ijaz Hussain, Farooq Anwar, Shahzad Ali Shahid Chatha, Abdul Jabbar, Shahid Mahboob, Poonam Singh Nigam. (2010). *Rosmarinus officinalis* essential oil: Antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*: 1076, 1070-1078.

Acourene S et Tama M, (2001). Caractérisation physicochimiques des principaux cultivars de dattes de la région de Ziban. *Revue Recherche Agronomique. INRAA Algerie* .Vol 1.P 59-66.

AL Namer Rashad Mohammed Musleh.(2014). Valorisation Pharmacologique de *Rosmarinus Officinalis* et de *Lavandula Officinalis*: Toxicité aigue ,Potentiel Psychotrope et Antibactéries. Thèse de doctorat, Pharmacologie et Toxicologie. Univrsité Mohammed V – AGDAL.

Alawa C.B.I., Adamu A.M., Gefu J.O., Ajanusi O.J., Abdu P.A., Chiezey N.P., Alawa J.N., Bawman D.D. 2003. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants, *Vernoniaamygdalina* and *Annonase negalensis*, for anthelmintic activity. *Else vier Science*, 73- 81.

Albu S, Joyce E, Paniwnyk L, Lorimer J, Mason T. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11: 261-265.

Altinier, G., Sosa, S., Aquino, R.P., Mencherini, T., Loggia, R.D., Tubaro, A., (2007). Characterization of topical anti-inflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.* 55:1718–23.

Anderson K. J., Teuber S. S., Gobeille A., Cremin P., Waterhouse A. L. and Steinberg F. M. (2001). Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. Biochemical and molecular action of nutrients. *Journal of Nutrition*. 131:2837–2842.

Aneta Wojdyło, Jan Oszmian ´ski a, Renata Czemerys b. (2007). Antioxidant activity and phenolic compound in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105,945:940-949.

Références Bibliographiques

- Arous, S. (2014).** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antiradicalaire des extraits de *Fredolia aretioides*.
- Atik bekkara F, Bousmaha L, Taleb bendiab SA, Boti JB, Casanova J.(2007).**Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis L* poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé*,7: 6-11.
- Atik bekkara, F., Bousmaha, L., Taleb bendiab, S.A., Boti, J.B., Casanova J. (2007).** Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis L*. poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé*. 7: 6-11.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. (2005).** Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem*. 89, 27-36.
- Ayadi S ., Jerribi . et Abderrabba M., (2011)-** Extraction et études des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* cueillie dans trois régions différents de la Tunisie .Unité de recherche physico-chimique moléculaire .IPFST boite postale, la marsa Tunisie, p.51.
- Ayman Al-Mariri, PhD; Mazen Safi, PhD. (2014).***In Vitro* Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria.38: 36-42.
- Bahorun, T., (1997).** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentiel. *Food and agricultural resarch council, Réduit, Mauritus*. 83-94.
- Bakirel, T., Bakirel, U., Keles, O.U., Ülgen, S.G., Yardibi, H., (2008).** *In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol*. 116: 64–73.
- Bartels M (1997).** Guide des plantes du Bassin méditerranés, *Edition Ulmer*, page 6.
- Belabbassi, O. (2012).**Etude de l'effet de la polyploïdisation sur la teneur en hyoscyamine des chevelus racinaires de *Datura stramonium L*.
- Bellakhdar, J., (2006).** Plantes médicinales au Maghreb et soins de base : précis de phytothérapie moderne : Eds Le Fennec.
- Benzahi K. (2001).**Contribution à l'étude des flavonoides dans la Plante cynodn Dactylon-L (chindent), mémoides de Magister. Université de Ouargla, P,15-17.N.
- Bérubé-Gagnon, J., (2006).** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Quebec.
- Biljana, Bozin, Mimica-Dukic, Neda Samojlik, Isidora Jovin, Emilija. (2007).** Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis*

Références Bibliographiques

L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. Journal of agricultural and food chemistry. 55. 7879-85. 10.1021/jf0715323.

Boizot, Nathalie Charpentier, Jean-Paul. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 77 : 79-82.

