

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Abderrahmane Mira de Béjaïa**  
**Faculté des sciences de la nature et de la vie**  
**Département de Biologie Physico-chimique**

## **Mémoire de fin de cycle**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master**  
**En Biochimie Appliquée**

### **Thème**

*Evaluation de l'activité antioxydante de  
l'extrait méthanolique et l'activité  
Antimicrobienne des huiles essentielles  
de Rosmarinus officinalis*

#### **Présenté par :**

**M<sup>me</sup>: SOUFIT SAMIRA**

**M<sup>elle</sup>: BENNACER KAHINA**

#### **Membres du Jury:**

**President: Mr. Hamoum**

**Promoteur: Mr. Belkacem N.**

**Co-promotrice: Haouchine**

**Examinatrices: M<sup>me</sup> Bougouffa**

**M<sup>me</sup> Bakdi H.**

#### **Grade et lieu**

**M.C.A (UAMB)**

**M.A.B (UAMB)**

**UMMTO**

**M.A.A (UAMB)**

**M.A.A (UAMB)**

**2013-2014**

# Remerciements

*Louange à ALLAH, le miséricordieux qui nous a donné patience et courage afin d'achever ce travail.*

*Nous remercions tout particulièrement notre promoteur, Mr Belkacem Nassim. Pour l'honneur qu'il nous a fait en nous encadrant, pour l'aide précieuse qu'il nous a apporté, pour ses remarques et ses conseils avisés, qui nous ont permis de mener à bien ce travail.*

*Nous tenons à remercier aussi Mr hamoum F. D'avoir accepté de présider ce jury et d'apporter ses appréciations sur notre travail.*

*Merci à Mr Hamoum. Mm khetta pour nous avoir accueillies au sein de leur laboratoire.*

*Nous remercions aussi les technicien de laboratoire animalerie et biophysique, Benmessoud F. Farouk et Saida*

*Nous remercions également M<sup>m</sup> Bougouffa. K, et M<sup>me</sup> Bakdi qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail.*

*Nous remercions vivement, Dr. HAOUCHINE, Dr. AZZAM, Dr. AMRANE et toute l'équipe du service de Microbiologie et de Parasitologie du CHU de Tizi -Ouzou pour leur précieuse aide.*

*A toute personne ayant participé de près ou de loin à notre formation et à tous ceux qui nous ont apportés leurs soutiens et encouragements durant la réalisation de ce travail.*



*Linda Ch. et Hamida B.*



## *Dédicaces*

*Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce travail :*

*Aux deux être les plus chers au monde qui ont donné sens à mon existence, en m'offrant une éducation digne de confiance qui m'ont soutenu nuit et jours durant tout mon parcours.*

*J'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille*

*A mon très chère mari Zahir*

*Mes très chères sœurs, Zuina, Samiha, Sabrina, Kahina, Linda, Katia, ainsi que mes adorables belles sœurs, Nabila, Dahia et Kahina,*

*Mes très chers frères, Omar, Hicham et Nouar*

*A ma belle famille*

*A toute la famille Soufit*

*A toutes mes amies : Wassila, Acia, Djida, Nadia, Sabrina, Rabiha, Saida, Zahra, Nadjet, Hanane.....*

*A ma chère binôme Kahina et sa famille*

*A toute la promotion de biochimie appliquée « 2014 ».*

*Samira. S*





## *Dédicaces*

*Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce travail :*

*Aux deux être les plus chers au monde qui ont donné sens à mon existence, en m'offrant une éducation digne de confiance qui m'ont soutenu nuit et jours durant tout mon parcours.*

*J'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille*

*Ma grand mère*

*Mes très chères sœurs*

*Hassiba, Sabrina, Linda, Fahima*

*Mes très chers frères, Hmana, Walid, Yahaya, Djloul, Yanis,*

*A toute la famille BENNACER*

*A toutes mes amies : Wassila, Acia, Djida, Nadia, Sabrina, Rabiha, Saida, Zahra, Nadjet, Hanane, zakia, Noura .....*

*A ma chère binôme Samira et sa famille*

*A toute la promotion de biochimie appliquée « 2014 ».*

*Kahina.B*



## *Liste des abréviations*

ROO• : radical peroxyde

RO• : radical alkoxyde

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> : ion radicalaire super oxyde

OH• : radical hydroxyle

NO• : oxyde nitrique

O<sub>2</sub> : oxygène

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

SOD : Superoxyde dismutase

GSH : Glutathion

NADPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl

GSSG : glutathion oxydé

ADN : Acide désoxyribonucléique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

AH: antioxydant

ORAC: Oxygène Radical Absorbance Capacity

ABTS: acide 2, 2-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

FRAP: Ferric reducing antioxydant power

ATCC: American type culture collection

*R. officinalis* : *Rosmarinus officinalis*

EAG: Equivalent en acide gallique

Abs: Absorbance

BHA: Butyle hydroxytoluène

IC<sub>50</sub>: Concentration inhibitrice 50 %.

HEs : huiles essentielles

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : carbonate de sodium

AlCl<sub>3</sub> : Trichlorure d'Aluminium

DMSO : Dimethyl sulfoxyde

*E. coli* : *Escherichia coli*

R : Rendement

MHE : Quantité d'extrait récupéré en g

Ms : Quantité de matière végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g.

V : volume

UV-Vis : Ultraviolet/Visible

EQ : Equivalent en quercétine

MH : Muller Hinton

GN : gélose nutritive

DO : Densité optique

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

## *Sommaire*

### **Liste des abréviations**

### **Liste des figures**

### **Liste des tableaux**

Introduction .....	1
--------------------	---

## *SYNTHESE BIBELIOGRAPHIQUE*

### *Chapitre I*

#### *Généralité sur ROSMARINUS officinalis*

I.1.Description de romarin .....	3
I.2.Systématique botanique de la plante .....	3
I.3.Répartition géographique .....	4
I.4.Propriétés et emploi de l'espèce .....	4
I.5.Composition chimique du romarin .....	5
I.5.1.Composition en huiles essentielles.....	5
I.5.2.Composition en polyphénols.....	6
I.6.Les différentes activités biologiques de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	7

### *Chapitre II*

#### *L'activité antioxydante*

II.1.Définition d'un radical libre .....	9
II.2.Les antioxydants .....	9
II.2.1.Les antioxydants primaires .....	10
II.2.2.Les antioxydants secondaires.....	10
II.3.Mécanismes d'action des antioxydants .....	11
II.4.Les polyphénols comme antioxydant .....	11



II.5.Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant.....	11
II.6.Méthodes d'évaluations de l'activité antioxydante .....	12
II.6.1.Méthode de DPPH .....	12
II.6.2. LA METHODE ORAC .....	13
II.6..LA METHODE ABTS .....	13

### *Chapitre III*

#### *L'activité antimicrobienne*

III.1.Microbes.....	15
III.2.Les caractères biologiques de différentes souches utilisées .....	16
II.3.Les principales substances antibactériennes.....	17
III.3.1. Les antibiotiques.....	17
III.3.2. Les huiles essentielles.....	17
III.3.3.Huiles essentielle du romarin .....	18
II.3.4.L'activité antibactérienne des huiles essentielles .....	18
III.3.5.Mode d'action des huiles essentielles .....	19
III.3.6.Techniques d'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	20
III.3.6.1.L'aromatogramme .....	20
III.6.2.Méthode de dilution .....	21

### *Partie expérimental*

#### *Chapitre I*

#### *Matériels et méthodes*

I.1.Matériel .....	22
I.1.1.Matériel végétal .....	22
I.1.2.Matériel biologique .....	22
I.1.3. Appareils et produits chimiques.....	23
I.2.Méthodes.....	24

I.2.1. Méthodes d'extraction .....	24
I.2.1.1. Extraction des huiles essentielles .....	24
I.2.1.2. Extraction des composés phénoliques .....	25
I.2.1.2.1. Préparation des extraits méthanoliques .....	25
I.2.2. Analyse chimique.....	25
I.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux .....	26
I.2.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux .....	26
I.2.3. Evaluation, <i>in vitro</i> , de l'activité antioxydante.....	27
I.2.3.1 Réduction du radical ABTS <sup>•+</sup> .....	27
I.2.3.2.Méthode de réduction du radical libre DPPH .....	28
I.2.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	29
I.2.4.1. Isolements des souches et tests de confirmation .....	29
I.2.4.2. Activité antibactérienne de l'huile essentielle .....	29
I.2.4.3. Détermination des CMI .....	31
I.2.4.4.Activité antifongique .....	32

## *Chapitre II*

### *Résultats et discussions*

II.1.Extraction de l'huile essentielle .....	33
II.1.1.Résultat de l'extraction .....	33
II.1.2. Le rendement .....	33
II.2.Dosage des composés phénoliques.....	33
II.2.1.Dosage des phénols totaux .....	33
II.2.2.Dosage des flavonoïdes .....	34
II.3.Activités antioxydant de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	35
II.3.1.Activité scavenger du radical DPPH .....	35
II.3.2.Activité scavenger du radical ABTS <sup>•+</sup> .....	37
II.4.Evaluation de l'activité antimicrobienne .....	40

II.4.1. Activité antibactérienne de l'huile essentielle .....	40
II.4.1.1. Tests de confirmation .....	40
II.4.1.2. Aromatogramme de l'huile essentielle du romarin .....	41
II.4.1.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice .....	47
II.4.2. Activité antifongique .....	47
<b>Conclusion</b> .....	<b>49</b>
<b>Référence bibliographique</b>	
<b>Annexe</b>	

## *Liste de figures*

<b>N° de figure</b>	<b>Titre de la figure</b>	<b>page</b>
<b>1</b>	Aspect morphologique du romarin	<b>03</b>
<b>2</b>	conséquence de stress oxydatif	<b>12</b>
<b>3</b>	Forme libre et réduite du DPPH	<b>13</b>
<b>4</b>	Modes d'actions des huiles essentielles	<b>20</b>
<b>5</b>	Photographies de la partie aérienne de <i>Rosmarinus officinalis</i> sèche	<b>22</b>
<b>6</b>	Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits par l'ABTS <sup>+</sup>	<b>27</b>
<b>7</b>	courbe d'étalonnage de l'acide gallique	<b>34</b>
<b>8</b>	courbe d'étalonnage de la quercétine	<b>35</b>
<b>9</b>	pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait, BHA et de l'extrait, BHA et acide ascorbique.	<b>36</b>
<b>10</b>	Courbe d'étalonnage de Trolox	<b>38</b>
<b>11</b>	Effet scavenger du radical ABTS par l'extrait méthanolique à une concentration de 100µg/ml en fonction du temps.	<b>38</b>
<b>12</b>	pourcentage d'inhibition du radical ABTS <sup>+</sup> par l'extrait méthanolique de <i>R.officinalis</i> à différentes concentrations	<b>39</b>
<b>13</b>	l'effet de l'huile essentielle de romarin sur <i>Baccilus sp</i> (CHU)	<b>44</b>
<b>14</b>	l'effet de l'huile essentielle de romarin sur <i>staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	<b>44</b>
<b>15</b>	l'effet de l'huile essentielle de romarin sur <i>E. coli</i> (CHU)	<b>44</b>
<b>16</b>	l'effet de l'huile essentielle de romarin sur <i>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</i>	<b>44</b>
<b>17</b>	l'effet de l'huile essentielle de romarin sur streptococcus sp (CHU)	<b>45</b>
<b>18</b>	L'effet des antibiotiques sur les souches testé	<b>46</b>
<b>19</b>	Aromatogramme de l'huile essentielle de romarin sur candidas sp	<b>48</b>

## *Liste de tableaux*

<b>N° de tableau</b>	<b>Titre de tableau</b>	<b>page</b>
<b>1</b>	<i>la composition chimique d'huile essentielle du Rosmarinus officinalis</i>	<b>06</b>
<b>2</b>	les caractères biologiques de différentes souches utilisées	<b>16</b>
<b>3</b>	Diamètre des zones d'inhibitions des huiles essentielles de romarin sur les différentes souches bactériennes testées.	<b>42</b>
<b>4</b>	les différentes concentrations minimales inhibitrices	<b>47</b>

# *Introduction*

Depuis l'antiquité les hommes utilisent les plantes aromatiques (**majinda et al. 2001**). De nos jours, la majorité des habitants du globe terrestre utilisent de très nombreuses plantes, comme source d'assaisonnement ou comme remède en médecine traditionnelle. Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui possèdent un très large éventail d'activités biologiques.

Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèle pour les composés pharmacologiquement actifs (**Decaux, 2002**).

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 lamiacées, 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 antioxydantes et antimicrobiennes comme les polyphénols et les huiles essentielles. Plusieurs travaux de recherches ont été portés sur l'étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne de *Rosmarinus officinalis* aboutissant à des résultats variables selon la localisation géographique où la plante a été récoltée (**Yesil et al. 2005**).

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne de *Rosmarinus officinalis* récolté dans la région de Bejaia. Pour cela notre travail a porté sur :

- ❖ L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.
- ❖ L'extraction des composés phénoliques par macération.
- ❖ Dosage des polyphénols totaux et de flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis*.
- ❖ L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* par deux méthodes, le piégeage du radical libre DPPH et l'effet scavenger du radical ABTS<sup>+</sup>.
- ❖ L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles sur cinq souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus*

*ATCC 25923, E. coli* CHU, *Bacillus sp* CHU, *streptocoque sp* CHU) et une souche fongique (La levure *Candida sp*).



*SYNTHÈSE*  
*BIBLIOGRAPHIQUE*

# *Chapitre I*

*Généralité sur*

*ROSMARINUS officinalis*

## I.1. Description de romarin

*Rosmarinus officinalis* (romarin), est un arbuste aromatique qui appartient à la famille des lamiacées (labiées) qui est connue depuis l'oligocène. C'est l'une des familles les plus répandues dans le bassin méditerranéen et spécialement en Algérie. Elle comprend plus de 3300 espèces et environ 200 genres (**Jeun Brineton, 1999**).

C'est un arbrisseau, toujours vert de 1m à 2m de hauteur, touffu, très rameux couvert d'une écorce écailleuse portant des tiges ligneuses feuillées généralement érigées. Les feuilles sont opposées, persistantes, aromatiques, sessiles, étroites et linéaires. Elles sont réfléchies sur les bords, luisants et verdâtres sur la face supérieure. Les fleurs, insérées en grappes axillaires à corolle de type labiée sont de couleur bleu pâle à bleu violet clair. Le romarin tire son nom du latin *ros marinus*, qui signifie rosée de mer, reconnu pour sa saveur piquante et parfumée assez prononcée (**Wicht et Anton, 2003**) (fig.1).

