

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE DE BLIDA 1**



**Faculté des sciences de la nature et de la vie**  
**Département de Biotechnologie**

***Mémoire***

***En vue de l'obtention du diplôme de Master académique***

**Spécialité : Biotechnologie Végétale**

**THEME :**

**Évaluation chimique et microbiologique des huiles essentielles de  
*Rosmarinus officinalis L.* de la région de Blida**

***Présenté par :***

**DJOUMI Mohamed Choukri**

**TEFFERT Moussa**

**Devant le jury composé de :**

<b>Mr. BENDALI. A</b>	<b>U. Blida1</b>	<b>Président du jury</b>
<b>MME.BELGUENDOZ. R</b>	<b>U. Blida1</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>MME.BENRBIHA.F.Z</b>	<b>U. Blida1</b>	<b>Promotrice</b>
<b>MME.MOUAS. Y</b>	<b>U. Blida1</b>	<b>Co-promotrice</b>

**Blida, septembre 2017**

## *Remerciement*

*Nous tenons à remercier avant tout dieu le tout puissant de nos avoir accordé la force, la patience, la santé et le courage pour accomplir ce modeste travail.*

*Nous tenons à exprimé nos vif remerciement et notre profonde gratitude à notre promotrice **Mme Benrebiha** ainsi qu'à notre Co-promotrice **Mme Mouas** qui nous a beaucoup aidée à réaliser ce mémoire.*

*Nous exprimons nos plus sincères remerciements aux membres de jury qu'ils ont accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et de participer au jury de notre soutenance.*

*Nous exprimons également nos remerciements à **Mr DJAZOULI** pour son aide et sa disponibilité.*

*Nos remerciements sont également destinés à **Mme la technicienne** de laboratoire de Phytopharmacie au niveau de département de Biotechnologie , à **Mr TEFAHI Djamel** de laboratoire D'hygiène de la wilaya de Blida et à **Mr Othman** et **Mme Bekhti** et surtout **Mr Fouad** du laboratoire de SAIDAL, ainsi qu' à toute l'équipe de laboratoire de l'Institut national de criminalistique et de criminologie de la Gendarmerie nationale de Bouchaoui.*

*Nous remercions sincèrement nos très chers parents, qui ont toute notre gratitude pour leur sacrifice éternel, et qui ont fait tout leur possible pour la réussite de nos études.*

*Nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicace*

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont cher,  
*A ceux que j'aime du fond de mon cœur, à qui je dois la vie et qui n'ont cessé, à  
aucun moment, de me soutenir et de m'encourager par leurs prières et leurs  
sacrifices, mes cher parents Farid et Nadia,  
A mon frère Oussama,  
A mes grands parents Abdel Madjid et Zohra que Dieu vous préserve santé et  
longue vie,  
A mes tantes Yasmina, Malika, Saida et Sarah.  
A mon oncle : Med Nasser,  
A ma femme Amel qui m'a tellement aidé.  
A mes frères Abdelkader, Slimane, Hamza, Hacene, Mohamed et Amine.  
A mon binôme Teffert Moussa et toute sa famille  
A tous mes collègues de la promotion 2016-2017 Mohamed, Ghanou, Youcef,  
Khiro, Sidahmed et Cherif.*

# *Dédicace*

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont cher,  
A ceux que j'aime du fond de mon cœur, à qui je dois la vie et qui n'ont cessé, à  
aucun moment, de me soutenir et de m'encourager par leurs prières et leurs  
sacrifices, mes cher parents Mama settiet Mustapha,  
*A mon grand père Hadjnacer Bakir que Dieu vous préserve santé et longue vie,*  
*A mon oncle : Bakir qui m'a soutenu tout le temps et sa famille.*

*A ma sœur Aicha*

*A mes frères : Douad, Mohamad Amine, Mehdi, Aissa*

*A ma tante Faffa et son mari Redouane*

*A mes amis : Mohamed, Leila, Salah, Balhadj, Nouh, Slimane, Mokhtar, Housseem,  
Lyes , Aissa, Aziz, Brahim, Bouhoun et Mustapha*

*A mon binôme Djoumi Med Choukri et toute sa famille*

*A tous mes collègues de la promotion 2016-2017 Mohamed, Ghanou, Youcef,  
Khiro, Sidahmed, Cherif, Amina ,souad, Loubna, Amel.*



## Résumé

Le romarin *Rosmarinus officinalis* L. est une plante ligneuse, rustique, de taille faible à moyenne et toujours verte. Ses caractéristiques morphologique et physiologique font d'elle une espèce bien adaptée aux conditions climatiques semi-aride et aride. Elle possède plusieurs activités thérapeutiques et rentre dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique. Objectif de notre travail est de déterminer l'effet saisonnier sur le rendement, l'activité antimicrobienne et antioxydante et la composition chimique de l'huile essentielle de romarin de la région de Blida. L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydro distillation. L'aromatogramme a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle, vis-à-vis les souches antimicrobiennes testées. L'activité antioxydante a été évaluée in vitro par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH. L'huile essentielle de *R. officinalis* L. de printemps présente un rendement plus important (0,76%) que les deux autres saisons l'automne et l'hiver (0,17%, 0,28% respectivement). L'analyse par CG-SM a permis d'identifier les composants de l'huile essentielle des trois saisons. Dont l'huile essentielle d'automne est de type Alcanfor/Bornéol, l'huile de romarin d'hiver est de type  $\alpha$ -Pinène/Bornéol, et celle de printemps est de type  $\alpha$ -Pinène/Alcanfor, l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. des deux saisons automne et hiver possède une forte activité antibactérienne pour *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et une activité inhibitrice modérée pour la saison de printemps. Par contre *Pseudomonas fluorescens* est la plus résistante vis-à-vis l'HE. La levure testée *Candida albican* présente une forte sensibilité vis-à-vis l'HE pour les deux saisons d'hiver et automne, et une légère sensibilité vis-à-vis l'HE de printemps enfin l'évaluation de l'activité antioxydante a montré que l'HE d'hiver possède une activité antioxydante plus importante que celles de printemps et d'automne.

**Mots clés :** *Rosmarinus officinalis* L., huile essentielle, saisons, activité antioxydante, activité antimicrobienne, CG /MS.

## Abstract

*Rosmarinus officinalis L.* is a woody, rustic plant of small to medium size and always green. Its morphological and physiological characteristics make it a species well suited to semi-arid and arid climatic conditions. It has several therapeutic activities and is involved in the pharmaceutical and cosmetic industry. Objective the our work is the determining the seasonal effect on yield, microbial and antioxidant activity and the chemical composition of the rosemary essential oil of the Blida region. The extraction of the essential oil was carried out by hydro distillation. The aromatogram showed the antibacterial potency of the essential oil with regard to the antimicrobial strains tested. The antioxidant activity was evaluated in vitro by measuring the trapping power of the DPPH radical.

Spring essential oil of *R. officinalis L.* showed a higher yield (0.76%) than the other two seasons in autumn and winter (0.17%, 0.28%, respectively). GC-MS analysis identified the essential oil components of the three seasons. Of which the essential oil of autumn is of the Alcanfor / Borneol type, the winter rosemary oil is of the  $\alpha$ -Pinene / Borneol type, and that of spring is of the  $\alpha$ -Pinene / Alcanfor type, the essential oil of *Rosmarinus officinalis L.* of both seasons fall and winter has strong antibacterial activity for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and moderate inhibitory activity for the spring season. On the other hand *Pseudomonas fluorescens* is the most resistant vis-à-vis HE. The yeast tested *Candida albican* has a high sensitivity towards essential oil for both winter and autumn seasons and a slight sensitivity towards the spring essential oil finally evaluation of antioxidant activity has shown that winter essential oil has more antioxidant activity than spring and autumn.

**Key words:** *Rosmarinus officinalis L.*, essential oil, season, antioxidant activity, antimicrobial activity, GC / MS.

## ملخص

إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis L.* هي نبتة خشبية، صغيرة إلى متوسطة الحجم و دائمة الاخضرار، خصائصها المورفولوجية والفزيولوجية تساعد على التأقلم مع الظروف المناخية شبه القاحلة والقاحلة. لديها العديد من الأنشطة العلاجية وتساهم في صناعة المستحضرات الصيدلانية ومستحضرات التجميل. يستند عملنا على تحديد تأثير التغيرات الموسمية على المردود، النشاط الضد ميكروبي، مضادات الأكسدة والتركيب الكيميائي للزيت الأساسي لإكليل الجبل لمنطقة البليدة. لقد تم استخراج الزيوت العطرية بواسطة التقطير المائي، حيث أظهر الأروماتوغرام القوة المضادة للجراثيم للزيوت الأساسية فيما يتعلق بسلالات الميكروبات المختبرة. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر عن طريق قياس قوة محاصرة أيونات الـ DPPH. الزيوت الأساسية لإكليل الجبل لفصل الربيع أظهرت عائد أعلى (0.76%) من الموسمين الآخرين الخريف والشتاء (0.17%، 0.28% على التوالي). التحليل بواسطة CG-MS سمح بتحديد مكونات الزيت الأساسية للمواسم الثلاثة، حيث الزيوت الأساسية لإكليل الجبل لفصل الخريف هي من نوع Alcanfor/Bornéol ، و زيت الشتاء هو من نوع  $\alpha$ Pinène/Bornéol ، أما زيت الربيع فهو من نوع  $\alpha$ Pinène/Alcanfor، الزيوت الأساسية لإكليل الجبل الخاصة بموسمي الخريف والشتاء لديها نشاط مضاد للجراثيم قوي ضد المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) والإشريكية القولونية (*Escherichia coli*)، أما في فصل الربيع فقد كان نشاطها معتدلاً، من ناحية أخرى *Pseudomonas fluorescens* كانت الأكثر مقاومة للزيت الأساسي، أما بخصوص الخميرة المختبرة *Candida albican* فقد أظهرت حساسية عالية تجاه الزيت الأساسي لإكليل الجبل لفصلي الخريف و الشتاء، إضافة لحساسية بسيطة في فصل الربيع في الأخير أظهرت اختبارات النشاط المضاد للأكسدة أن الزيت الأساسي لفصل الشتاء لديه فعالية أكبر مقارنة بفصل الخريف ثم فصل الربيع.

**الكلمات المفتاحية :** إكليل الجبل، زيوت أساسية، فصول، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، CG/MS.

# Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation.

ARP : Puissance anti radicalaire.

ATCC : American type culture collection.

CG/MS : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

CIP : Collection de l'institut pasteur.

$d_{20}^{20}$  : Densité relative

DL50 : Dose létale médiane

EMA : Agence européenne du médicament.

ES : Essences.

HE : Huile essentielle.

HIV : Virus de l'immunodéficience humaine.

IC50 : Concentration inhibitrice médiane

INCC : Institut national de criminalistique et de criminologie

ISO : Organisation Internationale de Normalisation.

MH : Muller Hinton.

M<sub>H</sub> : Masse d'huile essentielle.

Min : Minimum.

M<sub>mv</sub> : Masse de la matière végétale .

pH : Potentiel d'hydrogène.

R<sub>HE</sub> : Rendement en Huiles Essentielles

UV : Ultraviolet.

ZI : Zone d'inhibition.

## Liste des tableaux

N°	Tableau	page
<b>01</b>	Surfaces utilisées pour certaines plantes en Algérie	<b>04</b>
<b>02</b>	Classification du romarin	<b>07</b>
<b>03</b>	Noms communs et synonymes	<b>07</b>
<b>04</b>	Comparaison entre l'huile végétale et l'huile essentielle	<b>16</b>
<b>05</b>	Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à cinéol et camphre) de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i>	<b>28</b>
<b>06</b>	Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à verbénone) de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i>	<b>29</b>
<b>07</b>	Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à cinéol) de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i>	<b>29</b>
<b>08</b>	Les normes AFNOR d'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i>	<b>30</b>
<b>09</b>	souches microbiennes testés.	<b>35</b>
<b>10</b>	Catégorie d'inhibition des HE selon le diamètre du halo	<b>42</b>
<b>11</b>	Condition opératoire des analyses par CG/SM	<b>46</b>
<b>12</b>	Rendement en huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> (g/100g de matière végétale) des trois saisons : automne, hiver et printemps.	<b>47</b>
<b>13</b>	Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	<b>48</b>
<b>14</b>	Sensibilité des bactéries et champignons à l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	<b>49</b>
<b>15</b>	Valeurs des IC <sub>50</sub> et le pouvoir antiradicalaire (ARP) des extraits méthanoliques de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> et de l'acide ascorbique.	<b>63</b>
<b>16</b>	les principaux composés chimiques des huiles essentielles de <i>R. officinalis</i> des trois saisons.	<b>65</b>

## Liste des figures

<b>Figure n°01</b> :Sommité fleurie et fleur de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	<b>06</b>
<b>Figure n°02</b> :Compositions phénoliques caractéristiques des extraits du romarin.....	<b>10</b>
<b>Figure n°03</b> :Schéma représentant le dispositif expérimental.....	<b>32</b>
<b>Figure n°04</b> :Photographie du romarin .....	<b>33</b>
<b>Figure n°05</b> :Localisation de la wilaya de Blida.....	<b>34</b>
<b>Figure n°06</b> :Localisation du lieu de prélèvement .....	<b>34</b>
<b>Figure n°07</b> :Dispositif d'hydrodistillation type Clevenger.....	<b>37</b>
<b>Figure n°08</b> :Ampoule à décanter.....	<b>37</b>
<b>Figure n°09</b> :Principe de la méthode d'Aromatogramme.....	<b>39</b>
<b>Figure n°10</b> :Ensemencement des boites de pétri.....	<b>40</b>
<b>Figure n°11</b> :Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boite de Pétri.....	<b>41</b>
<b>Figure n°12</b> :Des disques déposés sur la gélose.....	<b>41</b>
<b>Figure n°13</b> : Etuve à 37°C.....	<b>42</b>
<b>Figure n°14</b> :Préparation de la solution de DPPH.....	<b>43</b>
<b>Figure n°15</b> :Dilution du DPPH.....	<b>44</b>
<b>Figure n°16</b> :Réaction de test DPPH.....	<b>45</b>
<b>Figure n°17</b> :Spectrophotomètre .....	<b>45</b>
<b>Figure n°18</b> : Rendement des huiles essentielles de <i>Rosmarinusofficinalis</i> .....	<b>47</b>
<b>Figure n°19</b> : Huile essentielle de <i>Rosmarinusofficinalis</i> . .....	<b>48</b>
<b>Figure n°20</b> : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des Bactérie d'automne.....	<b>49</b>
<b>Figure n°21</b> : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des Champignons d'automne. ....	<b>50</b>
<b>Figure n°22</b> : Illustration des zones d'inhibition des fongis d'automne .....	<b>51</b>
<b>Figure n°23</b> : Illustration des zones d'inhibition des bactéries d'automne.....	<b>51</b>
<b>Figure n°24</b> : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des Bactérie de la saison d'hiver.....	<b>52</b>
<b>Figure n°25</b> : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des Champignonsde la saison d'hiver .....	<b>52</b>
<b>Figure n°26</b> : Illustration des zones d'inhibition des fongis d'hiver.....	<b>53</b>
<b>Figure n°27</b> : Illustration des zones d'inhibition des bactéries d'automne.....	<b>54</b>
<b>Figure n°28</b> : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des Bactérie de la saison de printemps. ....	<b>54</b>

<b>Figure n°29</b> : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des Champignons de la saison de printemps. ....	<b>55</b>
<b>Figure n°30</b> : Illustration des zones d'inhibition des fongis de printemps.....	<b>56</b>
<b>Figure n°31</b> : Illustration des zones d'inhibition des bactéries de printemps.....	<b>56</b>
<b>Figure n°32</b> : Histogramme représente les résultats d'aromatogramme des Bactérie.....	<b>57</b>
<b>Figure n°33</b> : Histogramme représente les résultats d'aromatogramme des Champignons.....	<b>58</b>
<b>Figure n°34</b> : Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	<b>59</b>
<b>Figure n°35</b> :Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'HE de <i>Rosmarinusofficinalis</i> de la saison d'automne.....	<b>60</b>
<b>Figure n°36</b> :Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'HE de <i>Rosmarinusofficinalis</i> de la saison d'hiver.....	<b>60</b>
<b>Figure n°37</b> : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'HE de <i>Rosmarinusofficinalis</i> de la saison de printemps.....	<b>61</b>
<b>Figure n°38</b> : Le pourcentage d'inhibition des trois échantillons comparés à l'acide ascorbique.	<b>61</b>
<b>Figure n°39</b> : La concentration inhibant 50 % de la réaction .....	<b>64</b>
<b>Figure n°40</b> : Principaux composés identifiés dans l'HE d'automne.....	<b>66</b>
<b>Figure n°41</b> : Chromatogramme de CG/MS de HE d'automne .....	<b>67</b>
<b>Figure n°42</b> : Principaux composés identifiés dans l'HE d'hiver .....	<b>68</b>
<b>Figure n°43</b> : Chromatogramme de CG/MS de HE d'hiver.....	<b>69</b>
<b>Figure n°44</b> : Principaux composés identifiés dans l'HE de printemps.....	<b>70</b>
<b>Figure n°45</b> : Chromatogramme de CG/MS de HE de printemps.....	<b>71</b>
<b>Figure n°46</b> : Comparaison de la composition chimique des HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	<b>72</b>
<b>Figure n°47</b> : Comparaison des chromatogrammes de trois saisons .....	<b>73</b>

<b>Table des matières</b>	
<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>Partie bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Les plantes médicinales</b> .....	<b>3</b>
1. Généralité.....	<b>3</b>
2. Définition des plantes médicinales.....	<b>3</b>
3. Importance des plantes médicinales et aromatiques.....	<b>4</b>
4. Les plantes médicinales en Algérie.....	<b>4</b>
5. L'application des plantes médicinales et aromatique.....	<b>5</b>
6. Généralités sur la plante du romarin.....	<b>5</b>
7. Origine de la plante.....	<b>5</b>
8. Description botanique.....	<b>5</b>
9. Taxonomie.....	<b>8</b>
10. Noms communs et synonymes.....	<b>8</b>
11. Origine et Habitat.....	<b>8</b>
12. Les caractères phénologiques.....	<b>8</b>
13. Culture.....	<b>8</b>
14. Récolte.....	<b>8</b>
15. Localisations des huiles essentielles dans la plante.....	<b>8</b>
16. Principaux constituants.....	<b>9</b>
16.1. Huile essentielle.....	<b>9</b>
16.2. Phénols diterpéniques.....	<b>9</b>
16.3. Flavonoïdes.....	<b>9</b>
17. Propriétés du romarin.....	<b>10</b>
17.1. Action cholérétique.....	<b>10</b>
17.2. Action anti-hépatotoxique.....	<b>10</b>
17.3. Action spasmolytique.....	<b>10</b>
17.4. Action anti-inflammatoire.....	<b>10</b>
17.5. Activité antioxydante.....	<b>11</b>
17.6. Activités antibactérienne et antifongique.....	<b>11</b>
17.7. Activité antivirale.....	<b>11</b>
17.8. Activité antidiabétique.....	<b>11</b>
17.9. Propriétés anticarcinogènes .....	<b>11</b>
18. Utilisation.....	<b>12</b>
18.1. Usage alimentaire.....	<b>12</b>
18.2. En cosmétologie.....	<b>12</b>
18.3. Usage thérapeutique.....	<b>12</b>
18.3.1. Usage interne.....	<b>12</b>
18.3.2. Usage externe.....	<b>12</b>
19. Toxicité.....	<b>13</b>
<b>Chapitre II : Généralités sur les huiles essentielles</b>	<b>14</b>
1. Introduction .....	<b>14</b>
2. Historique sur les huiles essentielles .....	<b>14</b>
3. Définition des huiles essentielles .....	<b>15</b>



4. Le chémotype .....	15
5. Nomenclature des huiles essentielles .....	15
6. Comparaison entre huile végétale et huile essentielle .....	16
7. Les huiles essentielles des plantes médicinales et aromatique .....	17
8. Localisation des huiles essentielles dans la plante .....	17
9. Le rôle des huiles essentielles chez les plantes .....	17
10. Domaines d'utilisations des huiles essentielles .....	17
10.1. Domaine Agro-alimentaire .....	18
10.2. Domaine pharmaceutique .....	18
10.3. Domaine cosmétique .....	18
11. Méthodes d'extraction des huiles essentielles .....	19
11.1. L'hydrodistillation.....	19
11.2. Autres méthodes d'extraction.....	19
12. Propriétés physico-chimique des huiles essentielles.....	20
13. Conservation des huiles essentielles.....	21
14. Les propriétés fondamentales des Huiles Essentielles.....	21
14.1. Les propriétés anti-infectieuses et de défense de l'organisme .....	21
14.1.1. Le pouvoir antiseptique, antibactérien.....	21
14.1.2. Le pouvoir antiviral .....	22
14.1.3. Le pouvoir antifongique.....	22
14.1.4. Le pouvoir antiparasitaire.....	22
14.2. Le pouvoir insecticide.....	22
14.3. Antioxydant .....	23
15. Classification des huiles essentielles.....	23
16. Composition chimique des huiles essentielles.....	23
16 .1. Composés terpéniques.....	24
16.2. Composés aromatiques (phénylpropanoïdes).....	24
16.3. Groupe des lipides issus de la dégradation d'acide gras et de terpènes.....	25
17. Les paramètres influençant la composition qualitative et quantitative des huiles essentielles.....	25
18. Toxicité des huiles essentielles.....	25
19. La qualité des huiles essentielles.....	26
20. Les différents modes d'utilisation des huiles essentielles.....	26
21. Les huiles essentielles et la médecine.....	27
21.1. La phytothérapie.....	27
21.2. L'aromathérapie .....	27
22. Les huiles essentielles du <i>Rosmarinus officinalis</i> .L.....	28
22.1. Composition chimique.....	28
<b>Partie expérimentale</b>	
<b>CHAPITRE III : Matériel et Méthodes.....</b>	<b>31</b>
1. Objectifs du travail.....	<b>31</b>
2. Lieux d'expérimentation.....	<b>31</b>

3. Plan expérimental.....	32
4. Matériel biologique.....	33
4.1. Matériel végétal.....	33
4.2. Matériel microbiologique.....	35
5. Méthode d'analyses.....	35
5.1. Extraction de l'huile essentielle.....	35
5.2. Présentation du dispositif.....	36
5.3. Protocole expérimental d'extraction.....	37
6. Paramètres étudiés.....	38
6.1. Rendement des huiles essentielles.....	38
6.2 Analyses organoleptiques.....	38
6.3 Etude de l'activité antimicrobienne.....	38
6. 3.1. Le principe d'aromatogramme.....	39
6. 3.2. Préparation du milieu de culture.....	40
6. 3.3. Protocole expérimentale.....	40
6.4. L'activité antioxydante.....	43
6.4.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	43
7. Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse Couplée par Spectrophotométrie de Masse (CG/MS).....	46
<b>CHAPITRE V : Résultats et discussion.....</b>	<b>47</b>
1. Détermination du rendement.....	47
2. Résultats des analyses organoleptiques..	48
3. Evaluation de L'activité antimicrobienne de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	49
3.1. Etude de l'activité inhibitrice.....	49
4. Piégeage du radical libre DPPH. ....	57
4.1. Calcul des IC <sub>50</sub> .....	58
5. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	64
5.1. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>R. officinalis L.</i> d'automne.....	67
5.2. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>R. officinalis L.</i> d'hiver.....	68
5.3. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>R. officinalis L.</i> de printemps....	70
5.4. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>R. officinalis L.</i> des trois saisons	72
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>74</b>

# **INTRODUCTION**

### Introduction

L'Algérie de par sa situation géographique, possède une flore riche et diverse. Un grand nombre de plantes y poussent spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Leurs propriétés, dues notamment à la fraction huile essentielle, peuvent être mises à profit pour traiter les inflammations et les infections bactériennes (**Berton, 2004**).

Les plantes ont été employées depuis la préhistoire par l'humain pour des raisons nutritionnelles et thérapeutiques. Les plantes médicinales sont la source principale des drogues par leurs métabolites secondaires riches. Ainsi, les plantes médicinales sont les moyens principaux de lutter contre les maladies (**NsiAkoué, 2013**). Un grand nombre des plantes aromatiques, médicinales, des plantes épices et autres possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture (**Kokkini et al., 1997**). Parmi toutes les espèces végétales (800 000 à 1500 000 selon les botanistes), seulement 10% sont dites aromatiques (**Khia et al., 2014**).

Aujourd'hui encore, la science confirme les différentes vertus des plantes aromatiques et de leurs huiles essentielles et leurs extraits bruts dont les domaines d'application sont très variés (**Ait Hellal et al., 2011**).

Les huiles essentielles qui se composent de métabolites secondaires sont des mélanges volatils, naturels et complexes qui sont trouvés dans différentes comportement de plantes aromatiques. Une recherche massive a été récemment consacrée aux huiles essentielles dû à leurs caractéristiques multifonctionnelles, comme ayant antioxydant, antibactérien, antifongiques et activités antivirales (**Damyeh et al., 2016**).

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

En effet, plus de 5 000 substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont avérées utiles dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies (**Khia et al., 2014**).

## INTRODUCTION

---

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines des composés, principalement terpéniques. Les terpènes, molécules construites à partir d'entités isopréniques, constituent une famille très diversifiée, tant au niveau structural qu'au niveau fonctionnel. Dans les huiles essentielles, on rencontre généralement des mono et des sesquiterpènes (possédant respectivement 10 et 15 atomes de carbone) et plus rarement des diterpènes (20 atomes de carbone) ainsi que des composés linéaires non terpéniques et des phénylpropanoïdes (**Paolini ,2005**).

Les composants des huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leurs éventuelles utilisations comme alternative pour la protection des aliments contre l'oxydation. Les nombreuses propriétés naturelles des huiles essentielles en font des agents de conservation très prometteurs pour l'industrie alimentaire, le recours aux huiles essentielles s'avère être un choix pertinent face à un risque de contamination précis ou à la nécessité de réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques (**Barkat et Laib, 2011 ; Damyeh et Niakousari, 2016**).

L'objectif de ce travail consiste principalement à étudier l'effet saisonnier sur l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis L.*, extraite par hydrodistillation à partir d'une plante fraîche que nous avons séchée, en suite nous avons opté pour l'analyse antimicrobienne (par la méthode des disques), ainsi que l'évaluation des activités antioxydante (par méthode du DPPH) et l'analyse qualitative et semi quantitative en utilisant la CG/SM, et pour conclure nous avons fait la comparaison de ces résultats vis-à-vis la culture d'automne , d'hiver et de printemps.

# **CHAPITRE I:**

## **Les plantes médicinales**

## CHAPITRE I : PLANTES MEDICINALES

### I.1. Généralité

Depuis les temps les plus reculés et sur tous les continents, l'homme a cherché chez les végétaux sa nourriture et ses remèdes (**Ollier, 2011**).

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire. Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive. (**Farnsworth et al., 1985**).

La première ordonnance connue, au III<sup>e</sup> millénaire avant Jésus-Christ, en Mésopotamie, prescrivait déjà des remèdes à base de saule pour soigner les maux de tête. Les chinois connaissaient, bien avant notre ère, la préparation des extraits qui consistait à rassembler sous masse réduite tous les principes solubles des drogues en se débarrassant ainsi du volume fort en cambrant des matières inertes (**Kassel, 1996**).

Au 18<sup>e</sup> siècle, les plantes acquièrent leur identité. En effet, un double nom latin indique le genre et l'espèce et ce, grâce aux travaux de Carl Von Linné (**Kaller, 2004**).

### I.2. Définition des plantes médicinales

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Farnsworth et al., 1985**).

Environ 35000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (**Eqajetal., 2007**).

En médecine, les remèdes tirés des plantes portent le nom de préparation galénique (du nom Galien, médecin du premier siècle) (**Rameau et al., 2008**).

Une plante est dite Médicinale lorsqu'elle possède des propriétés médicamenteuses, les plantes aromatiques sont constituées par des organes apportant une odeur et une saveur destinées à améliorer un bien-être lors de la dégustation. Il peut s'agir soit d'une plante entière ou d'un organe particulier (feuilles, fleurs, fruits, bourgeons, grains, rhizome ou bulbe) (**Teusheretal, 2005**).

Les plantes médicinales portent à la fois sur les plantes spontanées dites « sauvages » ou « de cueillette » et sur les plantes cultivées.

### I.3. Importance des plantes médicinales et aromatiques

Le développement de l'industrie chimio-pharmaceutique a permis une révolution dans tous les pays du monde. Les méthodes d'extraction des principes actifs sont développées,

Les besoins en médicaments ont augmenté, et malgré l'existence des produits synthétiques, le recourt aux plantes médicales et aromatiques demeure très important. En parfumerie plusieurs plants grâce à leurs essences aromatiques sont recherchées tel que le jasmin, le rosier, la lavande et le géranium. Les huiles essentielles de ces plantes sont très recherchées et constituants la base de l'industrie de parfums et produits cosmétiques dans le monde.

### I.4. Les plantes médicinales en Algérie

L'Algérie a toujours été un pays riche en plantes médicinales et aromatiques, c'est un pays présentant une grande richesse en flore spontanée.

En effet plusieurs espèces se trouvent répandues sur des milliers d'hectares dans toutes les régions du pays (**Tableau n°1**).

**Tableau n°1 : Surfaces utilisées pour certaines plantes en Algérie (Gheyouche et Hammiche, 1998).**

Les plantes	Surfaces (hectares)
Romarin	6000
Lavande	23000
Menthe vert	47000
Sauge	220

L'Algérie attache de l'importance à ces plantes, puisque dans le domaine des industries pharmaceutiques, il existe un projet visant le développement de l'utilisation des principes actifs d'origine végétale dans la fabrication des médicaments. (**Gheyouche et Hammiche, 1998**).

Les substances contenues dans les plantes sont de nature chimique variée, certaines sont soluble dans l'eau, dans l'alcool, ou bien dans l'huile. On peut utiliser une plante seule ou en mélange avec plusieurs drogues, parfois même combinée avec d'autres préparations naturelles ou synthétiques (**Thurzova, 1981**). Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi synthèse (**Bahorun et al., 1997**).