Botanica, T., (2011). Projet de numérisation de la flore de L'Abbé Coste par le réseau Tela botanica. Retrieved from http://www.tela-botanica.org/bdtx-nn-75333_synthese?Referentiel=bdtx&niveau=2&module=pdf-export&action=pdf-export&num_nom=75333

Boullard, Boudjemaa Nour Elyakin et Ben Guegua Hadjer (2010). L'effet antibactérien de *Nigella Sativa*. Thèses de doctorat. Université Kasdi Merbah Ouargla.

Brand WW, Cuvelier HE, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 1995, 82: 25-30.

Bremness, L. (2002). Plantes aromatiques et médicinales. Bordas (Ed). Paris, 303 p.

Brian M. Lawrence. (1993). Huiles essentielles de la plante à la commercialisation – Manuel pratique corporation laseve, 142 pages.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris. Carcinogenesis by dietary polyphenolic compound. *Annual Review of Nutrition.* 21:381-406.

Ca-sfm. (2013). Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources. Springer New York; pp. 363-369.

Cassella S., Cassella JP. and Smith I., (2002). Synergistic antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils against dermatophyte infection. *The International Journal of Aromatherapy.* 12:2-15.

Catherine GAUDYBUXERAUD. (2005). Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. Elsevier / Masson, 269.

Chan, E.W.C. Lim, Y.Y. Wong, L.F. Lianto, F.S. Wong, S.K. Lim, K.K. . Joe, C. Lim. ET.Y. (2007). Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry,* 477–483.

Chaouch.,(2001). Etude des alcaloïdes dans la coloquinte *Colocynthis vulgaris* (L) Schrad (cucurbitacées) Région de Oued N' sa (Wilaya d'ourgla). Mémoire de magister. Université d'Ouargla. P 44.

Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Poel B.V., Pieters L., Vlietinck A.J. and Berghe D.V. (1988). Structure-activity relationship and Classification of

Références Bibliographiques

flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide Scavengers. *Journal of Natural Products*. 61: 71-76.

Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12 (4): 564- 582.

Delattre, J., Beaudoux, J.-L., and Bonnefont-Rousselot, D. (2005)."Radicaux libres et stress oxydant (aspects biologiques et pathologiques)."

Dewick, P.M. (1995). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*. 12: 579-607.

Dias, P.C., Foglio, M.A., Possenti, A., Carvalho, J.E., (2000). Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extracts of *Rosmarinus officinalis* L. *J. Ethnopharmacol.* 69: 57–62.

Dworkin. S. Falkow, D.R. (2006). The order Methanosarcinales. In: M., E. Rosenberg. Kendall, M.M., and Boone, K-H. Schleifer. And E. Stackebrandt (eds.). *The Prokaryotes*. Vol 3: Archaea. Bacteria; Firmicutes, Actinomycetes. pp 244-256. Springer, New York.

Erkan, N; Ayranci, G ; et Ayranci, E.(2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) Extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic Acid and sesamol. *Food Chemistry* 110:76–82.

Fadili K. , Amalich F., Soro K. N’dedianhoua. , Bouachrine M, Mahjoub M. , El Hilali F. , and Zair H. (2015).Teneurs en polyphénols et évaluation de l’activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc: *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides*.

Falleh H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their Biological activities .*C. R. Biologies*. 331: 372-379.

Favier A., (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L’actualité Chimique*. P:108-115.

Fernanda Villas Boas Petrolini, Rodrigo Lucarini, Maria Gorete Mendes de Souza, Regina Helena Pires, Wilson Roberto Cunha, Carlos Henrique Gomes Martins. (2013). Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. *Brazilian Journal of Microbiology*, 832: 829-834.