## I.1. 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 (Labiiales)

Famille : Lamiacées

Genre : *Rosmarinus*

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




**Figure 1** : aspect morphologique du romarin

### I.3. Répartition géographique

Le romarin spontané qui pousse sur le bassin méditerranéen, et le sud-ouest de l'Asie, est souvent cultivé dans les jardins comme clôture, très exigeant en lumière et en chaleur, et résistant à la sécheresse. Le romarin est une plante des coteaux arides, garrigues et lieux rocheux de la région méditerranéenne (**Boullard, 2001**).

En Algérie, le romarin est l'une des sept espèces végétales excédant 50,000 hectares sur le territoire national.

Appellation régionales en Algérie :

-  région de l'est : Eklil
-  région de l'ouest : Helhal
-  région de centre : Yezir ou Amezir

### I.4. Propriétés et emploi de l'espèce

Le romarin est utilisé comme arbuste ornementale et pour les haies bien exposées à la lumière. En usage traditionnel ses feuilles sont utilisées en tisanes ainsi que sur les blessures et les plaies (**Dorvant, 1982**).

Le romarin est employé dans le traitement de plusieurs maladies, son usage peut être interne ou externe.

#### I.4.1. Usage interne

Il est utilisé sous forme d'infusion, extrait fluide ou autre préparation galénique contre les douleurs d'estomac. Il est associé fréquemment à d'autres cholagogues et cholérétiques pour favoriser les fonctions d'élimination rénale et digestive et dans le traitement symptomatique de troubles digestifs (**Bruneton, 1993**). Le romarin était déjà cité en médecine arabe classique (**Leclerc, 1877**) pour ces propriétés hépatotrope et emménagogue qui sont dues à la présence des flavonoïdes (**F.piozzi, 1996 ; F.piozzi, 1998**). Comme il lutte contre la diarrhée, la fermentation intestinale, les spasmes et les troubles hépatiques. Il stimule les grandes fonctions nutritives et hormonales, améliore la circulation sanguine et lutte contre l'asthme, épilepsies, dyspepsies atonique ainsi que contre les céphalées et les migraines d'origine nerveuse, les vertiges et les troubles de mémoire (**Poletti, 1988**).

En Turquie, la décoction de feuilles du romarin a été traditionnellement employée pour traiter les diabétiques (**Bakirel et al. 2008**).

#### **I.4.2. Usage externe**

Le romarin est un cicatrisant des plaies et des brûlures. C'est un antiseptique, et un excitant du cuir chevelu (arrête la chute des cheveux) (**F.piozzi, 1996**). Il constitue un excellent parasiticide, un antirhumatismal, et il est également utilisé comme antigoutteux.

##### **I.4.2.1. En industrie agro-alimentaire**

Les extraits végétaux de romarin présentent un pouvoir antioxydant et peuvent être appliqués à la conservation des aliments et des huiles lipidiques. Ces propriétés sont dues aux acides polyphénoliques (rosmarinique, caféique) (**Albert.Y. et al. 1996 ; F.piozzi, 1996**).

Les deux, l'épice et l'huile sont largement utilisés en alimentation, l'épice est utilisée dans les boissons alcoolisées, les aliments cuits, viande et produits de viande, sauces, les aliments industriels et autres avec le niveau maximum est d'environ 0,4% dans les aliments cuits. L'huile est utilisée dans les boissons alcoolisées et non, les desserts glacés, confiseries, aliments cuits, viande avec le niveau maximum utilisé est d'environ 0,003% (**Albert.Y. et al. 1996**).

##### **I.4.2.2. En industrie cosmétique et parfumerie**

Au 19<sup>ème</sup> siècle l'essence de romarin est utilisée dans la fabrication de la très célèbre eau de Cologne de la reine de Hongrie. Aujourd'hui, elle entre dans la composition de savonnerie, détergent, crème, l'eau de toilette, des poudres, du dentifrice et des bains de beauté ; le taux d'utilisation maximum rapporté à 1% (**Albert.Y. et al. 1996**).

### **I.5. Composition chimique du romarin**

#### **I.5.1. Composition en huiles essentielles**

Le Romarin est relativement riche en l'huile essentielle (1 à 5%). Les organes pouvant renfermer l'huile essentielle sont les fleurs et les feuilles mais la plus haute qualité est obtenue à partir de ces dernières. Des études phytochimiques antérieures de cette espèce ont montré que cette plante accumule plus de 50 composants terpéniques qui rentrent dans la composition

chimique d'huile essentielle de romarin dont les constituants principaux sont : camphre (15-25%) ; -pinène (19,6%) ; Borneol et estérifié (10,0%) ; 1,8 Cinéol (15-50%) Limonène (3,6%) (Albert. Y. *et al.* 1996 ; deans *et al.* 1998).

Gachkar *et al.* 2006 ont identifié par GC et GS-MS, 20 composants dans l'huile essentielle du romarin, présentés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 1** : la composition chimique d'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* (Gachkar *et al.* 2006).

Composant	Pourcentages %	composant	Pourcentages %
Borneol	14.9	-Pinène	3.68
Terpinen-4-ol	3.33	Camphene	1.70
a-Terpineol	1.61	3-Octanone	0.83
Verbinone	0.56	Sabinene	1.94
Piperitone	2.07	Myrcene	23.7
Bornylacetate	0.71	O-Cymene	3.08
b-Caryophyllene	7.43	1,8-Cineole	2.68
cis-b-Farnesene	14.9	Linalool	1.26
Germacrene D	0.75	Myrcenol	0.52
a-Bisabolol	4.97	Camphor	1.01

### I.5.2. Composition en polyphénols

Cette espèce comprend aussi des dérivés phénoliques. On cite les acides phénoliques qui sont identifiés par Lamaisons J-L Petit Jeanen (1991). Les plus présents en teneur importante sont : l'acide rosmarinique ; l'acide caféique ; l'acide néo-chlorogénique ; l'acide vanillique (M. Culvier *et al.* 1996).

Le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence des flavonoïdes, des tannins et des saponines, et l'absence des alcaloïdes détecté dans l'extrait aqueux. Les flavonoïdes détectés par la chromatographie sur couche mince (CCM) sont la quercétine et le kaempférol (Gonzalez-Trujano *et al.* 2007).

Lallement Guillbert et Benzager-Beauquesne. 1970 ; Briescon *et al.* 1973) ont identifiés et isolés plus de dix flavonoïdes dans le romarin, la plus part d'entre eux sont les

flavones parmi eux : l'apégénine, le genkwanine, le 6-méthoxygenkwanine, (M-Culvier et al. 1996).

Actuellement, plus de douze diterpènes, sont isolés et identifiés dans le Romarin (M-Culvier et al. 1996). Ils sont responsables de l'activité antioxydante de la plante, à titre d'exemple : l'acide carnosique, le carnosol, le 12-Acide méthoxycarnosique, rosmanol, l'épirosmanol (Paris et al. 1993 ; Q Chen et al. 1992 ; S.L.Richheimer et al. 1996).

## I.6. Les différentes activités biologiques de *Rosmarinus officinalis*

Divers auteurs ont rapporté que certains composés présents dans les extraits du romarin possèdent des propriétés biologiques (Georgrantelis et al. 2007) :

- ❖ **Celiktas et al (2007)** ont étudié l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques de romarin de trois régions différentes et pendant quatre intervalles de l'année. Ils ont trouvé que les bactéries testées étaient sensibles aux huiles essentielles mais partiellement aux extraits méthanoliques et d'après leurs résultats ont indiqué que l'activité antibactérienne des huiles essentielles diffère selon les variations régionales et saisonnières.
- ❖ **Sacchetti et ses collaborateurs (2005)** ont évalué l'activité antifongique de 11 huiles essentielles y compris celle du romarin en utilisant la technique standard de diffusion sur gélose, les résultats ont montré que la plupart de ces huiles ont une activité inhibitrice modérée contre les cinq levures (*Candida albicans*, *Rhodotorulaglutinis*, *Schizosaccharomycespombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowialypolitica*) examinées.
- ❖ L'évaluation de l'activité antivirale du romarin à carnosol, a montré qu'il ya une inhibition de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) à une concentration de 8 µM qui n'était pas cytotoxique (Aruoma et al.1996).
- ❖ Divers modèles d'essai expérimentaux ont été employés pour la caractérisation des propriétés anti-oxydantes des extraits aqueux, de quatre herbes appartenant à la famille de *Lamiacée* : *Origanumvulgaris*, *Rosmarinusofficinalis*, *Salviaofficinalis* et *Thymus vulgaris*. Les extraits ont montré des degrés variables d'activité dans tous les essais utilisés (Dorman et al. 2003).
- ❖ L'effet anti-carcinogène a été étudié par **Visanji et ses collaborateurs (2006)**. Ces auteurs ont constaté que le traitement des cellules de Caco-2 (des cellules issues d'un cancer du colon), par le carnosol et l'acide carnosique a empêché l'incorporation de la thymidine-H3

d'une manière dépendante de la dose. Cet effet a été associé par l'accumulation des cellules traitées dans la phase G2 / M du cycle cellulaire.



# *Chapitre II*

*L'activité antioxydante*

## II.1 Définition d'un radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (**Dacosta, 2003**).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxyde  $\text{ROO}\bullet$ , radical alkoxyde  $\text{RO}\bullet$ ), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Novelli, 1997**).

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde  $\text{O}_2\bullet^-$ , radical hydroxyle  $\text{OH}\bullet$ , monoxyde d'azote  $\text{NO}\bullet$ , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ , peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxyde d'azote  $\text{ONOO}^-$  (**Favier, 2003**).

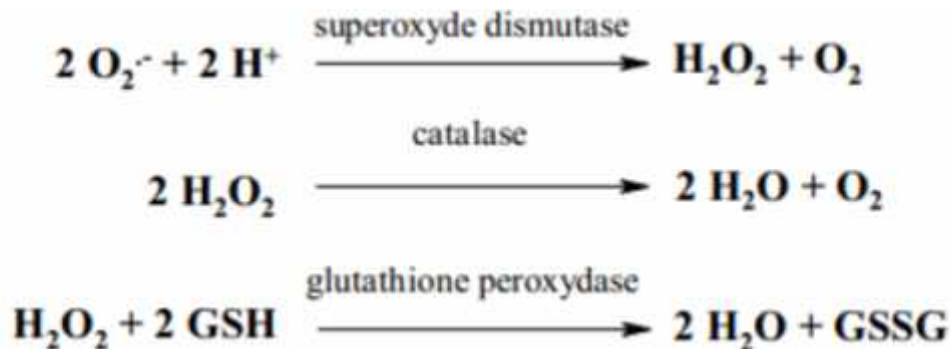
## II.2 Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (**Favier, 2003**).

### II.2.1. Les antioxydants primaires

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de :

- Super oxyde dismutase (SOD) : elle accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène.
- La catalase : présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec le SOD puisque son rôle est accéléré la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.
- Glutathion peroxydase et réductase : elles sont localisées dans le cytosol et la mitochondrie. La glutathion peroxydase joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène et autre hydro peroxydes résultant de l'oxydation du cholestérol et des acides gras. La glutathion peroxydase quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH (glutathion réduit) à partir du GSSG (glutathion oxyde) tout en utilisant le NADPH comme cofacteur (**Meziti, 2009**). Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :



### II.2.2. Les antioxydants secondaires

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (**Dacosta, 2003**).

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposées. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le  $\beta$ -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques, ...etc. (**Kohen et Nyska, 2002**).

### II.3. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Favier, 2006**).

### II.4. Les polyphénols comme antioxydant

L'activité antioxydante des polyphénols est principalement due à leur propriété redox qui peut jouer un rôle important dans l'absorption et la neutralisation des radicaux libres, par attraction d'oxygène, ou la décomposition des peroxydes (**Karou et al. 2005**).

Le fort caractère réducteur des composés phénoliques est à la base de la capacité à piéger les espèces réactives d'oxygène et de leur capacité à s'oxyder (**Dangles, 2006**).

L'autooxydation des polyphénols, génératrice des ERO est une source potentielle de toxicité (**Dangles, 2006**).

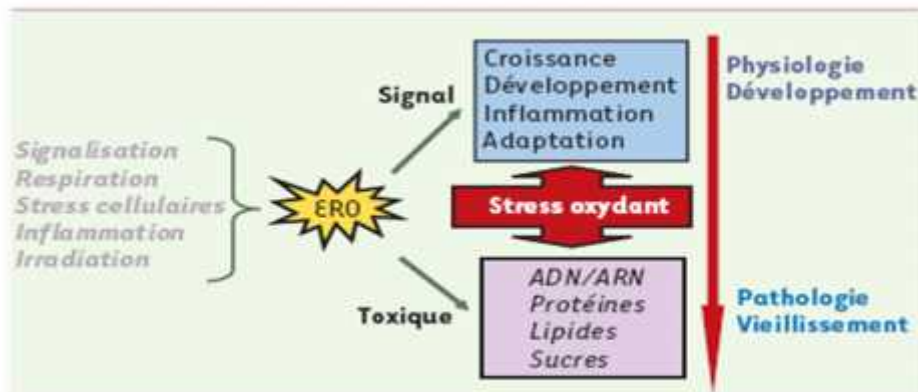
### II.5. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant

Les ROS ont des rôles physiologiques très importants en agissant, à faibles concentrations, sur la régulation des réponses biologiques, la transduction du signal et autres voies de signalisation (**Favier, 2003**).

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance Oxydants /Antioxydants est en équilibre.

Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution, ...) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apport des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatique), un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (**Sohal et al. 2002**).

Lors d'un stress oxydant, les ERO non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation des macromolécules directement à leur contact, contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines et l'ADN (**figure 2**) (**Koehler-Ramonatxo, 2002; Halliwell, 2007**).



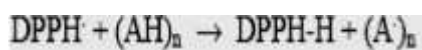
**Figure 2:** conséquence de stress oxydatif (Barouki, 2006).

Pour enrayer le stress oxydant, il faut donc aider la cellule et l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaires (vitamine C, E, caroténoïdes, polyphénols) (Kohen et Nyska, 2002).