En parfumerie plusieurs plantes grâce à leurs essences aromatiques sont recherchées tel que le jasmin, le rosier, la lavande, le géranium et le romarin. Les huiles essentielles de ces plantes sont très recherchées et constituent la base de l'industrie des parfums et produits cosmétiques dans le monde. L'Algérie attache encore de l'importance à ces plantes, puisque dans le domaine des industries pharmaceutiques, il existe un projet visant le développement de l'utilisation des principes actifs d'origine végétale dans la fabrication des médicaments (**Gheyouche et Hammiche, 1998**).

### **I.5. L'application des plantes médicinales et aromatique**

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaires, cosmologique ou en médecine. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutiques. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche montre chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières (**Bahorun et al., 1997**).

### **I.6. Généralités sur la plante du romarin**

Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) est un arbrisseau de la famille des Labiées, répandu sur toutes les rives de la méditerranée (**Gildemeister et Hoffmann, 1912**). Il est dominant dans les communautés arbustives post-feu, principalement dans les sols calcaires. Il s'agit d'un germe à semences obligatoire et à floraison abondante. Son caractère ensoleillé et son effort de reproduction élevé lui permettent de coloniser les paysages découverts (**Sardans et al., 2005**).

### **I.7. Origine de la plante**

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

Il s'est également appelé les « autos » par les grecs anciens, qui est « Power de la Floride », ou des « libanotis » en raison de son odeur d'encens (**Ribeiro-Santos et al., 2015**).

### **I.8. Description botanique**

Le romarin est une plante aromatique qui a été connue des périodes antiques comme herbe de mémoire (**Sasikumar, 2012**), appartient à la famille des labiées. Elle se présente sous forme d'arbuste, sous arbrisseau ou herbacée.

Le romarin est un arbrisseau touffu, xérophyte, toujours vert très aromatique, fortement rameux, très feuillé, à racine pivotante, à tiges ligneuses, généralement érigées, mesurant environ de là 2 m (**Teuscher et al., 2005**).

Les feuilles sont rigides, axillantes dans les parties herbacées des rameaux (**Volak et Stodola, 1984**), linéaires à marge, révolutes mesurant 2cm de longueur sur 2mm de largeur (**Bouloued ,2014**), opposées et sessiles, étroites et lancéolées ; leur port est raide, leur texture coriace ; leur limbes épais cassants, verts foncés sur la surface supérieur et blanchâtres sur la surface inférieur, son bords sont enroulés sur le dessous et la nervure médiane est saillante (**Rombi et Robert, 2007**).

Les inflorescences sont épis de fleurs zygomorphes, caduques, regroupées en petites grappes denses axillaires ou terminales disposées à l'aisselle des feuilles ;calice gamosépale 3-lobé ; corolle est longuement tubuleuse de 1,2cm de large et de 10 -12 mm de long ,bleue pâle lilas ou blanche mais souvent maculée de petites taches violettes avec lèvre supérieure en casque bilobé et lèvre inférieure à 3 lobes dont un médian plus large ,androcée réduit à 2 étamines fertiles, munies à la base d'une petite dent et terminées par une anthère ;le gynécée qui repose sur un disque nectarifère formé de 2 carpelles soudées : l'ovaire est supère divisé en 2 loges contenant chacune 2 ovules.

(**Teuscher et al., 2005 ; Rombi et Robert 2007; Wolfgang, 2008 ; Miam et al., 2013**).

Le fruit est un tétrakène lisse et globuleux, brun foncé de 2,3 mm de long (**Teuscher et al., 2005**).



**Figure n° 1** : Sommité fleurie et fleur de *Rosmarinus officinalis* (**Bouloued, 2014**)

### I.9. Taxonomie

La classification botanique est du genre *Rosmarinus* L. n'était achevée qu'au début du 20ème siècle en raison de l'extrême variabilité des espèces. Le romarin appartient à la deuxième famille des labiées ou lamiacées qui en compte six.

Cette famille, est l'une des plus importants de la flore d'Algérie, compte plus de 200 genres et 3500 espèces (**Bolens, 1985**).

**Tableau n°2 :Classification du romarin (Quezel et Santa ,1963).**

	<b>Romarin</b>
Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaire
embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Gamopétales
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae (ou labiées)
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.

### I.10. Noms communs et synonymes

**Tableau n°3 : Noms communs et synonymes (Beloued, 2010).**

Noms communs	Herbe aux couronnes, Encensier, Herbe des troubadours Rose des marins, Rose de la mer, Rose marine
Nom vernaculaire en arabe	Klil, Hatssalouban, hassalban.
Noms targui ou berbère	Lazir, Azir, Ouzbir, Touzala

### I.11. Origine et Habitat

Le romarin est une plante thermophile mais le jeune plant peut craindre les gelées. Sur les rivages marins (Gilly, 2005).

Il pousse spontanément dans les régions méditerranéennes où il croit dans les terrains calcaires (le pH idéal pour le romarin serait entre 6 et 7,5), les lieux secs et arides du midi surtout au voisinage du littoral, en Corse ; dans tout le bassin méditerranéen (Goetz et Ghedira, 2012).

Des collines de faible altitude et des garrigues en particulier en France et en Afrique de nord (Rombi et Robert, 2007).

### I.12. Les caractères phénologiques

- Période de floraison : de mai à juillet (Teuscher et al., 2005).
- Plantation, repotage : Printemps.
- Méthode de multiplication : le romarin fertile se multiplie par graine, par bouture, et éclat de touffe (Gilly, 2005).

### I.13. Culture

Affectionnant le soleil et le sol bien drainés, plutôt maigres, le romarin tolère les embruns. On le plante en haie basse ou sujet isolé. Tailler régulièrement pour maintenir compact, multiplier par semi ou bouturage en été (Bournie et al., 2006).

### I.14. Récolte

La barre de coupe est placée à 30cm du sol. On récolte que de 12 à 18 mois après plantation, en pleine floraison, au printemps pour l'huile essentielle et en septembre-novembre pour l'herboriste (Gilly, 2005).

On récolte les feuilles, avec les plus jeunes pousses par temps chaud et ensoleillé. Elles sont ensuite mises à sécher sur des claies à l'ombre et dans un endroit bien aéré ou dans un séchoir à 35°C au maximum. Les feuilles séchées dégradent une forte odeur enivrante et présentent une saveur amère (Blot et Gouillier, 2013).

### I.15. Localisations des huiles essentielles dans la plante

La partie active est la feuille entière séchée du *Rosmarinus officinalis*. Elle doit contenir au minimum 1,2% d'HE et 3% de dérivés hydroxycinnamiques totaux, exprimés en acide rosmarinique (Rombi et Robert, 2007).

## I.16. Principaux constituants

### I.16.1. Huile essentielle

La composition d'HE dépend fortement des chémotypes ainsi que de degré de développement de la plante.

Ses principaux constituants peuvent être du :

- . 1,8-cinéole (teneur entre 3 et 60%).
- . L' $\alpha$ -pinène (1 à 57%).
- . Camphre (1 à 57%).
- . Boméol (1 à 18 %).
- . L'acétate de bomer (1 à 21%).
- . Verbénone (0 à 28%).
- . P-cymène (0,5 à 10%) ou de myrcène (0,5 à 12%).

Ils peuvent être accompagnés de  $\beta$ -pinène, de sabinène, de  $\gamma$ -terpinène, d' $\alpha$ -terpinéol et de terpinéo 1-4 ; la présence d'ocan-3-one (teneur allant jusqu'à 10%) est contestée.

Cette espèce très polymorphe, présente plusieurs variétés. Mais à cette différenciation morphologique très aléatoire, nombreux botanistes préfèrent s'appuyer sur la composition chimique de l'huile essentielle pour lister quatre chémotypes, suivant le composé dominant (**Chaumont et Millet-Clerc, 2011**)

- L'HE de romarin à cinéole.
- L'HE de romarin à verbénone.
- L'HE de romarin à camphre, boméol.
- L'HE de romarin à myrcène.

### I.16.2. Phénols diterpéniques

Constitués principalement :

- . D'acidecamosolique (environ 0,3 5%) qui se dégrade facilement en camosol.
- . D'isorosmanol.
- . De rosmariquinone.
- . De rosmafidiol.

### I.16.3. Flavonoïdes

Présents sous forme d'aglycones et d'hétérosides comme la cirsimarine, la diosmine, l'hespéfidine, l'homopla, tiginine (**Figure n°3**) (**Teuscher et al., 2005**).

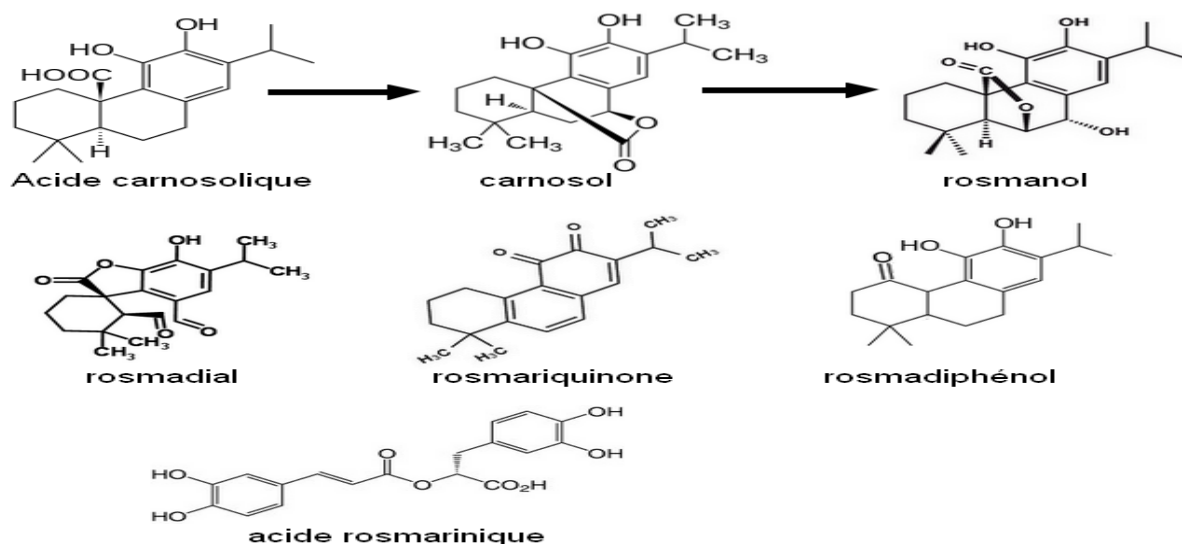


Figure n° 2 : Compositions phénoliques caractéristiques des extraits du romarin.

### I.17. Propriétés du romarin

L'expérimentation animale et biologique permet de confirmer certaines des propriétés que la tradition prête au romarin.

#### I.17.1. Action cholérétique

La feuille de romarin est réputée cholérétique, action confirmée expérimentalement chez l'animal, à forte dose et par voie parentérale ; elle est surtout due aux principes amers.

#### I.17.2. Action anti-hépatotoxique

L'évaluation de l'extrait aqueux de la feuille sur les hépatocytes en culture met en évidence l'action protectrice de cet extrait à l'égard des effets de l'hydroperoxyde de ter-butyle. Elle est constatée in vivo sur différents modèles à doses de 1 et 1,5 g/ kg.

#### I.17.3. Action spasmolytique

Cette action est mise en évidence sur l'iléon de cabaye stimulé électriquement ou par l'acétylcholine ainsi sur le muscle trachéal du lapin stimulé par l'histamine et rapportée à l'HE.

#### I.17.4. Action anti-inflammatoire

Elle est due à l'acide rosmarinique et mise en évidence chez le rat par l'œdème à la carragénine. Chez la souris, l'inflammation au TPA (12-O-tétradécanoylphorbol) est réduite par application topique d'extrait.

**I.17. 5. Activité anti-oxydante**

L'activité anti-oxydante d'extraits de romarin a été mise en évidence sur différents modèles et avec divers produits alimentaires (lipides, viandes, charcuterie ...). Cette activité ; en partie liée à l'acide rosmarinique, est due à 90% aux O-diphénols diterpéniques (camosol et acide carnosolique) qui inhibent la peroxydation lipidique.

**I.17.6. Activités antibactérienne et antifongique**

L'HE et l'extrait chloroformique des parties aériennes exercent une activité antibactérienne à un large spectre d'application. Elle est due aux principaux constituants de l'extrait chloroformique qui est efficace sur *Helicobacter pylori* (acide carnosolique, carnosol et 12-méthoxy-trans-acide camosolique).

L'HE est bactéricide en vis-à-vis *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Echerichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*.

L'activité antifongique est moins marquée et s'exerce notamment vis-à-vis de *Fusarium graminearum*.

**I.17.7. Activité antivirale**

L'activité antivirale in vitro a été mise en évidence sur Herpes virus simples de type 2 et HIV et rapportée pour le camosol.

**I.17.8. Activité antidiabétique**

En ce qui concerne l'effet hypoglycémiant d'un extrait éthanolique administré par voie orale chez des lapins normoglycémiques et hyperglycémiques à des doses allant de 50 à 200 mg/kg. L'effet optimal a été observé à une dose de 200 mg/kg. Cette activité est indépendante des effets de l'insuline. Chez les lapins diabétiques (diabète introduit par l'alloxane), la même dose d'extrait diminue de façon significative les niveaux de la glycémie et augmente la concentration sérique d'insuline.

**I.17.9. Propriétés anticarcinogènes**

Ont été trouvées au camosol et son mécanisme d'action a été étudié dans des tests in vitro sur des cellules de souris. Une étude indique que l'acide carnosolique et le carnosol sont les constituants majeurs de l'extrait de romarin susceptibles de promouvoir la synthèse des NGF dans les cellules T98G humaines. Une activité inhibitrice de l'agrégation plaquettaire a été mise

en évidence in vitro et in vivo permettant d'envisager un effet préventif antithrombose du romarin (**Rombi et Robert, 2007 ;Goetz et Ghedira, 2012** ).

## **I.18. Utilisation :**

### **I.18.1. Usage alimentaire**

Le romarin est une bonne source naturelle de composés antioxydants. Il est largement utilisé dans l'industrie alimentaire pour prévenir une éventuelle dégradation oxydative et microbienne des aliments (**Bousbia, 2011**).

En cuisine, il est conseillé d'en utiliser quelques feuilles lors de la cuisson (les viandes, le poulet, les légumes, les poissons et les coquillages), car ses propriétés bactéricides permettent de réduire les toxines de putréfaction (**Bourgeois, 2007**).

### **I.18.2. En cosmétologie**

Le romarin entre dans la composition de parfums surtout masculins, hespéridés aromatiques boisés et fugères aromatiques, ainsi que dans la formulation des pommades dermiques (**Bousbia, 2011**) pour leur pouvoir aromatique et aussi leur action régénérant et hydratante (**El goudour, 2003**).

### **I.18.3. Usage thérapeutique**

#### **I.18.3.1. Usage interne**

Stimulant général, tonicardiaque, antiseptique, pulmonaire, carminatif, asthénie, surmenage, chlorose, asthme, goutte, bronchite, hépatisme, dyspepsie atonique, migraines, vertiges, syncopes.

➤ Mode d'emploi

• **Infusion** : une cuillère à dessert de feuilles ou de fleurs par tasse d'eau bouillante, laisser infuser 10m et prendre une tasse avant et après chaque repas.

• **Essence** : 3 à 4 gouttes par jour sur un morceau de sucre.

#### **I.18.3.2. Usage externe**

Cicatrisant et parasiticide, plaies, brûlures, fatigue, rhumatismes.

➤ Mode d'emploi



- **Décoction** : Une poignée de sommités par litre d'eau. Bouillir 10 mn ; en compresses contre les rhumatismes, en bains fortifiant, à prendre le matin de préférence en cas de fatigue.

- **Teinture** : Laisser macérer durant 10 jours 20g de feuilles desséchées et concassées dans 80g d'alcool à 70°.Prendre 20 à 40 gouttes sur un morceau de sucre ou dans une tisane (Alloun,2007).

### **I.19. Toxicité**

Des effets secondaires n'ont pas mentionnés quand le romarin est utilisé correctement aux doses adéquates (jusqu'à 20 gouttes par jours) ; la poudre de plante totale elle-même n'est pas toxique : un lyophilisat de jeunes pousses peut être administré sans problèmes jusqu'à la dose 22 g/kg ; mais à forte dose peut être toxique.

L'ingestion de doses élevées d'HE de romarin provoque des hémorragies gastriques, de l'albuminurie, une dégénérescence graisseuse du foie et du rein.

La toxicité de l'HE se manifeste par une action épiléptogène : Eucalyptol et camphre inhibent in vitro la respiration tissulaire du cortex cérébral de rat (Teuscher et al., 2005 ; Rombi et Robert, 2007).

**CHAPITRE II:**  
**Généralités sur les**  
**huiles essentielles**

## CHAPITRE II : GENERALITE SUR LES HUILES ESSENTIELLES

### II.1. Introduction

De nos jours, l'usage des huiles essentielles est très répandu dans les domaines de la pharmacologie, la Cosmétique, l'agroalimentaire, et récemment l'agro phytosanitaire, et leurs propriétés thérapeutiques font l'objet de nombreuses recherches scientifiques.

### II.2. Historique sur les huiles essentielles

Les végétaux furent pendant des millénaires utilisés pour combattre les maladies, les plantes aromatiques étaient brûlées, ou mises à infuser ou à macérer dans des huiles végétales (**Kaloustian et Hadji-Minaglou , 2013**). L'utilisation des huiles essentielles (parfums et aromates) remonte à l'antiquité. Les Egyptiennes les utilisaient sous forme de bains aromatiques. (**Sallé, 1991**). Aussi bien pour honorer les dieux en Egypte à l'époque de pharaons que pour parfumer le corps.

Pendant la période où la peste faisait des ravages à Marseille (1720), le fameux « vinaigre des quatre voleurs », constitué d'un mélange de vinaigre de cidre et de plusieurs plantes aromatiques permit à quatre voleurs, après s'être enduits le corps de cette préparation, d'entrer dans les maisons, pour cambrioler, sans être inquiétés par l'épidémie. Ils étaient immunisés contre ce fléau.

En médecine traditionnelle, plusieurs principes actifs odorants des huiles essentielles furent isolés, d'où leur utilisation spécifique. C'est en 1930 que le chimiste français René Maurice Gatte Fosse utilisa le terme d'aromathérapie pour désigner les pratiques médicales utilisant les huiles essentielles (**Kaloustian et Hadji-Minaglou , 2013**).

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances. Depuis deux décennies, des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles dans différents domaines (**Zhiri, 2006**).

### II.3. Définition des huiles essentielles

L'huile essentielle est le parfum des plantes aromatiques. Elle s'appelle aussi l'essence ou l'huile volatile qui est un produit de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatiles contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation (**Bruneton, 1999**).

La dénomination « huile essentielle » a été définie par l'**AFNOR dans la norme NFT75-006 de 1998**, comme une matière première aromatique d'origine naturelle. Cette définition est reprise par la norme internationale **ISO 9235 (2010)**. Ainsi, une huile essentielle est un produit odorant, généralement de composition complexe obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage.

L'Association Française de Normalisation, a défini les huiles essentielles comme étant : des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques (**AFNOR, 2000**).

### II .4. Le chémotype

Il définit la molécule aromatique révélatrice des principales propriétés thérapeutiques de l'huile essentielle. Une plante de même variété botanique peut produire des huiles essentielles de compositions chimiques différentes selon son origine, son pays, son climat et son sol. Une huile essentielle peut contenir de vingt-cinq à cent molécules biochimiques différentes. Ce qui explique la polyvalence d'action des huiles essentielles. On effectue une chromatographie en phase gazeuse liée à une spectrométrie de masse pour identifier et quantifier chacune de ces molécules et connaître ainsi la composition précise des huiles essentielles (**Baudouxet Zhiri, 2009**). Les huiles sont aussi appelées : essence de plante, essence aromatique, essence végétale (**Sallé, 1991**).

### II .5. Nomenclature des huiles essentielles

Selon la Norme **AFNOR NF - T75.006 - 10/87** des huiles essentielles il existe une nomenclature propre qui permettra d'identifier de manière certaine l'huile essentielle :

- Le nom latin : Le nom français est insuffisant pour la reconnaître.

- Le chémotype : Le chémotype permet d'identifier les composants biochimiques majoritaires d'une huile essentielle.
- Le procédé d'extraction : la plupart des huiles essentielles sont obtenues par distillation.
- L'origine d'extraction : On peut extraire les essences de différentes parties de la plante utilisée pour l'extraction : la fleur, la feuille, la racine, la graine.

## II.6. Comparaison entre huile végétale et huile essentielle

Les huiles végétales sont les résultats de l'extraction d'une huile brute ou raffinée, mais sans modification chimique, à partir de plantes oléagineuses par simple pression à froid (de préférence) (Couic-Mainier, 2014).

Comme les huiles végétales, les huiles essentielles sont hydrophobes, totalement solubles dans l'alcool mais insolubles dans l'eau. Cependant, elles présentent des différences qui sont résumés dans le Tableau 2.

**Tableau° 2** : Comparaison entre l'huile végétale et l'huile essentielle (Stewart, 2005).

Huile essentielle	Huile végétale
Distillé à partir de parties des plantes	Pressée à partir des graines
Ne participe pas à la germination des semences et la croissance précoce semences	Indispensable pour la germination des semences
Petite molécule	Grosse molécule
Aromatique et volatile	Non aromatique et non volatile
Peuvent traverser les tissus, les parois et les membranes cellulaires	Ne traverse pas les tissus, les parois et les membranes cellulaires
Non grasse au toucher	Grasse au toucher
Présente des propriétés : antimicrobienne, antifongiques, antiparasitaires et antiseptique	Ne présente aucune de ses propriétés

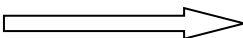
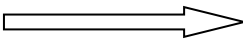
### I.7. Les huiles essentielles des plantes médicinales et aromatique

Les parfums qu'exhalent certaines plantes sont dus à des molécules volatiles que l'on désigne globalement par le terme essence. L'huile essentielle correspond à l'extrait obtenu par entraînement à la vapeur d'eau de l'organe végétal où a lieu stockage de l'essence. Ces composés volatils ont la propriété d'être solubles dans l'huile et les graisses et ont de ce fait le nom d'huiles essentielles. Le terme huile souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances (**Willem, 2002**).

### II .8. Localisation des huiles essentielles dans la plante

La partie de la plante utilisée pour obtenir les huiles essentielles doit être précisée (fleurs, feuilles, écorces, bois, rhizomes, fruits secs, graines). L'huile essentielle se trouve dans des cellules sécrétrices spécifiques. Ce sont des structures histologiques spécialisées servant à leur synthèse et à leur stockage. Les cellules sécrétrices sont rarement à l'état isolé, mais le plus souvent regroupées dans des poches, canaux sécréteurs ou dans des poils sécréteur. Ces cellules sont le plus souvent à la périphérie des organes extérieurs de la plante (**Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2013**).

Selon l'organe producteur des huiles essentielles on choisie la méthode d'extraction (**Zahalka, 2015**).

- A partir de feuille et fleur par  distillation.
- A partir du zeste par  expression (cas de citrus).

### II .9. Le rôle des huiles essentielles chez les plantes

Les huiles essentielles permettent aux plantes de s'adapter à leur environnement et assurer leur ultime défense, elles jouent plusieurs rôles écologiques:

-Interaction plante- plante (inhibition de la germination et de la croissance).

-Interaction plante animale.

-Pour leur protection contre les prédateurs. (**Fouché et al., 2008**).

### II .10. Domaines d'utilisations des huiles essentielles

Les huiles essentielles des plantes ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (**Amarti et al., 2010**).

### II .10.1. Domaine Agro-alimentaire

Dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires et peuvent également être employés en tant que pesticides (**Roquebert, 2002**).

Les huiles essentielles sont utilisées comme un potentiel agent naturel de conservation, pour améliorer la durée de vie en post-récolte et pour contrôler les phytopathogènes dans l'industrie alimentaire (**Touaibia, 2014**). Cette orientation trouve son origine du fait que la production des huiles essentielles par les plantes est un moyen de défense contre les pathogènes et les radiations (**Laghchimi et al., 2014**).

### II.10.2. Domaine pharmaceutique

Beaucoup d'huiles essentielles ont des propriétés médicinales qui ont été utilisées en médecine traditionnelle depuis des temps très anciens et qui sont largement répandues, par exemple :

- L'huile essentielle de menthe poivrée qui est utilisée contre les maux de tête.
- L'huile essentielle d'arbre à thé qui est un antiseptique à large spectre.
- L'huile essentielle de clou de girofle qui est un analgésique puissant, comme antiseptique, et pour un certain nombre d'usages médicaux.

Les huiles essentielles ont un grand intérêt en pharmacie. Elles s'utilisent sous forme de préparations galénique et dans la préparation d'infusion. Aussi, elles s'emploient pour leurs propriétés aromatisants pour masquer l'odeur désagréable des médicaments destinés à la voie orale (**Sallé, 1991**).

### II .10.3. Domaine cosmétique

L'industrie des cosmétiques et le secteur des produits d'hygiène sont également des consommateurs, même si le cout souvent élevé des produits naturels conduit parfois à privilégier, pour les formulations de grande diffusion, les produits synthétiques.

A la limite de la pharmacie et des produits d'hygiène, on notera la présence d'huiles essentielles dans les préparations pour les bains « calmants » ou « relaxants ». On notera qu'il ya à la une possibilité d'absorption percutanée des constituants terpéniques. (**Bruneton, 1999**).

Les produits de soin personnel comprenant des stimulants, des parfums, des protections solaires, des antimicrobiens, et des insectifuges sont des contaminants naissants qui ont attiré beaucoup d'attention ces dernières années (**Feiran et al.,2015**).

Les huiles essentielles, à l'état dilué, sont utilisées dans les parfums et les eaux de toilette (**Kaloustian et Hadji-Minaglou ,2013**).

## **II .11. Méthodes d'extraction des huiles essentielles**

Le choix du procédé d'extraction influe directement sur la qualité des produits et sur le rendement de l'extraction.

Il est orienté par la localisation histologique et la composition chimique de ces essences :

La pharmacopée française ainsi qu'AF.N.O.R et I.S.O admettent seulement deux :

- L'entraînement à la vapeur d'eau.
- L'expression à froid des péricarpes frais de certains citrus.

### **II .11.1. L'hydrodistillation**

Hydrodistillation est l'une des méthodes les plus anciennes employées pour obtenir les huiles essentielles des plantes. Il est exécuté dans le laboratoire et à l'échelle industrielle. Dans ce dernier cas, l'hydrodistillation peut être exécutée dans des appareils qui diffèrent selon le laboratoire, en ce qui concerne la génération de vapeur.

parmi les types : Clevenger, où la matière végétale est placée dans l'eau dans un ballon à fond arrondi, et des huiles essentielles sont condensées tandis que le matériel de plante/eau est bouilli pour 1-3 H (**Jelen et al.,2015**).

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait (**Lucchesi, 2005**).

### **II .11.2. Autres méthodes d'extraction**

Il existe plusieurs méthodes d'extraction mis à part l'hydrodistillation :

- **La méthode de distillation** : qui consiste à séparer un marqueur du carburant. (**Croud et al., 2016**).



- **Entraînement à la vapeur d'eau** : c'est est une technique utilisable pour certain agrumes, réalisée dans certains pays uniquement (**Salle, 1991**).

- **L'hydrodiffusion ou la percolation** : Ce procédé s'applique aux huiles essentielles facilement entraînables (**Fernandez et al.,2012**).

- **L'expression (ou pression à froid)** : Les huiles essentielles des agrumes sont les seules à être extrait par ce procédé qui est basée sur la rupture des parois des sec oléifères (**Ferhate, 2010**).

- **Extraction par micro-ondes** : la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-ondes (**Bruneton, 1993**).

- **L'extraction par les fluides supercritiques** : Cette méthode a été développée dans l'industrie agroalimentaire afin d'améliorer les rendements d'extraction (**Kaloustian, 2012**).

- **Extraction par solvant** : nous utilisons cette méthode en cas d'HE qui ont une densité voisine de l'eau (**Sallé, 1991**).

- **L'enfleurage** : Cette méthode n'est presque plus utilisée, car elle est très coûteuse (**Sallé, 1991**), il existe plusieurs types d'enfleurage : l'enfleurage à froid, l'enfleurage à chaud, l'enfleurage à huile (**Millet, 2013**).

## II .12. Propriétés physico-chimique des huiles essentielles

La plupart des huiles essentielles présentent les propriétés suivantes :

Les huiles essentielles sont liquides par fois visqueuses, inflammables, totalement solubles dans les huiles végétales (**Zahalka, 2015**).

Les huiles essentielles sont solubles dans les solvants organiques (l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes ...). Leur point d'ébullition varie de 160° à 240°C, Leur densité est en général inférieur à celle de l'eau, elle varie de 0.75 à 0.99, Elles ont un indice de réfraction élevé.

- Elles sont dextrogyres ou lévogyres, rarement inactives sur la lumière polarisée.
- Elles dissolvent les graisse, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels.
- Elles sont très altérables et sensible à l'oxydation.
- Incolores ou jaunes pâles (**Bekhachi et al., 2014**).

Il est important de distinguer entre les huiles essentielles, les huiles fixes (huile d'olive...) et les graisses contenues dans les végétaux. En effet :

Seules les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes et les graisses, Cette volatilité explique leur caractère odorant ainsi que leur mode d'obtention par entraînement à la vapeur d'eau (Couic-Mainier et Annelise ,2013).

### **II .13. Conservation des huiles essentielles**

La conservation des HE nécessite quelques précautions .Le flacon doit être opaque, protégé de la lumière (généralement de couleur brune pour les HE et bleue foncée pour les hydrolats) et de la chaleur. Il doit être soigneusement fermé après chaque usage (Couic-Mainier et Annelise ,2013).Ces dernières se conservent à 3 C° ou 4 C° (Sallé, 1991). Une huile essentielle peut se conserver très longtemps, cela se compte en années. Certaines au bout de 2 ou 3 années, elles perdent un peu de leur parfum et de leurs propriétés thérapeutiques (Alix ,2012).