Références Bibliographiques

- Fernandez-López J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Pérez-Alvarez J.A. & Kuri V., (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69: 371-380.
- Ferrari, J., (2002).** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud. Ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne.
- Fleeger, J.L. et Flipse, I.J. (1964).** Metabolism of bovine semen XIII. Malonic acid metabolism by bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*. 47 (5): 535-538.
- Gachkar L, Yadegari D, Bagher MR, Taghizadeh M, Staneh SA, Rasooli I.,(2007).** Chemical and biological characteristic of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*; 102: 898-904.
- González-Trujano, M.E., Peña, E.I., Martínez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Déciga-Campos, M., et al., (2007).** Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 111: 476–82.
- Graundmann Hajo MD, Marta Aires-de-sousa PhD, John Boyce MD and Edine tiemersma PhD. (2006).** Emergence and resurgence of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* as a public-health threat, Elsevier Ltd All rights reserved, 880:874-885.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J O., Charlier C. et Chapelle J. P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue Medical de Liege*. 10: 628-638.
- Haloui, M., Louedec, L., Michel, J.B., Lyoussi, B., (2007).** Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. *J. Ethnopharmacol.* 71: 465-72.
- Hamdi Bendif, Messaoud Boudjeniba, Mohamed Djamel Miara, Loreta Biqiku, Massimo Bramucci, Giovanni Caprioli, Giulio Lupidi, Luana Quassinti, Gianni Sagratini, Luca A Vitali, Sauro Vittori, Filippo Maggi. (2017).** *Rosmarinus eriocalyx*: An alternative to *Rosmarinus officinalis* as a source of antioxidant compounds. *Food chemistry*, 85:78-88.
- Hamdi Bendif¹, Khawla Adouni² & Messaoud Boudjeniba¹.(2017).** The effect of growth regulators and explants on callus induction in four Cultivars of potato (*Rosmarinus officinalis*). ISSN 2490-4392, *Journal of Bioresources Valorization*, 38:34-41.
- Hamia C, Guergab A, Rennane N, Birache M, Haddad M, Saidi M, Yousfi M. (2014).** Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du *rhanterium adpressium*. *Annales des sciences et technologie*, 6: 1.

Références Bibliographiques

- Hammer KA ., Carson CF., Riley TV., (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86:985–990.
- Harborne J. (1973).** Phytochemical methods. London. Chapman and Hall, p: 49.
- Harborne JB.(1998).** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB). 203-214.
- Hayouni, E.A., Abedrabba Bouix, M., Hamdi, M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera L.* and *Rosmarinus officinalis L.* fruit extracts. *Food Chemistry.*105, 1126– 1134.
- Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M., (2006).** Ethnobotany and ethnopharmacology – interdisciplinary links with the historical sciences. *J. Ethnopharmacol.* 107: 157–60.
- Henrich, et al., (2006).** Ethnobotany and Flavonoids-potent and versatile.
- Hilan C, Sfeir R, Jawish D et Aitour S. (2006).** Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiaceae-Lebanese Science Journal Vol.7 ; N°2.
- Hoffman L. (2003).** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes. Thèse de doctorat. Strasbourg, 2003, pp 245.
- Hopkin, W.G. et William, G. (1995).** Physiologie végétale. De Boeck Supérieur, Bruxelles. 278-280.
- Iserin P., (2001).**Encyclopédie des plantes médicinales, Tome 2.Ed. Larousse.londres, 143-225-226p.
- Kahlkoèn, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., et al. (1999).** Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954–3962.
- Kamal Fadili, Smail Amalich, Touria ZairPublished. (2015).** Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: *Rosmarinus officinalis* and *Thymus satureioides*. *Journal of International Scientific Publication: Materials, Methods and Technologies*, 35:30-38.
- Kasparaviciene G, Ramanauskiene K, Savickas A, Velziene S, Kalvèniene Z, Kazlauskiene D, Ragazinskiene O, Ivanauskas K, Ivanauskas K. (2013).** Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of different *Rosmarinus officinalis L.* Ethanolic extracts. *J.Biology*, 59: 39–44.