## II.6. Méthodes d'évaluations de l'activité antioxydante

### II.6.1. Méthode de DPPH

le 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) est un radical stable et il présente en solution une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confèrent la couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton  $H^+$ . On peut résumer cette réaction par l'équation suivante :



Où  $(AH)_n$  représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH $\cdot$ . (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H (Brand-Williams et al, 1995).

L'activité anti radicalaire est mesurée par la dégradation du DPPH, qui est un radical synthétique présentant une intense coloration violette. La couche électronique de ce radical est saturée en contact d'antioxydant (figure 3), ce qui explique la disparition de sa couleur (Menichini et al. 2011).

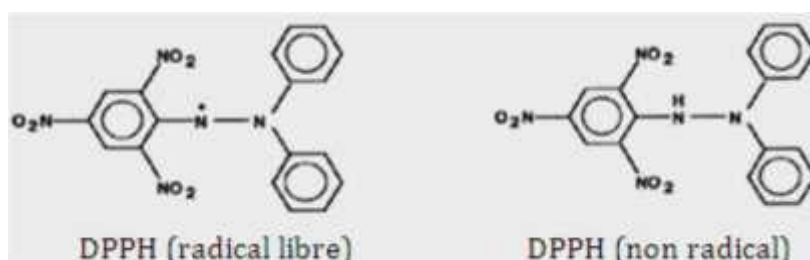


Figure 3 : Forme libre et réduite du DPPH (Brand-Williams *et al.* 1995).

## II.6.2. La méthode ORAC

Le principe du test ORAC (Oxygène Radical Absorbance Capacity) est de mesurer la destruction d'une protéine végétale, qui possède la propriété de fluorescer lorsqu'elle est soumise à un rayonnement lumineux spécifique. Sous l'action des radicaux libres présents dans le milieu réactionnel, la protéine est réduite et perd sa fluorescence, tandis qu'en présence d'un capteur de radicaux libre (antioxydant), la fluorescence persiste : ce test permet d'évaluer la capacité globale d'anti oxydation (pouvoir antiradicalaire) d'un extrait végétal, par référence à un standard qui est le TROLOX (vitamine E hydrosoluble, dépourvue de chaîne carbonée) (Juddr, 2004).

## II.6.3. La méthode ABTS

Cette méthode est basée sur la capacité des composés phénoliques à piéger le radical-cation ABTS<sup>+</sup> (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)).

Le radical ABTS<sup>+</sup> est formé par arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS. En présence du Trolox (ou d'antioxydant donneur de H), le radical d'azote concerné piège un H, conduisant au cation l'ABTS<sup>+</sup>, ce qui entraîne la décoloration de la solution bleue (Djeridane *et al.* 2007).

Il existe aussi d'autres méthodes comme :

- ✓ la méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants)(Amarowicz *et al.* 2004).
- ✓ la méthode de DMPD (Balayage du radical cation N, N- dimethyl-phenylenediamine) (Li *et al.* 1994) ;
- ✓ la méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux) (Winston *et al.* 1998) ;

- ✓ la méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total) (**Wayner *et al.* 1985**) ;
- ✓ la méthode photochimiluminescence (PCL) (**Popov *et al.* 1987**) ;
- ✓ la méthode d'hémolyse (**Charfi, 1995**).

# *Chapitre III*

*L'activité antimicrobienne*



Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutané-muqueux. Pour résister à ces microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (**Kaufmann. 1997**).

### **III.1. Microbes**

Sont des organismes vivants très petits visibles uniquement au microscope, ils sont classés en trois groupes.

- les bactéries qui sont des organismes unicellulaires à structure très simple sans noyau organisée ni de chloroplaste.
- les virus ne sont pas vraiment des êtres vivants, sont incapable d'avoir des descendants tout seul
- le champignon est un être vivant qui n'est ni animale, ni végétal, il constitue un règne biologique à part. il peut être constitué d'une seul ou plusieurs cellule. Il existe deux class : les levures et les moisissures.

**III.2. Les caractères biologiques de différentes souches utilisées**

**Tableau 2 :** les caractères biologiques de différentes souches utilisées

Souches microbiennes	Familles	Propriétés et pouvoir pathogène
<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	E. coli commensal le tube digestif de l'homme et de l'animal, généralement mobile grâce aux flagelles et la bactérie la plus impliquée dans l'infection aigue d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires ( <b>Percival. 2004</b> ).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Pseudomonaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales. il s'agit de bactérie résistante pour plusieurs antibiotiques ( <b>Van Delden et Iglewski. 1989</b> ).
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Micrococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i> représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aigue, intoxication alimentaire ( <b>Dworkin et falkow. 2006</b> ).
<i>Bacillus sp</i>	Bacillaceae	Sont des germes ubiquitaire de l'environnement car leur spore confèrent une grande résistance ce qui pose de graves problèmes dans les industries de l'aliment. Ils sont isolés comme contaminants.
<i>Candidas sp</i>	Saccchromycetacées	Levure non pigmentée, non capsulée, à bourgeonnement multiple et formant un pseudo-mycélium et du mycélium vrai. Saprophyte endogène de la lumière intestinale humaine et des cavités génitales par contiguïté (femme). Elles provoquent des affections cosmopolites atteignant la peau, les ongles, les cavités naturelles et les divers viscères par hémio-dissémination ( <b>Moulinier, 2003</b> ).

### III.3. Les principales substances antibactériennes

#### III.3.1. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (**Bergogne-Berezin et Dellamonica. 1995**).

#### III.3.2. Les huiles essentielles

##### III.3.2.1. Définition

Les huiles essentielles désignent les composants liquides, odorants et hautement volatiles des plantes. Elles sont obtenues à partir de toutes les parties de la plante (feuilles, graines, bourgeons, fleurs, écorces, racine et fruits), mais aussi, à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres et parfois des troncs même (**Kone. 2001**).

Ce sont des métabolites secondaires composés d'environ 90 % de terpènes. Ces extraits contiennent en moyenne 20 à 60 composés peu complexes, contenant plusieurs familles biochimiques incluant les alcools, les phénols, les esters, les oxydes, les coumarines, les sesquiterpènes, les terpinols, les cétones, les aldéhydes,...etc. Mais ne contenant aucun acide gras, ni aucun autres corps gras (**Bastien. 2008**).

Les "huiles" essentielles ne sont pas des lipides et n'ont de commun avec les huiles fixes ou végétales que leur aspect physique et leur comportement apolaire. De plus, les huiles essentielles sont volatiles et solubles dans les solvants organiques polaires, à l'inverse des huiles fixes (**Bastien. 2008**).

Les huiles essentielles sont employées aussi bien pour leurs propriétés pharmacologiques qu'aromatiques, mais elles jouent aussi le rôle de conservateurs alimentaires (**Burt. 2004**).

### III.3.2.2. Classification des huiles essentielles

On distingue deux types de classification des huiles essentielles (**Bekhechi et al. 2010**) :

a. Selon la composition chimique :

- 📌 les HEs hydrocarburées qui sont les plus nombreuses.
- 📌 les HEs oxygénées qui présentent toutes les HEs solides (HEs du camphre).
- 📌 les HEs sulfurées retrouvées chez les Liliaceae et les Brassiaceae.

b. Selon la couleur de l'huile :

- 📌 les incolores qui sont dépourvues de résines et d'azulène.
- 📌 les jaunes qui renferment des résines.
- 📌 les bleues qui contiennent de l'azulène.
- 📌 les jaunes, vert et vert-brun qui contiennent de l'azulène mais aussi d'autres colorants.

### III.3.3. Huiles essentielle du romarin

L'huiles essentielle du romarin est un liquide incolore ou jaunâtre dont l'odeur est fortement camphré, pénétrant de saveur très aromatique, les sommités fleuries fournissent plus de 10 à 25 ml/kg (**Jeun. Brineton. 1992**). Le type Algérien confère plus que (**Boukhalfa. 1995**) :

- 📌 0,74% dans la plante sèche ;
- 📌 0,1% dans les feuilles ;
- 📌 1,4% dans les fleurs et rameaux

### III.4. L'activité antibactérienne des huiles essentielles


La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (**Boyle. 1955**). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (**Burt. 2004**).

Une autre étude a révélé que les 2 souches de la levure *Saccharomyces* et la bactérie *Escherichia coli* se sont montrées sensibles vis-à-vis l'huile essentielle du romarin, tandis que la bactérie *Staphylococcus epidermis* est résistante. L'huile a


empêché également la réplication du plasmide métabolique d'*Escherichia coli* (**Schelz et al. 2006**).

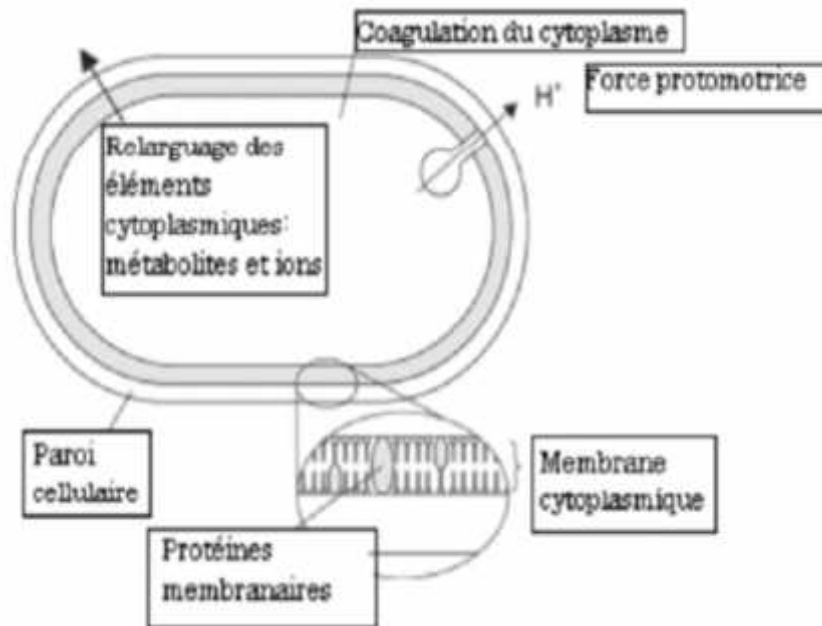
### III.5. Mode d'action des huiles essentielles

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (**Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt. 2004**). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (**figure 4**).

 altérations membranaires :

- les HEs sont constituées de molécules lipophiles capables de pénétrer la double couche phospholipidique, leur accumulation entre les phospholipides entraîne un changement de conformation et un mauvais fonctionnement de la membrane cellulaire, perturbant ainsi le transport membranaire des substances nutritives (**Burt. 2004**).
- les HEs peuvent perturber le gradient ionique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique, bloquant la production de l'énergie cellulaire et diminuant la stabilité membranaire (**Walsh et al. 2003 ; Ultee et al. 2002**).

 inhibitions enzymatiques : les groupements fonctionnels des composés terpéniques (phénoliques et aldéhydiques) des HEs réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique (**Giordani et al. 2006**).



**Figure 4** : Modes d'actions des huiles essentielles (Burt, 2004).

### III.6. Techniques d'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles sont nombreuses on mentionne :

#### III.6.1. L'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode qui se réalise *in vitro*, basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Elle permet de déterminer l'activité des huiles essentielles sur la croissance des microorganismes par la mesure du diamètre des zones d'inhibition.

Selon **Belaiche (1979)**, il existe trois types d'aromatogrammes utilisés pour l'étude de l'effet antibactérien des huiles essentielles :

L'aromatogramme sur milieux solide (gélose) comporte la méthode des disques qui est basée sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles, à l'intérieure d'une boîte de pétri, dans le milieu Mueller-Hinton (**Pibiri. 2005**).

L'aromatogramme sur milieu liquide (sur bouillon) qui consiste à faire agir, en phase liquide, des concentrations croissantes d'huiles essentielles après adjonction d'un tensio-actif sélectionné (**Belaiche. 1979**).

L'aromatogramme sur milieu gazeux (micro atmosphère) qui consiste à déposer le disque imbibé d'une quantité déterminée d'huile essentielle, au milieu du couvercle de la boîte de pétri et non plus en contact avec la gélose ensemencée. La boîte est fermée avec le couvercle en bas, ce qui empêche le disque de tomber sur la gélose (**Pbiri. 2005**).

### **III.6.2. Méthode de dilution**

Les huiles essentielles à tester peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide sans oublier que les techniques de dilutions exigent une dispersion homogène. Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes et après incubation on note la présence ou l'absence de culture; la lecture peut être visuelle ou spectrophotométrique car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (**Ferhat. 2004**).

*Partie*  
*expérimentale*



# *Chapitre I*

*MATERIALS  
ET METHODES*

## I.1. Matériel

### I.1.1. Matériel végétal

Notre étude est portée sur une espèce de plante de la famille des lamiacées (labiées) qui est *Rosmarinus Officinalis*.

La partie aérienne de *Rosmarinus Officinalis* a été récoltée au mois de février 2014 dans le village Atmous commune de Timezrit située à 45 km de la wilaya de Bejaïa, loin de tout impact de pollution.

Après la récolte, la partie aérienne de la plante a été lavée à l'eau courante afin de les débarrasser des poussières et autres particules. Puis la plante a été séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant 7 jours. La partie aérienne a été d'abord coupée en petits morceaux dans le but d'accélérer leur séchage.



**Figure 5:** Photographie de la partie aérienne sèche de *Rosmarinus officinalis*

### I.1.2. Matériel biologique

#### I.1.2.1. Les souches microbiennes utilisées

##### I.1.2.1.1. Les souches bactériennes utilisées

Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*, sont les suivant :

- Deux souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *staphylococcus aureus* ATCC 25923

- Trois souches isolées de patients au centre hospitalier universitaire de Tizi-Ouzou (*E. coli* CHU, *Bacillus sp* CHU, *streptocoque sp*(CHU).

Ces souches nous ont été fournies par le service de Microbiologie du centre hospitalo-universitaire de Tizi-Ouzou.

#### **I.1.2.1.2. Les levures**

La levure *Candida sp* est obtenue du laboratoire de parasitologie et mycologie du CHU de Tizi-Ouzou.

### **I.1.3. Appareils et produits chimiques**

#### **Appareillage**

- Balance de précision.
- Broyeur électrique.
- Tamis.
- Etuve.
- Agitateur magnétique.
- Poupinel.
- Bec benzène
- Une ampoule à décanter.
- Hydrodistillateur.
- Densitomètre
- Spectrophotomètre.