### **II .14. Les propriétés fondamentales des Huiles Essentielles**

Les huiles essentielles ont été testées sur différentes cibles en protection des cultures : les insectes, les micro-organismes (champignons et bactéries), les adventices et aussi en protection des semences (Iteipmai ,2013).

#### **II .14.1. Les propriétés anti-infectieuses et de défense de l'organisme**

Les huiles essentielles et autres extraits obtenus à partir de matières végétales possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales. Elles sont actuellement considérées comme des alternatives potentielles aux antibiotiques pour traiter diverses maladies infectieuses (Fernandez et Chemat, 2012).

##### **II .14.1.1. Le pouvoir antiseptique, antibactérien**

Les constituants antibactériens des plantes médicinales et leur utilisation pour le traitement des infections microbiennes en tant que solutions de rechange possibles aux drogues synthétiques auxquelles beaucoup de micro-organismes infectieux sont devenus résistants semblent être prometteurs. Au cours des 20 dernières années, il y a eu beaucoup d'intérêt pour l'enquête sur les matériaux naturels comme sources de nouveaux agents antibactériens (Mary et al., 2012).

La grande majorité des études sur l'activité antibiotique des huiles essentielles porte sur les micro-organismes pathogènes pour l'homme ou qui altèrent sa nourriture. Les huiles essentielles les plus efficaces sont riches en phénols (thymol, carvacrol, eugénol) ou en aldéhyde

cinnamique, bien que quelques alcools (linalol, terpinène-4-ol...) montrent dans certains cas une activité intéressante (**Ghazghazi et al., 2013**).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K<sup>+</sup>). En général, les bactéries Gram- sont plus résistantes que les Gram + grâce à la structure de leur membrane externe (**El Amri et al., 2014**).

#### **II .14.1.2. Le pouvoir antiviral**

Les virus sont assez sensibles aux huiles essentielles à phénol et à monoterpénol. Plus d'une dizaine d'huiles essentielles possèdent des propriétés antivirales. Nous pouvons citer l'huile essentielle de ravintsara, l'huile essentielle de bois de Hô ou l'huile essentielle de cannelle de Ceylan (**Purchon, 2001**).

#### **II.14.1.3. Le pouvoir antifongique**

L'augmentation de la résistance aux fongicides et aux coûts conventionnels a impliqué, de la recherche de la nouvelle alternative thérapeutiques plus efficaces qui respecte l'environnement, et d'être moins toxique pour le traitement des infections fongiques. Parmi ces nouvelles approches, les huiles essentielles sont les composés naturels prometteurs pour l'usage dans la prévention et le traitement des infections fongiques (**Asdadi et al., 2015**). Avec l'intérêt croissant d'utilisation des HE ou d'extraits de plante dans la nourriture et les industries pharmaceutiques, l'examination des extraits des plantes pour ces propriétés est devenu très importants (**Sharifzadeh et al., 2015**).

#### **II .14.1.4. Le pouvoir antiparasitaire**

Les molécules aromatiques possédant des phénols ont une action puissante contre les parasites. Le thym à linalol, la sarriette des montagnes sont d'excellentes huiles essentielles antiparasitaires (**Purchon, 2001**).

#### **II .14.2 . Le pouvoir insecticide**

Les activités des huiles essentielles décrites sur les insectes sont variées : larvicides, adulticides, répulsifs ou inhibiteurs de croissance. La plupart des huiles essentielles agissent en perturbant la structure de la membrane cellulaire mais, pour certaines, des effets neurotoxiques ont pu être mis en évidence (**Iteipmai ,2013**).

### II .14.3. Antioxydant

Dans ce contexte, les huiles essentielles constituant une source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet de nombreuses études concernant leurs éventuelles utilisations en tant qu'antioxydants (**Fernandez et Chemat, 2012**). Les relations entre l'effort oxydant et les antioxydants sont très souvent expliquées d'une façon très simple. D'abord, des espèces réactives de l'oxygène sont réagies ensemble en tant qu'une entité fonctionnelle produisant des composés de destruction tels que les produits secondaires de peroxydation de lipide. Cependant, il y a beaucoup de différentes espèces réactives de l'oxygène qui ont des rôles distincts et essentiels en physiologie normale et exigé pour un grand choix de processus normaux.

L'oxygène réactif toxique peut être produit par beaucoup de sources telles que le rayonnement ultraviolet (UV) et la chaleur de la lumière du soleil. Ces espèces sont essentiellement réactives et agissent l'un sur l'autre avec un certain nombre de molécules et de métabolites cellulaires menant de ce fait à un certain nombre de processus destructifs causant des dommages de cellules et de maladies neuro-dégénératives (**Rabia et al., 2012**).

### II.15. Classification des huiles essentielles

Selon le pouvoir spécifique sur les germes microbiens, et grâce à l'indice aromatique obtenu par des aromatogramme, les huiles essentielles sont classées en 3 groupes (**Sallé, 1991**):

- **Les huiles majeures** : elles agissent aussi bien sur les bacilles à gram+ ou à gram-, leur action bactéricides est constant et forte, elles sont appelées essences de germe.
- **Les huiles médiums** : elles sont moyennement antiseptiques.
- **Les huiles terrains** : ont un pouvoir bactéricide ou bactériostatique selon les individus

### II .16. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique d'une huile essentielle est très complexe et soumise à de très nombreuses variables. Connaître avec exactitude les constituants d'une huile essentielle est fondamental, à la fois pour vérifier sa qualité, expliquer ses propriétés et prévoir sa toxicité potentielle (**Couic-Mainier et Annelise, 2013**).

Les composants des huiles essentielles peuvent être partagés en trois grands groupes (**Bourrain, 2013**).

- les terpènes : monoterpènes et terpènes sesquiterpéniques dont les formes oxydées, les hydroperoxydes sont sensibilisants.
- les composés aromatiques, ex : alcool cinnamique, coumarine.

- d'autres composés très divers (acides, alcools, aldéhydes, esters. . .).

### II .16 .1. Composés terpéniques

Les terpènes sont des métabolites secondaires jouant un rôle de défense des plantes et d'attraction des pollinisateurs. Il s'agit de polymères d'isoprène (CSHS), principalement des dimères (monoterpènes C10), trimères (sesquiterpènes C15), tétramères (diterpènes (C20)), hexamères (tri- terpènes C30) et tétraterpènes (carotènes C40). Les mono et sesquiterpènes sont les constituants majoritaires des huiles essentielles (**Cibaka et al., 2014**).

Ils sont classés selon :

- leurs fonctions : alcools (géranol, linalol), esters (acétate de linalyle), aldéhydes (citral, Citronellal), cétones (menthone, camphre, thuyone), éthers-oxydes (cinéole).

- Leur structure : linéaire (famésène, farnésol), monocyclique (humulène, zingiberène), bicyclique (cadinène, caryophyllène, chamazulène) ou tricyclique (cubébol, patchoulol, viridiflorol) (**Couic-Mainier et Annelise, 2013**).

- Les monoterpènes : Constituants les plus simples de série, les monoterpènes sont issus de deux unités « isopréniques ». Ils peuvent être acycliques (Mycènes, ocimène), monocycliques (α et γ-terpinène, p-cymène) ou bicycliques (pinène, camphène, ocimène). Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (citrus). Les variations structurales justifient l'existence de nombreuses molécules : alcools (geraniol, α-terpineol, baméol, trans-trans-farnésol), phénols (thymol), aldéhydes (citronellal), cétones (carvone, B-vetivone), esters (acétate de caryophyllène), éthers (1,8-cinéole). Lorsque la molécule est optiquement active, les deux énantiomères sont le plus souvent présents dans les plantes différentes (**Bruneton, 1993**).

- Les sesquiterpènes : Les sesquiterpènes sont les hydrocarbures produits par les plantes avec des fonctions écologiques importantes dans la communication d'installation à installation et de plante-à-insecte (**Copolovici et Niinemets, 2015**). Ils sont des composés caractéristiques des arômes produits par les plantes et donnent à celle-ci un goût amer. Ce sont de structure très divers, les carbures, les alcools et les cétones sont les plus fréquents (**Bruneton, 2008**).

### II .16.2. Composés aromatiques (phénylpropanoïdes)

Ces composés sont des dérivés du phénylpropane ; il s'agit des noyaux aromatiques couplés de chaînes de 3 carbones (C6-C3) donnant naissance à de nombreuses molécules chimiques voisines les unes aux autres (**Anton et Wichtel, 1999**).

### **II.16.3. Groupe des lipides issus de la dégradation d'acide gras et de terpènes**

Ces composés proviennent de la dégradation de molécules peu ou pas volatiles. Par exemple l'oxydation des acides linoléique et linolénique conduit à des peroxydes instables qui à leur tour, après dégradation, vont donner des alcools, des aldéhydes et des acides de masse moléculaire plus petite (Kaloustian et Hadji-Minaglou ,2013).

### **II.17. Les paramètres influençant la composition qualitative et quantitative des huiles essentielles :**

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant divers facteurs, elle est avant tout déterminée par sa biosynthèse et son profil génétique, ainsi pour une même espèce de nombreux chémotype aux profils chimique différent peuvent exister.

La composition chimique varie selon la nature de ces organes car la biosynthèse y est nettement différenciée. Les conditions de croissance de la plante conditionnement également sa composition chimique.

Ainsi selon les conditions environnementales le profil chimique peut également être modifié, la qualité et la quantité de lumière, la température, l'indice de pluviométrie, les facteurs édaphiques.

Les conditions de culture de la plantes aromatique influençant également les profils qualitatifs et quantitatifs : dates de semis et de récolte, traitement phytosanitaires, emploi d'engrais, technique de récolte, traitement après la récolte (Teacher et al., 2005).

### **II .18 . Toxicité des huiles essentielles**

Bien que d'usage populaire, les huiles essentielles ne sont pas neutres et peuvent nous exposer à des risques toxiques, mais aussi allergiques essentiellement cutanées (Bourrain ,2013). Certains de leurs constituants, de nature terpénique, s'avèrent même d'être des agents d'accélération, de pénétration de certains principes actifs. Il faut donc sélectionner avec discernement les HE, leur mode d'administration et leur posologie pour éviter des effets indésirables

- Certaines HE peuvent être convulsivantes et abortives : c'est le cas des HE de thuya, d'absinthe, d'armoise, de sabine, de sauge officinale ou encore d'hysope.
- Certaines HE sont agressives pour les muqueuses : HE de cannelle de Ceylan, de giroffier, de sarriettes, de thym à thymol, d'origan.
- Certaines HE sont allergisantes : HE de cannelle de Ceylan, de giroffier.

- Certaines HE sont irritantes : HE de verveine citronnée, de pin sylvestre, de mélisse officinale, de gaulthérie, de lemon-grass.

- Les essences (ES) d'agrumes sont toutes photosensibilisantes, entraînant des réactions épidermiques après exposition au soleil : ES de citron, de mandarine, de bergamote, de pamplemousse, d'orange douce ou encore d'orange amère (**Couic-Mainier et Annelise ,2013**).

- En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie Per os faible ou très faible: une DL50 comprise entre 2 et 5 g/kg de poids corporel pour la majorité des huiles couramment utilisées telles que l'anis, l'eucalyptus, le girofle...ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, maljoline, vétiver, etc.). D'autres ont uneDL50 inférieure à 1 g/kg : l'huile essentielle de boldo (0.13 g/kg, convulsions apparaissent dès0.07 g/kg), l'essence de moutarde (0.34 g/kg) ; l'origan et la sarriette (1.37 g/kg); le basilic, l'estragon et l'hysope (1.5 ml/kg). Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (**Bruneton ,1999**).

## II .19. La qualité des huiles essentielles

La qualité des huiles essentielles jugées par les critères suivant :

- Le lieu de culture, et les conditions de culture de la plante, le moment de récolte et la qualité de l'eau de la distillation sont des paramètres très importants pour obtenir des HE de qualité (**Folliard,2014**).

- Les huiles essentielles elles sont très fragiles, elles seront de préférence vendues et conservées dans un double étui en carton ou idéalement en métal.

- L'emballage doit comporter la mention suivante :

- le nom complet de l'HE en français et en latin.
- la précision de l'organe qui produit l'HE (zeste, feuille, fleur, plante entière. . .).
- le chémotype (Le noms des molécules chimiques doit être précisé) ;
- la qualité (bio certifiée en France, ou non).

- les huiles essentielles doivent être vendues en pharmacie (**Couic-Mainier, 2014**).

## II.20. Les différents modes d'utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être utilisées par différents modes, mais il faut toujours respecter la lettre, les dosages et les modes d'emploi. La diffusion, l'inhalation, dans le bain, les massages, l'application sur la peau, la voie orale (**Alix, 2012**).

## **II.21. Les huiles essentielles et la médecine**

La richesse et la diversité du patrimoine végétal mondial devraient permettre, avec l'avancée des connaissances dans ce domaine, l'essor d'une médecine dite douce et efficace basée sur les huiles essentielles.

### **II .21.1. La phytothérapie**

La phytothérapie, dont l'utilisation par l'homme remonte aux temps les plus reculés de son histoire. Fait l'objet actuellement dans notre médecine occidentale d'un regain d'intérêt parfaitement justifié. La définition est très simple «traitement par les plantes», du grec phytos qui signifie plantes et terapeia : traitement (**Jeanpert, 1983**).

Des études cliniques permettent parfois à l'Agence Européenne du Médicament (EMA) de conclure à usage bien établi des plantes médicinales dans certaines pathologies. Il est, dans ce cas, préférable de recommander des phytomédicaments formulés pour avoir cette efficacité (**Solène et Sèverine, 2016**).

La phytothérapie correspond à l'utilisation des plantes dites « médicinales » pour traiter les pathologies bénignes. Cette pratique est ancestrale et répandue dans le monde entier.

Les patients opposent souvent cette thérapeutique à l'utilisation des médicaments allopathiques (**Sèverine et Sèverine, 2016**). On distingue deux sortes de phytothérapie :

- La phytothérapie classique : de nos grands-mères tisanes.
- La phytothérapie moderne : de nombreux laboratoires ont mis au point différents procédés d'utilisation des plantes avec un mode d'administration plus facile (**Sallé, 1991**).

### **II.21.2. L'aromathérapie**

L'aromathérapie est une discipline qui peut être définie par l'utilisation d'huiles essentielles extraites de fleurs ou d'autres parties de la plante en application topique, par voie orale, par inhalation ou de toute autre manière sur le corps humain, afin de promouvoir la santé, le bien-être (**Laurie, 2015**).

L'aromathérapie désigne une branche particulière de la médecine par les plantes. Ce terme savant est composé de deux racines grecques, aroma signifie: parfum et thérapie: méthode visant à soigner la maladie, et à soulager le malade (**Anonyme, 2015**).

Il ne faut pas confondre l'usage en phytothérapie des plantes aromatiques et l'usage en aromathérapie des HE issues pourtant de ces mêmes plantes aromatiques : la gamme des concentrations d'actifs s'avère immensément large (**Couic-Mainier et Annelise, 2013**).



## II.22. Les huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis*. L

### II.22.1. Composition chimique

La composition qualitative de cette huile essentielle est relativement fixe, par contre les proportions des composants varient en fonction de l'origine géographiques et des conditions du milieu (Besombes, 2008).

Il existe trois variétés de romarin, de provenance différente : le camphré de France, le cinéole d'Afrique du Nord et le verbénone de Corse. Elles ont des vertus différentes et des odeurs différentes. Ainsi, l'huile essentielle de romarin, présente 3 Chémotypes différents. La composition chimique de certaines huiles essentielles de Romarin est présentée dans les tableaux, seuls les composés majoritaires (ayant une teneur supérieure à 5 %) sont mentionnés dans ces tableaux : (Ouassila, 2010).

**Tableau n° 5:** Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à cinéol et camphre) de l'espèce *Rosmarinus officinalis* (Ouassila, 2010).

Composé	Localité et pourcentage (%) de composé								
	Algérie	Tunisie	France	Serbie	Grec	Chine	Afrique du Sud	Turquie (Mersin)	Iran
$\alpha$ -pinène	4.5	-	20.8	-	-	19.43	18.18	9.4	14.9
Camphène	7.2	5.9	5.1	-	-	11.52	6.08	-	-
1,8-cinéole	12.2	33.1	36.9	52.20	12.89	27.23	31.12	50.7	7.43
Camphre	14.6	18.0	34.2	10.08	22.24	14.26	30.12	5.9	4.94
Terpinen-4-ol	-	6.0	-	-	-	-	-	-	-
Bornéol	10.6	8.0	-	-	7.37	-	-	6.8	-
Pipéritone	-	-	-	6.68	-	-	-	-	23.7
$\alpha$ -terpéniol	5.2	-	-	-	5.67	-	-	6.8	-
Caryophyllène Oxyde	10.9	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -pinène	8.5	-	-	-	-	6.71	-	-	-
Camphrène	-	-	-	-	-	19.43	18.18	-	-
Linalol	-	-	-	-	-	-	-	-	14.9

**Tableau n°6** : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à verbénone) de l'espèce *Rosmarinus officinalis* (Ouassila, 2010).

Composé	Localité et pourcentage (%) de composé					
	Maroc	Espagne	Portugal	Italie	Argentine	Turquie
$\alpha$ -pinène	-	-	-	-	-	14.2
1,8-cinéole	11.6	11.09	-	7.26	-	12.1
Camphre	11.6	13.12	5.5	14.6	33.6	16.1
Terpinen-4-ol	-	-	-	-	8.4	-
Bornéol	15.6	14.32	-	10.4	-	7.8
Pipéritone	-	-	-	5.75	-	-
$\alpha$ -terpénol	-	5.04	7.2	-	8.2	-
Verbénone	11.2	11.75	35.4	21.76	24.9	11.1
Caryophyllène Oxyde	-	-	-	-	-	6.0
E- caryophyllène	-	-	-	-	14.8	-
Linalol	5.4	-	-	-	-	-
3-octanol	-	11.92	-	-	-	-

**Tableau n°7** : Composants majoritaires (% > 5.0) d'huiles essentielles (à cinéol) de l'espèce *Rosmarinus officinalis* (Ouassila, 2010).

Composé	Localité et pourcentage (%) de composé		
	Tunisie	Brésil	Turquie
$\alpha$ -pinène	13.45	37.22	12.57
Camphène	5.86	3.97	-
1,8-cinéole	43.49	23.76	44.42
Bornéol	60.14	-	8.52
$\beta$ -pinène	8.36	-	5.18
Camphrène	8.95	-	-

**Tableau n°8** : Les normes AFNOR d'HE de *Rosmarinus officinalis* (Ouassila, 2010).

<b>Aspect</b>	Liquide mobile, limpide
<b>Couleur</b>	incolore à jaune pâle ou jaune verdâtre
<b>Odeur</b>	caractéristiques, agreste, cineolée plus ou moins camphrée
<b>densité relative a 20°C,</b> $d_{20}^{20}$	Minimum : 0.907 Maximum : 0.920
<b>Pouvoir rotatoire à 20°C</b>	compris entre - 2° et + 5° Miscibilité à l'éthanol à 80 %
<b>L'indice d'ester</b>	Minimum : 2 Maximum : 15
<b>L'indice de Réfraction</b>	Minimum : 1.4640 Maximum : 1.4700
<b>L'indice d'acide</b>	Maximum : 1.0

# **CHAPITRE III:**

## **Matériel et méthodes**

## CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

### III.1. Objectifs du travail

Notre étude a pour objectif d'étudier l'effet saisonnier sur les huiles essentielles de la plante médicinale *Rosmarinus officinalis*, pour cela nous avons fait l'extraction des huiles essentielles par la méthode d'hydrodistillation de type Clevenger, Après avoir déterminé le rendement et les caractéristiques organoleptiques, nous avons fait l'étude du pouvoir antimicrobien, antioxydant et l'analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM).

Enfin, nous allons comparer les résultats d'analyses des trois saisons étudiées (automne, hiver et printemps).

### III.2. Lieux d'expérimentation

Au cours de notre travail expérimentale nous avons étudié différentes activités de la plante. Ces derniers ont eu lieu dans différents laboratoires qui sont présentés ci-dessous :

- L'extraction des huiles essentielles a été réalisée au sein du laboratoire de Phytopharmacie au niveau de département de Biotechnologie à l'université Saad Dahleb de Blida.
- L'étude de l'activité antimicrobienne est réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène et de contrôle alimentaire de la wilaya de Blida.
- L'étude de l'activité antioxydant est réalisée au niveau du laboratoire de SAIDAL à Médéa.
- L'analyse chimique de l'huile essentielle est réalisée au niveau de laboratoire de l'Institut national de criminalistique et de criminologie de la Gendarmerie nationale (INCC) de Bouchaoui (Alger).

## III.3. Plan expérimental

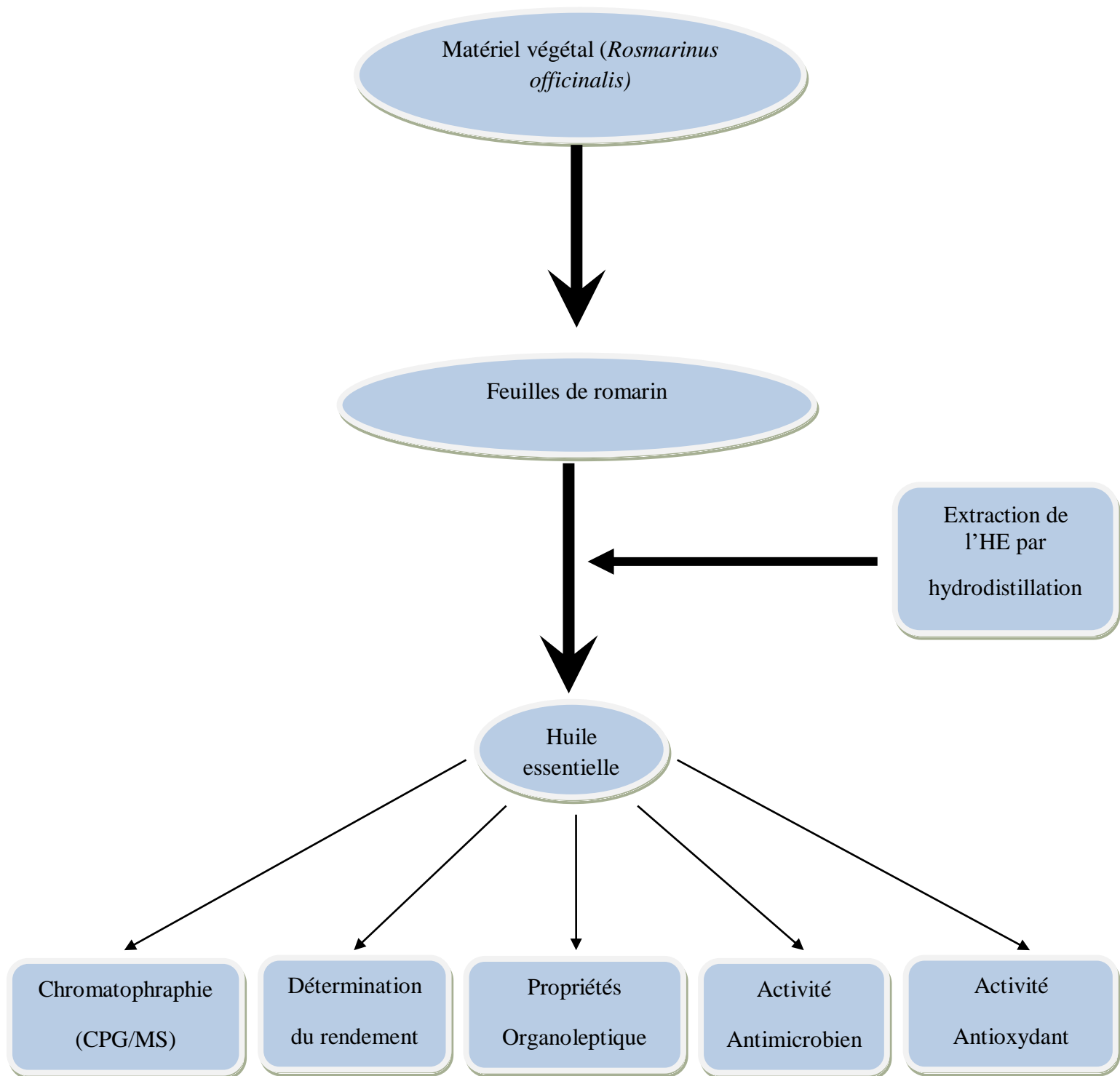


Figure n°3 : Schéma représentant le dispositif expérimental.

### III.4. Matériel biologique

#### IV.4.1. Matériel végétal

Les échantillons du romarin proviennent de la région de Soumaa située au centre de la wilaya de Blida, à environ 8 km au nord-est de Blida et à environ 44 km au sud-ouest d'Alger, à 230 mètres d'altitude. Les coordonnées du lieu de récolte: 36°30'31.28" Nord et 2°52'20.56" Est.

Les échantillons ont été identifiés par le professeur Benrebiha Fatima Zohra. Et ils ont été séchés à l'air libre et à l'ombre pendant quelques jours. La récolte a été réalisée pendant l'automne (le 14 novembre 2016), puis en hiver (le 05 février 2017) et enfin en printemps (le 03 avril 2017).



**Figure n°4** : Photographie du romarin (photographie originale, 2016).



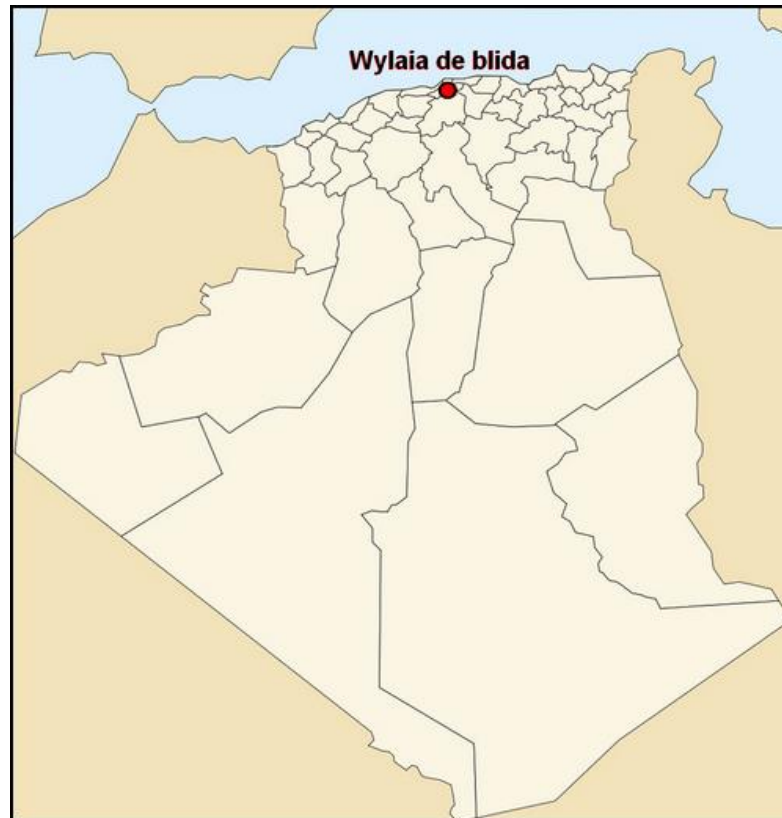


Figure n°5 : Localisation de la wilaya de Blida.

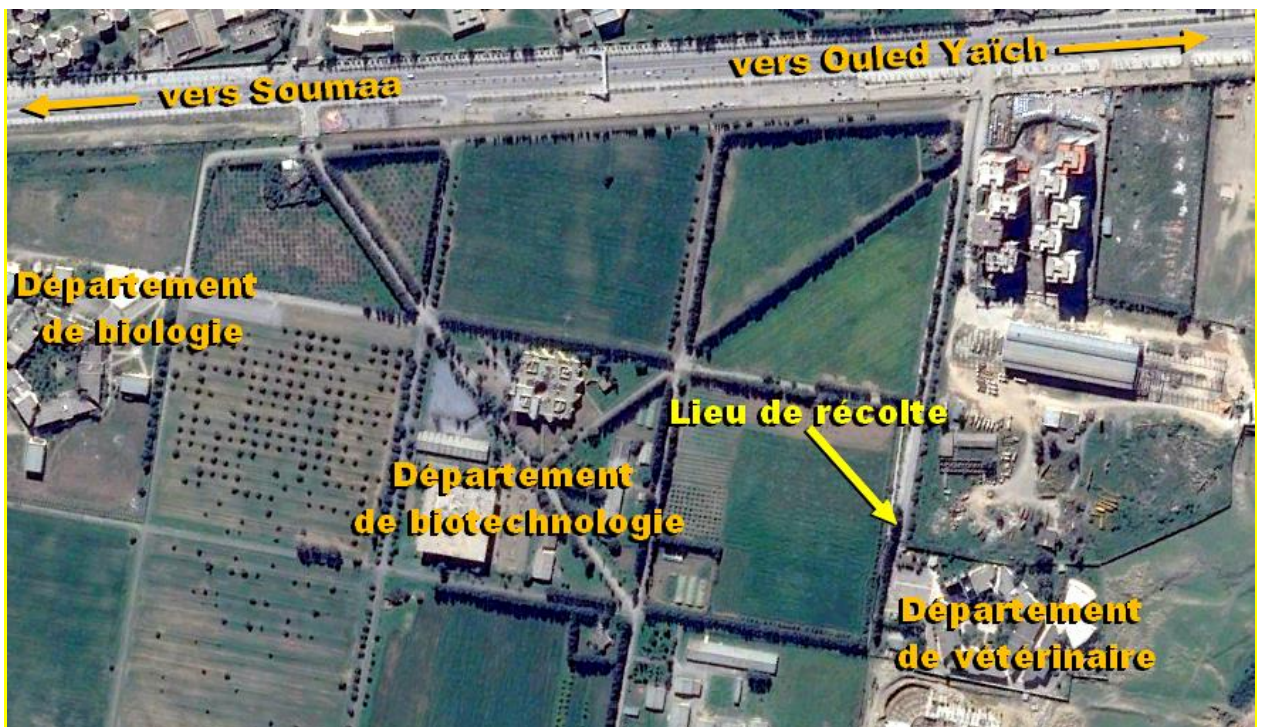


Figure n°6 : Localisation du lieu de prélèvement



### III.4.2. Matériel microbiologique

- **Souches bactériennes et fongiques**

Dans le but d'évaluer le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle, nous avons testé sur 8 micro-organismes. (3 bactéries Gram-, 1 bactérie Gram+, 1 levure et 3 champignons). Les souches utilisées sont des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection). Et proviennent de l'Institut Pasteur (Collection de l'Institut Pasteur, CIP), ils sont choisis pour leur fréquence élevée à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité. Les disques utilisés pour les essais de diffusion par disque, sont vierges avec un diamètre de 9 mm.