Références Bibliographiques

- Kelen M. et Tepe B., (2008).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora; *Bioresource Technology*; 99,4096-4104
- Khaled Ibraheem Qabaha1. (2013).** Antimicrobial and free radical scavenging activities of five Palestinian medicinal plants. *Qabaha Afr J Tradit Complement Altern Med.* 105:101-108.
- Koné, K. Kamanzi Atindehou, C. Terreaux, K. Hostettmann, D. Traoré , M. Dosso. (2004).** Traditional medicine in North C^ote-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 93 (2004) ,48 :43–49.
- Lamia Boutabia, Salah Telailia, Ismail Bouguetof, Faouzi Guenadil et Azzedine Chefrou. (2016).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, vol85(187) ,174-189.*
- Lee W, Lee Y. (2003).** Extraction optimization in food engineering, Flavor and aroma Substances. Korea Institute of Science and Technology Seoul, Korea, p: 923.
- Lendvai B ; Zelles T ; Rozsa B ; Vizi ES. (2002).** Vinca alkaloid enchanges morphological dynamics of dentric neocortical Layer 2/3 pyramidal cells. *Brain Research Bulletin*, 59 (4): 257-260.
- Lhuillier, A., (2007).** Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat. Toulouse.
- Machado, D.G., Bettio, L.E., Cunha, M.P., Capra, J.C., Dalmarco, J.B., Pizzolatti, M.G., Rodrigues, A.L., (2009).** Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 33(4):642-50.
- Madhavi D. (1996).** Food antioxidants. Edition: *CRC PRESS*, p: 361- 460.
- Makhloufi, A., (2013).** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis*) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Mémoire doctorat. Université Aboubaker Belkaid Bechar, 136p.

Références Bibliographiques

- Mangambu, M., Mushagalusa, K., and Kadima, N. (2014).**"Contribution à l'étude photochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, RD Congo)." *Journal of Applied Biosciences*, 75(1), 6211- 6220.
- Mata, A.T., Proenc, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Araujo, M.E.M., (2007).** Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.* 103: 778-786.
- Mathias, M., (2008).** Filière plantes aromatique et à parfum. Fiche technique de Lycée Agricole de Rivesaltes, 8p.
- Menaceur Fouad. (2011).**composition chimique et activité biologique des huiles essentielles et extraits du romarin .Diplôme de magister. École nationale supérieur agronomique El-Harrach Alger.
- Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. *Thèse de Magistère.* Université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen.
- Monod, T., (1978).** Les Rosas de Sancta Marya de Gil Eanes (1434): Junta de Investigações Científicas do Ultramar.
- Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HM. (2000).** Anti parasitic activity of two lavandula essential oils against *Giardia doudenalis*, *Trichomonas vaginalis*, and *Hixamita inflota*. *Parasitol. Res.* 99: 722-8.
- Mostefai, A., (2012).** Contribution à une étude morphométrique de *Rosmarinus officinalis* L (Lamiacées) dans la région de Tlemcen. Mémoire Master. Université Abou beker Belkaid, 100p.
- Mouas Yamina¹, Benrebiha Fatma Zohra¹, Chaouia Cherifa¹. (2017).** Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *Rosmarinus officinalis* L. *Revue Agrobiologia*, 366:363-370.
- Muchuweti M., Kativu E., Mupure C. H., Chidewe C., Ndhlala A. R. et Benhura M. A. N. (2007).**Phenolic composition and antioxidant propreties of some species. *American journal of food technolgy.*,2(5) : 414-420.
- Nathalie Boizot, Jean-Paul Charpentier. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. p80.
- Nauciel, C. (2000)** .Bactériologie médicale. Masson (Ed).Paris, 276p.
- Nauciel, C., JL. Vildé. (2000).***Escherichia coli*. In Bacteriologie médicale. 2ème Édition. Edition Masson, Paris, P 122-125.