#### **Réactifs**

- L'acide gallique.
- Réactif de Folin-Ciocalteu.
- Carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).
- Chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ).
- L'eau distillé et l'eau physiologique.
- DPPH.
- Quercétine.
- Méthanol.
- Acide 2, 2-azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS).

- Persulfate de potassium.
- Diméthyle sulfoxyde ( DMSO)
- Violet de gentiane, lugol, alcool et la fushine.

### Milieus utilisés

- Gélose nutritive
- Gélose sang cuit
- Gélose Muller- Hinton
- Gélose sabouraud chloramphénicol
- Bouillon glucosé tamponné (BGT).

## **I.2. Méthodes**

### **I.2.1. Méthodes d'extraction**

Avant toute extraction, le séchage des feuilles du matériel végétal est effectué dans l'étuve durant 72h à 40°C dans le but de compléter le séchage.

#### **I.2.1.1. Extraction des huiles essentielles**

L'HE est extraite par hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger. L'extraction a duré 2h30 en plaçant 90 g de la partie aérien de la plante sèche dans un ballon avec de l'eau distillée, puis chauffée, les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles se séparent de l'eau par différence de densité. L'huile essentielle est stockée à 4°C jusqu'aux tests antimicrobiens.

Calcul du rendement : le calcul du rendement est définit comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse de matière végétale à traiter (Belyagoubi,2006) :

$$R = \text{MHE} / \text{MS} \cdot 100$$

- **R** : Rendement en extrait fixe en g/100g
- **MHE** : Quantité d'extrait récupéré en g
- **MS** : Quantité de matière végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g.

## I.2.1.2. Extraction des composés phénoliques

### I.2.1.2.1. Préparation des extraits méthanoliques

#### A. Broyage

Le matériel végétal (la partie aérienne) destiné à l'extraction des composés phénoliques a été broyé, à l'aide d'un broyeur électrique, en une poudre fine pour permettre une meilleure extraction.

#### B. Tamisage

La poudre obtenue suite au broyage a été tamisée à l'aide d'un tamis ayant un diamètre de 125 $\mu$ m, pour récupérer à la fin une poudre très fine.

#### C. Macération

L'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* a été préparé à partir de 60 g de poudre, qui ont été mis à macérer dans un mélange méthanol/eau (80/20 : V/V) équivalent à 540ml. Cette macération se fait en trois temps, c'est-à-dire pendant trois jours successifs avec changement du solvant chaque 24h à la température ambiante et à l'abri de la lumière, avec un maximum d'agitation. Ensuite le mélange est filtré sur papier Wattman (n°3). Pour la troisième macération, on a pris un rapport de (50/50 : V/V), qui veut dire 270ml de chacun. Les filtrats obtenus sont additionnés et évaporés à sec dans l'étuve à une température de 40°C pendant 24 heures (**Belhattab et al. 2004; Ben Ammar et al. 2008**).

#### D. Délipidation

Après l'évaporation du solvant, on précède à un lavage avec l'éther de pétrole avec une ampoule à décanter, c'est ce qu'on appelle une délipidation.

On ajoute 100ml d'eau distillée à l'extrait obtenu après évaporation du solvant pour faciliter le grattage de ce dernier. Pour le lavage on rajoute 120ml d'éther de pétrole à l'extrait gratté, on mit le tout dans une ampoule à décanter. Après quelques minutes, on récupère la phase inférieure (la phase aqueuse) et on jette la phase supérieure (phase organique). Cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'élimination de tous les lipides et avoir un extrait phénolique pur. Cet extrait est séché dans l'étuve à 40°C. Après

48 heures de séchage on gratte l'extrait final sous forme de poudre et on le conserve dans un tube.

## **I.2.2. Analyse chimique**

### **I.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par (**Wong *et al.* 2006**).

#### **Principe**

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec les pectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acidephosphotungstique phosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline (**Vuorela, 2005**).

Brièvement 200µl de l'extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 5 minutes.

Après l'incubation 800µl de la solution de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75g /l) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 1 heure dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance d'extrait a été mesurée par un spectrophotomètre à 740 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de la courbe d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (2,5-10 µg/ml).

Le blanc est représenté par le méthanol additionné du Folin-Ciocalteu, et de carbonate de sodium.

### **I.2.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux**

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) citée par (**Djeridane *et al.* 2006**) et **Boudiaf, 2006**) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans l'extrait méthanolique.

#### **Principe**

1ml de l'extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables (1mg/ml) a été ajouté à un volume égal d'une solution d'AlCl<sub>3</sub> (2% dans le méthanol).

Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 410 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

### Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = a x + b$ ) réalisée par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (2,5-30 $\mu$ g/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en Microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (mg EQ/g).

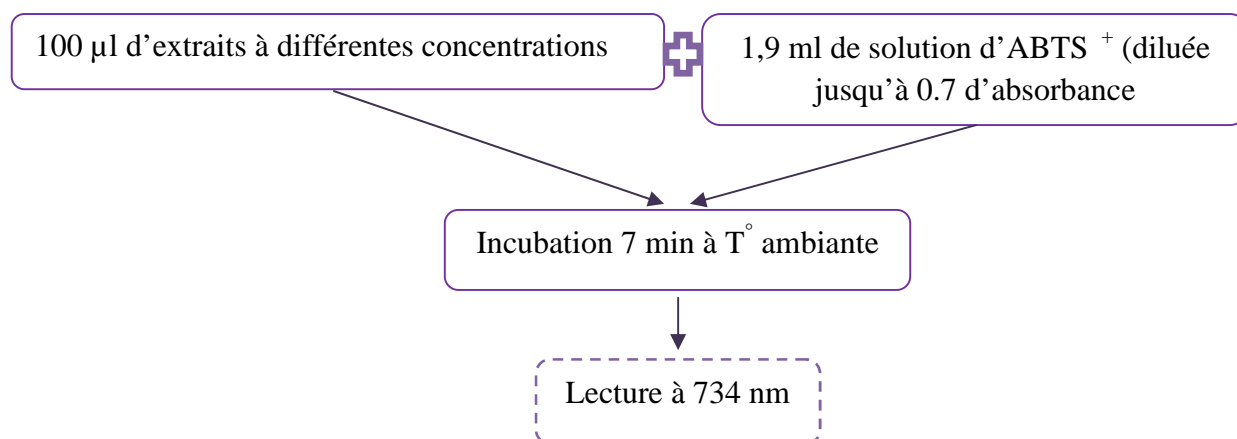
## I.2.3. Evaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante

### I.2.3.1. Réduction du radical ABTS<sup>o+</sup>

#### Mode opératoire

La mesure de l'activité scavenger du radical ABTS a été effectuée en suivant le protocole (Le et al.2007). Pour ce faire, la préparation du radical a été réalisée comme suit : (Re et ses collaborateurs, 1999) :

- Préparation d'une solution ABTS à 7 mM ;
- Préparation d'une solution de persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ) à 2,45 mM ;
- Réaliser un mélange des deux solutions, avec une ration de solution ABTS : persulfate de potassium, (1 :0,5) ;
- Incuber à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 16 heures (formation du radical ABTS<sup>+</sup>)
- La solution de l'ABTS<sup>+</sup> est diluée ensuite avec de l'eau distillée afin d'obtenir une absorbance de  $0,7 \pm 0,02$  à 734nm.



**Figure :** Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits par l'ABTS<sup>+</sup> (Le et al. 2007).

Le contrôle contient 1,9 ml d'ABTS et 100ul du méthanol à la place de l'extrait

Le pourcentage d'activité scavenger du radical ABTS<sup>+</sup> a été calculé selon la l'équation suivante :

$$\text{Activité anti-radicalaire du radical-cation ABTS}^+ = [(A_C - A_E / A_C) \times 100$$

Où :

**A<sub>C</sub>**: absorbance du contrôle.

**A<sub>E</sub>**: absorbance du test.

### I.2.3.2. Méthode de réduction du radical libre DPPH

#### Mode opératoire

La méthode décrite par **Annie. S et al (2006)** a été employée, le DPPH est solubilisé dans du méthanol pour avoir une solution de 0,1 mM. 1ml de cette solution est ajouté à 1ml de l'extrait (1mg/ml) en solution dans de l'eau distillée à différentes concentration (05 ; 10 ; 20 ; 40 et 60µg/ml). Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité, à la température ambiante pendant 30 minutes. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par un spectrophotomètre.

On a préparé un blanc qui est composé de 1ml de l'extrait de concentration 60µg/ml et de 1ml de méthanol. 1ml de la solution DPPH (0,1mM) et 1ml de méthanol pour préparer le contrôle.

Le même protocole est effectué pour le contrôle positif qui est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique et le BHA dont l'absorbance est mesurée dans les même conditions

Les résultats sont exprimés en pourcentages d'inhibition selon la formule suivante :

$$\% \text{scavenging du radical DPPH} = (A_C - A_E / A_C) \times 100$$



Où :

$A_C$ : Absorbance du contrôle (DPPH+méthanol)

$A_E$ : Absorbance de l'échantillon [Absorbance du test (échantillon +DPPH)- Absorbance du blanc du test (échantillon+méthanol)]

## **I.2.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne**

### **I.2.4.1. Isolements des souches et tests de confirmation**

#### **I.2.4.1.1. Isolements des souches**

Le contrôle de pureté des souches a été fait par ré-isolement de chacune des souches utilisées sur le milieu d'isolement spécifique (annexe 1). Le repiquage des souches s'est fait à partir du milieu de sélection sur le milieu de conservation, avec incubation à 37C° pendant 24 heures.

#### **I.2.4.1.1. Tests de confirmation**

Dans le but de vérifier les caractères bactériologiques des différentes souches bactériennes, des colorations de Gram sont réalisées. selon **Singleton et Sainsbury (1984)**.

### **I.2.4.2. Activité antibactérienne de l'huile essentielle**

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de diffusion des disques ou aromatoگرامme. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieure d'une boîte de pétri qui consiste à déterminer la résistance ou la sensibilité vis-à-vis de cette huile essentielle.

La méthode de diffusion des disques appliquée est celle décrite par **Mayachiew &Devahastin (2008)**; **Gachkar et al. (2006)** et **Hussain et al. (2010)**.

#### **I.2.4.2.1. Préparation du milieu de culture**

Les milieux de culture appropriés à cette étude est le milieu Muller-Hinton pour les bactéries et sabouraud chloramphénicol pour les levures sont préparés comme suit :

Les milieux MH et sabouraud sont commercialisés préparés dans des bouteilles et en tubes respectivement. Donc, ils doivent être bouillis dans un bain-marie jusqu'à dissolution complète puis nous les coulons en boîtes de pétri sur une épaisseur de 4mm.

#### **I.2.4.2.2. Stérilisation du matériel**

Les tubes à essai utilisés pour la préparation des suspensions bactériennes et la préparation des différentes concentrations d'huile essentielle de romarin, les disques en papier wattman qui sont préparés avec de diamètre 6mm, ont été stérilisés dans un stérilisateur poupinel à 180°C pendant 30 min.

#### **I.2.4.2.3. Préparation des dilutions d'huile essentielle de *R. officinalis***

L'huile essentielle de romarin a été dissoute dans le méthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations des dilutions successives au demi. Ce choix a été fait, parce que, le DMSO est le solvant utilisé par la majorité des auteurs, notamment, **Gachkar et al. (2006)** qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir antibactérien puissant.

#### **Préparation de l'inoculum**

Les bactéries à tester sont ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) ou autres milieux selon les souches et incubées pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées. A partir de ces boîtes, on racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Dans le cas de streptococcus sp, on a utilisé un écouvillon pour prélever plus facilement les colonies bactériennes.

Ensuite, décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%. Dans le cas de streptococcus sp, décharger l'anse dans le B.G.T, la suspension bactérienne est bien homogénéisée. Son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

**Remarque :** l'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

#### **I.2.4.2.5. Ensemencement et dépôt des disques**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri. Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis essoré en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier Wattman (6 disques/boîte) sont déposés sur l'agar, précédemment inoculé avec le microorganisme choisi, puis les imbiber par 10µL d'huile essentielle de romarin.

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques appropriés (témoin positif) prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés et les disques Wattman imprégnés de DMSO (témoin négatif). Chaque test est effectué en triple.

Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 1h pour que l'huile essentielle puisse diffuser (Rožman & Jeršek, 2009).

Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

#### **I.2.4.2.6. Lecteur**

La lecture a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques à l'aide d'un pied à coulisse.

-Pour les bactéries testées sur milieu Mueller-Hinton simple, nous avons pris les mesures en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de pétri fermée.

-Pour la bactérie testée sur milieu Mueller-Hinton au sang cuit, nous avons pris les mesures de diamètre de zone d'inhibition, boîte de pétri ouverte et bien éclairée.

#### **I.2.4.3. Détermination des CMI**

Pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI), il s'agit de déterminer les plus petites concentrations auxquelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu. Des dilutions successives au demi ont permis de

préparer une gamme de dilution. En effet, de chaque dilution on prélève 10 µl et on la met dans les disques qui sont déjà dans les boîtes de pétri.

#### **I.2.4.4. Activité antifongique**

Les mêmes opérations sont effectuées avec la levure, mais dans ce cas le milieu de culture utilisé est le milieu Sabouraud chloramphénicol. L'inoculum de levure est préparé et l'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri coulés qui contiennent du Sabouraud chloramphénicol.

La lecture des zones d'inhibition est faite après 48 heures d'incubation à 28°C.

# *Chapitre II*

*RESULTATS*

*ET*

*DISCUSSIONS*

## II.1. Extraction de l'huile essentielle

### II.1.1. Résultat de l'extraction

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* obtenue par hydrodistillation est un liquide visqueux, limpide d'une coloration jaunâtre et à odeur forte caractéristique du romarin.

### II.1.2. Le rendement

Le rendement en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* local est de 1,42%. Ce dernier taux est proche de celui cité par **karimi et al** (1,5%) et **Hilan et al(2006)** (1,52%) ; et il est inférieur à celui cité par **El-Bastawesy et al** (1,79%) et **Ayadi(2011)** (1,85%) ; et il est supérieur à celui cité par **Atik Bekkara et al (2007)** (0,8%) et **Biljana et al (2007)** (1,18%). (Il varie selon la localisation géographique).