**Tableau n°9** : souches microbiennes testés.

Souches	Type	Références	Gram
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie	ATCC 6538	+
<i>Escherichia coli</i>	Bactérie	ATCC 25922	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bactérie	ATCC 13525	-
<i>Salmonella arizonae</i>	Bactérie	ATCC 13314	-
<i>Candida albicans</i>	Levure	ATCC 24433	/
<i>Aspergillus Nigers</i>	Champignon	ATCC 16888	/
<i>Penicillium</i>	Champignon	ATCC 20464	/
<i>Fusarium oxysporum</i>	Champignon	ATCC 3461	/

### III.5. Méthode d'analyses

#### IV.5.1. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* a été réalisée par hydrodistillation (type Clevenger). Le principe de cette méthode, préconisée par la pharmacopée Européenne, est basé sur un entraînement des constituants volatiles de l'huile essentielle par la vapeur d'eau. Cette dernière chargée des produits volatils est condensée dans un réfrigérant pour donner de l'huile essentielles après décantation.

### III.5.2. Présentation du dispositif

Le dispositif d'extraction comprend principalement :

- Un chauffe-ballon qui contient le ballon
- Un ballon de 1 litre contenant la matière végétale
- Un Clevenger
- Un réfrigérant alimenté par un système de refroidissement
- 

### III.5.3. Protocole expérimental d'extraction :

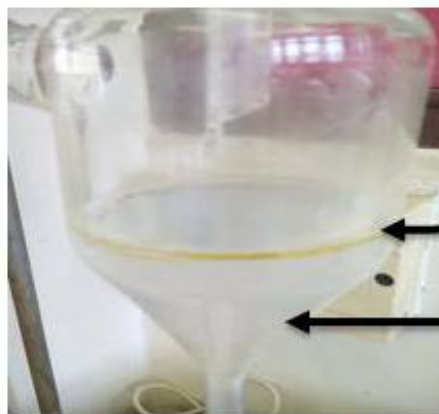
100g de feuilles séchées de *Rosmarinus officinalis* sont mises dans un ballon, additionné de 700 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition, après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur, l'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par un condensateur, fixé par un support approprié en position verticale pour faciliter l'écoulement du distillat. Le temps de cette extraction est d'environ trois heures.

Le distillat obtenu est récupéré dans une ampoule à décanter. Le mélange est laissé au repos quelques minutes, ce qui résulte l'apparition de deux phases, l'une est organique (huile essentielle) et l'autre est aqueuse. En fin, le distillat est recueilli dans un tube à essai et l'huile essentielle des fleurs de *Rosmarinus officinalis* sera par la suite récupérée dans un flacon approprié.

Après installation et fermeture du montage, le ballon sera chauffé à l'aide d'un chauffe ballon commençant dans un premier temps avec un réglage optimum du chauffage afin de stabiliser l'extraction.



**Figure n°7** : Dispositif d'hydrodistillation type Clevenger



Phase organique

Phase aqueuse

**Figure n°8** : L'ampoule à décanter (photographie originale, 2016)

### III.6. Paramètres étudiés

#### IV.6.1. Rendement des huiles essentielles

Selon les normes d'AFNOR (2000), le Rendement en Huiles Essentielles ( $R_{HE}$ ) est défini comme le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction ( $M_H$ ) et la masse de la matière végétale utilisée ( $M_{mv}$ ).

Le rendement est exprimé en pourcentage et donné par l'expression suivante :

$$R_{HE} (\%) = M_H / M_{mv}$$

$M_H$  : La Masse d'Huile Essentielle en gramme.

$M_{mv}$  : la masse de la matière végétale utilisée en gramme.

$R_{HE}$  : Rendement en Huiles Essentielles

#### III.6.2 Analyses organoleptiques

L'appréciation des caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles consiste à évaluer l'aspect, l'odeur, la couleur et la flaveur ; en utilisant les sens.

#### III.6.3 Etude de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* des trois saisons (automne, hiver et printemps), nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en celluloses, la méthode est appelée aromatoگرامme, Le test a été réalisé au laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* à été faite sur 8 micro-organismes 4 bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella arizonea*), une levure (*Candida albicans*) et 3 champignons (*Aspergillus niger*, *Penicillium*, et *Fusarium oxysporum*) par la méthode des aromatoگرامmes. Le pouvoir antimicrobien de tous ces produits est obtenu par la mesure du diamètre des zones d'inhibition y compris le disque.

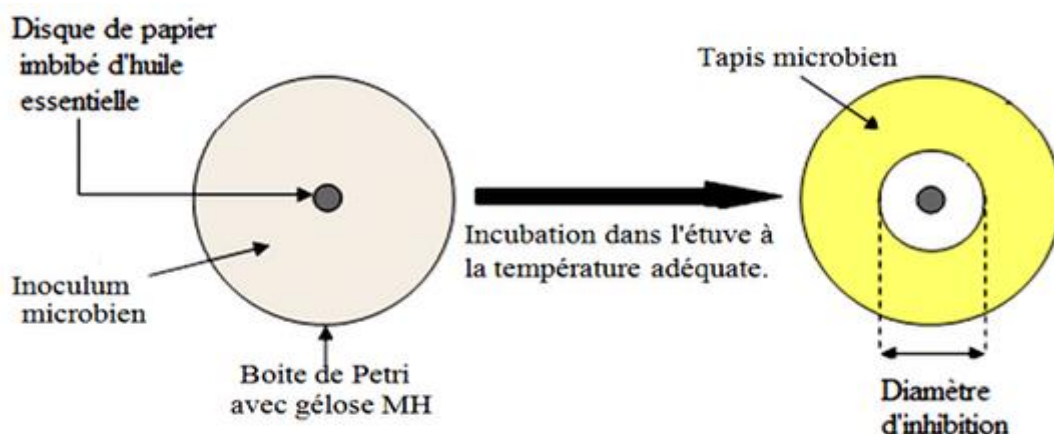
##### III.6. 3.1. Le principe d'aromatoگرامme

Aromatoگرامme est basé sur une technique utilisée en bactériologie appelée méthode des disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé. Cette méthode permet d'évaluer l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle .Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et

reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement quantitatifs.

La technique consiste à utiliser des disques de papier, déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la souche à étudier. Après incubation, les colonies se développent, laissant des zones vierges autour des disques appelée zones d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand plus la souche est sensible vis-à-vis la substance testée, plus il est petit, plus la souche est résistante.

Nous pouvons exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre soit en traduisant en croix le degré d'activité (**Guerin et Carret, 1999**).



**Figure n°9** : Principe de la méthode d'Aromatogramme.

### III.6. 3.2. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antibactérienne est Muller Hinton (MH), c'est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens (**Gachkar et al., 2007**), le milieu sabouraud est celui utilisé pour l'activité antifongique.

Nous avons fait fondre les milieux Muller Hinton et Sabouraud dans un bain marie à 95°C, ensuite nous avons versé aseptiquement dans des boîtes de pétri à raison de  $\frac{3}{4}$  du volume total de la boîte, à la fin nous avons laissé la gélose refroidir et solidifier sur pailleasse.

### III.6. 3.3. Protocole expérimental

Le protocole expérimental est divisé en trois parties : ensemencement des boîtes de pétri, dépôt de disque et enfin la lecture des résultats.

A noter que cette manipulation est répétée trois fois pour chaque souche.

#### a. Ensemencement des boîtes pétri

Nous avons trempé un écouvillon stérile dans une suspension bactérienne déjà préparée, (essorer en le passant fermement sur la paroi interne du tube à essai afin de le décharger). Ensuite nous avons frotté l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées et répété l'opération deux fois, en tournant la boîte 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, à la fin de l'ensemencement on passe l'écouvillon sur périphérique de la boîte de Pétri.



**Figure n°10** : Ensemencement des boîtes de pétri (photographie originale, 2017).

#### b. Dépôt de disque

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, un disque de 9mm vierge est déposé dans une seule boîte de pétri, sur un milieu de culture précédemment inoculé avec le micro-organisme choisi, puis à l'aide d'une micropipette, nous avons prélevé 40  $\mu$ L de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et déposée sur le disque qui va l'absorber progressivement.

Enfin les boîtes pétri suivies d'une incubation à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures à cinq jours pour les champignons.



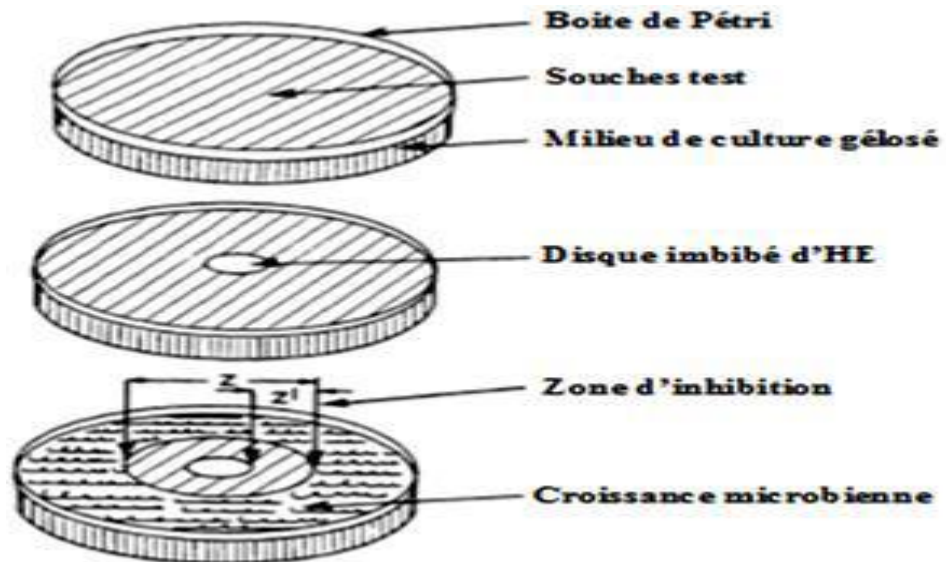


Figure n°11 : Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri (Zaika, 1988).

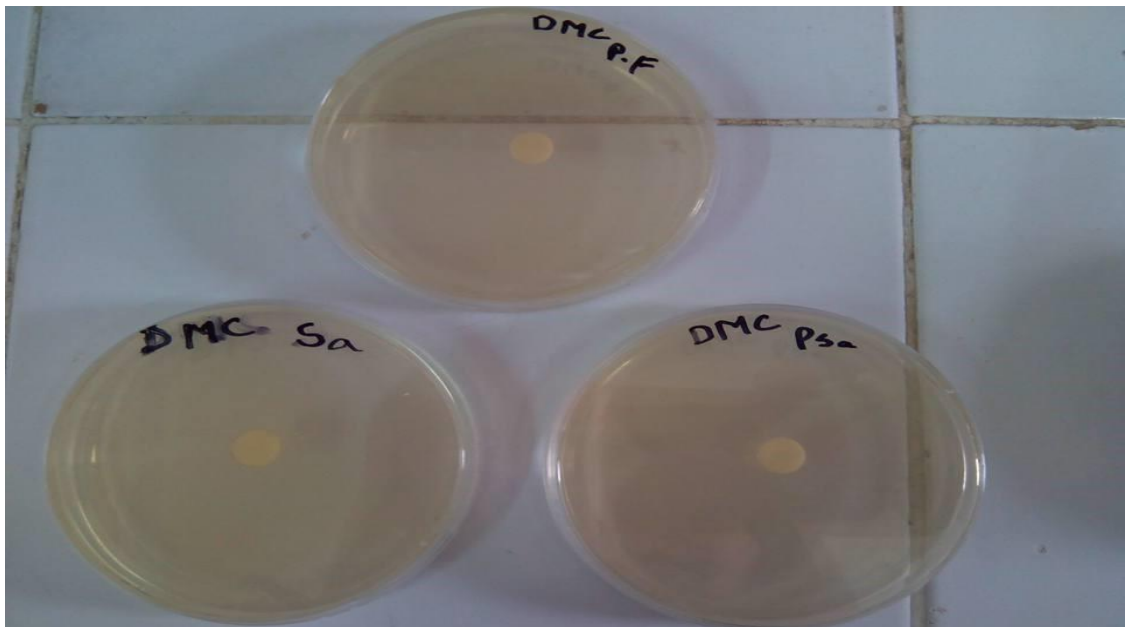


Figure n°12: Des disques déposés sur la gélose (photographie originale, 2017)



**Figure n°13** : Etuve à 37°C (photographie originale, 2017)

### c. Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (**Ponce et al., 2003**). L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Mutai et al (2009)**, dans laquelle les diamètres des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne sont hiérarchisés en cinq classes :

**Tableau n°10** : Catégorie d'inhibition des HE selon le diamètre du halo.

Catégorie d'inhibition	Diamètre
Très fortement inhibitrice	$D \geq 30$ mm
Fortement inhibitrice	$21 \text{ mm} \leq D \leq 29$ mm
Modérément inhibitrice	$16 \text{ mm} \leq D \leq 20$ mm
Légèrement inhibitrice	$11 \text{ mm} \leq D \leq 16$ mm
Non inhibitrice	$D < 10$ mm



### III.6.4. L'activité antioxydante

#### IV.6.4.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH. Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle testée a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel qui est l'acide ascorbique.



**Figure n°14** : Préparation de la solution de DPPH (photographie originale, 2017)

#### • Principe

La capacité de donation des électrons par les huiles essentielles est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH<sup>•</sup> (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) (**Burits et Bucar, 2000**).

Pour évaluer l'activité antioxydante, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par **Sanchez-Moreno et al., (1998)**.

Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.



**Figure n°17** : Dilution du DPPH (photographie originale, 2017)

Cinquante microlitres de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations ou de standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,0025g/l). En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 $\mu$ l de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH.

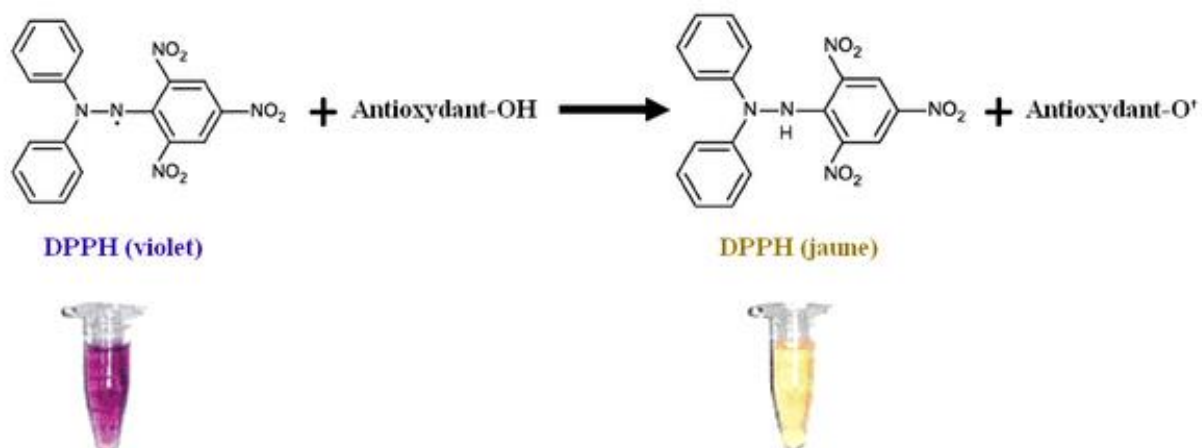
La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 516nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Selon **Sharififar et al., (2007)**, l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculé de la manière suivante :

$$I\% = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) \times 100 / A \text{ blanc}$$

**A blanc** : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol) ;

**A échantillon** : Absorbance du composé d'essai.



**Figure n°16:** Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl) (Congo, 2012).

Nos résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne de trois mesures obtenues.

Chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC<sub>50</sub> qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH. Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance antiradicalaire (Samarth et al., 2008).

$$\text{ARP} = 1 / \text{IC}_{50}$$

**ARP :** Puissance anti radicalaire

**IC<sub>50</sub> :** Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.



**Figure n°17 :** Spectrophotomètre (photographie originale, 2017)

### III.7. Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse Couplée par Spectrophotométrie de Masse (CG/MS)

La chromatographie en phase gazeuse couplée au spectrophotomètre de masse (CPG-SM) se présente comme la technique de base dans le domaine d'analyse et d'étude de la composition chimique complexe des huiles essentielles. Nous avons fait réaliser l'analyse de nos échantillons au niveau de laboratoire de l'Institut national de criminalistique et de criminologie de la Gendarmerie nationale (INCC) de Bouchaoui (Alger).

L'analyse des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse couplé au détecteur à un spectrophotomètre de masse de type : Trace GC Ultra DSQII.

**Tableau n°11** : Condition opératoire des analyses par CG/SM

<b>Type de colonne</b>	<b>HP- 5ms (30×0.25×0.25)</b>
<b>Port d'injection du GC</b>	Température : 250°C
<b>Programme du four du GC</b>	50°C pendant 01 minute 03°C/min jusqu'à 280 °C 01 minute de maintien
<b>Gaz vecteur</b>	He
<b>Débit de colonne</b>	1.0 ml/min débit constant
<b>Spectromètre de masse</b>	Ligne de transfère à 280 °C Source d'ions a 200 °C Retard sur l'acquisition 4.0 min Energie d'ionisation 70 eV Full scan de 35 à 450 amu
<b>Volume injecté</b>	1 µL

# **CHAPITRE IV:**

## **Résultats et discussions**

## CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

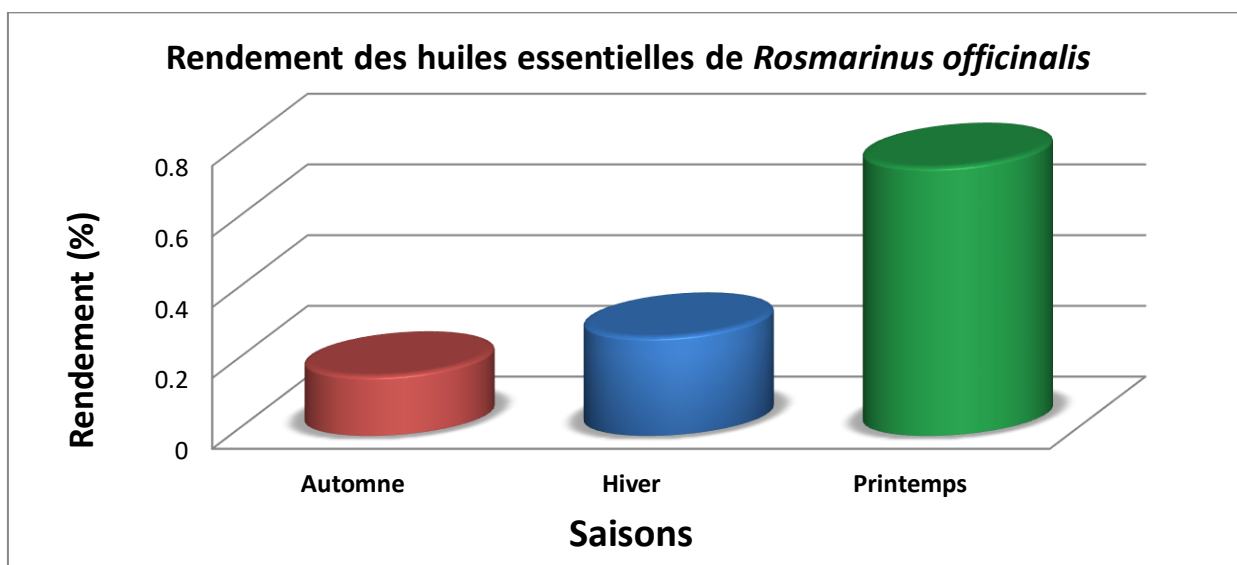
Dans cette partie du travail, les différents résultats obtenus sont présentés, discutés et comparés aux valeurs normes et autres valeurs obtenues sur *Rosmarinus officinalis*. Notre but est de voir s'il existe un effet saisonnier sur le rendement, les caractéristiques organoleptiques, et aussi sur l'activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis*.

## 1. Détermination du rendement

Les rendements en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sont représentés dans le tableau n°12 et la figure n°18.

**Tableau n°12** : Rendement en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (g/100g de matière végétale) des trois saisons : automne, hiver et printemps.

Espèce	Rendement(%)		
	Automne	Hiver	Printemps
<i>Rosmarinus officinalis</i> .	0.17	0.28	0.76
Norme <b>AFNOR</b>	0.5 à 2		



**Figure n°18** : Rendement des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*.

Les résultats obtenus montrent que les rendements en huile essentielle des deux saisons, l'automne et l'hiver sont très faibles par rapport aux normes d'AFNOR 1999 (0.5-2%). Pour la saison printanière, le rendement était plus important, que les deux premières saisons, et comparable aux normes d'AFNOR 1999.

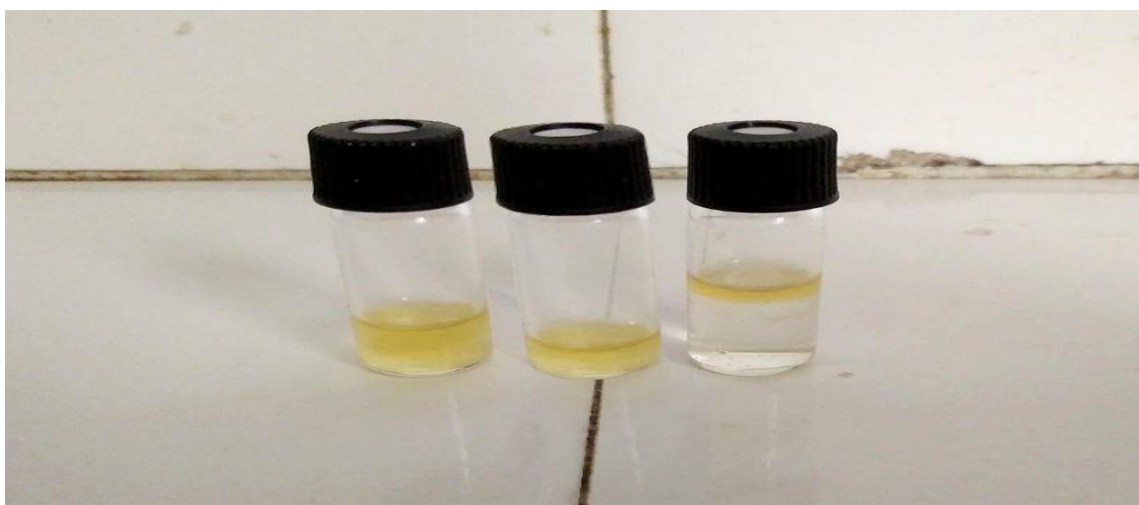
## 2. Résultats des analyses organoleptiques

Les résultats des analyses des caractéristiques organoleptiques d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* des trois saisons sont présentés dans le **tableau n°14** :

**Tableau n°14** : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Caractéristiques organoleptiques			
	Aspect	Couleur	Odeur
Huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	Liquide mobile	Jaune pâle	Odeur caractéristique de l'espèce
La norme (AFNOR 2000)	Liquide mobile, limpide	Incolore à jaune pâle ou jaune verdâtre	Caractéristique fraîche plus ou moins camphrée selon l'origine.

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation du matériel végétal de *Rosmarinus officinalis* des trois saisons, est de couleur jaune pâle, elle représente une odeur caractéristique de l'espèce. Les caractéristiques de nos huiles essentielles des trois saisons, sont comparables à ceux cités par AFNOR 2000.



**Figure n°19** : Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.



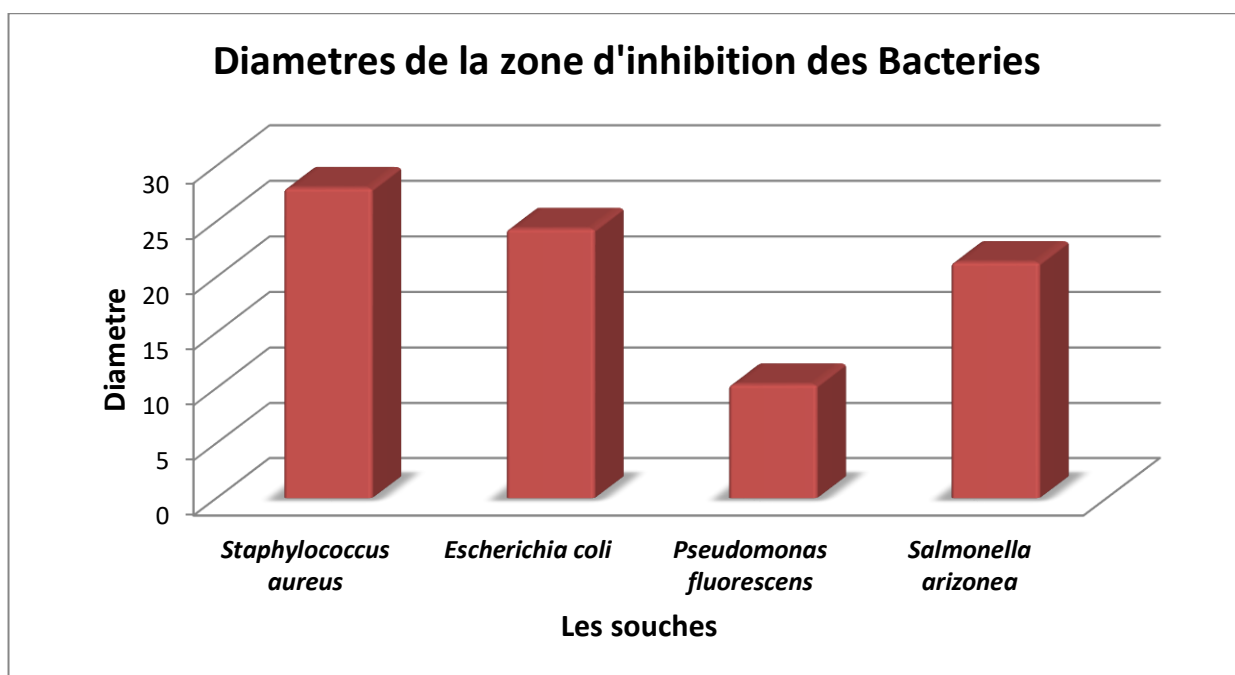
### 3. Evaluation de L'activité antimicrobienne de l'HE de *Rosmarinus officinalis*

#### 3.1. Etude de l'activité inhibitrice

Les résultats de l'activité sont présentés au (Tableau n°14)

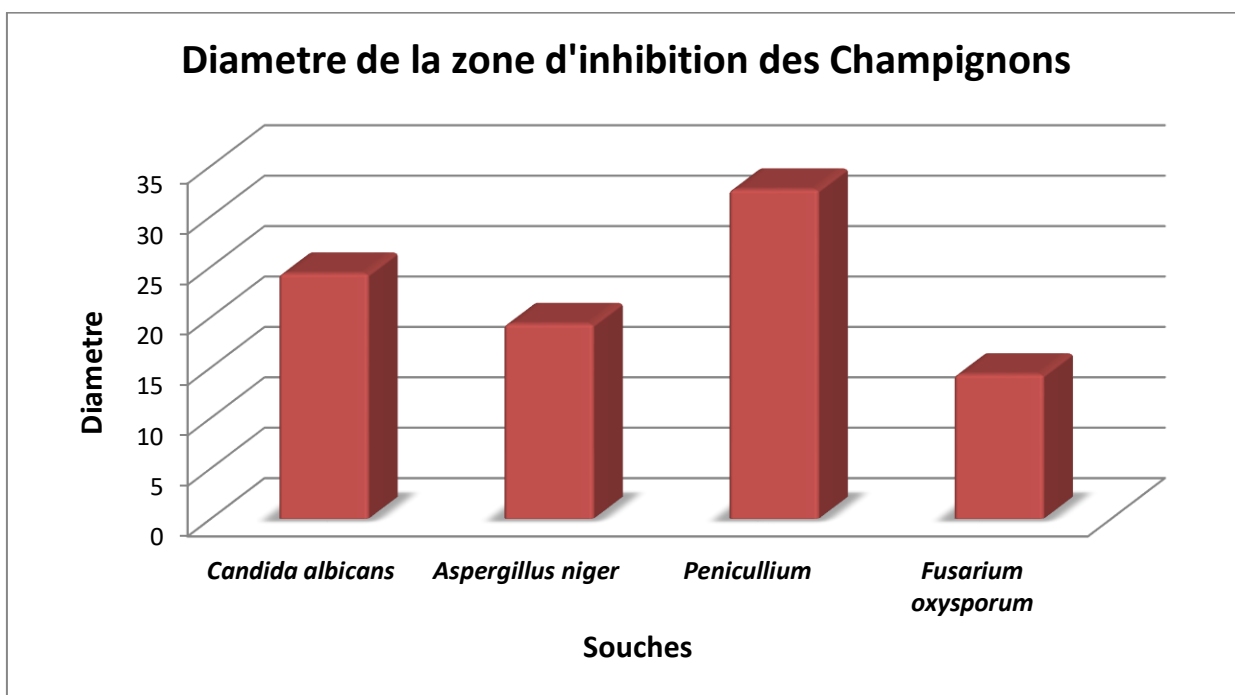
**Tableau n°14:** Sensibilité des bactéries et champignons à l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Souches		Diamètre (mm) et catégorie d'inhibition					
		Automne		Hiver		Printemps	
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	28	Forte	22	Forte	12.67	Légère
	<i>Escherichia coli</i>	24.33	Forte	29.33	Très forte	19.33	Modérée
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10.33	Légère	13.33	Légère	10	Légère
	<i>Salmonella arizonea</i>	21.33	Forte	16.33	Modérée	14.33	Légère
Champignons	<i>Candida albicans</i>	24.33	Forte	32.33	Très forte	14.33	Légère
	<i>Aspergillus niger</i>	19.33	Modérée	34	Très forte	15.67	Légère
	<i>Penicillium</i>	32.67	Très forte	14	Légère	11.67	Légère
	<i>Fusarium oxysporum</i>	14.33	Légère	11	Légère	16.33	Modérée
	<i>Staphylococcus aureus</i>	28	Forte	22	Forte	12.67	Légère