Références Bibliographiques

- Novelli G. P. (1997).** Role of free radicals in septic shock. *Journal of physiology and pharmacology*.48: 517-527.
- Oloyede O. (2005).** Chemical Profile of Unripe Pulp of Carica papaya. Pakistan, *J. nutrition*, 4: 379-381.
- Omar Belkhodja, Muhammad Mohiuddin & Egide Karuranga. (2016).** The determinants of FDI location choice in China: a discrete-choice analysis, *Applied Economics*, 49:13, 1241-1254.
- Ouibrahim, A., (2015).** Evaluation de l'effet ant-microbien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurusnobilis* L., *Ocimumbasilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'Est Algérien. Thèse Doctorat. Université Badji Mokhtar Annaba, 95p.
- Parr A.J. and Bolwell J.P. (2002).** Phenols in the plant and in man. The potential for, possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Ournal of Science Food Agrictural*. 80: 985-1012.
- Pavela, R., (2006).** Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Pharmacol*. 76: 699-6.
- Pham-Huy, L.A., He.H. Et Pham-Huy.C. (2008).** Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *The International journal of Biomedical science*. 4(2): 89-96.
- Pharmacopée-française. (1998).** Pharmacopée française : France. Ministère du commerce, de l'industrie, des postes et des télégraphes France. Ministère de l'instruction publique.
- Pibiri M. C., Goel A., Vahekeni N. and Roulet C. A. (2006).** Indoor Air Purification and Ventilation Systems Sanitation with Essential Oils. *Int J Aromather*. 16 (3): 149-153.
- Pincemail, J., and Defraigne, J.(1999).**"Les antioxydants: un vaste réseau de défenses pour lutter contre le es effets toxiques de l'oxygène." Presented at Symposium «antioxydants et alimentation», Institut Danone, Bruxelles.
- Podsedek, A. (2007).** Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A Review. *LWT*, 40:1-11. Percival SL. *Microbiology of waterborne diseases*. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, 2004, p. 480.
- Poletti, A. (1988).** Fleurs et plantes médicinales. 2ème Edition. Delachaux & Niestlé (Ed). Paris,222p.
- Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. & Roura S.I., (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol*.36, pp.679-684. *J.Soc.Alger.Chim.*, 2011, 21(1), 25-33. *Journal de la Société Algérienne de Chimie* 25.

Références Bibliographiques

- Quezel P. et Santa, S., (1963).** La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. Ed. CNRS. Paris. 360-361 p.
- Quezel, P., Santa, S. (1963) ;** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. Tome II. C.N.R.S. (Ed). Paris, 565p.
- Ribéreau-Gayon, Pascal, R J Gautheret. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux / par Pascal Ribéreau-Gayon; préf. de R.-J. Gautheret. *Botanical chemistry*, 239 :232-242.
- Rozman L, Kalinovic I, Korunic Z. (2007).** Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *J. Stored Prod. Res.* 43: 349–355.
- Rožman T. and Jeršek B.5. (2009);** Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) Against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, Vol. 93; N°1, Pp.51-58.070-1078
- Tavassoli S and Emam Djomeh. (2011).** Total Phenols, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Methanol Extract of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *IDOSI Publications*, 338:337-341.
- Sanchez-Moreno C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int. J. of Foods Sci. Tech.* 8:121-137.
- Schauenberg O. and Paris F., (1977).** Guide to Medicinal Plants. Keats, New Canaan, C T.
- Sedjelmassi. (1993).** « Les plantes médicinales du Maroc, Najah et El Djadida Casa ». pp, 103.
- SKOCIBUSIC M., Bezic, N., Dunkic, V., (2006):** *Food Chem.*, (96) ,20-28.
- Sotelo-Félix JI, Martinez-Fong D, Muriel P, Santillán RL, Castillo D, Yahuaca P.,(2002).** Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J. Ethnopharmacol.* 81:145–54.0
- Stephanovits Banyai E., Tulok M-H., Hegedus A., Renner C., Szololosi Varga L. (2003).** Antioxidant effect of various Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) clones, Vol 47 (1-4): 111-113.
- Sthéfane G. Araújo¹, Lucas F. Alves¹, Maria Eduarda A. Pinto¹, Graziela T. Oliveira¹, Ezequias P. Siqueira², Rosy I. M. A. Ribeiro¹, Jaqueline M. S. Ferreira¹, Luciana A. R. S. Lima¹. (2014).** Volatile compounds of Lamiaceae exhibit a synergistic

Références Bibliographiques

antibacterial activity with streptomycin, *Brazilian Journal of Microbiology*, 1343: 1341-1347.

Tawaha, Khaled & Alali, Feras & Al-Gharaibeh, Mohammad & Mohammad, Mohammad & El-Elimat, Tamam. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*. 104. 1372-1378. 10.1016/j.foodchem.2007.01.064.

Traboulci, A.F., Taoubik., el-Haj, S., Bessiere, J.M., Rammal, S., (2002). Insecticidal properties of essential oils against the Mosquito *Culex pipiens molestus*. *Post. Mange. Sci.* 58: 491-5.

Trease E, Evans W. (1987). *Pharmacognosy*. Billiare Tindall.Londone, 13: 61- 62.

Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat, G. (2007). Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. 12:484-496.