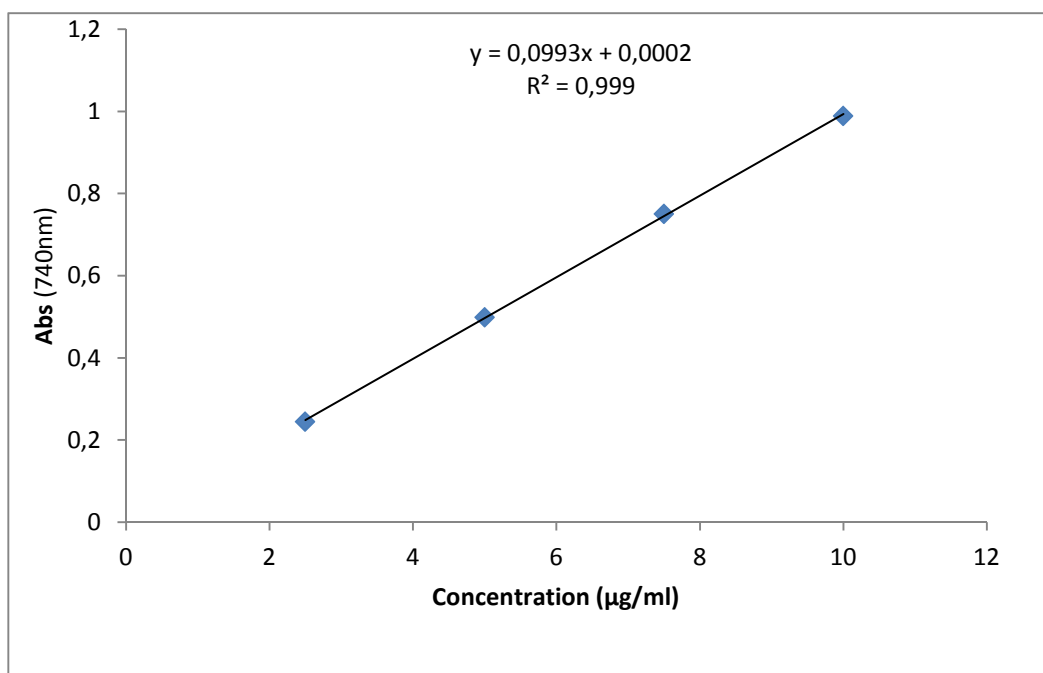
## II.2. Dosage des composés phénoliques

### II.2.1. Dosage des phénols totaux

La couleur bleue après 1heure d'incubation confirme la présence des polyphénols qui ont réduit le réactif Folin-ciocalteu. L'intensité de la couleur qui varie entre le bleu clair et le bleu foncé est en fonction de la teneur en polyphénols.

La teneur en polyphénols totaux d'extrait méthanolique de *R.officinalis* a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme standard (**Figure 7**).

La teneur en polyphénols de l'extrait méthanolique du romarin est de  $43,89 \pm 2,75$ mgEAG/g de l'extrait. Cette valeur est proche de celle obtenue par **Tsai et al. (2007)** qui est de l'ordre de 58.1 mg EAG/g et de celle obtenue par **Tawaha et al. (2007)** qui est de l'ordre de  $39.1 \pm 3.6$  mg GAE/g. Elle est inférieure à celle obtenue par **Erkan et al. (2008)** qui est de l'ordre de 162 mg GAE/g et **Ho et al. (2008)** qui est de l'ordre de  $127 \pm 3$  mg GAE /g.



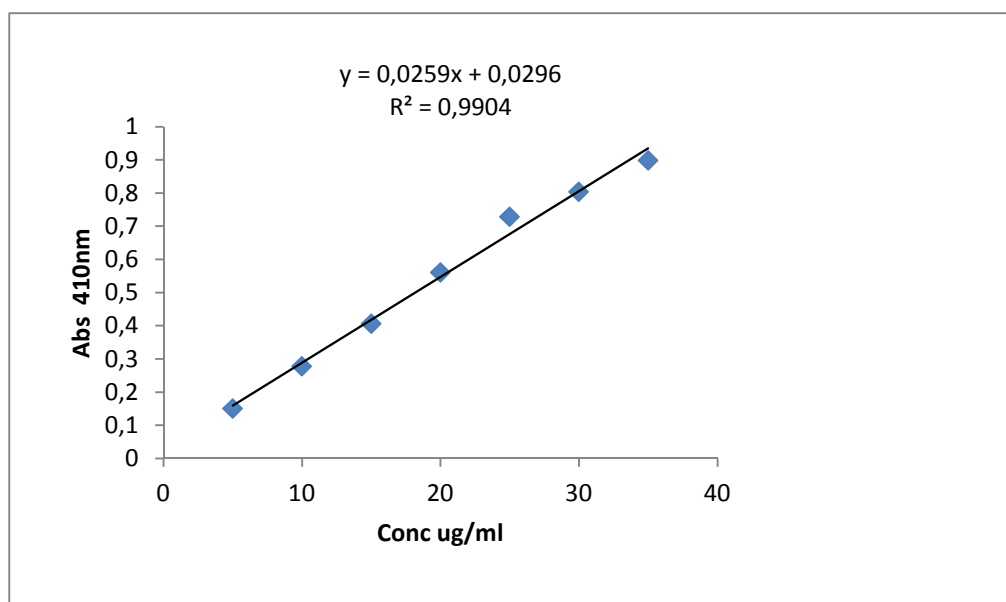
**Figure 7** : courbe d'étalonnage de l'acide gallique

**Yesil-celiktas et ses collaborateurs,(2007b)** ont mené des études sur les teneurs en composés phénoliques totaux issus de trois régions différentes de Turquie, variaient entre 70,3 et 147,3 mg d'Eq AG/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) (**Falleh et al.2008 ; Podsedek, 2007**).

### II.2.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments naturels largement répandus chez les plantes. Ils protègent l'organisme contre les dommages oxydatifs tels que les rayons ultraviolets, la pollution de l'environnement, les produits chimiques, etc. (**Martínez-Flórez et al. 2002**).

La teneur en flavonoïde d'extrait méthanolique de *R.officinalis* a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage utilisant la quercétine comme standard (**Figure 8**).



**Figure 8** : courbe d'étalonnage de la quercétine

La teneur en flavonoïdes de *Rosmarinus officinalis* qui est de  $7,06 \pm 0,62$  mg Eq quercétine /g d'extrait.

La teneur en flavonoïdes rapportée par **Ho et ses collaborateurs, (2008)** est de l'ordre de  $20.1 \pm 1.30$  mg EQ/g et celle obtenue par **Tsai et al.(2007)** est de l'ordre de  $60.7 \pm 1.1$  mg EQ/g. Les teneurs rapportées par **Ho** et **Tsai** sont très élevées par rapport à nos résultats, cette différence se trouve probablement due aussi aux facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (**Falleh et al.2008 ; Podsedek, 2007**).

### II.3. Activités antioxydant de *Rosmarinus officinalis*

#### II.3.1. Activité scavenger du radical DPPH

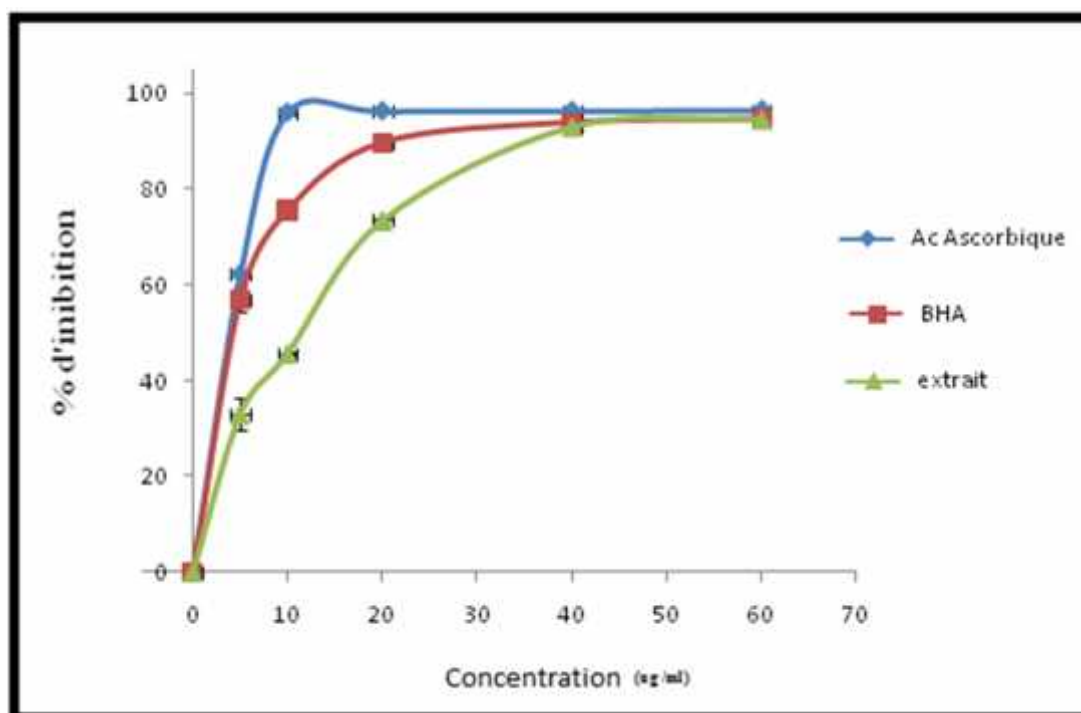
Dans cet essai les antioxydants réduisent et décolorent le radical DPPH, à un composé jaune le diphenylpicryl hydrazine, l'ampleur de la réaction dépendra de la capacité des antioxydants de donner l'hydrogènes (**Ardestani et Yazdanparast, 2007**).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des standards (BHA et acide ascorbique) et de l'extrait et sont également exprimés en utilisant le paramètre IC50, qui est défini comme la concentration



du substrat qui cause une perte de 50% de l'activité de DPPH (Markowicz Bastos *et al.*2007).

Les résultats de l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical DPPH, des standards et de l'extrait sont représenté dans la (**figure 9**) ci dessous.



**Figure 9** : pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait, BHA et acide ascorbique

Nos résultats, révèlent que l'extrait méthanolique testé ainsi que le BHA et l'acide ascorbique pris comme référence sont des anti-radicalaire.

La comparaison de l'activité scavenger du radical DPPH de l'extrait méthanolique du romarin et des standards (BHA et l'acide ascorbique) montre une activité antiradicalaire dépendante de la concentration. A chaque fois que la concentration augmente, le pourcentage d'inhibition augmente. A la concentration de 20µg/ml, le pourcentage d'inhibition moyenne est de l'ordre de 73,51%, 89,78% et 94,67% pour l'extrait, BHA et l'acide ascorbique respectivement. On remarque que même à de faibles concentrations, l'extrait montre un pourcentage d'inhibition important, ce qui permet de déduire que les composés phénoliques contenus dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *R.officinalis* sont très efficaces comme antioxydants.

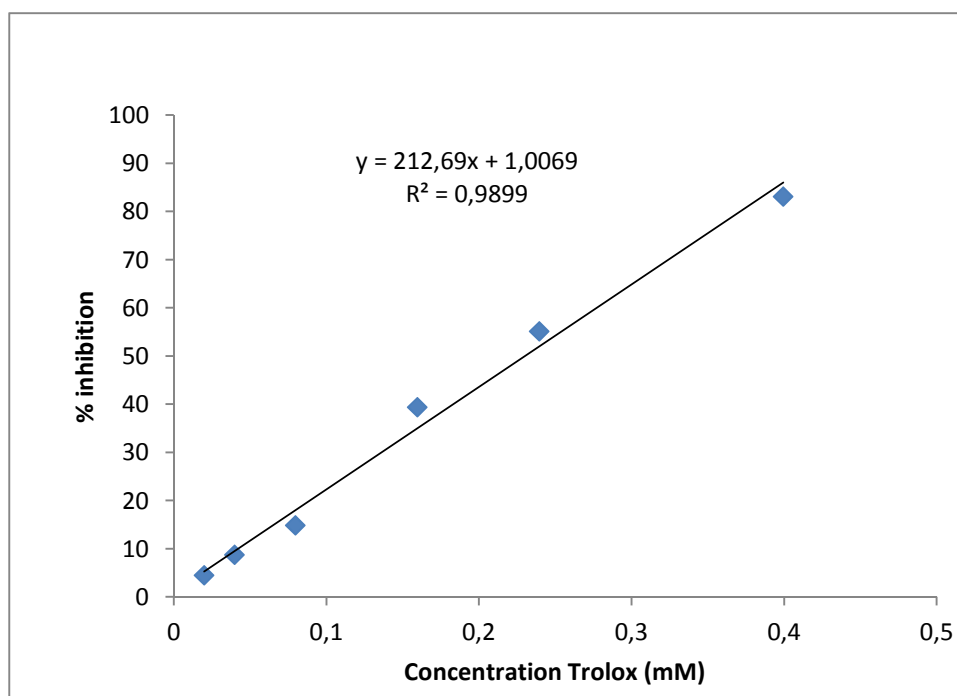
L'activité antiradicalaire des extraits méthanolique du romarin (94,67%) reste inférieure par rapport au control positif BHA (94,70%) et l'acide ascorbique (96,51%). Ces valeurs obtenues sont supérieures par rapport à celle rapporté par (**Athamena.S et al. 2012**) en Constantine qui est de l'ordre de (80,50%).

Dans le cas de notre échantillon, l' $IC_{50} = 17,87 \mu\text{g/ml}$  est supérieure à celles des standards utilisés : la BHA et l'acide ascorbique qui ont respectivement des  $IC_{50}$  égales à  $6,03 \mu\text{g/ml}$  et  $1,24 \mu\text{g/ml}$ . Ils ont donc un meilleur pouvoir anti-radicalaire.

La valeur  $IC_{50} = 17,87 \mu\text{g/ml}$  obtenu pour l'extrait méthanolique de *R.officinalis* présente une grande activité antioxydante par rapport aux valeurs  $IC_{50} = 0,23 \text{mg/ml}$  et  $IC_{50} = 54 \mu\text{g/ml}$  obtenues pour la même espèce rapporté par **Dormana et ses collaborateurs, (2003) et Erkan, (2008)** respectivement. Ceci peut être dû 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**).