**Figure n°20:** Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des Bactérie d'automne.



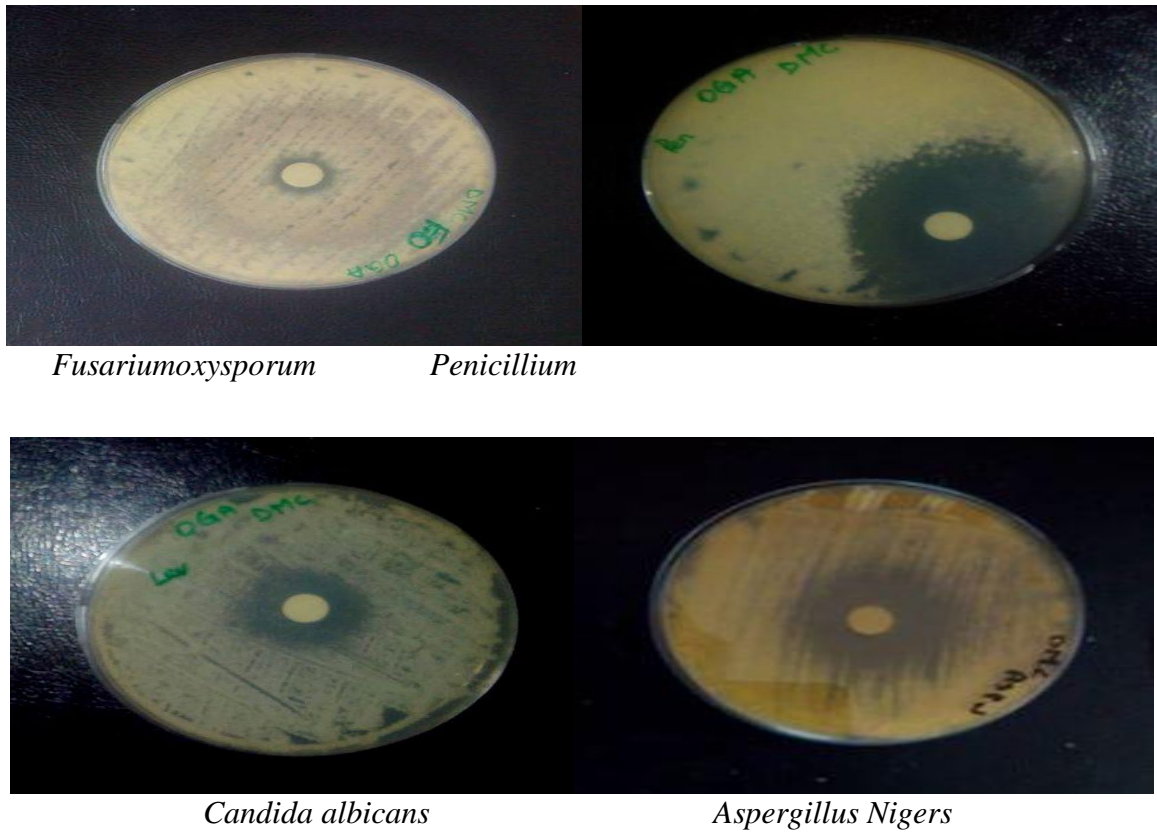


**Figure n°21:** Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des Champignons d'automne.

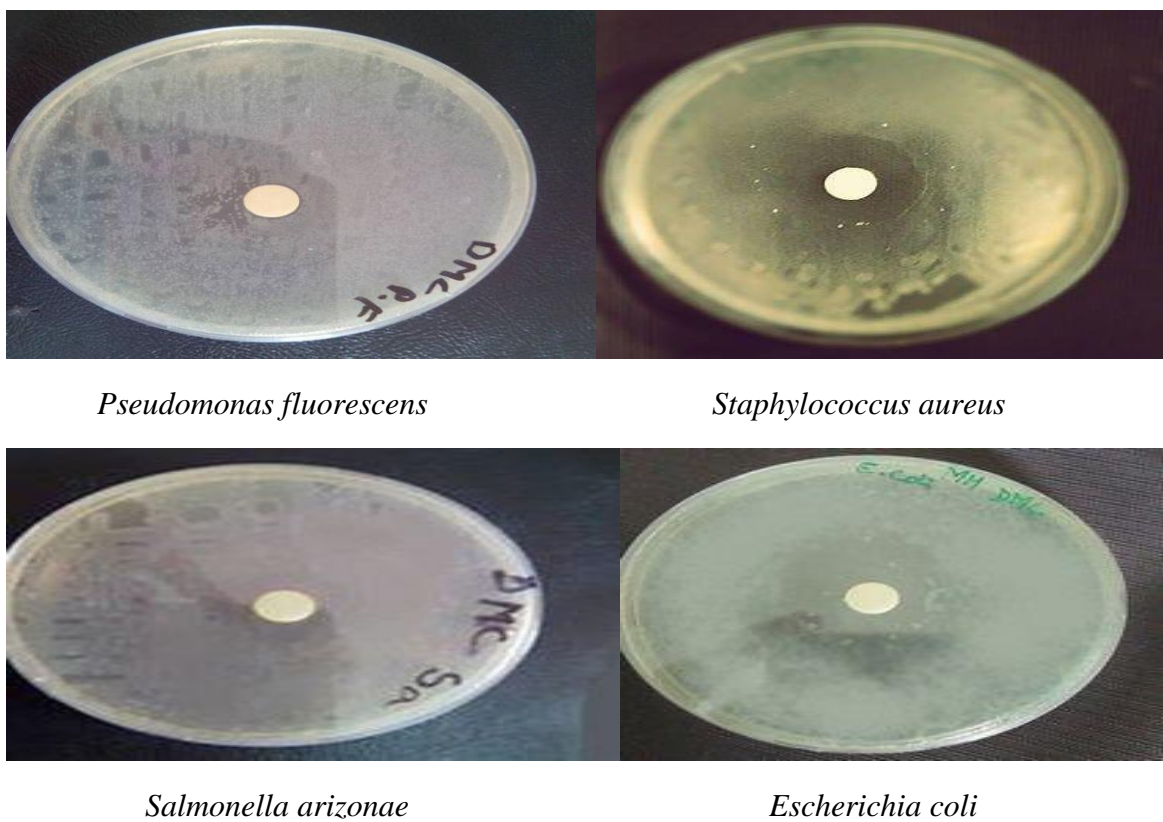
Les diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle de notre plante *Rosmarinus officinalis* pour la saison d'automne sont compris entre 10.33 et 28 mm pour l'activité antibactérienne et entre 14.33 et 32.67 mm pour l'activité antifongiques.

D'après les résultats nous constatons que *Staphylococcus aureus* (28mm  $\pm$  1), *Escherichia coli* (24.33mm  $\pm$  2.08) et *Salmonella arizonea* (21.33mm  $\pm$  1) présente une forte sensibilité vis-à-vis de HE, tandis que *Pseudomonas fluorescens* (10.33 mm  $\pm$  0.58) a montré une résistance vis-à-vis notre HE.

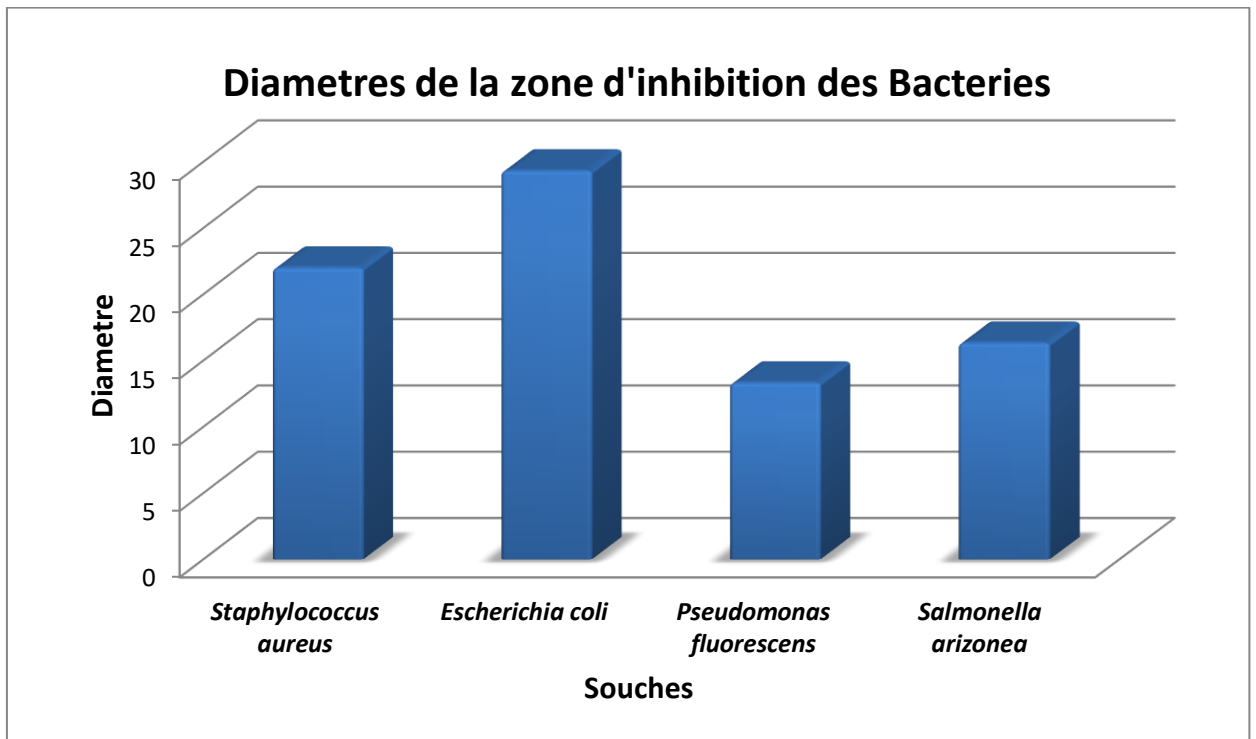
Pour les champignons nous avons remarqué que *Penicillium* présente une très forte sensibilité avec une zone d'inhibition de 34.67 mm  $\pm$  2.52, pour *Candida albicans* (24.33mm  $\pm$  0.58) l'huile essentielle de romarin est fortement inhibitrice, alors que pour *Aspergillus niger* (19.33 mm  $\pm$  1.15) son activité est modérément inhibitrice. L'HE du romarin est légèrement inhibitrice vis-à-vis *Fusarium oxysporum* (14.33 mm  $\pm$  2.31).



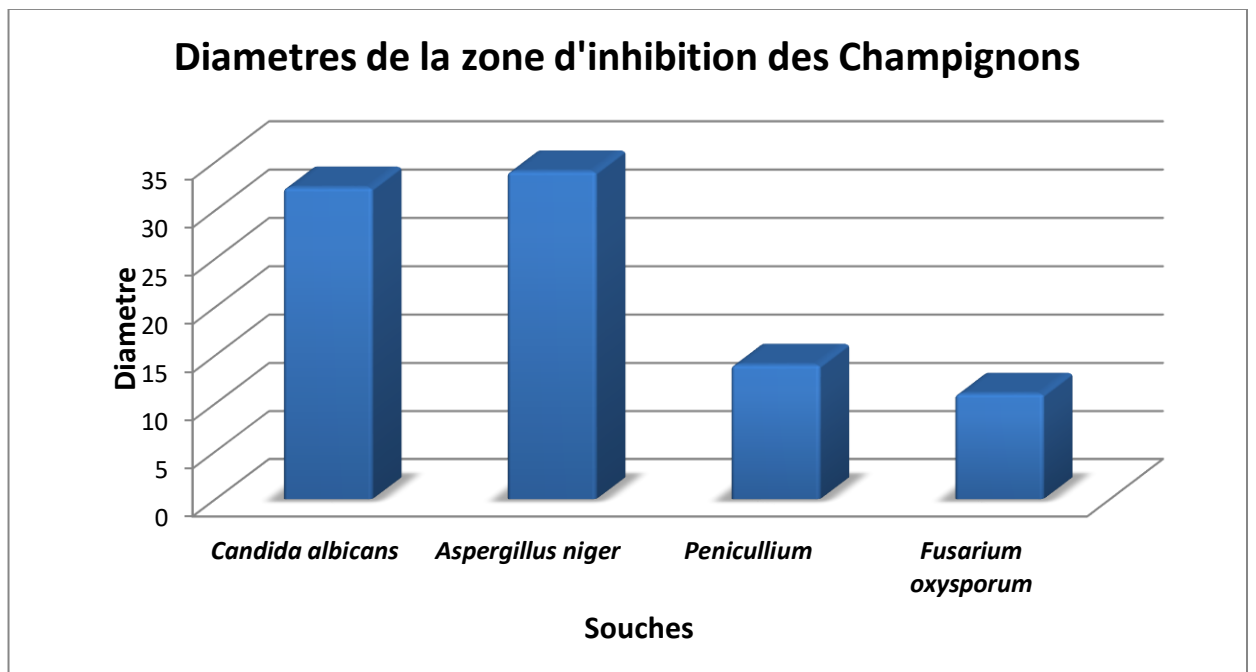
**Figure n°22:** Illustration des zones d'inhibition des champignons d'automne (photographie originale).



**Figure n°23 :** Illustration des zones d'inhibition des bactéries d'automne (photographie originale).



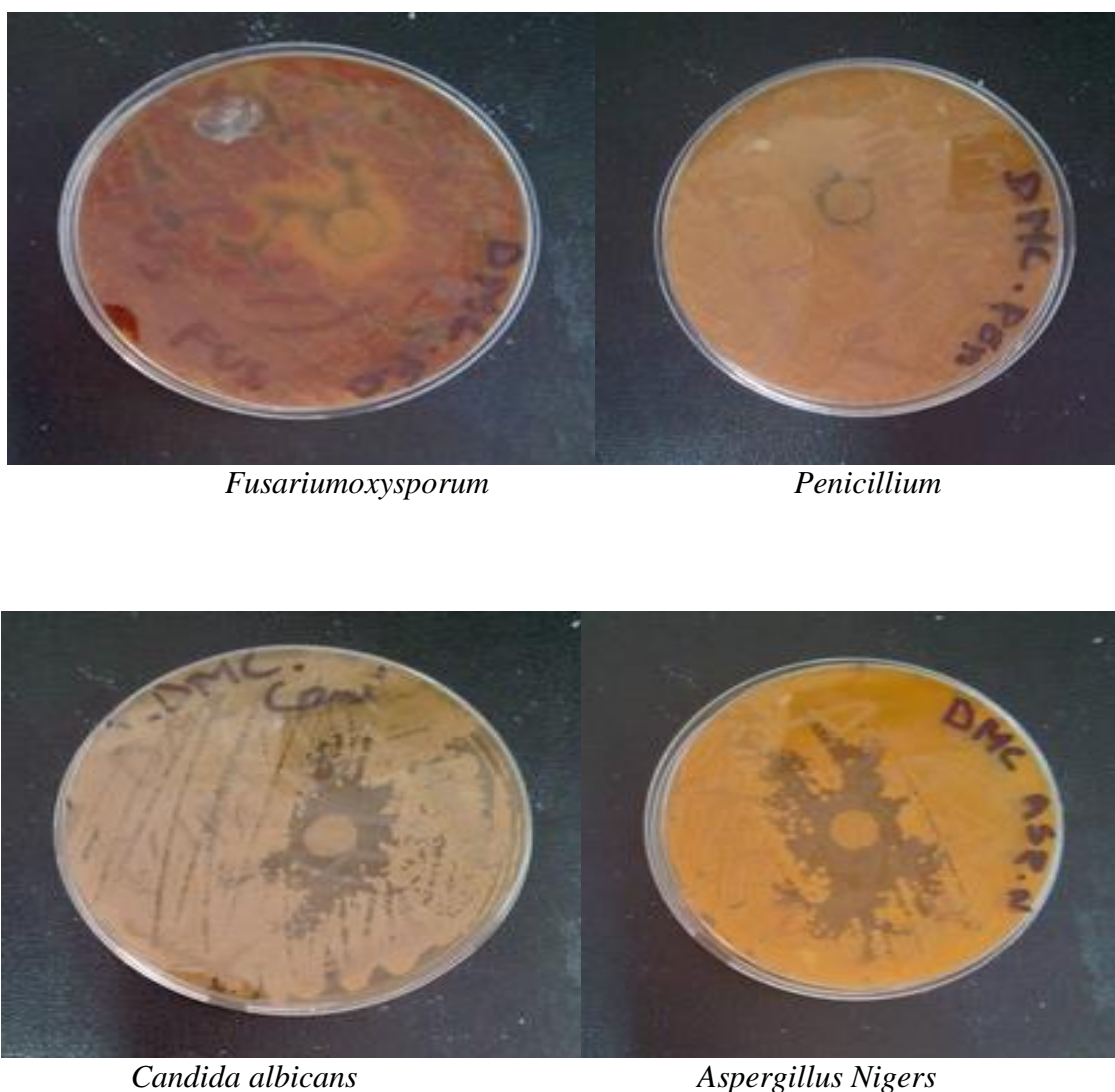
**Figure n°24 :** Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des Bactérie de la saison d'hiver.



**Figure n°25 :** Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des Champignons de la saison d'hiver.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition de notre HE de romarin de la saison d'hiver sont compris entre 13.33mm et 29.33mm pour l'activité antibactérienne et entre 11 mm et 34 mm pour l'activité antifongique.

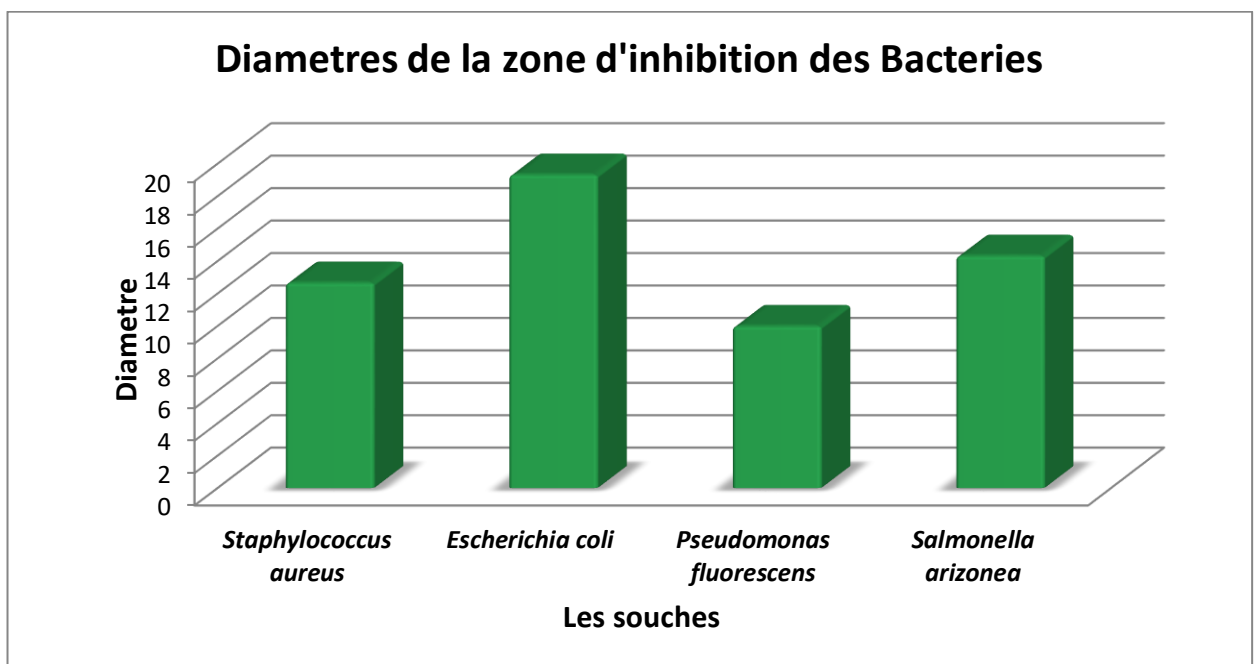
Ces résultats révèlent que *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* apparaît sensible vis-à-vis notre HE avec respectivement 29.33 mm  $\pm$  2.08 et 22 mm  $\pm$  2.56. Pour *Salmonella arizonea* et *Pseudomonas fluorescens* l'huile de romarin a présenté une activité légèrement inhibitrice avec respectivement 16 mm  $\pm$  1 et 13.33mm  $\pm$  1.15. Pour les champignons, *Aspergillus niger* (34 mm  $\pm$  4.36) et *Candida albicans* (32.33mm  $\pm$  1.53) présentent une forte sensibilité vis-à-vis à cette l'huile d'où son action inhibitrice est remarquable, alors que *Penicillium* (14mm  $\pm$  1) a montré une légère sensibilité, quant à *Fusarium oxysporum* (11mm  $\pm$  1) elle a montré une résistance vis à vis cette l'huile.



**Figure n°26:** Illustration des zones d'inhibition des fongis d'hiver (photographie originale).

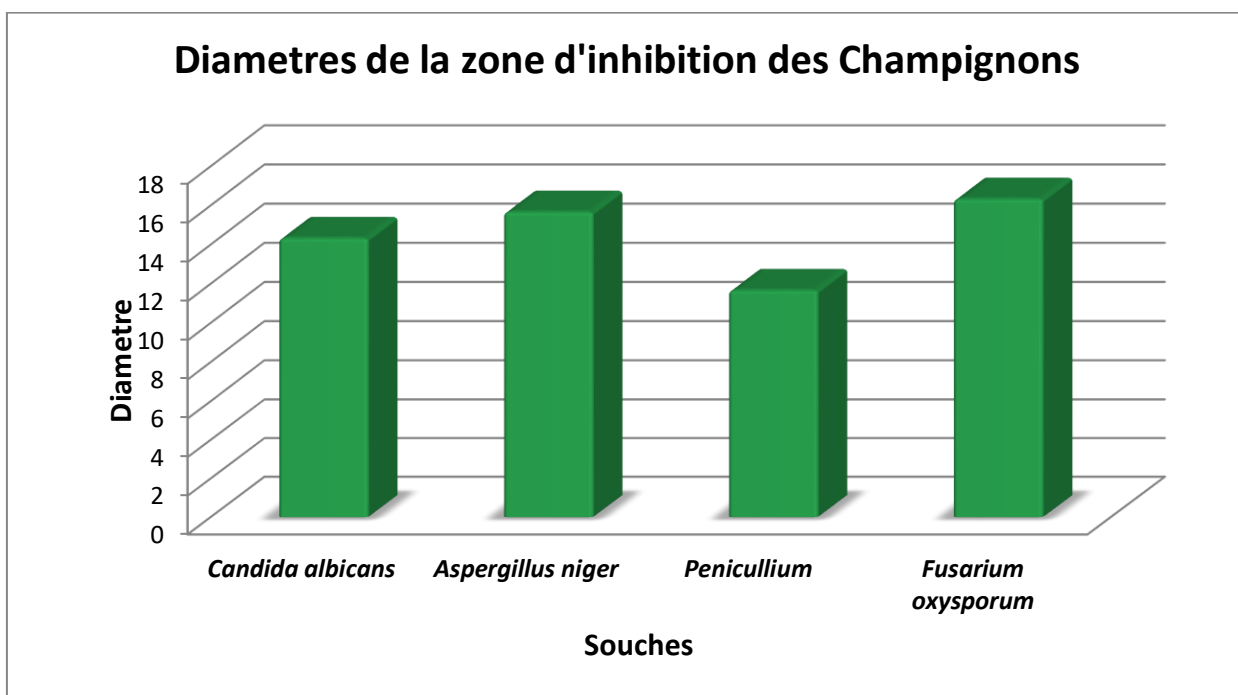
*Pseudomonas fluorescens**Staphylococcus aureus**Salmonella arizonae**Escherichia coli*

**Figure n°27 :** Illustration des zones d'inhibition des bactéries d'automne (photographie originale).



**Figure n°28 :** Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des Bactérie de la saison de printemps.



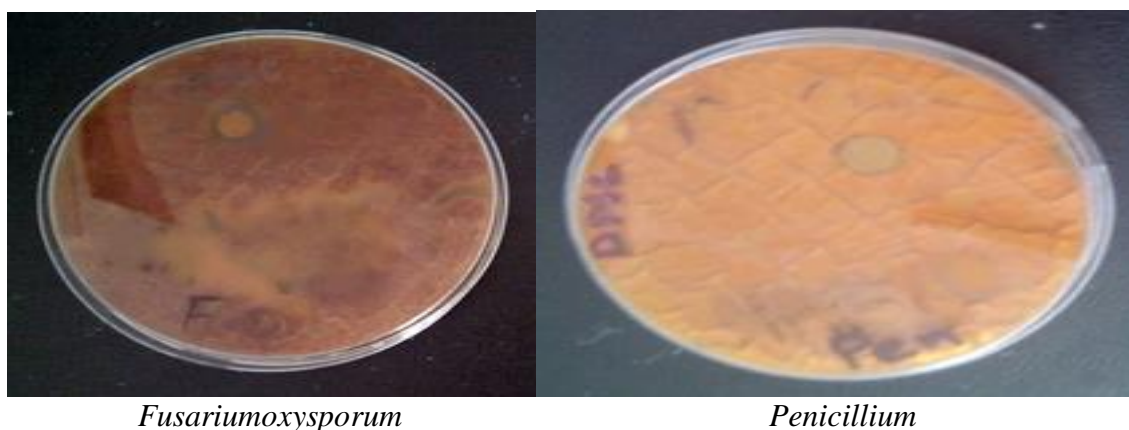


**Figure n°29 :** Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des Champignons de la saison de printemps.

Les diamètres des zones d'inhibition de notre HE de romarin de la saison de printemps sont compris entre 10 mm et 19.33 mm pour l'activité antibactérienne et entre 11.67 mm et 16.33mm pour l'activité antifongique.

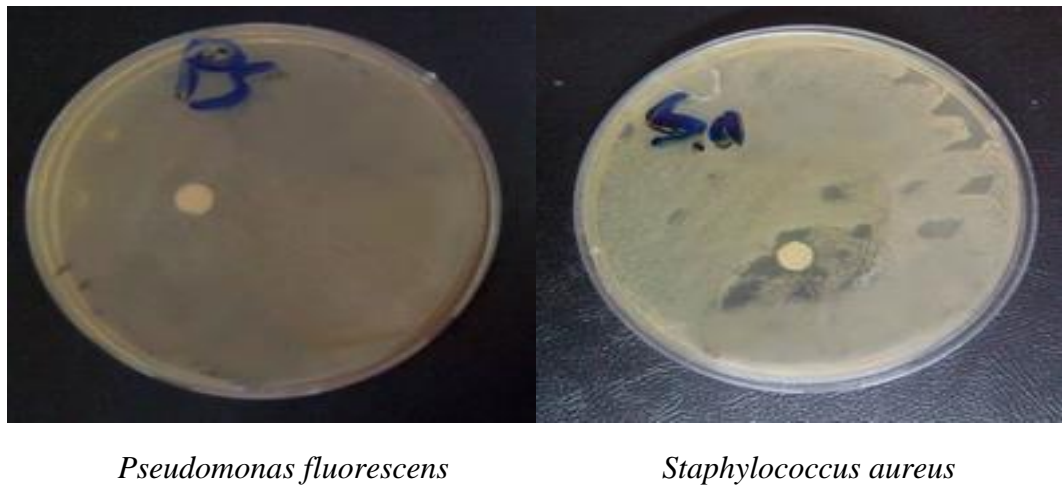
Les résultats montrent que *Escherichia coli* est modérément sensible à notre HE avec une zone d'inhibition de 19.33mm  $\pm$  2.08, alors que *Staphylococcus aureus* (12.67mm  $\pm$  1.15) et *Salmonella arizonea* (14.33mm  $\pm$  1.15) sont légèrement sensibles. Quant à *Pseudomonas fluorescens* (10 mm) elle a montré une résistance vis-à-vis l'HE.

Pour les champignons, *Aspergillus niger* (15.67 mm  $\pm$  2.08), *Candida albicans* (14.33 mm  $\pm$  1.53), *Fusarium oxysporum* (16.33 mm  $\pm$  0.58) et *Penicillium* (11.67mm  $\pm$  0.58) ont tous montré une sensibilité moyenne vis-à-vis l'HE.