Vekiari S.A., Protopapadakis E.F., Papadopoulou P., Papanicolaou D, Panou C. et Vamvakias M., (2002). Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and pelé of a limon variety; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 5(1), 147-153

Vican, P., (2001). *Encyclopédie des plantes médicinales*. Larousse (Ed). Paris, 355p.

Wang. (2008). «Régulation of Primate Trophoblast Lineage Differentiation Insights Learned from plants Embryonic Stem Cells.

Wilkinson J.M.,(2006). Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapter VIII.pp.157-165. *In* Ahmad I., Aqil F. and Owais M. *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*. Ed. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim, 405 p.

Williams, D. G., (1996). *The Chemistry of Essential Oils: An Introduction for Aromatherapists, Beauticians, Retailers& Studentss (0th Edition ed.)*: Micelle Pr (October 1, 1996).

Yamamoto J, Yamada K, Naemura A, Yamashita T, Arai R., (2005). Testing various herbs for antithrombotic effect. *Nutri*. 21: 580-587.

Yang C.S., Landau J.M., Huang M.T. and Newmark H.L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*. 21:381-406.

Références Bibliographiques

Yano, Y., Satomi, M., Oikawa, H., (2006). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International J Food Microbiology*. 111: 6-11.

Yesil Celiktas, O, Bedir, Erdal & Fazilet, vardar-sukan. (2007).*In vitro* antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*. 101. 1457-1464. 10.1016/j.foodchem.2006.03.055.

Annexes



Figure 8 :Evaluation de l'activité antimicrobienne d'extrait éthanolique de romarin contre *E. coli* selon la méthode d'aromatogramme (disques).

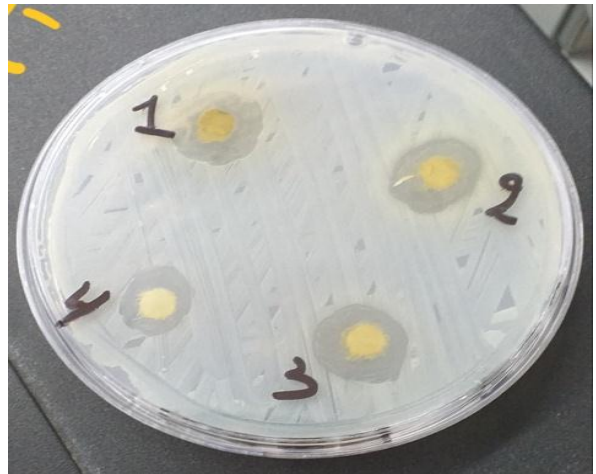


Figure 9 :Evaluation de l'activité antimicrobienne d'extrait hydro-éthanolique de romarin contre *E. coli* selon la méthode d'aromatogramme (disques).

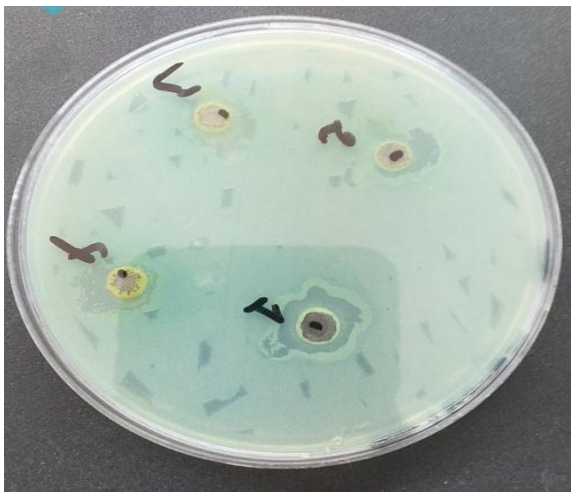


Figure 10 :Evaluation de l'activité antimicrobienne d'extrait éthanolique de romarin contre *Pseudomonas aeruginosa* selon la méthode des puits.