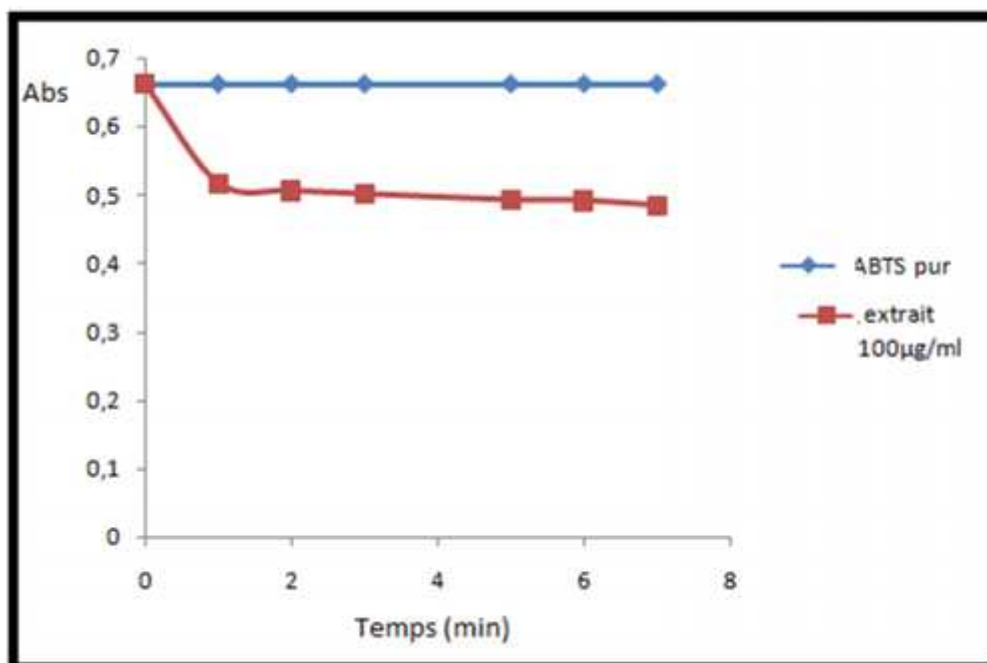
### II.3.1. Activité scavenger du radical ABTS<sup>+</sup>

L'activité antiradicalaire de l'extrait de *R.officinalis* a été déterminée aussi par la méthode de TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) qui correspond à la concentration du Trolox donnant la même capacité antioxydant qu'une concentration du composé testé. La courbe d'étalonnage de Trolox est représentée ci-dessous (**figure 10**).



**Figure 10 :** Courbe d'étalonnage de Trolox

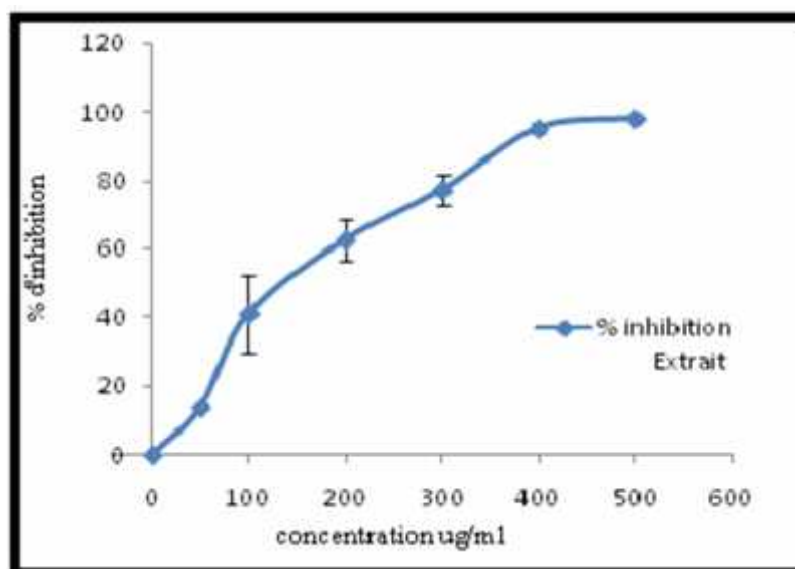
Cette méthode déduite par la capacité des molécules à inhiber le radical  $ABTS^+$ . La cinétique de la réduction du radical  $ABTS$  par l'extrait est représentée dans la figure ci-dessous.



**Figure 11 :** Effet scavenger du radical  $ABTS$  par l'extrait méthanolique à une concentration de  $100\mu\text{g/ml}$  en fonction du temps.

D'après cette figure, on constate que l'effet scavenger maximal du radical ABTS est atteint au bout d'une minute.

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>+</sup> par l'extrait méthanolique de *R.officinalis* est représenté dans la (Figure 12).



**Figure 12** : pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>+</sup> par l'extrait méthanolique de *R.officinalis* à différentes concentrations

D'après cette figure, on remarque que le taux d'inhibition augmente en fonction de l'augmentation de la concentration de l'extrait méthanolique. A 50 µg/ml, il est de l'ordre de  $13,58 \pm 0,93\%$  (correspond à 0,059 mM Eq Trolox) et augmente jusqu'à atteindre  $98,02 \pm 0,93\%$  (correspond à 0,456 mM Eq Trolox) à 500 µg/ml, cette augmentation devient presque stable à des concentrations supérieures à 500 µg/ml, ce qui signifie que toutes les molécules ABTS<sup>+</sup> sont réduites en ABTS.

La valeur d'IC<sub>50</sub> calculée pour l'extrait de *R. officinalis* est de l'ordre de 194,92 µg/ml (correspond à 0,23 mM Eq Trolox)

**Tawala et ses collaborateurs, (2007)** ont rapporté l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique qui est de  $274 \pm 1,4$  µmol Eq Trolox. Ces résultats sont inférieurs à ceux de la présente étude. Cela peut être expliqué par la qualité des composés phénoliques dans l'extrait, qui doivent avoir une forte activité antioxydante. Celle-ci peut être influencée par de 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.

## II.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* est évaluée sur six souches microbiennes (Cinq souches bactériennes et une souche fongique). Cette activité est évaluée par la méthode d'aromatogramme. Le pouvoir antimicrobien de cette huile essentielle est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition en mm.

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 5 classes :

- .Extrêmement sensible +++ : plus de 20mm
- .Très sensibles ++ : de 15mm à 19mm
- .Sensibles + : 8 mm à 14mm
- .Nom sensibles - : moins de 8 mm

### II.4.1. Activité antibactérienne de l'huile essentielle

#### II.4.1.1. Tests de confirmation

Les résultats des colorations de gram effectués sur les différentes bactériennes utilisées sont :

➤ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Les staphylocoques sont des cocci à gram positif qui tendent à se grouper en amas irrégulière à la façon d'une grappe de raisin.

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

Le genre pseudomonas est fait de bacilles mobiles à gram négative.

➤ *Escherichia coli*

*E. coli* sont des bacilles à gram négative.

➤ *Streptocoque sp*

Les bactéries appartenant au genre streptococcus sont des cocci à gram positif se disposant en chinettes plus ou moins longues.

➤ *Bacillus sp*

Sont des longs bacilles sporulés à gram positif

### II.4.1.2. Aromatogramme de l'huile essentielle du romarin

La méthode d'aromatogramme nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de romarin vis-à-vis de cinq bactéries. Les résultats présentés dans le (**tableau 3**) et les (**Figures 13, 14, 15, 16, et 17**) ci-dessous, montrent que l'huile essentielle de romarin présente une activité importante, qui s'étend sur la totalité des souches testées, mais il exerce une forte activité sur les bactéries à gram positif.

D'après **Nikaido (2003)**, ces résultats pourraient être dus à la composition chimique de la membrane externe des bactéries gram négatives. En effet, ces derniers possèdent une membrane qui présente une perméabilité sélective ; la surface des lipopolysacharides contient des charges négatives qui empêchent la diffusion des molécules hydrophobes, et des porines qui bloquent le passage des molécules à haut poids moléculaire.

**Tableau 3:** Diamètre des zones d'inhibitions des huiles essentielles de romarin sur les différentes souches bactériennes testées.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
	Les dilutions de l'huile essentielle du romarin					
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	T
<b>Escherichia coli (CHU)</b>	11,33±0,577	10,33±1,527	10±1,414	9±1	6,66±1,154	06
<b>Bacillus sp(CHU)</b>	15±1	13,33±0,577	06±0	06±0	06± 0	06
<b>Staphylococcus aureus ATCC</b>	13,33±0,577	11,33±0,577	06±0	06±0	06±0	06
<b>Streptococcus sp (CHU)</b>	14±0,577	10,33±0,577	8,66±2,309	8±1,732	6,66±1,154	06
<b>Pseudomonas aeruginosa ATCC</b>	13±1	12±0	10±1	8±1,732	06±0	06

T : témoin négatif (DMSO) ; (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) : Différentes dilutions de l'huile essentielle de romarin.

Malgré l'existence des zones d'inhibition, moyens faible, nos résultats prouvent l'existence d'activité antimicrobienne contre les cinq souches testées et les effets inhibiteurs augmentent considérablement avec la concentration de l'extrait.

Comme on peut voir dans le tableau ( ), une activité la plus élevée avec l'HE du romarin, a été remarqué chez *Bacillus sp(CHU)* avec une zone d'inhibition maximale de 15mm pour la dilution 1/2, suivie de *streptococcus sp (CHU)*, *staphylococcus aureus*

*ATCC 25923* et *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* avec 14mm, 13,33mm, 13mm respectivement et une zone minimale de 11,5 mm pour *E. coli* (CHU).

D'après la classification de Ponce et al. (2003), les zones d'inhibition, variant entre 15 et 19mm, indiquent que la souche *Bacillus sp* est très sensible et que les autres souches testées sont sensible à l'huile essentielle de romarin (zone d'inhibition entre 8-14mm).

L'effet antibactérien de l'HE du romarin a persisté jusqu'à la dilution 1/16 pour les souches *E. coli* (CHU), *streptococcus sp* (CHU) et *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*.

Nous avons employé une quantité moyenne de 10µl d'extrait par disque, par rapport à **Gachkar et al. (2006)** qui ont employé des fractions minimales de 5µl d'huile alors qu'ils ont trouvés que *staphylococcus aureus ATCC* et *Escherichia coli* sont sensibles avec un diamètre 8,33mm et 16,33mm respectivement. Dans ce cas-là l'huile essentielle du romarin a une activité plus élevés sur les bactéries gram négatives que les bactéries gram positives.

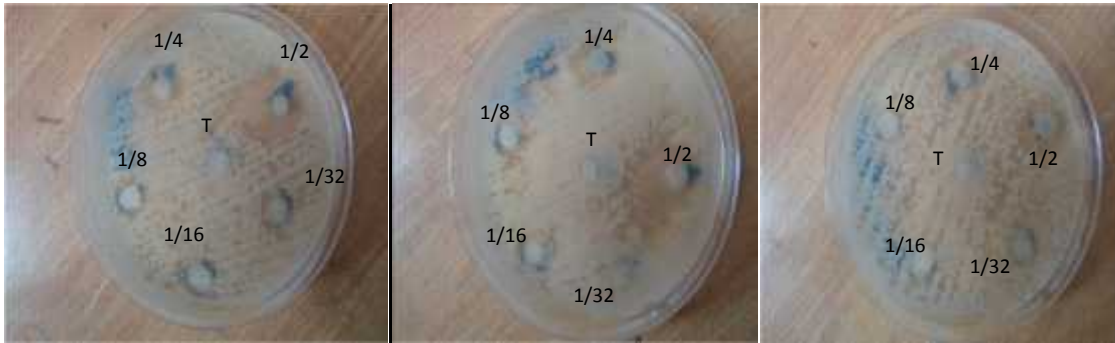
Les résultats de **(S. Ayadi et al. 2011)** révèlent que la souche *Pseudomonas aeruginosa* clinique est résistante avec un diamètre 07mm et *Pseudomonas aeruginosa ATCC* de référence est sensible avec une zone d'inhibition 09,5m.

La charge du disque influe l'activité antimicrobienne, **Rasooli et ses collaborateurs. (2008)** ont remarqué que l'inhibition de la croissance d'*Aspergillus parasiticus* est forte lorsque le disque est plus chargé en huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Trachyspermum Copticum*.

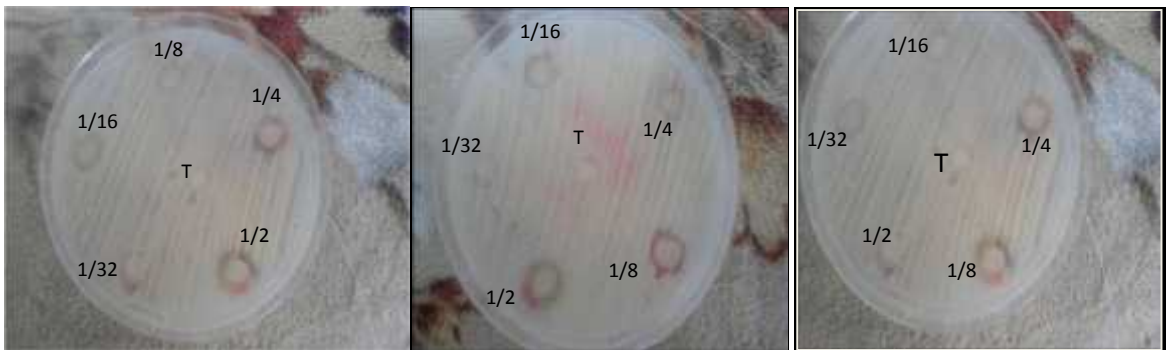
Certaines études ne révèlent aucune activité antimicrobienne sélective vis-à-vis les bactéries Gram (+) ou Gram (-) **(Guesmi Et Boudabous. 2006)**. La résistance de la souche *Streptocoque sp* peut être attribuée à la capacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans l'agar **(Hayouni et al. 2007)**.

Pour le DMSO a été testé comme contrôle négatif, les résultats montrent que le solvant ne présente aucun effet sur la croissance des souches bactériennes.