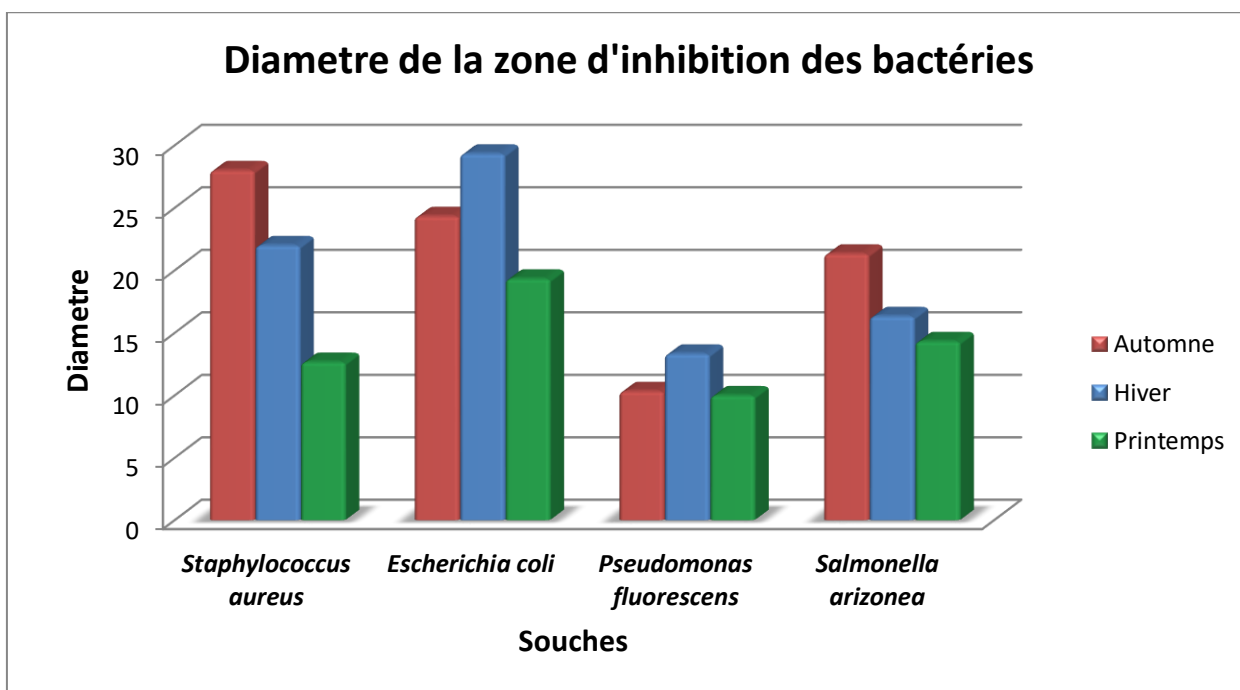
**Figure n°30** : Illustration des zones d'inhibition des fongis de printemps (photographie originale).



**Figure n°31** : Illustration des zones d'inhibition des bactéries de printemps (photographie originale).

### 3.2. Comparaison des résultats :

Les résultats de la comparaison sont représenté sou forme d'histogramme (**Figure n°34**)



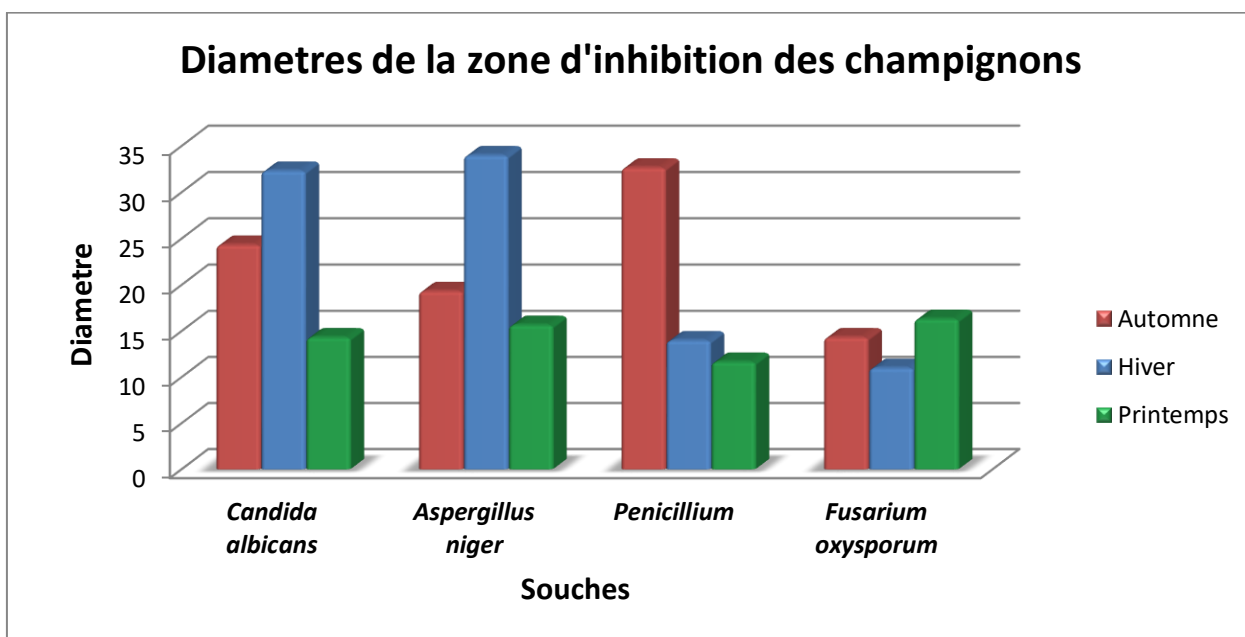
**Figure n°32** : Histogramme représente les résultats d'aromatogramme des Bactérie.

L'analyse des résultats de **la figure n°32** de l'huile essentielle du romarin a montré une forte activité inhibitrice de HE pour *Staphylococcus aureus* pour les deux saisons automne et hiver, et une légère activité inhibitrice pour la saison de printemps, mais avec une différence de +16 mm entre l'automne et le printemps, et c'est le même cas pour *Escherichia coli* qui a montré une forte activité inhibitrice pour les deux saisons l'automne et l'hiver et une activité modérément inhibitrice pour la saison de printemps, avec une différence de +10 mm entre la saison d'hiver et de printemps.

Pour *Salmonella arizonea*, nous avons eu des résultats différents pour chaque saison, en hiver l'huile essentielle de romarin avait une activité modérément inhibitrice (21.33 mm  $\pm$  0.58), alors qu'en automne elle était fortement inhibitrice (16.33 mm  $\pm$  1), et enfin en printemps l'activité est devenue légèrement inhibitrice (14.33 mm  $\pm$  1.15), avec une différence de +7 mm entre l'hiver et le printemps.

Enfin pour *Pseudomonas fluorescens*, nous avons constaté qu'elle est la plus résistante vis-à-vis de l'HE du romarin. Pour la saison hivernale, l'HE a montré une activité légèrement inhibitrice à l'ordre de 13.33 mm  $\pm$  1.15, alors que pour les deux autres saisons (automne et du printemps) l'espèce a montré une résistance vis-à-vis notre huile essentielle.





**Figure n°33 :** Histogramme représente les résultats d'aromatogramme des Champignons.

D'après les résultats, nous avons remarqué que l'activité antifongique est variable selon les souches et les saisons. La plus grande surface d'inhibition est observée en hiver chez *Aspergillus niger* (34 mm  $\pm$  4.36). Pour *Candida albicans* qui a présenté une forte sensibilité vis-à-vis l'huile en saison hivernale (32.33 mm  $\pm$  1.53), nous remarquons qu'en automne et printemps, la ZI était moins faible à l'ordre de 24.33 mm  $\pm$  0.58 et 14.33 mm  $\pm$  1.53 respectivement.

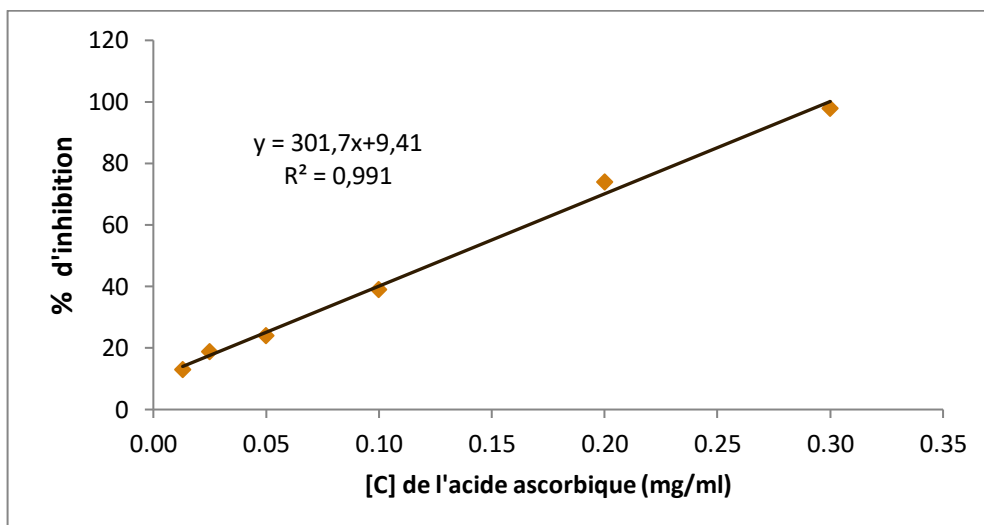
Alors que *Fusarium oxysporum* a présenté une résistance vis-à-vis l'huile essentielle en saison hivernale (11 mm  $\pm$  1), nous remarquons qu'en automne et printemps, la ZI était plus importante à l'ordre de 14.33 mm  $\pm$  2.31 et 16.33  $\pm$  0.58 respectivement.

Enfin pour *Penicillium* qui a présenté une forte sensibilité vis-à-vis HE en automne avec une ZI de 32.67 mm  $\pm$  2.52, alors qu'en hiver et printemps la ZI était beaucoup moins importante à l'ordre de 14 mm  $\pm$  1 et 11.67 mm  $\pm$  0.58 respectivement.

#### 4. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 515 nm (**figure n°36**). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires (Majhenic et al, 2007).

Afin de mettre en évidence l'activité antioxydante de *R. Officinalis*L. une courbe d'étalonnage réalisée par l'acide ascorbique a été tracée (**figure n°34**).



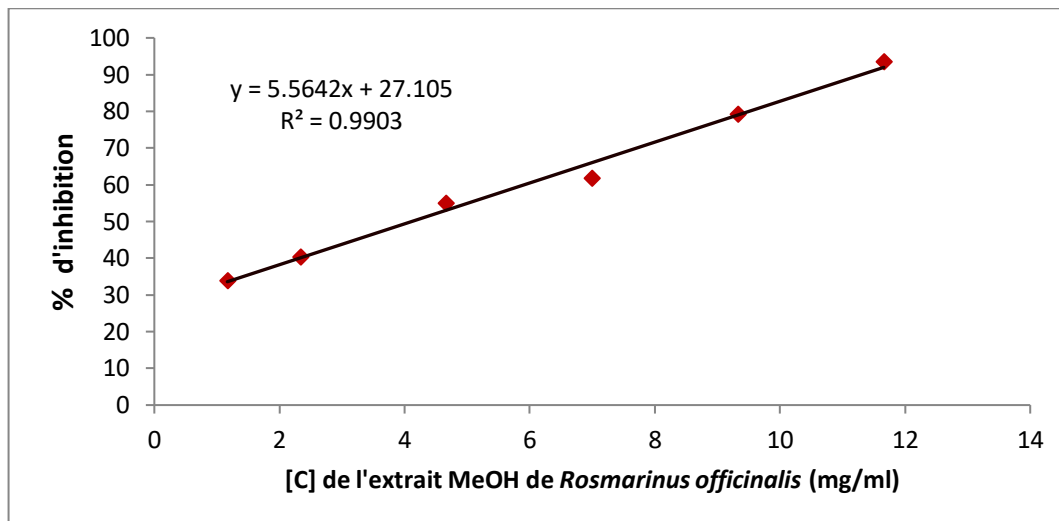
**Figure n°34:** Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

Les figures (**n°35**, **n°36**, **n°37**) montrent les résultats du pouvoir antioxydant des HE de *Rosmarinus officinalis* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

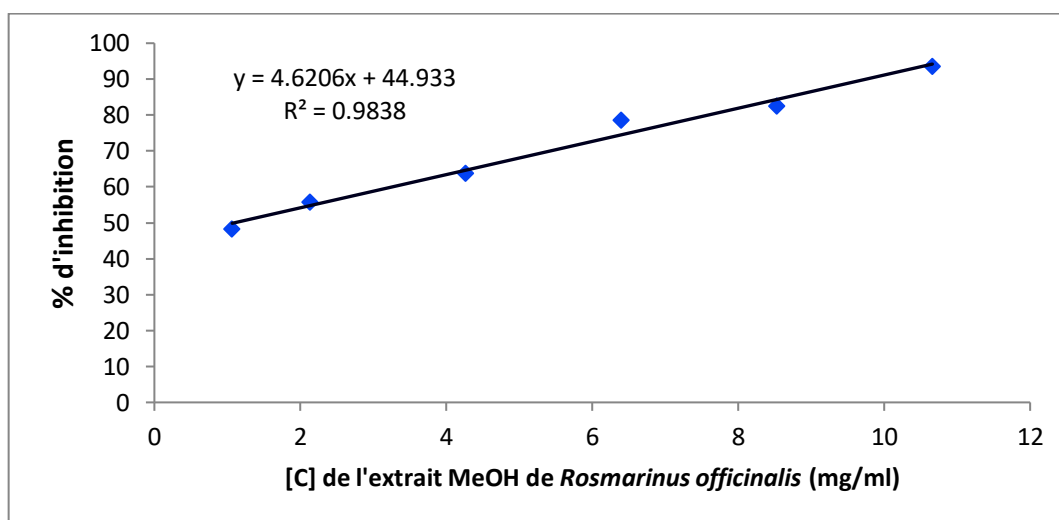
D'une manière générale, tous les extraits testés ont provoqué une diminution plus ou moins importante de l'absorbance à 516nm selon leurs concentrations.

D'après ces mêmes histogrammes, il apparaît clairement que l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle entraîne l'augmentation de l'activité antioxydante par le piégeage du radical DPPH. La plus forte activité est de 93.56% avec une concentration de 10.84 mg/ml et la plus faible activité est de 33.92% avec une concentration de 1.17 mg/ml.

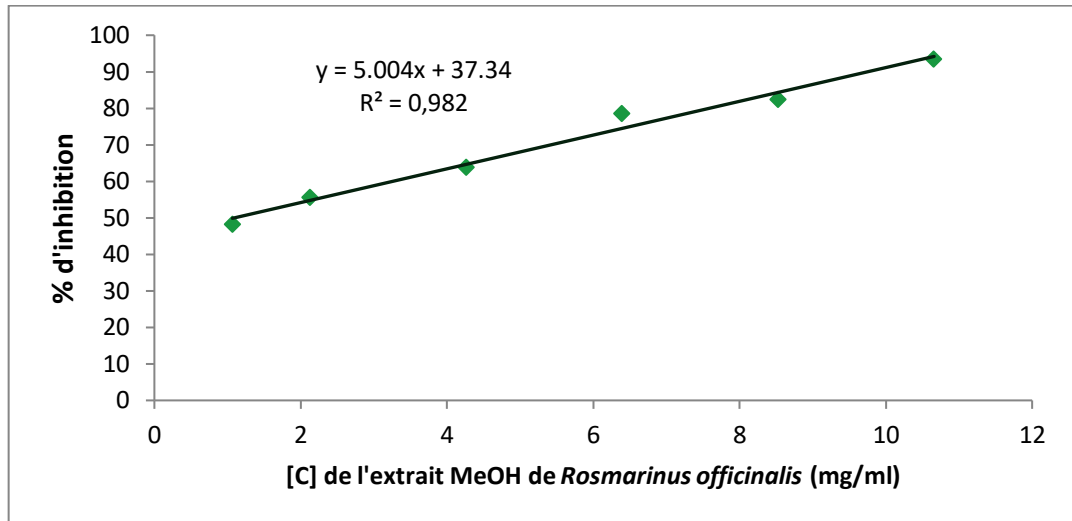
Les **figures n°35, n°36 et 37** montrent que l'HE de *Rosmarinus officinalis* présente un pourcentage d'inhibition le plus élevé, il est supérieur à 90% à des concentrations de l'ordre de 9.76 mg/ml pour l'hiver et 10.52 mg/ml pour le printemps et 11.3 mg/ml pour l'automne.



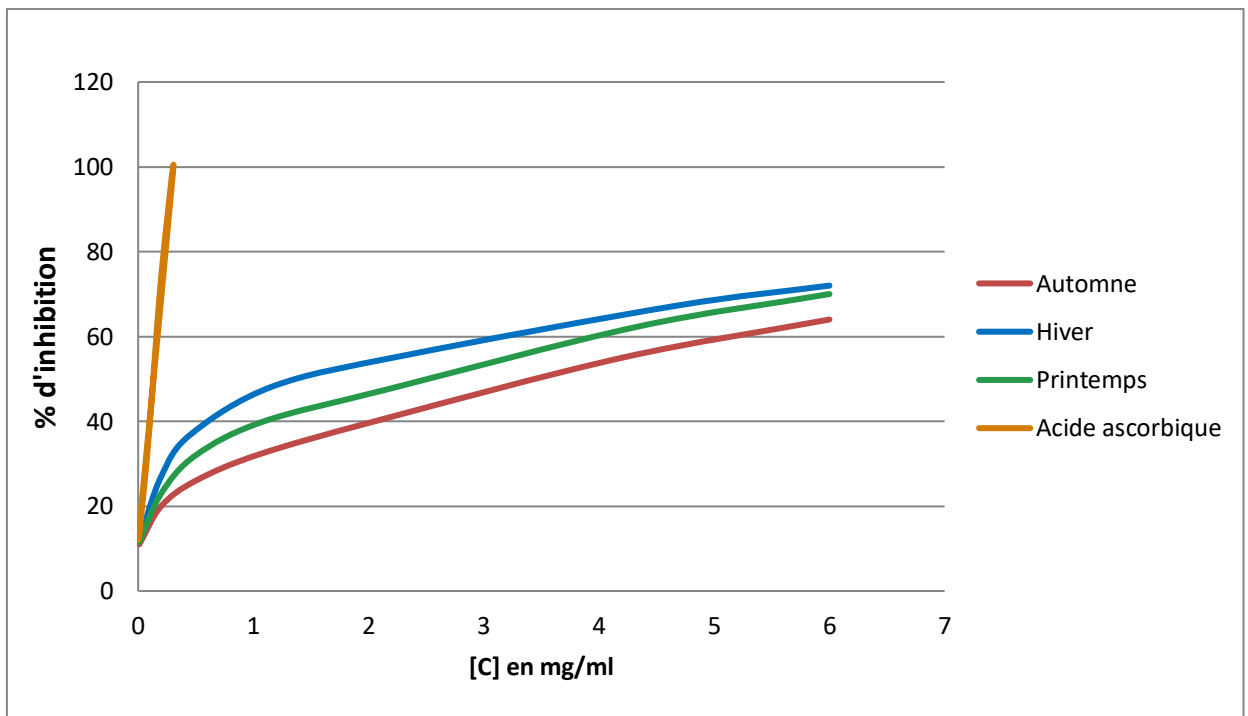
**Figure n°35 :** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'HE de *Rosmarinus officinalis* de la saison d'automne.



**Figure n°36:** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'HE de *Rosmarinus officinalis* de la saison d'hiver.



**Figure n°37:** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'HE de *Rosmarinus officinalis* de la saison de printemps.



**Figure n°38 :** Le pourcentage d'inhibition des trois échantillons comparés à l'acide ascorbique.

D'après la **Figure n°38** ci-dessus, on remarque que quelque soit la concentration des échantillons testés, l'activité antioxydante de l'acide ascorbique (vitamine c) est nettement supérieure à celle de l'huile essentielle étudiée. Cette étude nous renseigne sur la capacité antioxydante des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* et la puissance des antioxydants à capter ses radicaux libres.

Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour la vitamine C (acide ascorbique) ou pour les trois huiles essentielles du romarin (**Figure n°38**). On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'huile essentielle du romarin de la saison d'hiver est le plus élevé par rapport à celui de printemps qui est aussi plus élevé à celui de l'automne pour toutes les concentrations utilisées.

Il semble aussi que cette activité est liée à la présence des composés phénoliques dans l'huile essentielle. Le rôle principal des composés comme réducteurs des radicaux libres est souligné dans plusieurs rapports (**Villano et al, 2007**).

Les études sur la composition chimique des huiles essentielles des plantes aromatiques en relation avec le screening de leurs activités biologiques sont abondantes. Il est établi dans de nombreux travaux que l'activité d'une huile essentielle est en rapport avec les composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre les constituants).

En effet, il a été démontré que les constituants responsables de l'activité antioxydante des huiles essentielles sont généralement des composés oxygénés comme les phénols, les alcools et les cétones. (**Bourgou S et al, 2008**).

#### 4.1. Calcul des $IC_{50}$

La capacité antioxydante de nos huiles essentielles est déterminée à partir des  $IC_{50}$ , paramètres couramment utilisés pour mesurer l'activité antioxydante. C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH dans une période de temps définie. Une valeur faible d' $IC_{50}$  correspond à une activité antioxydante plus élevée de l'extrait (**Prakash et al., 2007**).

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit deux paramètres :

- ✓ Le calcul d' $IC_{50}$  : il définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution.

Les valeurs de  $IC_{50}$  des trois saisons étudiées de l'HE de *Rosmarinus officinalis* (tableau 16) ont été estimées en utilisant la courbe de régression linéaire :  $y = ax + b$

Où  $y = 50\%$  (pourcentage de réduction de DPPH)

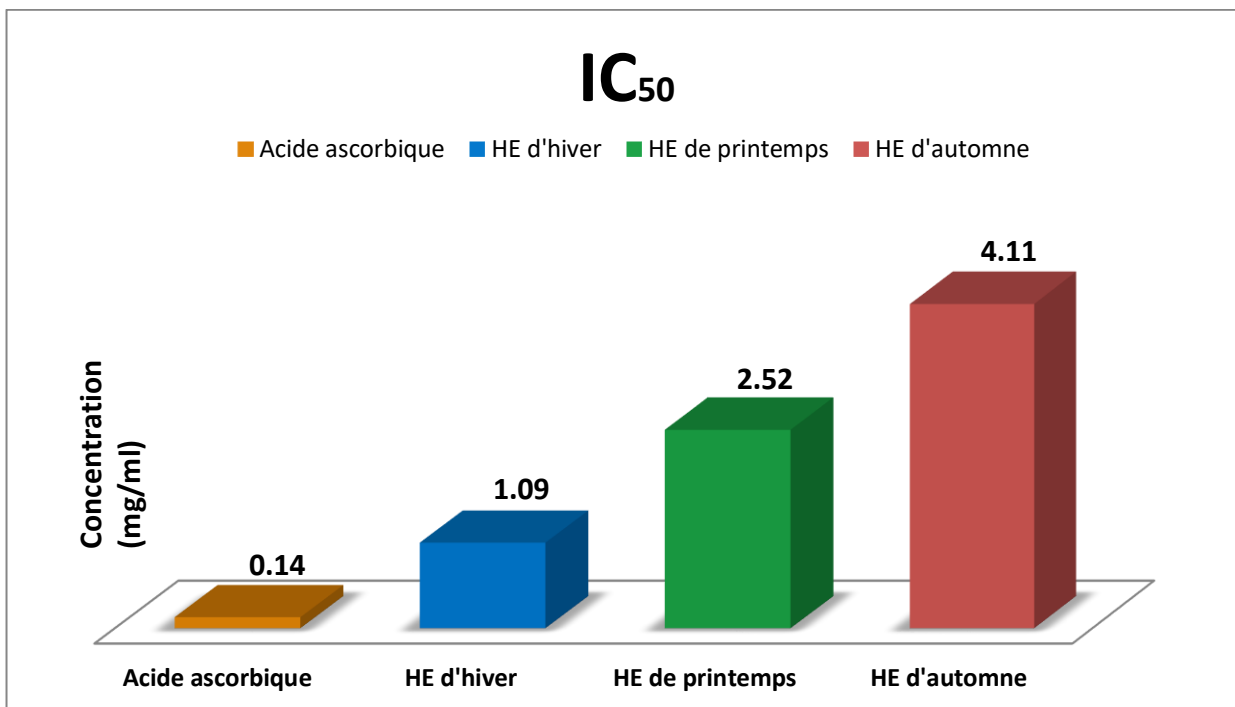
$x : IC_{50}$  (concentration en mg/ml)

- ✓ Le calcul du pouvoir antiradicalaire : (ARP) qui est inversement proportionnel à l' $IC_{50}$ .  
( $ARP = 1/IC_{50}$ )

**Tableau<sup>o</sup>15** : Valeurs des  $IC_{50}$  et le pouvoir de l'HE de *Rosmarinus officinalis* et de l'acide ascorbique.

plante	saisons	$IC_{50}$ (mg/ml)	ARP
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Automne	4.114	0.243
	Hiver	1.096	0.912
	Printemps	2.528	0.395
<b>Acideascorbique</b>		0.134	7.462

Les valeurs des  $IC_{50}$  trouvées pour les trois extraits testés et l'acide ascorbique sont représentées dans la **figure n°39**.



**Figure n°39** :La concentration inhibant 50 % de la réaction.

À des fins comparatives un antioxydant standard est utilisé (l'acide ascorbique). Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec  $IC_{50}$  de l'ordre de 0,134 mg/ml. La valeur  $IC_{50}$  de l'acide ascorbique est conforme avec celle de (Talbi, H et al, 2014).

Les résultats présentés dans la **Figure n°41** de l'activité antiradicalaire des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* montrent un  $IC_{50}$  (Concentration inhibant 50% de la réaction) égal à 1,09 mg/ml pour la saison hivernale, et 2,52 mg/ml pour la saison de printemps et enfin 4,11 mg/ml pour la saison d'automne.

Nous pouvons donc conclure que l'HE du romarin récolté en hiver est l'antioxydant le plus efficace, suivi par celui du printemps et enfin celui d'automne.

### 5. Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

L'analyse par GC/MS de l'HE de *Rosmarinus officinalis* provenant de la région de Blida nous a permis de déterminer sa composition chimique, les résultats sont représentés dans le **tableau n°16**

**Tableau 16** : les principaux composés chimiques des huiles essentielles de *R. officinalis* des trois saisons.

Composés	Temps de retention (min)			Taux des composés majoritaires (%)		
	Automne	Hiver	Printemps	Automne	Hiver	Printemps
$\alpha$ -Pinene	7.44	7.44	7.44	1.755%	<b>20.172%</b>	<b>20.334%</b>
Camphene	7.94	7.93	7.93	4.059%	4.460%	8.603%
$\beta$ -pinene	8.97	8.97	8.97	0.421%	0.517%	2.666%
3-Carene	10.27	10.26	10.26	2.701%	3.420%	1.866%
o-cymene	10.87	10.85	10.85	0.461%	4.530%	2.020%
m-Menth-6.8-diene.	11.02	11.02	11.02	4.994%	6.112%	5.814%
Eucalyptol	11.10	11.09	11.09	<b>17.721%</b>	<b>11.386%</b>	9.043%
$\beta$ -Linabol	14.11	14.10	14.11	6.471%	4.273%	2.326%
Alcanfor	15.95	15.96	15.96	<b>25.838%</b>	<b>15.783%</b>	<b>19.044%</b>
Borneol	16.93	16.94	16.93	<b>18.905%</b>	<b>17.340%</b>	<b>11.321%</b>
2-Pinen-4-one	18.89	18.88	18.88	<b>12.839%</b>	7.936%	<b>12.077%</b>
Borneol acetate	22.36	22.34	22.34	0.384%	1.303%	2.740%

D'après le tableau, nous constatons que la nature des constituants est la même pour les trois échantillons de l'huile essentielle ; Seules les teneurs des composés qui se diffèrent selon la saison.



### 5.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *R. officinalis* L. d'automne

L'analyse chimique montre que le composé majoritaire chez le Romarin d'automne est l'Alcanfor(25.838%) suivi par Borneol(18.905%), Eucalyptol(17.721%) et 2-Pinen-4-one(12.839%)(Figure n°40)

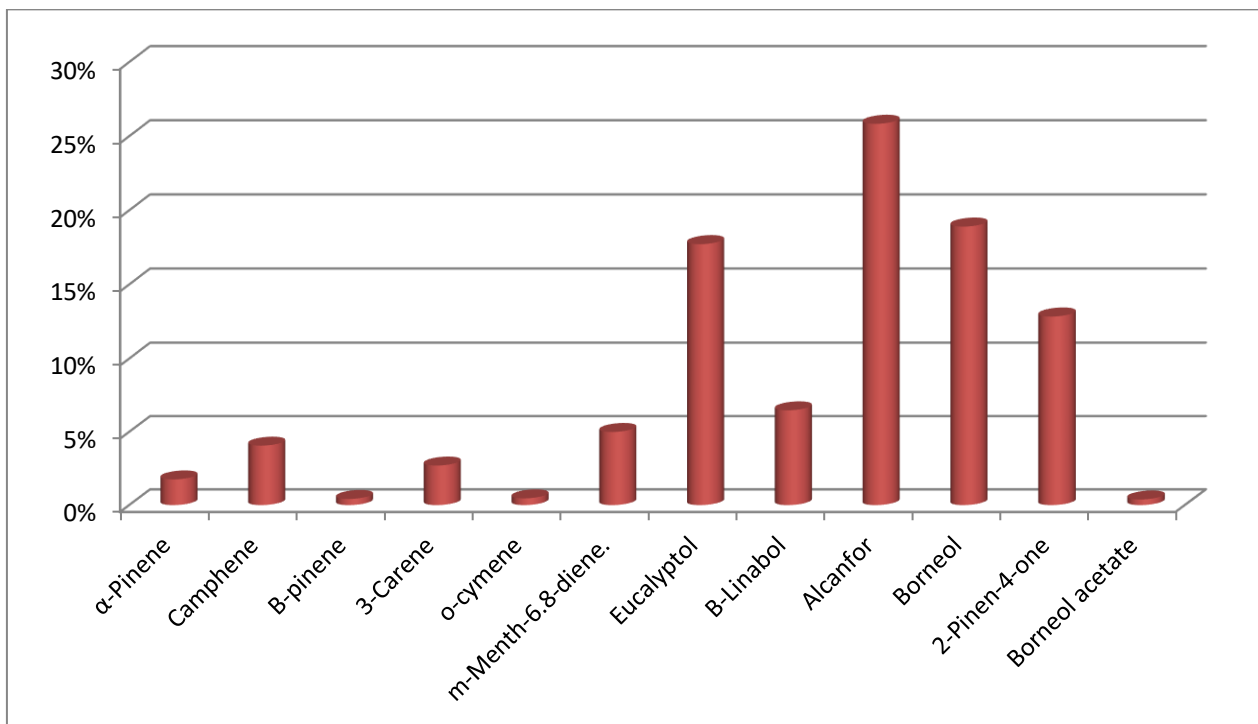


Figure n°40 : Principaux composés identifiés dans l'HE d'automne.