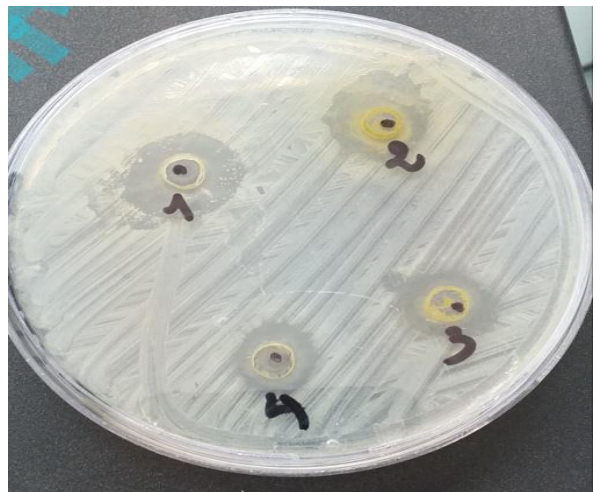


Figure 11:Evaluation de l'activité antimicrobienne d'extrait hydro-éthanolique de romarin contre *Pseudomonas aeruginosa* selon la méthode des puits.

Annexes

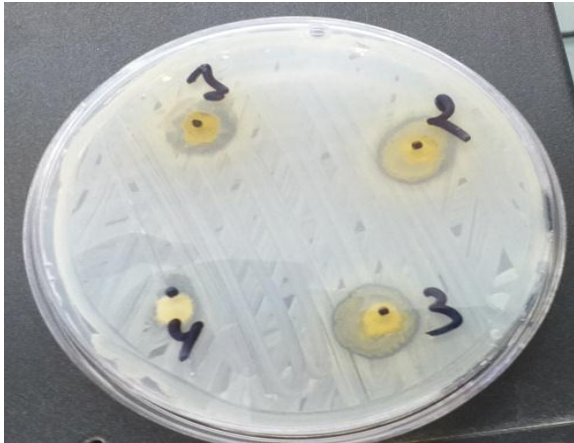


Figure 12 :Evaluation de l'activité antimicrobienne d'extrait éthanolique de romarin contre *Staphylococcus aureus* selon la méthode d'aromatogramme (disques).

- 1- Solution mère (extrait+DMSO)
- 3- La deuxième dilution (1/4)

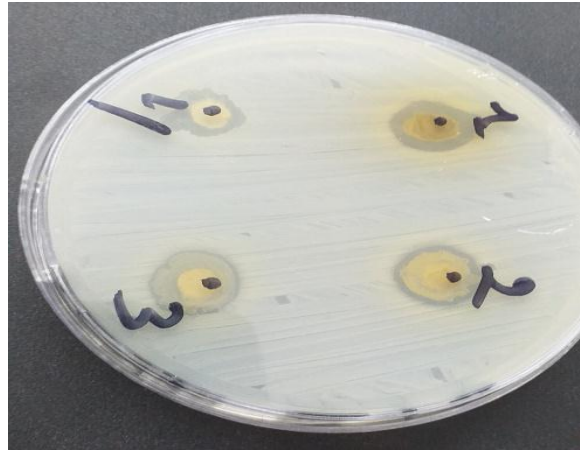


Figure 13 :Evaluation de l'activité antimicrobienne d'extrait hydro-éthanolique de romarin contre *Staphylococcus aureus* selon la méthode d'aromatogramme (disques).

- 2-La première dilution (1/2)
- 4-La troisième dilution (1/8)

Annexe I :Résultat des diamètres (mm) des zones d'inhibition (Diamètre des disques et des puits) des trois bactéries testées.

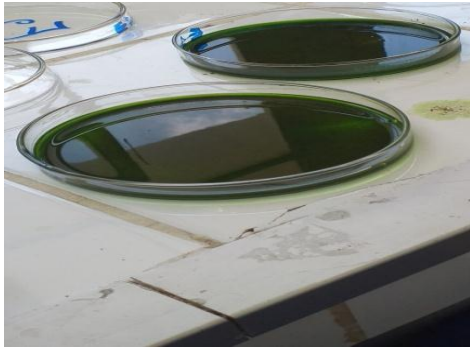


Annexe II : Balance électrique peser le romarin.



Annexe III : plaque chauffante pendant l'extraction (macération).

Annexes



Annexe IV : l'extrait éthanologique avant le séchage



Annexe V : l'extrait éthanologique après le séchage.



Annexe VI :Ensemencement de MH par écouvillon pour remplir dans des bactéries.