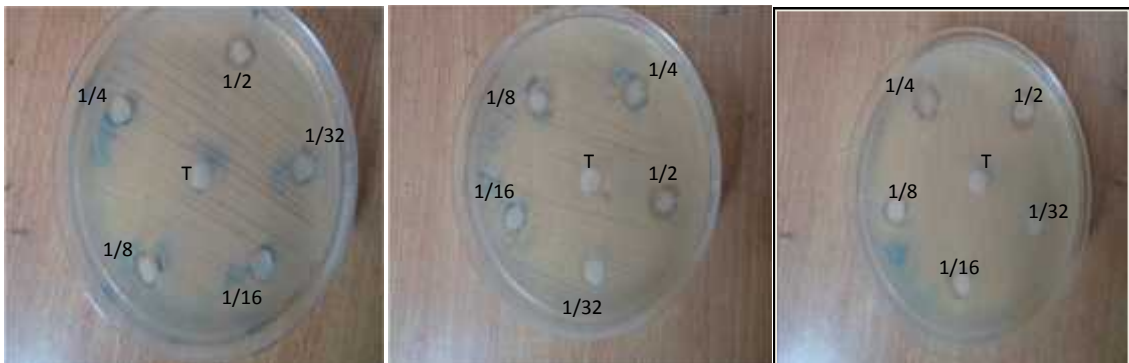




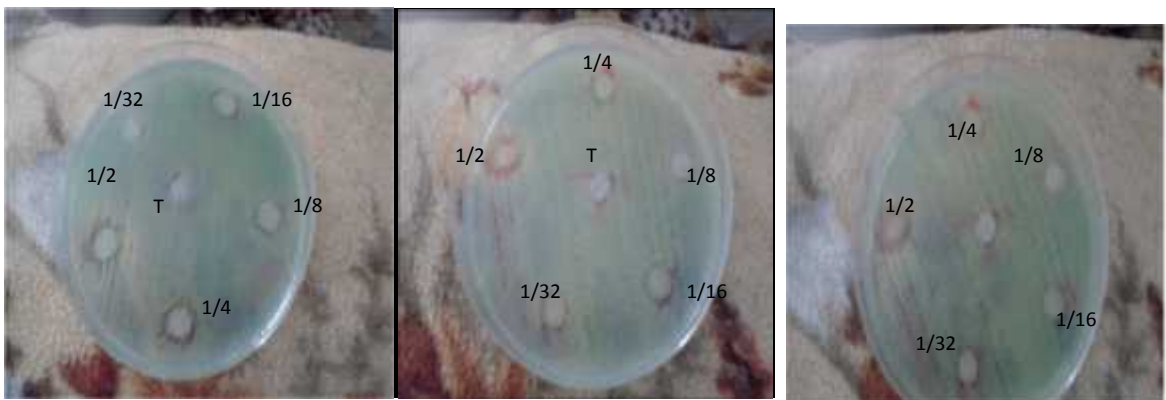
**Figure 13** : l'effet de l'huile essentielle de romarin sur *Bacillus sp*(CHU)



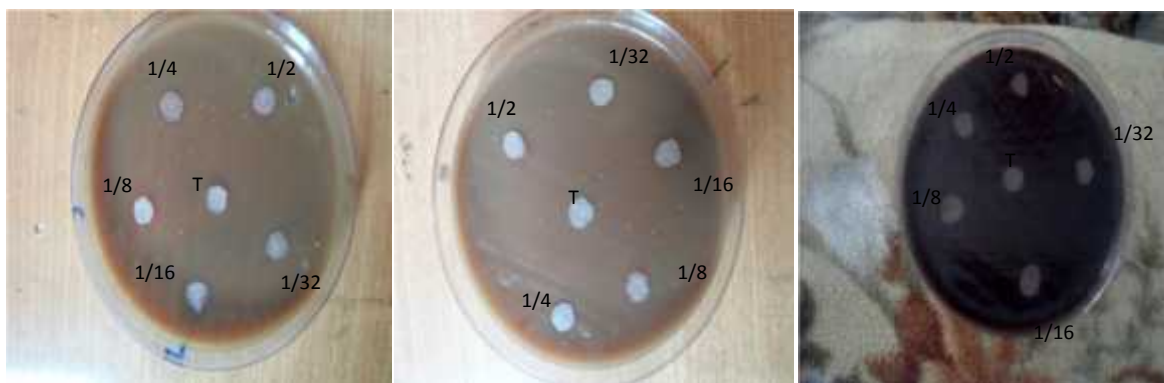
**Figure 14** : l'effet de l'huile essentielle de romarin sur *staphylococcus aureus*ATCC25923



**Figure 15** : l'effet de l'huile essentielle de romarin sur *E. coli* (CHU)



**Figure 16** : l'effet de l'huile essentielle de romarin sur *pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

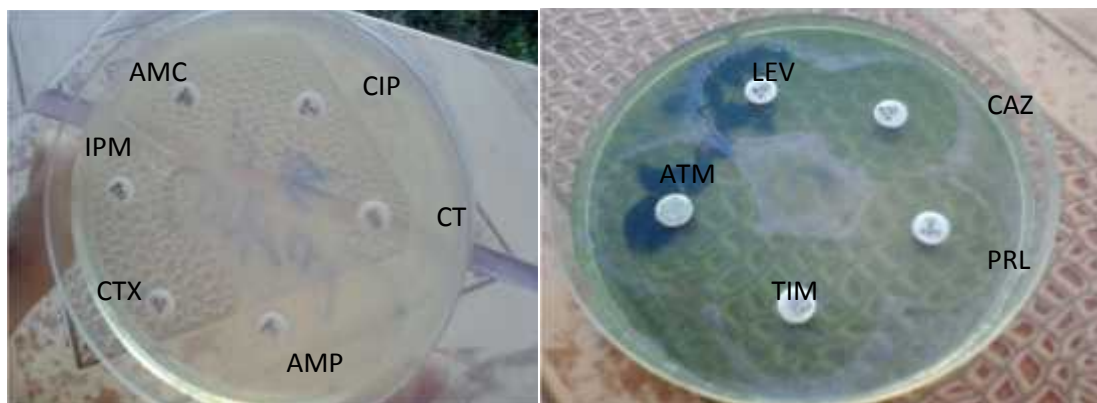


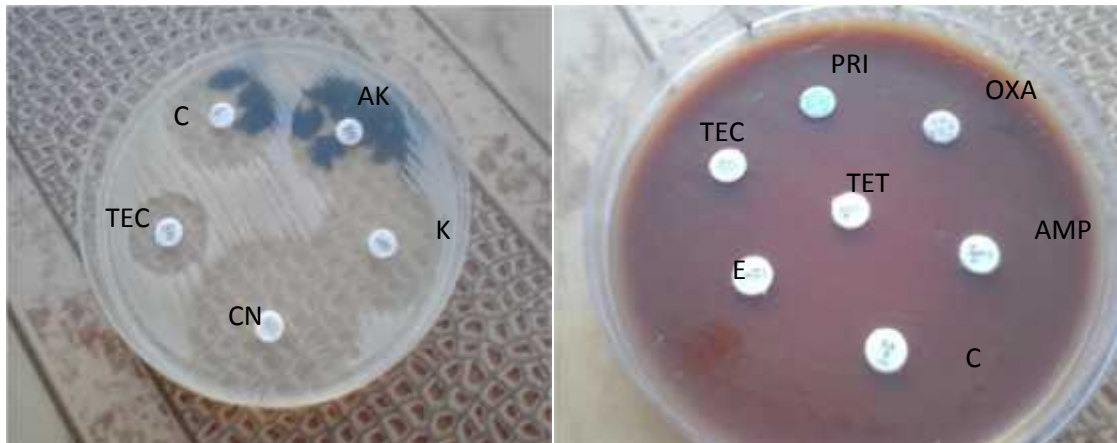
**Figure 17** : l'effet de l'huile essentielle de romarin sur *streptococcus sp* (CHU)

D'après la figure ci-dessous, nous constatons également que les zones d'inhibition étaient inférieures à celles des antibiotiques, qui ont montrés des zones d'inhibition larges par rapport à celles obtenues en testant l'huile essentielle de *R. officinalis*.

Cette différence peut être due :

- concentration des substances (peut être exagérée dans le disque)
- diffusion dans l'agar
- le degré de pureté





**Figure 18** : l'effet des antibiotiques sur les souches testés

La bactérie *E. coli* a montré des sensibilités différentes aux antibiotiques standards testés : céfotaxine (CTX), (CT), ciprofloxacine (CIP), clavulanique (AMC) et omépénème (IPM) alors qu'elle est résistante à l'ampicilline (AMP) avec un diamètre 06 mm.

*Pseudomonas aeruginosa* est sensible aux antibiotiques testés : levofloxacine (LEV), aztréonam (ATM), tiraccilline (TIM), pépiracilline (PRL) et ciflazidine (CAZ).

*Staphylococcus aureus* est sensible aux différents antibiotiques : la teicoplanine(TEC), chloramphénicol(C), amikacine(AK), kanamycine(K) et gentamicine(CN).

*Streptococcus sp* est sensible à l'ampicilline (AMP), chloramphénicol (C), erythromycine (E), pristinamycine (PT), oxacciline (OXA), teicoplanine (TEC) alors qu'elle a montré une certaine résistance vis-à-vis de tetracycline avec un diamètre 13 mm.

### II.4.1.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Tableau 4 : les différentes concentrations minimal inhibitrices

Souches bactériennes	Les différentes concentrations en huile essentielle de romarin					
	Les dilutions de l'huile essentielle du romarin					
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	CMI
<b>Escherichia coli (CHU)</b>	500µl/ml	250µl /ml	125µl/ml	62,5µl/ml	31,5µl/ml	>62,5µl/ml
<b>Bacillus sp(CHU)</b>	500µl/ml	250µl /ml	125µl/ml	62,5µl/ml	31,5µl/ml	>125µl/ml
<b>Staphylococcus aureus ATCC</b>	500µl/ml	250µl /ml	125µl/ml	62,5µl/ml	31,5µl/ml	>125µl/ml
<b>Streptococcus sp(CHU)</b>	500µl/ml	250µl /ml	125µl/ml	62,5µl/ml	31,5µl/ml	>62,5µl/ml
<b>Pseudomonas aeruginosa ATCC</b>	500µl/ml	250µl /ml	125µl/ml	62,5µl/ml	31,5µl/ml	>62,5µl/ml

CMI : concentration minimal inhibitrice

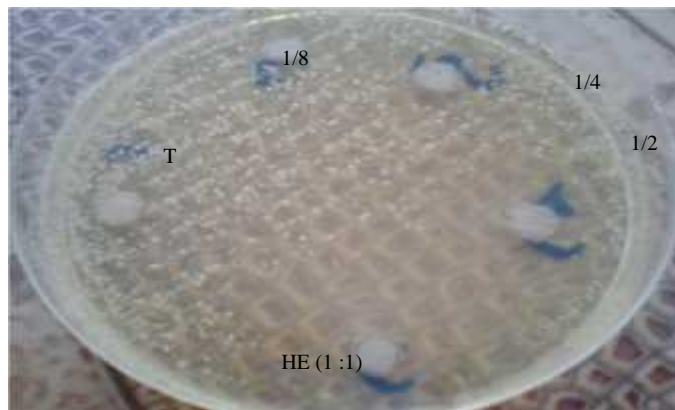
*Bacillus sp(CHU)* et *staphylococcus aureus ATCC* sont sensibles à des concentrations supérieures à la concentration minimale inhibitrice qui est de 125µl/ml. Alors que la CMI est > 62,5µl/ml pour *Escherichia coli (CHU)*, *Streptococcus aureus(CHU)* et *Pseudomonas aeruginosa ATCC*.

### II.4.2. Activité antifongique

L'huile essentielle isolée à partir de la partie aérienne de romarin est testée pour l'activité antifongique contre une souche de levure *candida sp.*

D'après la figure ci-dessous, l'HE a réduit la croissance de candida avec une zone d'inhibition 24mm et la sensibilité diminue avec diminution des concentrations de l'huile essentielle. Pour la dilution 1/2 le diamètre est de 20mm, 1/4 le diamètre est de 11mm, 1/8 le diamètre est de 06mm.

Si on compare ces résultats avec celles obtenu de l'activité antibactérienne, on déduit que l'huile essentielle de la plante étudiée a une activité antifongique plus importante que l'activité antibactérienne.



**Figure 20** : Aromatogramme de l'huile essentielle de romarin sur *candidas sp*

*CONCLUSION*  
*ET*  
*PERSPECTIVES*

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 méthanolique et l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis*. On peut conclure que :

- ✓ Le dosage quantitatif des polyphénols totaux par le réactif de Folin-ciocalteu a révélé que le romarin contient  $43,89 \pm 2,75$  mg Eq G/g.
- ✓ Le dosage quantitatif des flavonoïdes totaux par la méthode d'AlCl<sub>3</sub> a révélé une valeur de  $7,06 \pm 0,62$  mg Eq Q/g.
- ✓ Les résultats de test DPPH ont démontré une activité antiradicalaire égale à 94,67 % avec un IC<sub>50</sub> = 17,87 ug/ml. On peut noter que cette activité était même inférieure à celle du BHA (94,70%) et l'acide ascorbique (96,51%).
- ✓ Les résultats du teste ABTS ont démontré un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 98,02% qui correspond à 0,456 Mm Eq TROLOX et l'IC<sub>50</sub> = 194,92 ug/ml qui correspond à 0,23 Mm Eq TROLOX.
- ✓ L'activité antimicrobienne des huiles essentielles du romarin a été évaluée sur cinq souches bactériennes et une souche fongique par la méthode d'aromatogramme. Les résultats obtenus tout au long de ce test ont montré que les huiles essentielles du romarin ont une activité bactérienne contre un certain nombre de bactérie, surtout contre *Baccilus sp* avec un diamètre d'inhibition maximal 15mm. Les huiles essentielles du romarin ont été révélées actives vis-à-vis de candida sp avec une zone d'inhibition de 24mm. On déduit que les huiles essentielles du romarin ont une activité antifongique plus importante que l'activité antibactérienne pour les souche testées dans ce présent travail.

Les résultats préliminaires montrent que l'extrait méthanolique et les huiles essentielles du romarin témoignent d'une activité antioxydantes et antimicrobienne in vitro. Il serait également intéressant de réaliser d'autres études pour évaluer le potentiel in

vivo sur modèle animal. Et il serait aussi intéressant de définir le mécanisme d'action de l'activité antimicrobienne de cette substance végétale sur les microorganismes.



*RÉFÉRENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

## A

**Albert.Y.leung, Steven Foste. (1996);** Encyclopedia of common Naturel Ingradients used In Foods ,Drugs, and cosmetics, 2éme édition , Awreley-interscience publication, P445.

**Amarowiez, R; pegg, R. B; Rahimi. Moghaddan, P; Barl B et weilc, J.A. (2004) ;**Free radical scavenging capacity and antioxydant activity of selected plant spies from the Canadian prairies. *Food chemistry*, 84:551-562.