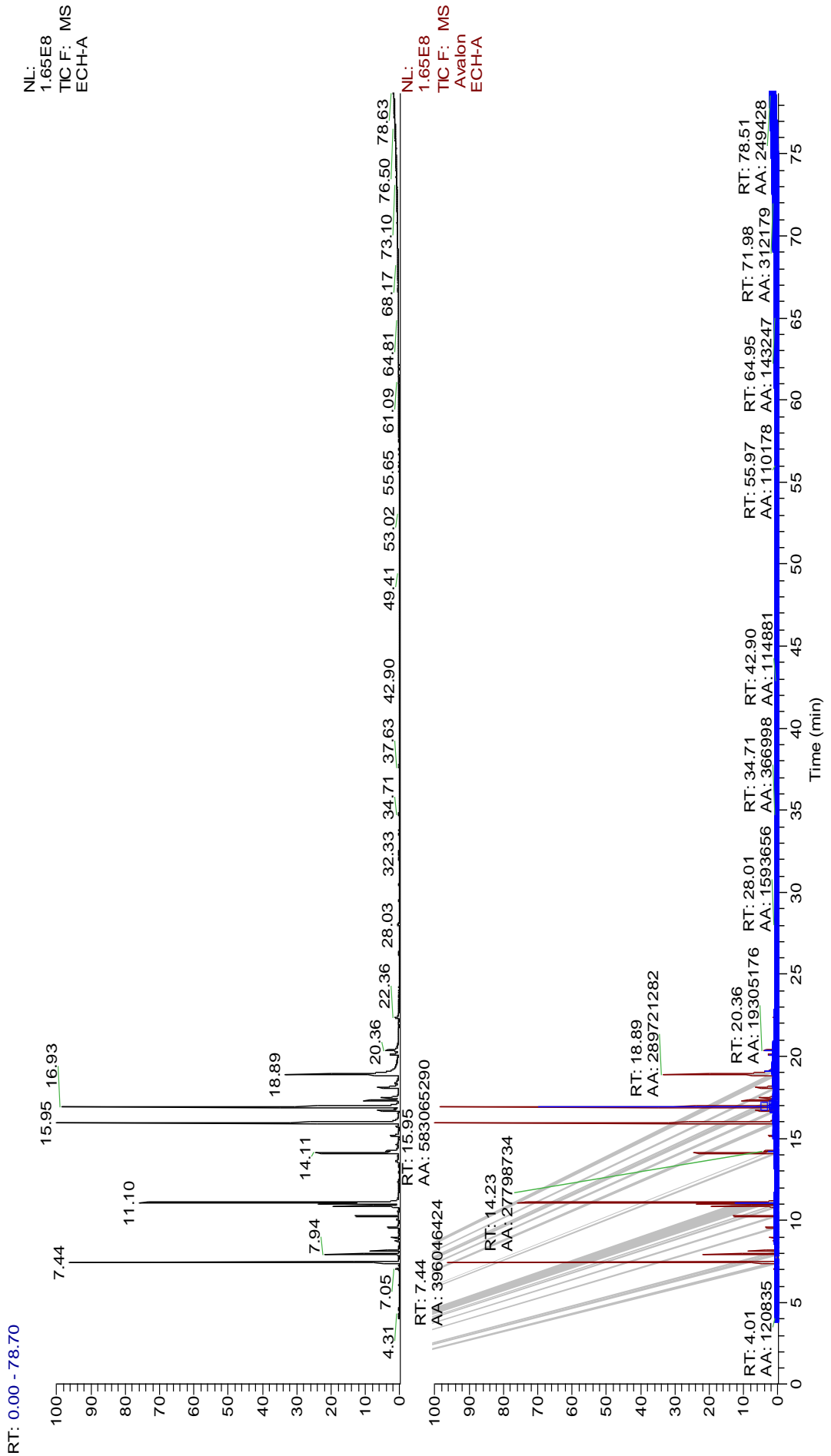
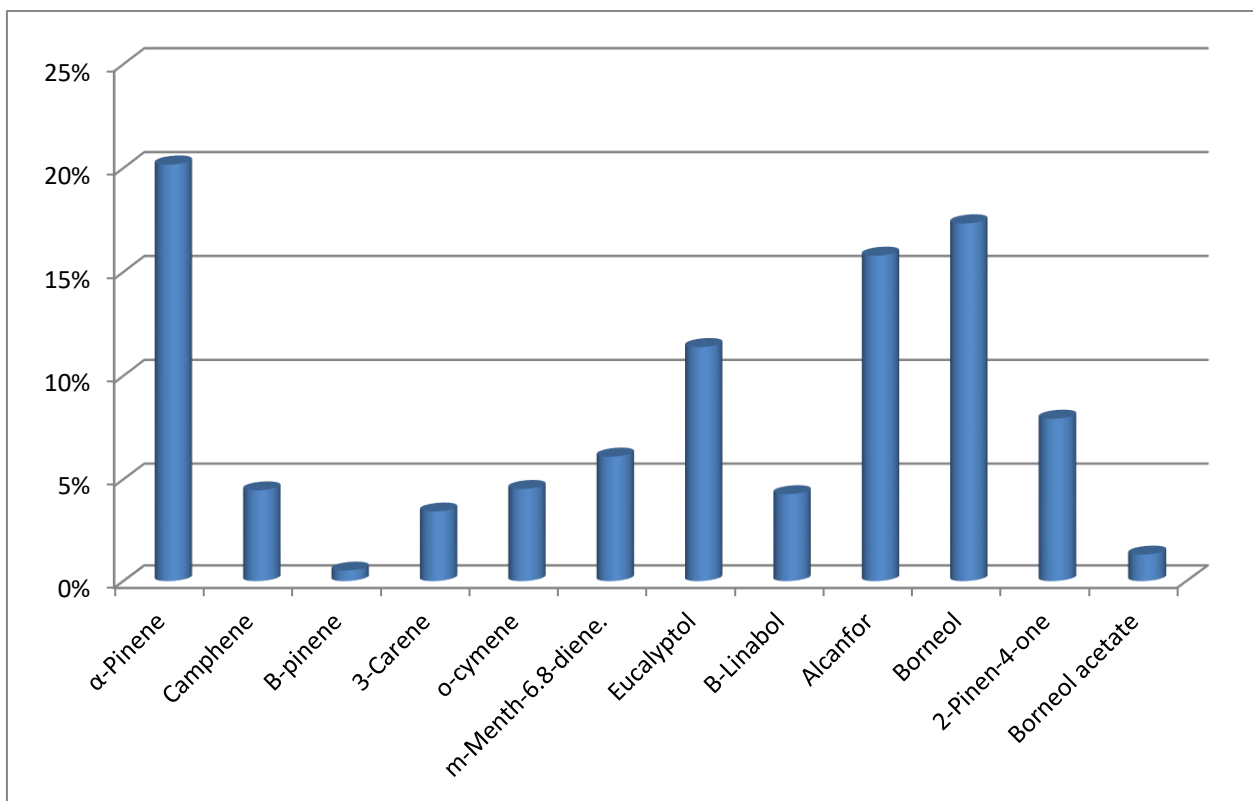


Figure n°41 : Chromatogramme de CG/MS de HE d'automne

## 5.2. Composition chimique de l'huile essentielle de *R. officinalis* L. d'hiver

Les résultats de l'analyse chimique, obtenus par CG/MS, ont montré que le composé majoritaire chez le Romarin d'hiver est l' $\alpha$ -Pinene (20.172%), suivi par Borneol (17.340%), Alcanfor (15.783%) et Eucalyptol (11.386%) (**Figure n°42**)



**Figure n°42** : Principaux composés identifiés dans l'HE d'hiver

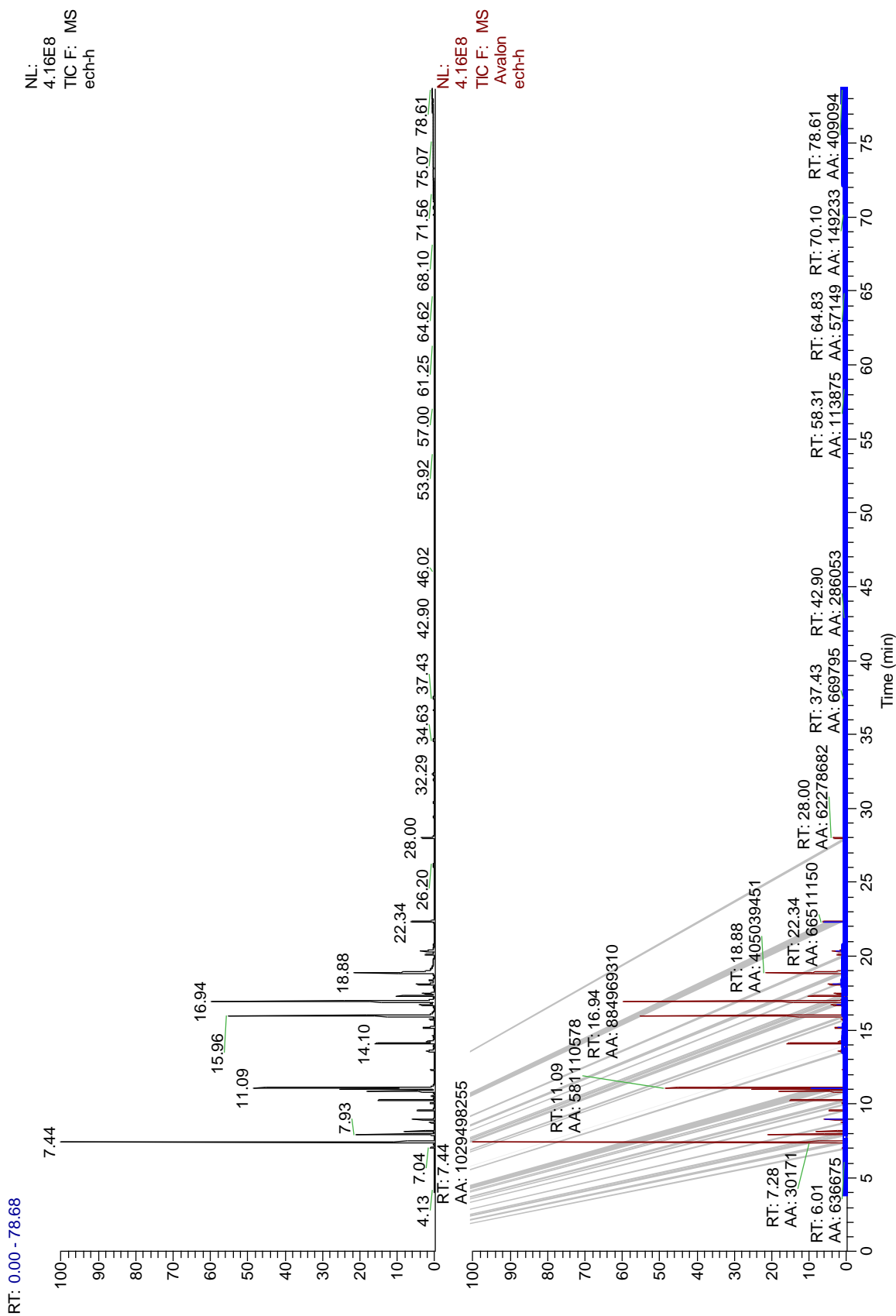


Figure n°43 : Chromatogramme de CG/MS de HE d'hiver

### 5.3. Composition chimique de l'huile essentielle de *R. officinalis* L. de printemps

Pour le romarin de printemps, le composé majoritaire est l' $\alpha$ -Pinene(20.334%) suivi par Alcanfor (19.044%), 2-Pinen-4-one (12.077%) et Borneol(11.321%)

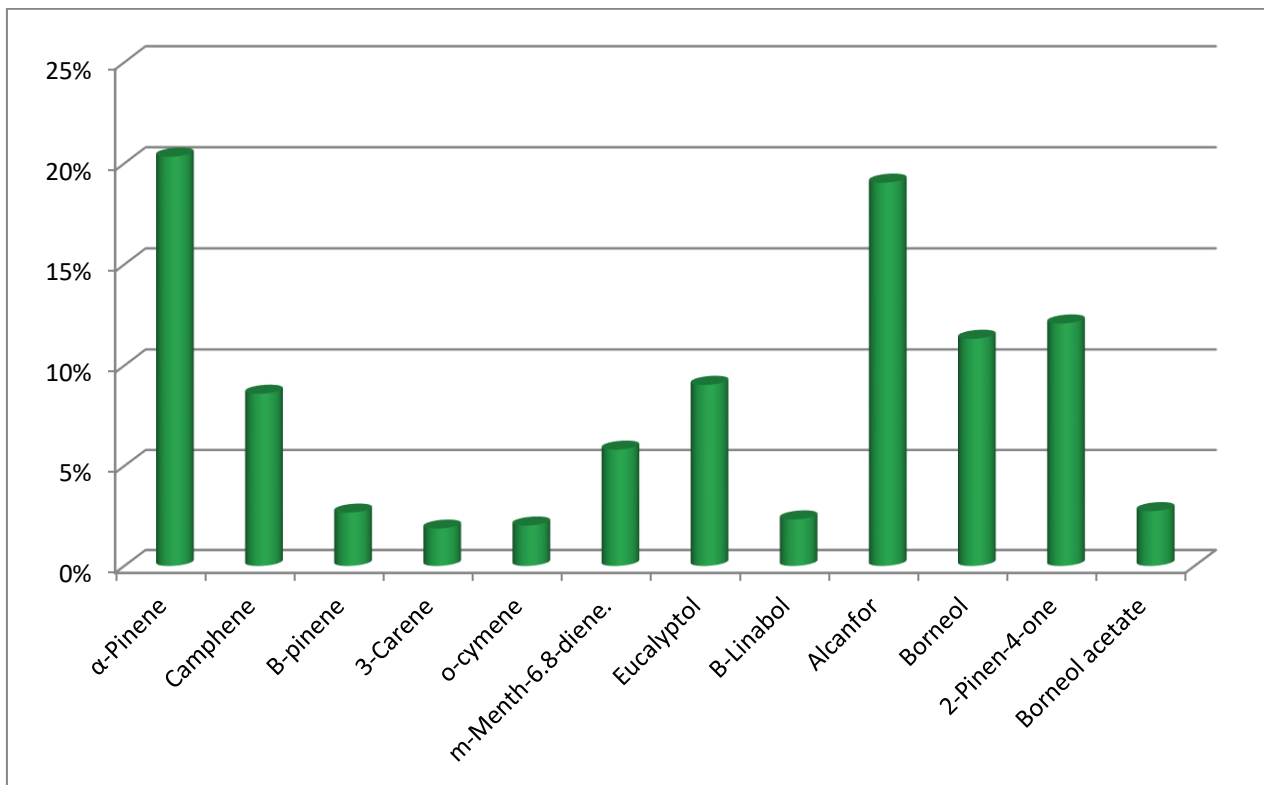


Figure n°44: Principaux composés identifiés dans l'HE de printemps

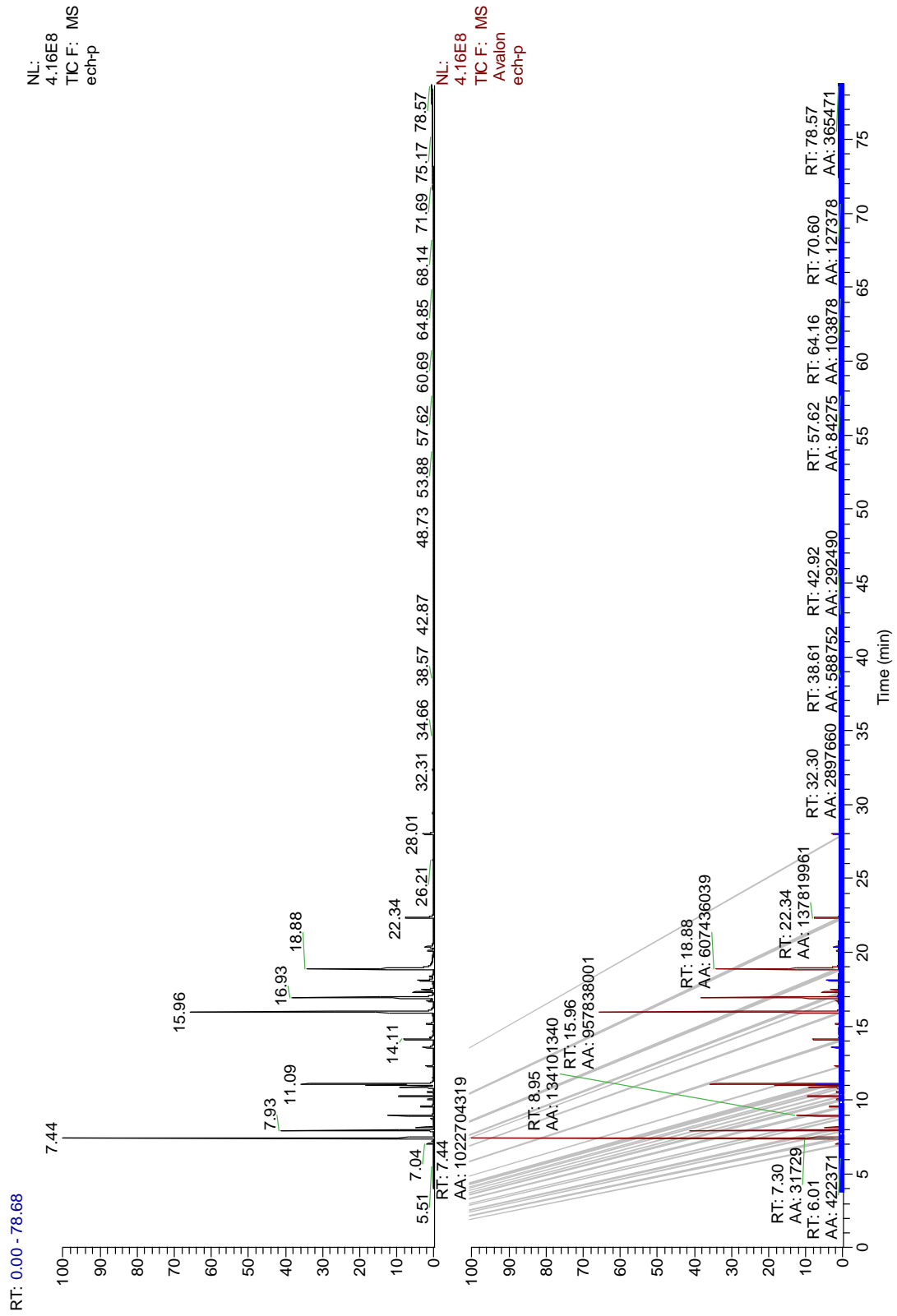


Figure n°45 : Chromatogramme de CG/MS de HE de printemps

#### 5.4. Composition chimique de l'huile essentielle de *R. officinalis* L. des trois saisons

L'analyse chimique par CG/MS de l'huile essentielle de *R. officinalis* L. a montré que les composés ne changent pas selon les saisons mais ce sont teneurs qui changent. (figure n°46)

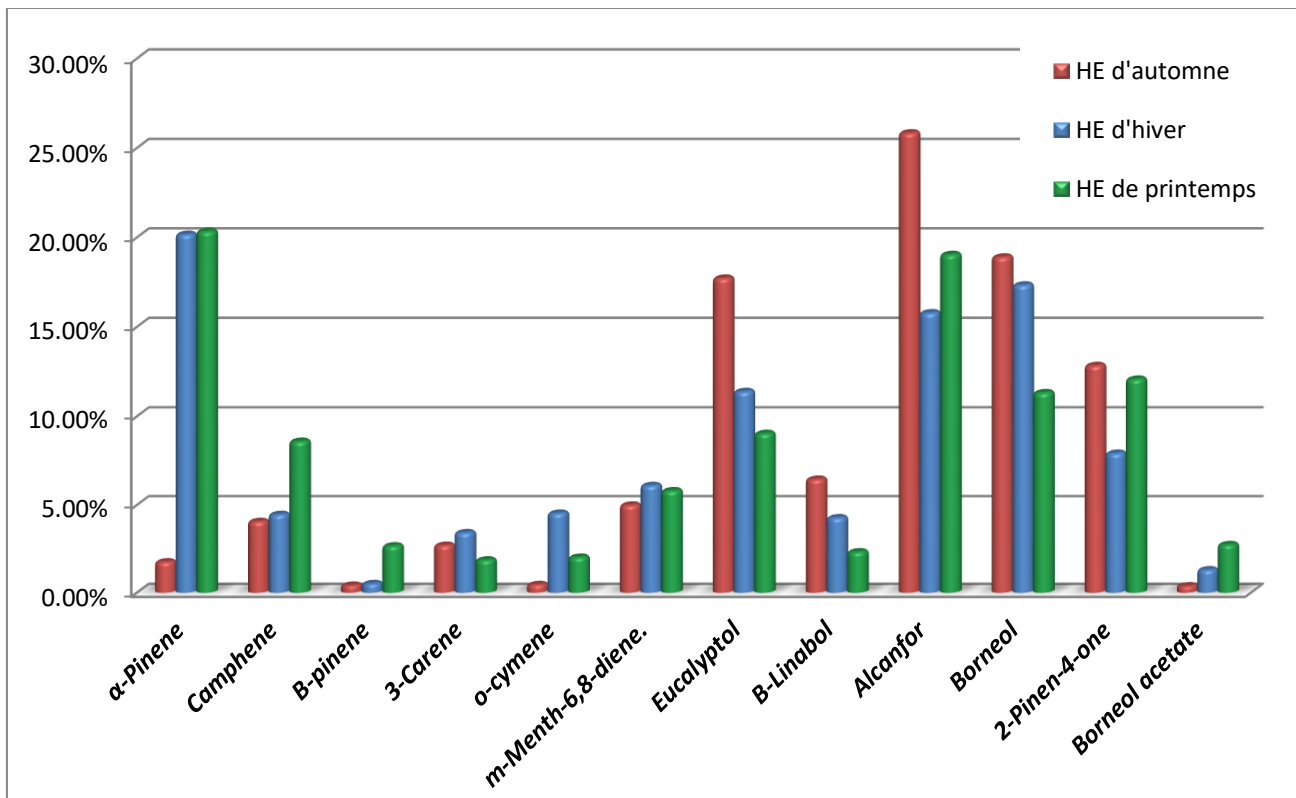


Figure n°46 : Comparaison de la composition chimique des HE de *Rosmarinus officinalis*.

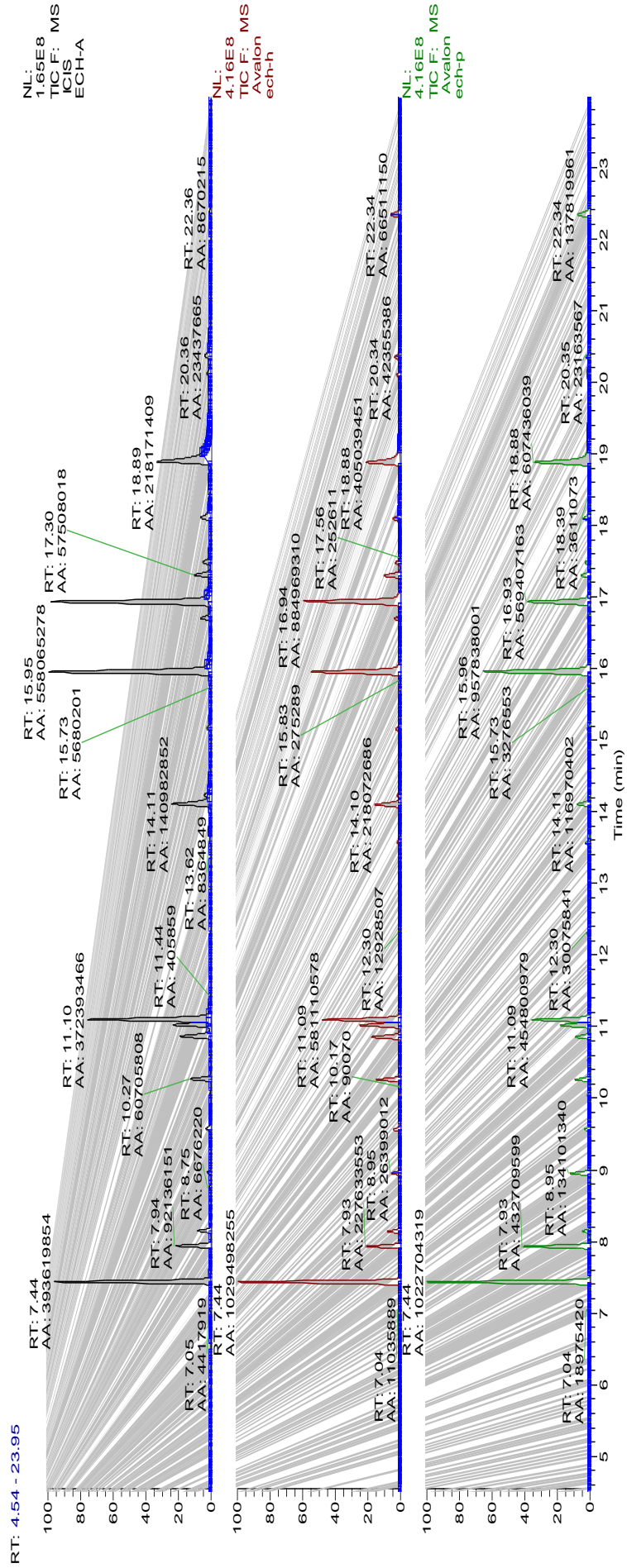


Figure n°47: Comparaison des chromatogrammes de trois saisons



D'après les résultats obtenus, le composé majoritaire chez le romarin d'automne est Alcanfor (25.838%) suivi par Borneol (18.905%), Eucalyptol (17.721%) et 2-Pinen-4-one (12.839%).

Pour le romarin d'hiver, le composé majoritaire est  $\alpha$ -Pinene (20.172%) suivi par Borneol (17.340%), Alcanfor(15.783%) etEucalyptol(11.386%).

Chez le romarin de printemps, le composé majoritaire est  $\alpha$ -Pinene (20.334%) suivi par Alcanfor (19.044%), 2-Pinen-4-one (12.077%) et Borneol (11.321%).

L'analyse chimique montre que le seul composé qui a gardé presque un pourcentage stable pour les 3 saisons automne, hiver et printemps est le m-Menth-6,8-diene avec respectivement 5 %, 6.11 % et 5.81%.

Alcanfor et Borneol sont les composants majoritaires pour les 3 saisons.L' $\alpha$ -Pinene c'est un composant majoritaire pour l'huile d'hiver et de printemps (20.172%-20.334%) et pas pour huiles d'automne (1.755%).

Cependant, les données ne sont pas toujours facilement comparables car les conditions d'extraction, de l'ensoleillement et de la pluviosité sont très souvent différentes.

Les variations dans la composition chimique des HE de *R. officinalis* L. sont certes dus à des facteurs génétiques, mais également à des facteurs géographiques, bioclimatiques ainsi qu'aux conditions de récolte et de stockage de la plante (**Hussain et al., 2008; Anwar et al., 2009**).

Nous constatons que la nature des constituants est la même pour les huiles essentielles des trois saisons ; cependant, les teneurs des composés diffèrent selon la saison. Donc cette étude nous a permis de mettre en lumière l'influence du facteur saison sur la variation dans la composition chimique de notre huile essentielle.

# CONCLUSION

### Conclusion:

La flore de la région de la Mitidja jouie d'une biodiversité considérable, elle possède de nombreuses plantes aromatiques et médicinales riches en métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de trois saisons, (automne, hiver et printemps), sur le rendement, l'activité antimicrobienne et antioxydante ainsi que la composition chimique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L.

Les résultats montrent que le rendement en huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de printemps est plus important que ceux d'automne et d'hiver. L'étude des caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle, a montré qu'elle est presque conforme aux normes AFNOR.

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. a été illustrée par la méthode d'aromatogramme. Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle présente une activité antimicrobienne sur quelques souches testés mais pas sur l'ensemble. Nous avons aussi constaté que le pouvoir antimicrobien varie selon les souches et selon la saison pour la même souche.

Pour les champignons, *Penicillium* a présenté une forte sensibilité en hiver avec 32,67mm alors qu'en printemps elle était très faible avec 11,67mm, *Candida albicans* et *Aspergillus Nigers* ont présenté une forte activité inhibitrice en hiver (32,33mm et 34mm respectivement) alors que leurs activité a diminuée en printemps (14,33mm et 15,67mm respectivement), *Fusarium oxysporum* a présenté une résistance vis-à-vis l'huile essentielle d'hiver (11mm) alors que l'activité inhibitrice de l'huile est plus importante en automne (14,33mm) et en printemps (16,33mm).

Pour les souches bactériennes étudiées, c'est *Escherichia coli* qui s'est avéré la plus sensible à l'huile essentielle d'hiver avec une ZI de 29,33mm suivi par *Staphylococcus aureus* avec l'huile essentielle d'automne (28mm), alors que la souche la plus résistante est *Pseudomonas fluorescens* avec une ZI de 10mm pour les saisons d'automne et de printemps.

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthode de DPPH, montre que notre HE présente une faible activité antioxydante en la comparant à l'acide ascorbique (vitamine c). Alors lorsque nous comparons l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. des trois saisons, nous constatons

## CONCLUSION GENERALE

---

que l'activité antioxydante de l'huile essentielle d'hiver est la plus importante, suivie par celle de printemps puis d'automne.