**Annie SHIRWAIKAR,\*<sup>a</sup> Arun SHIRWAIKAR,<sup>b</sup> Kuppusamy RAJENDRAN,<sup>a</sup> and Isaac Sam Raj PUNITHA<sup>a</sup>.(2006);** *In Vitro* Antioxidant Studies on the Benzyl Tetra Isoquinoline Alkaloid Berberine *a Department of Pharmacognosy, and b Department of Pharmaceutics, Manipal College of Pharmaceutical Sciences; Manipal, Karnataka, 576 104 India. Biol. Pharm. Bull.* 29(9) 1906—1910 Vol. 29, No. 9.

**Ardestani, A., Yazdanparast, R. (2007);** Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.* **104**: 21-29.

**Aruoma, O I. (1999);** Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific J Clin Nutr.* **8**: 53-63.B

**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.

## B

**Bakirel, T., Bakirel, U., Ustuner Keles, O., Gunes Ulgen, S., Yardibi, H. (2008);** *In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol.* **116**: 64-73.

**Bastien F. (2008) ;** Effet larvicide des huiles essentielles sur *Stomoxys calcitrans* a la réunion. Thèse doctorat. Université Paul-Sabatier. Toulouse. P : 25-26.

**Bekhechi C et Abdelouahid D. (2010) ;** *Les huiles essentielles. Offices des publications Universitaires.* ALGER. P : 55 - 56.

**Belaiche P. (1979)** : Traité de phytothérapie et d'aromathérapie . Tom1 l'aromatogramme. Ed Maloine. Paris.

**Belyagoubi L-M (2006)** ; Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration de céréales. Thèse magistère. Université de Tlemcen.

**Bergogne-Berezin E., Dellamonica P. (1995)** ; Antibiothérapie en pratique clinique. *Ed Masson*, Paris, 486 p.

**Boudiaf, K., (2006)** ; Etude des effets anti-xanthine oxydoreductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Mémoire de magister .Setif.

**Boullard, B. (2001)** ; Plantes médicinales du monde réalités et croyances. ESTEM (Ed) Paris .660 p.

**Boyle W (1955)**; Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfurmer Essent. Oil Rev.* **66**: 25-28.

**Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995)**; Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol.* **28** : 25-30.

**Bruneton J ; (1993)** ;pharmacognosie phytochimie ; plantes médicales ; édit : lavoisier TEC et DOC Paris 1éme édition.

**Burt S. A. (2004)**; Essential oils: their antibacterial properties and potentiel applications in foods-a review International. *J. Food Microbiol.* **94**: 223-253.

## C

**Campos, M., Lopez-Munoz, F.J. (2007)**; Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol.* **111**: 476-482.

**Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C. (2007a)**; Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* **100**: 553-559.

**Celiktas, O.Y, Bedir, E., Vardar Sukan, F. (2007b)**; In vitro antioxidant activities of Rosmarinus officinalis extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chem.* 101: 1457-1464

**Charfi D. (1995)**. Effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et sur la physiologie de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'ElHajeb (Sfax). Thèse en écologie végétale, Fac. Sci. De Sfax.

**Colette-Keller D. (2004)** ; Les plantes médicinales.

## D

**Dacosta Y. (2003)** ; Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris, p. 317.

**Dangles O. (2006)**. Propriétés chimiques des polyphénols. Et les polyphénols en agroalimentaire. Ed. TEC et DOC. Lavoisier. Paris.

**Deans et al. (1998)**; chemical composition, antibacterial, and antioxidant activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J. Essent. Oils*, 1998, 10, P10

**Decaux I. (2002)**. *Phytothérapie : Mode d'emploi*. Ed : Le bien public. Pp 6

**Djeridane A.M., Yousfi B., Nadjemi D., Boutassouna P., Stocker N. (2006)**. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds *Food Chemistry*, 97: 654–660.

**Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J.F., Stocker P. (2007)**. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. 224: 801–809.

**Delaveau P, (1982)** : histoire et renouvellement des plantes médicinales, Paris Albin Michels : éditeur. p348 ;

**Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J. (2003)**; Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem.* **83**: 255-262.

**Dworkin MM and Falkow S. Proteobacteria : Gamma subclass. Ed. Springer, New York, NY, ( 2006), p. 1248.**

## **E**

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

## **F**

**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.

**Ferhat M. (2009) ;** Recherche de substances bio actives de *Centaurea microcarpa* coss et dur. Diplôme étude supérieur de biochimie Université de M'sila.

**F.Piozzi, J. (1994);** phytochemistry, vol: 3, p125.

**F.Piozzi, J. phytochemistry, (1996) ,** vol :6 , p146.

**Favier A. (2003) ;** Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique* ; 108-117.

**Favier A. (2006);** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr* ; 64: 390-396.

## **G**

**Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh S.A., Rasooli, I. (2007);** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.* **102**: 898-904.

**Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S A. (2007);** Effect of rosemary extract, chitosan and -tocopherol on microbiological parameters and lipid

**Giordani R., Hadeif Y., Kaloustian J. (2008) ;** Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* **79**: 199-203.

**Gonzalez-Trujano, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga- Campos, M., Lopez-Munoz, F.J. (2007);** Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol.* **111**: 476-482. oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science.* **76**: 172-181.

**Guesmi, A., Boudabous, A. (2006) ;** Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie. *Revue des Régions Arides.* Numéro spécial : 224-230.

## H

**Hayouni, E.A, Abedrabba, M. Bouix, M., Hamdi, M., (2007);**The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.* (In press).

**Ho, S.C Ferhat M. (2009);** Recherche de substances bio actives de *Centaurea microcarpa* coss et dur. Diplôme étude supérieur de biochimie Université de M'sila.

**Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam P.S., (2010);**  
*Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: pp.1

## J

**Judde A. (2004) ;** Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique: mécanismes, conséquences, moyens de mesure, duels antioxydant pour quelles applications ? 11. pp : 414-418.

## K

**Kalemba D, Kunicka A (2003);** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**: 813-829.

**Karou D., Dicko M. H., Simpore J., and Traore A. S., (2005).** Antioxydant and antimicrobial activities of polyphénols from ethnomedicinal plants of Burkina faso. *African Journal of biotechnology* vol. 4 (8), pp. 823-828.

**Kohen R. and Nyska A. (2002);** Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path*; 30: 620-650.

**Kone S. (2001).** Extraction des huiles essentielles par distillation. *Gate Information Service*. Eschbom. P: 1-2.

### *L*

**Le K., Chiu F. and Ng K. (2007);** Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105: 353–363.

**Li, C., Oldham, C.D., May, S.W.N. (1994).** N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono oxygenase catalysis. *Biochem. J*, 300: 31-36.

### *M*

**Markowicz Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A.C.H. F., Cunha, I B. S., Carvalho, P. O. Eberlin, M. N. (2007);** Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. **12**: 423-432. M-Culvier et al, sage and rosmary phenolic antioxidants, *JAOCS*, 1996 , VOL(73),

**Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J.M. & Tuñón M.J. (2002).** Los flavonoïdes: propiedades y acciones antioxidants. *Nutr. Hosp.* 17:271-278.

**Meziti A. (2009).** Activité antioxydante des extrait de *Nigella sativa* L etude in vitro et in vivo, mémoire de magister en biochimie appliquée, option : molécules bioactives, université El-Hajlakhdar Batna, pp 71.

**Minichini. F, Loizzo M.R., Bonesi M., Conforti F., Luca D., Statti G. A., Cindio B., minichini F., Tundis R. (2011) ;** Phytochemical profile, antioxydant, ant-inflammatory and hypoglycémie potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus media* L. cv diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages; *Food and chemical Toxicology*; 49: 1549-1555.

**Moulinier, C., (2003)** ; Parasitologie et mycologie médicales Eléments de morphologie et de biologie. E M inter (Ed), 796p.

## N

**Novelli G. P. (1997)**; Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol. Pharmacol*; 48: 517-527.

## P

**Paris et al. (1993)**; effect of carnosolic acid products, vol 56, N°8 , p1426.

**Pibiri M-C, (2005)** ; Assainissement microbiologique de l'aire et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse N °3311, Lausan Suisse.

**Podsdek, 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.

**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.

**Popov, I., Lewin, G., Baehr, R. (1987)**. Photochemiluminescent detection of antiradical Activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomed Biochim Acta*, 46: 775–779.

## Q

**Q Chen et al. (1992)**; Rosemary antioxydants. *JACOS*, vol 69, N° 10.

**Quezel, P., Santa, S. (1963)** ; Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. C.N.R.S. (Ed). Paris, 565p.

## R

**Rasooli, I., Fakoor, M.H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., Rezaei, M.B. (2008)** Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum Copticum* L. essential oils. *International J of Food Microbiology*.122:135-139.



**Re R. (1999)**, pellegriani N. et poteggente A. Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 26:1231-1237.

**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

#### S

**S. Ayadi, C. (2011)** ; Extraction et etude des huiles essentielles de *rosmarinus officinalis* cueillie dans trois regions differentes de la tunisie, jerribi, m. abderrabba *Unité de recherche Physico-Chimie Moléculaire.IPEST, Boite postale 51, 2070 la Marsa, Tunisie.*

**S.L.Richheimer et al, rosmary antioxidants, AJOCS, (1996)**, vol 73, N°04, P507.

**Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. (2005)**; Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional

**Schelz Z., Molnar J, Hohmann J. (2006)**; Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*. 77: 279-285. Stefanovits-Banyai, E.,

**Sohal R. S., Mockett R. J. and Orr W. C. (2002)**; Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biol. Med*; 33: 575-586. antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem*. 91: 621-632.

#### T

**Tawaha K., Alali F. Q., Gharaibeh M., Mohammad M. and El-Elimat T. (2007)**, Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem*; 104: 1372-1378.

**Tsai, P., Tsai, T., Ho, S. (2007)**, *in vitro* inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chem*. (in press).

**Tulok, M.H., Hegedus, A., Renner, C., Szollosi Varga, I. (2003)**; Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones+. *Acta Biologica Szegediensis*. 47:111-113.

#### V

**Van Delden C. and Iglewski B. H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 1998 ; 4: 551-560. 90. Vuorela S. Analysis, isolation and bioactivities.**

**Visanji, J.M., Thompson, D.G., Padfield, P.J. (2006);** Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Letters.* **237**: 130-136.

**Vuorela, S. (2005);** Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki.

## W

**Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U. et Locke, S. (1985).** Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, 187: 33-37.

**Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A. J., Fong, J. H., Blanchard, K. A. (1998).** A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biol. Med*, 24: 480–493.

**Wong, C.C., Li H.B., Cheng, K.W., Chen, F. (2006)** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* **97**: 705-711.



# *ANNEXES*

## Annexe 1

### **Gélose Nutritive**

Extrait de viande de bœuf.....1g ;  
Extrait de levure..... 2g ;  
Peptone.....5g ;  
Chlorure de sodium.....5g ;  
Agar.....15g.

PH= 7,2 à 7,4

### **Agar Mueller Hinton**

Eau distillée.....1000ml ;  
Infusion de viande de bœuf.....02.0g ;  
Hydrolysat de Caséine.....17.5g ;  
Amidon.....1,5 g ;  
Agar.....10g.

pH= 7.4

### **Milieu sabouraud**

Eau distillée.....1000ml;  
Peptone.....10g;  
Glucose.....20g;  
Agar-agar.....15g .

pH=6.3

## Annexe 2

**Tableau n° 1** : l'antibiogramme des antibiotiques.

antibiotiques	LEV	AT M	TIM	PRL	CAZ	TEC	C	AK	K	CN
<i>Pseudomonas Aeruginosa ATCC27853</i>	23	27	25	23	27	NT	NT	NT	NT	NT
<i>Staphylococcus aureus ATCC25923</i>	NT	NT	NT	NT	NT	18	25	27	26	34

**Tableau n° 2** : l'antibiogramme des antibiotiques.

antibiotiques	CTX	OXA	AMP	CT	CIP	TEC	AMC	IPM	C	E	TET	PT
Streptococcus Sp(CHU)	28	NT	06	14	36	NT	18	28	NT	NT	NT	NT
E. coli(CHU)	NT	28	34	NT	NT	16	NT	NT	30	32	13	25

NT : non testées

## Résumé

Le présent travail a pour objectif l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique et l'activité microbienne des huiles essentielles de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis*. L'activité antioxydante a été évaluée par le biais de deux méthodes : la méthode de l'ABTS et le test DPPH. Les résultats du test ABTS ont démontré que l'extrait du romarin a un pourcentage d'inhibition de 0,456 Mm Eq TROLOX. Les résultats du test DPPH ont démontré que l'extrait du romarin a un pourcentage d'inhibition égal à 94,67 % avec un  $IC_{50}=17,87$  ug/ml, qui est supérieur à celui de BHA (6,03  $\mu$ g/ml) et l'acide ascorbique (1,24  $\mu$ g/ml).

Le rendement des huiles essentielles de romarin obtenu par hydrodistillation égal à 1,42 %. L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été étudiée vis-à-vis de cinq souches bactériennes et une souche fongique par la méthode d'aromatogramme. Cette dernière montre que l'huile essentielle de romarin exerce une activité antifongique remarquable à celle des bactéries. Et que les bactéries gram positives sont plus sensibles à l'action des huiles que les bactéries gram négatives.

**Mots clés :** *rosmarinus officinalis*, extrait méthanolique, huiles essentielles, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

## Abstract

This work aims at evaluating the antioxidant activity of methanolic extract and the antimicrobial activity of essential oil of the aerial parts of *Rosmarinus officinalis*. The antioxidant activity is evaluated by the means of two methods: the ABTS method and DPPH assay. The results of ABTS assay have showed that the rosemary extract has a rate of inhibition equal to 0,456 mM Eq TROLOX. The results of DPPH assay have showed that the rosemary extract has a rate of inhibition equal to 94, 67 % with an  $IC_{50}= 17, 87$  ug/ml, which were higher than that of BHA (6,03ug/ml) and ascorbic acid (1, 24  $\mu$ g/ml).

The yield in essential oil of rosemary obtained by hydrodistillation is equal to 1, 42 %. The antimicrobial activity of essential oil was studied against of five bacteria and one fungus by the aromatogram method. The aromatogram, show that the essential oil of rosemary exercises a remarkable antifungal activity than that of bacteria. And that, the gram positive bacteria are more sensitive to the action of essential oil than the gram negative.

**Key words:** *Rosmarinus officinalis*, methanolic extract, essential oils, antioxidant activity, antimicrobial activity.