Enfin, les analyses par Chromatographie en phase Gazeuse Couplée par Spectrophotométrie de Masse (CG/MS) de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L., ont montré que la nature des constituants est la même pour les trois saisons, et ce sont les teneurs qui diffèrent selon la saison. En se basant sur les résultats de la CG/MS, nous pouvons dire que l'huile essentielle d'automne est de type Alcanfor/Bornéol, celle d'hiver est de type  $\alpha$ -Pinène/Bornéol, et celle de printemps est de type  $\alpha$ -Pinène/Alcanfor.

Il est à noter que le pouvoir antimicrobien dépend de la composition chimique des huiles essentielles non seulement pour les composés majoritaires mais la synergie de ces derniers et les composés mineurs.

De ce fait, nous pouvons dire que les variations climatiques saisonnières influent le rendement, le pouvoir antioxydant et antimicrobien ainsi que la composition chimique de l'huile essentielle de romarin.

Pour l'utilisation de romarin de la région de Blida, des études ultérieures plus approfondies doivent être effectuées afin de cerner l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extrait, il serait intéressant de :

- Vérifier leur innocuité par des tests de toxicité et des tests d'allergénicité semble d'une grande importance.
- Tester l'HE sur d'autres agents microbiens afin de confirmer son efficacité à différentes concentrations de dilution.
- Etudier l'activité antioxydante et les aptitudes technologiques de cette HE.
- Poursuivre l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, notamment l'action isolée de chacun de ses constituants et la détermination de la concentration minimale bactériostatique (CMB).
- Et enfin l'application de ses résultats dans le domaine agro-alimentaire et agronomique.

# Références bibliographiques

- Ait Hellal, A., Haderbache, K. (2011).** Les techniques d'extraction des huiles essentielles par microondes. Illustrée, 68p, France.
- Alix, I. (2012).** Les huiles essentielles guide pratique et conseils d'utilisation. ESI, 284p, Paris.
- Alloun, K. (2007).** Les plantes médicinales d'Algérie. Berti Editions, 240p, Delly Brahim Alger
- Amrati, F., Satrani, B., Ghammi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., ElAjouri, M., Chaouch, A. (2010).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. Biotechnol. Agron. Soc, 14, 1, 141-148.
- Anonyme. (1999).** AFNOR, Huiles essentielles. Détermination de l'indice de réfraction (Homologuée le 5 septembre 1994). Journal officiel du 21 février 1999, 147, avis relatifs à l'homologation et à l'annulation de normes, NORECO 19910009V.
- Anonyme. (2000).** AFNOR, Huiles essentielles, Ed. PARA Graphic, Tome 1 – Échantillonnage et méthode d'analyse 471 p. Tome 2 – Vol. 1 Monographie relative aux huiles essentielles 323 p. Tome 2 – Vol. 2 Monographie relative aux huiles essentielles, 663 p.
- Anonyme. (2015).** Phytoaromathérapie. In <http://www.cfmc-dz.com/index.php/11-formations/11-phyto-aromatherapie> Consulté le 16 Juillet 2017.
- Anton, R., Wichtel, M. (1999).** Plantes thérapeutiques traditions. Pratique officinales, science et thérapeutique Françaises. Strasbourg.
- Asdadi, A., Hamdoucha, A., Oukachab, R., Moutaje, S., Gharbyf, H., Harhard, M., Elhadeke, B., Cheblif, I., Idrissi, H. (2015).** 4, 25, 118-127.
- Bahorun, T. (1997).** Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Food and agricultural research council, Reduit Mauritius, 83-94.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luycks, M., Vasseur, J., Cazin, M. and Pinkas, M. (1997).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Drug Research*, 46, 1086-1089.
- Barakat, M., Laib, I. (2011).** Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs séchées de *lavandula officinalis*. Génie Industriel, 6, 46-54.
- Baudoux, D., Zhiri, A. (2009).** Huiles essentielles chemotypées et leurs synergies. Inspir, 88p, Noisy-Le-Grand.
- Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., Abdelouahid, D, E. (2008).** Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. Phytothérapie, 153, 6, 153-159.

- Beloued, A. (2010).** Les plantes médicinales d'Algérie. Ed officie des publications universitaires. 227p, Algérie.
- Benhabiles N.E.H., Aït-Amar H. (2001).** Comparativestudy of Algeria's *Rosmarinus eriocalys* and *R officinalis*. *Perfumer & Flavorist*. 26 (5), 40-48.
- Besombes,C.(2008).**Contribution a l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbe aromatique. Thèse .Université de la Rochelle. France.93p.
- Bolt, N., Gouillier, J. (2013).** Plantes médicinales. Terres éditions, 328p, Paris.
- Bouloued, A. (2014).**Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires, 284p, Place de Ben-Aknoun(Alger).
- Bourgeois, I. (2007).**Le grand livre des plantes aromatiques. Rustica éditions, 191p, Paris.
- Bourgou S, Ksouri R, Skandranf I, Chekir-Ghedira L, Marzouk B. (2008).** Antioxidant and antimutagenic activities of the essential oil and methanol extract from Tunisian *Nigella sativa* L.(Ranunculaceae) .*Ital. J. Food Sei*, 20(2):191-201.
- Bousbia, N. (2011).** Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger.128p.
- Bournie, G., Forrester, S., Guest, S., Harman, M., Hobly, S., Jaskon, G., Lavarck, P., Ledge, H., Purdy, G., Ryan, S., Silk, J. (2006).** *Botanica : encyclopedie de Botanique & d'horticulture*, Plus de 10 000 plantes du monde entier. Ullman & Konemann.1020p, Places de victoire Paris.
- Bourrain, J. (2013).** Allergies aux huiles essentielles : aspects pratiques allergy to essential oils : pratical aspects. *Française d'allergologie*, 1, 53, 30-32.
- Boutekedjiret C., Bentahar F., Belabbes R., Bessière J.M. (1998).** The essential oils from *Rosmarinus officinalis* L. in Algeria, *J. Essent. Oil Res*, 10, 680-682.
- Boutekedjiret C., Belabbes R., Bentahar F., Bessière J.M. (1999).** Study of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and composition as a function of the plant life cycle, *J. Essent. Oil Res*. 11, 238-240.
- Bruneton, J. (1993).**Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Tee et Doc-Lavoisier, 915p, Paris.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 3eme édition, Tee et Doc-Lavoisier, 1120p, Paris.

- Bruneton, J. (2008).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition, Tee et Doc .Edition médicinales international, 1188p, Paris.
- Burits, M .,Bucar, F.(2000).** Antioxydant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytothérapie Research, 14, 323-328.
- Chang,S.S., Ostric-Manjasevic, B., Hsieh,O.L., Huang,C.L.(1977).**Natural antioxidant from Rosemary and sage J.Food Sci,42,1102-1106.
- Chaumont, J., Millet-Cler, J. (2011).** Phyto-aromathérapie appliquée à la dermatologie. Lavoisier, 263p.
- Cibaka, M., Gros, J., Collin, S.(2014).** Revue sur les étonnantes analogies et les différences relevées entre un cône de houblon et une baie de raisin : partie III : aromes. Terpènes. C13-norisoprénoïdes, hydrocarbures et dérivés oxygènes non terpéniques. Cerevisia, 38, 4, 103-117.
- Copolovici, L., Niinemets,U. (2015).** Temperature dependencies of Henry's law constants for different plant sesquiterpenes. Chemosphere, 138, 751-757.
- Congo., M.Y. (2012).** Etude des propriétés antiradicalaire et des propriétés antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *salvadora persica* L.( salvadoraceae).Thèse.Université de Ouagadougou.Burkina Faso.81p. .
- Couic-Mainier, F., Annelise, L. (2013).**Composition chimique des huiles essentielles : Chemical composition of essential oils. Actualités pharmaceutique, 525, 52, 22-25.
- Couic-Mainier, F., Annelise, L. (2013).**Mode d'utilisation des huiles essentielles. Actualités pharmaceutique, 525, 52, 26-30.
- Couic-Mainier, F., Annelise, L. (2013).** Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine : Essential oils gaining ground at the community pharmacy.Actualités pharmaceutique, 525, 52, 18-21.
- Couic-Mainier, F., Annelise, L. (2013).**Les huiles essentielles en pratique l'officine. Actualités pharmaceutique, 525, 52, 31-33.
- Couic-Mainier, F. (2014).**Se soigner avec les huiles essentielles. Solar, 156p. Paris.
- Croud, V., Marchaud,C., Maltas, P., Hecht, L., Douglas, R.(2016).**Criminal removal of fuel markers by distillation. Fuel processing technology, 144, 341-347.
- Damyeh, M., Niakousari, M. (2016).** Impact of ohmic-assisted hydrodistillation on kinetics data, physicochemical and biological properties of *Prangos ferulacea* Lindle. essential oil:



- Comparison with conventional hydrodistillation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 387-396.
- Dias, P.C., Foglio, M.A., Possenti, A., De Carvalho, J.E. (2000).** Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis L.* *Enthnipharmacol*, 69, 57-62.
- El amri, J., Elbadaoui, K., Zair., Bouharb, H., Chakir, S., Alaoui, T. (2014).** Etude de l'activité antimicrobienne de huiles essentielles de *Tencrium capitatum L* et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Bioscience*, 82, 7481-7492.
- Elqaj, M., Ahami, A., Belghyti, D. (2007).** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiothérapie". Maroc.
- Fabri, R.L., Nogueira, M.S., Braga, F.G, Coimbra, E.S., Scio, E. (2009).** *Mitracapus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresour Technol*, 100, 428–433.
- Farnsworth, NR., Akerele, O., Bingle, AS., Soejato, DD., Guo, Z. (1985).** Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organization*, 63, 6, 965-81.
- Feiran, C., Christian, H., Robert, M., Peter, S. (2015).** Metabolism of oxybenzone in a hairy root culture: Perspectives for phytoremediation of widely used sunscreen agent. *Journal of Hazardous Materials*, 306, 230-236.
- Ferhat, M., Maklati, B., Chemat, F. (2010).** Citrus d'Algérie: Les huiles essentielles et leur procédés d'extraction. Office des publications universitaires, 153p, Alger.
- Fernandez, X., Chemat, F. (2012).** La chimie des huiles essentielles : Tradition et innovation. Vuibert, 274p, France.
- Folliard, T. (2014).** Le petit Larousse des huiles essentielles. Larousse, 303p, Paris.
- Fouché, J.G., Marquet, A., Hambuckers, A. (2008).** Les plantes médicinales de la plante au médicament conception et réalisation.
- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. et Rasooli I. (2007).** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem*, 102, 898-904.
- Gazengel, J-M., Orecchioni, A-M. (2001).** Le préparateur en pharmacie. 2<sup>ème</sup> édition. Edition Lavoisier. 1727p, Paris.

- Ghazghazi, H., Aouadhi, C., Hasnaoui, B. (2013).**Activité antimicrobienne d'huile essentielle et d'extraits de feuilles de *Rosa canina*. F.S.B, 437, 179-188.
- Gheyouché, R., Hammiche, V. (1988).** Plantes médicinales et thérapeutiques : Les plantes médicinales dans la vie moderne et leur situation en Algérie. Annales INA El Harrach, 12, 1, 419-433.
- Gildemeister, E., Hoffmann, F.R.( 1912) .** Les huiles essentielles. 2ème Edition. Edition Schimmel & Cie, Miltitz près leipzig.
- Guerin-Faubleé, V., Carret,G. (1999).** L'antibiogramme, principe, méthodologie, intérêt et limite. Journées nationales GTV-INRA, 5-12.
- Guy-Gilly. (2005).**Les plantes aromatiques et huiles essentielles a grasse. Harmattan, 418p.
- Goetz, P., Ghedira, K. (2012).**Propriété phytothérapies anti-infectieuse. Springer verriag France, 364-366.
- Haloui,M., Louedec,L., Michel,J.B., Lyoussi, B.(2000).**Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erthraea*.J. Enthopharmacol, 71, 465-472.
- Heinrich, M., Kufer, J.,Leonti, M.,Pardo-de-Santayana, M(2006).** Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with historical science. Ethnopharmacol, 107, 157-160.
- Hellal, Z. (2011).** Des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des Citrus Application sur la sardine (*Sardina Pilchardus*). Mémoire, Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou, 78p.
- ISO. (2010).** International standard. ISO 9235. Huile essentielle.
- Iteipmai, (2013).**Les huiles essentielles dans la protection des cultures. Institut technique qualifié par le Ministre de l'Agriculture, 8p, France.
- Jeanpert, H. (1983).**La phytothérapie, 245p, Paris.
- Jelen, H., Gracka, A. (2015).** Analysis of black pepper volatiles by solid phase microextraction-gras chromatography: A comparison of terpenes profiles with hydrodistillation. Journal of chromatography, 1418, 200-209.
- Kaller, D.C. (2004).** Les plantes médicinales. *Ed ALS*, 57 p, France.
- Kassel, D. (1996).** Des hommes et des plantes. *Ed Kajet*, 102 p, Paris.

**Khia, A., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Aberchane, M., Quaboul, B., Chaoucb, A., Amusant, N., Charrouf, Z. (2014).** Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L*, Du Maroc. Culture de plantes médicinales, 12, 6, 341-347.

**Kaloustian, J., Hadji-Minaglou, F.(2013).** La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Springer-verlag, 210p, Paris.

**Kokkini, S., Karsou, R., Dardioti, A., Autumn, B. (1997).** Essential oils of Greek oregano. Phytochemistry, 44, 883-886.

**Laghchimi, A., Znini, M., Majidi, L., Renucci, F., El Harrak, A., Costa, J. (2014).** Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielles de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de pomme. IMESCN, 5, 6, 1770-1780.

**Laurie, C. (2015).** Aromathérapie: Les huiles essentielles sont-elles dangereuses à l'utiliser. Laboratoire phytochemia, Québec.

**Lucchesi, M. (2005).** extraction sans solvant assistée par Micro-onde conception et application à l'extraction des huiles essentielles pp 17, 23, 52.

**Leung, A.Y., Foster, S., Wiley, J& Sons.(1996).** Encyclopedia of common Natural ingredients used in food, drugs and cosmetics, Second ed. J. Nat. Prod ,1213p. New York.

**Majhenic L., kergel M.S., Knez Z. (2007).** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chemistry, 104, 1258–1268.

**Marxen, K., Vanselow, K.H., Lippermeir, S.,Hintze, R., Ruser,A., Hhansen,U-P. (2007).** Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microal-gal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. Sensors, 7, 2080–2095.

**Mary, H., Susheela, G., Jayasree,S., Nizzy, A., Rajagopal, B., Jeeva, S.(2012).** Phytochemical characterization and antimicrobial activity of curcuma xanthorrhiza Roxb. Asian pacific journal of Tropical Biomedicine, 3.

**Millet, F. (2013).** Le grand guide des huiles essentielles. Marabout, 479p, Espagne.

**Nsi Akoué, G., Clément Obame, L., Privat Orido, J., Brama, I., Tapoyo, S., Souza, A.(2013).** Phytochemical composition and antiradical activity of *Sakersia africana*. International Journal of Biomolecules and Biomedicine, 3, 3, 1-8.

**Mutai, C., Bii, C., Vagias, C., Abatis, D., Roussis, V. (2009).** Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes, Journal of Ethnopharmacol,4,132,143-8.

**Offord , EA., Macé,K., Ruffieux, C., Malnoe, A et Pfeifer ,A.M.(1995).** Rosemary components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. Carcinogenesis, 16, 2057-2062.

**Ollier, C. (2011).** Conseils en phytothérapie. 2ème édition *Pro-officina*, 147 p, Paris.

**Ouassila,T.(2010).**Etude physicochimique des plantes médicinales du nord et du sud Algérien. Thèse .Université de Mentouri. Constantine.248Pp.

**Paolini , J.(2005).** Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *cistus albidus* et de deux *asteraceae* endémiques de corse : *Eupatorium cannabinum subsp. Corsicum ET Doronicum corsicum* .Thèse. Université de Corse, France. 292p.

**Paris, A., Strukelj, B., Renko,M., Turk,V., Puki,M., Umek, A ., Korant, B.D.(1993).** Inhibitory effect of carnosolic acid on HIV-1 protease in cell-free assays.Nat prod,56,1426-1430.

**Ponce A.G., Fritz R., De Lvalle C., Roura S.I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensm.- Wiss.u.-Technol, 36 ,679-684.

**Pourmortazavi S, M., Hajimirsadeghi S, S. (2007).** Supercritical fluid extraction in plat essential and volatile oil analyse. Journal of chromatography A, 1162, 2-24.

**Prakash, D., Suri, S., Upadhyay, G., and Singh, B.N. (2007).**b. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. International Journal of Food Sciences and Nutrition 58 : 18-28.

**Purchon, N. (2001).**La Bible de l'aromathérapie. Marabout,461p, Bruxelles.

**Quezel, P., Santana, S. (1963).**Novelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionale. Tome 1 & 2, 1170 p, Paris.

**Rabia, A., El-Saltani, H., Nabeel, S., Al-Najjar, A., Hebail, F.(2012).** Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. Natural Science, 4, 324-335.

**Rameau, J.C., Mansion, D., Dume, G., (2008).**Flore forestière françaises : guide écologique illustre. Region mediteraneenne.Ed Foret privée française, 2426p

**Ribeiro-Santos, R., Ramos, F., Sanches-Silva, A., Costa, H. (2015).** A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary *Rosmarinus officinalis*. Trends in Food science & Technology, 245, 355-368.

**Rombi, M., Robert, D. (2007).** 120 plantes médicinales: composition, mode d'action et intérêt thérapeutique. Alpen, 527p, France.

**Roquebert, M-F. (2002).** Les contaminants biologiques des biens culturels. Elsevier Mason, 346p, France.

**Sadrans, J., Roda, F., Penuelas, J. (2005).** Effects of water and a nutrient pulse supply on *Rosmarinus officinalis* growth, nutrient content and flowering in the field. Environ. Botany, 53, 1 – 11.

**Sallé, J. (1991).** Les huiles essentielles : synthèse d'aromathérapie et introduction à la syntonothérapie. Frison-Roche, 167p, Paris.

**Samarth R.M., Panwar M., Soni A., Kumar M., Kumar A. (2008).** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract Food Chemistry, 106, 868-873.

**Sasikumar, B. (2012).** Rosemary. Handbook of herbs and spices, 1, 452-468.

**Schauenberg, P., Paris, F. (2005).** Guide des plantes médicinales-Analyse, description et utilisation de 400 plantes. Delachaux et Niestlé, 396p, 18, Rue de la Harpe Paris France.

**Sharifzadeh, A., Jebli Javanb, A., Shokrie, H., Abbaszadehd, S., Keykhosravi, K. (2015).** Evaluation of antioxidant and antifungal properties of the traditional plants against food borne fungal pathogens. Journal de mycologie Médicale/ Journal of medical Mycology, 11,002.

**Sharififar, F., Moshafi, M .H ., Mansouri, S.H., Khodashenas, M., khoshnoodi, M. (2007).** In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. Food control, 18,800-805.

**Smadja, J. (2009).** Les huiles essentielles colloque GP3A. Tananarive 2-3 Juillet 2009.

**Solène, C., Sèverine, D. (2016).** Cancer du sein : recommandations sur l'usage de la phytothérapie. Université d'Angers, UFR santé, 5p, France.

**Stewart, D. (2005).** The chemistry of essential oils made simple: gods loves manifests in molecules. Care publication, 625p.

**Talbi, H., Boumaza, A., El-mostafa, K., Talbi, J., Hilali. (2015).** A Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la

*Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *Mater. Environ. Sci.* 6 (4) 1111-1117.

**Teuscher, E., Robert, A., Annelise, L. (2005).** 1000 plantes aromatiques, Ed.Lavoisier. Tech & Doc, 522p, Paris.

**Thurzova, L. (1981).** Les plantes : santé qui pousse autour de nous. *Ed Bordas*, 268 p, Bruxelles.

**Touaibia, M. (2014).** Composition chimique et activité anti-fongique de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. *Nature & technologie*, 12, 5, 65-70.

**Villano, D., Fernandez-Pachon, MS., Moya, ML., Troncoso, AM., GarciaParilla, MC. (2007).** Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71: 230–235.

**Volak, J., Stodola, J. (1984).** Plantes médicinales : 256 illustrations en couleur. Grund Paris, 319p, Paris.

**Willem, JP. (2002).** Les huiles essentielles: médecine d'avenir. Dauphin, Paris.

**Wolfgang, H. (2008).** 350 plantes médicinales. Delachaux et Nieslté, 256p, Paris.

**Zahalka, JP. (2015).** Dictionnaire complet d'aromathérapie : 250 huiles essentielles. 32 hydrolats, 34 huiles végétales. Dauphin, 496p, Paris.

**Zaika, L.L. (1988).** "Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination," *Journal of Food Safety*, 9, 2, 97-118.

**Zhiri, A. (2006).** Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News*. Formation pour le libre choix, 16p, Royaume Uni.

# **ANNEXES**

## ANNEXE

---

### Annexe 01 :

Résultats des essais de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* de la saison d'automne.

		Automne			
		Diamètres			
Souches		D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	Moyenne
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	27	29	28	28 ± 1
	<i>Escherichia coli</i>	25	22	26	24.33 ± 2.08
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10	11	10	10.33 ± 0.58
	<i>Salmonella arizonea</i>	22	21	21	21.33 ± 0.58
Champignons	<i>Candida albicans</i>	24	24	25	24.33 ± 0.58
	<i>Aspergillus niger</i>	18	20	20	19.33 ± 1.15
	<i>Penicillium</i>	35	33	30	32.67 ± 2.52
	<i>Fusarium oxysporum</i>	16	13	13	14.33 ± 2.31



## Annexe 02 :

Résultats des essais de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

		Hiver			
		Diamètres			
Souches		D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	Moyenne
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	19	23	24	22 ± 2.56
	<i>Escherichia coli</i>	30	27	31	29.33 ± 2.08
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	14	14	12	13.33 ± 1.15
	<i>Salmonella arizonea</i>	17	15	16	16.33 ± 1
Champignons	<i>Candida albicans</i>	34	31	32	32.33 ± 1.53
	<i>Aspergillus niger</i>	36	37	29	34 ± 4.36
	<i>Penicillium</i>	12	14	13	14 ± 1
	<i>Fusarium oxysporum</i>	10	11	12	11 ± 1

de la saison d'hiver.

## Annexe 03 :

Résultats des essais de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* de la saison de printemps.

		Printemps			
		Souches	Diamètres		
			D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	12	12	14	12.67 ± 1.15
	<i>Escherichia coli</i>	21	17	20	19.33 ± 2.08
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10	10	10	10 ± 0
	<i>Salmonella arizonea</i>	15	13	15	14.33 ± 1.15
Champignons	<i>Candida albicans</i>	16	15	14	14.33 ± 1.53
	<i>Aspergillus niger</i>	18	15	14	15.67 ± 2.08
	<i>Penicillium</i>	10	11	11	11.67 ± 0.58
	<i>Fusarium oxysporum</i>	17	16	16	16.33 ± 0.58

## ANNEXE

---

### Annexe 04 :

Pourcentage de réduction de l'absorbance du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique.

<b>Concentration de l'acide ascorbique en (mg/ml)</b>	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2	0,3
<b>% de DPPH à 515nm</b>	12,15	17,96	23,24	38,37	75,58	96,64

### Annexe 05 :



**Spectrophotomètre**

### Annexe 06 :



**Agitateur + solution de DPPH**

## Annexe 07 :

Pourcentage de réduction de l'absorbance du DPPH en fonction des concentrations des extraits méthanolique des HE de *Rosmarinus officinalis L.*

Plante	Saisons	Concentration (mg/ml)	% de réduction du DPPH
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Automne	11,66	93,56
		9,33	79,19
		7,00	61,71
		4,66	55,02
		2,33	40,36
		1,17	36,92
	Hiver	10,66	93,34
		8,53	82,47
		6,40	78,55
		4,26	63,82
		2,13	55,64
		1,07	48,25
	Printemps	10,84	89,94
		8,67	79,97
		6,50	71,52
		4,34	63,32
		2,17	47,57
		1,08	39,93

Annexe 08 :

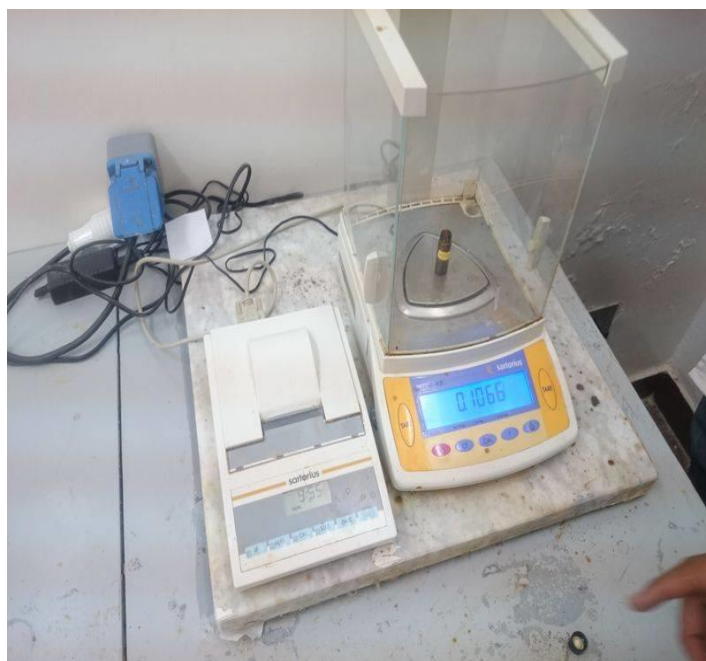
Matériels et méthodes :



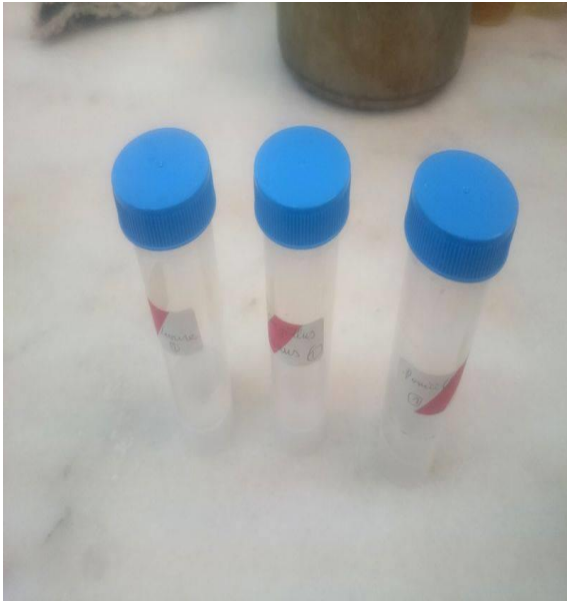
Etuve



Méthanol



Balance



**Souches bactériennes**

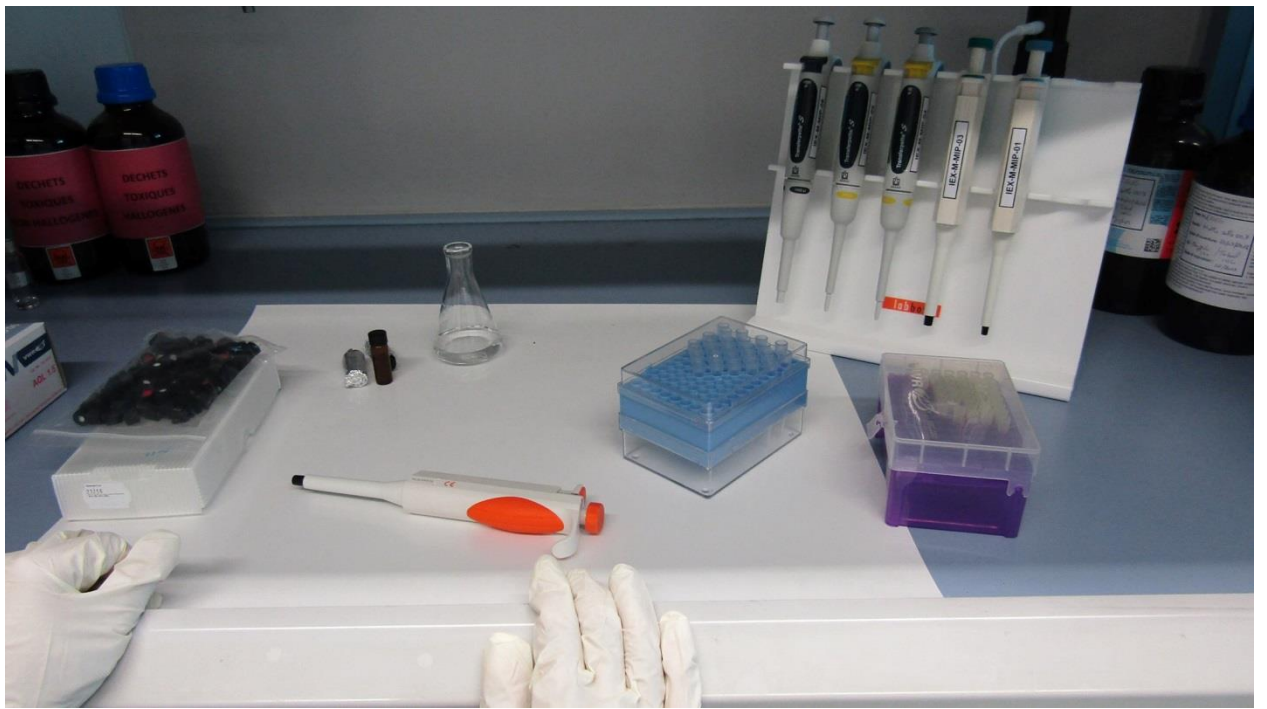


**Bec Benzène**



**Chromatographe en phase gazeuse couplé au détecteur à un spectrophotomètre de masse  
de type : Trace GC Ultra DSQII**





**La paillasse de la CG/MS**