



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahleb Blida 1
Faculté des sciences

Mémoire de Master

En Chimie

Présenté pour l'obtention du diplôme de master

Domaine : Science de la matière

Option : Chimie

Chimie des produits naturels

Thème

**Screening phytochimique et évaluation des activités
biologiques de l'huile essentielle extraite de plante
"*Salvia rosmarinus* "" région de Tipaza"**

Réalisé par :

- ✓ KERIFALI MAHFOUD ANIS
- ✓ SAYAH MADJDA

Encadré par :

Mr Abdallah elhadj.A

Soutenu le 13/09/2023 devant le jury composé de :

Mr Zahi. M.R	Maitre de conférences B	Université de blida-1	Président
Mr Sabour. S	Maitre de conférences B	Université de blida-1	Examineur
Mr Abdallah elhadj.A	Professeur	Université de blida-1	Promoteur

Promotion 2022/2023

Remerciement

Au terme de ce mémoire, nous tenons à remercier tout naturellement en premier **Allah** qui nous a donné la patience et le courage durant ces années d'études.

Nous tenons tout d'abord à exprimer nos vifs remerciements à notre promoteur monsieur **A. Abdallah el hadj** professeur à l'université de Blida-1, qui a toujours été à notre écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire , ainsi que pour l'inspiration , l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à monsieur **Zahi M.R.** Maitre de conférences à l'université de Blida-1, pour avoir accepté d'assurer la présidence de jury d'évaluation de ce mémoire

Nos vifs remerciements vont à monsieur **Sabour. S** Maitre de conférences à l'université de Blida-1, d'avoir accepté d'examiner notre modeste travail.

Nous tenons également à exprimer notre profonde gratitude envers toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je dédie ce modeste travail a

Chère mère

Il est difficile de trouver les mots pour exprimer à quel point je suis reconnaissante envers toi. Je suis ici grâce à toi et à tes prières sincères, qui ont été d'un soutien inestimable tout au long de ma vie. Ta présence est une source de tendresse, de patience et de sacrifices.

J'aurais souhaité pouvoir réaliser ne serait-ce qu'une partie de ce que tu as toujours désiré que je devienne. Peu importe ce que je dis ou écris, je ne saurais jamais exprimer pleinement l'immense affection et la profonde gratitude que j'éprouve envers toi. J'espère ne jamais te décevoir, ne jamais trahir ta confiance et tes sacrifices. Que Dieu te protège ainsi que tes proches, et qui bénisse ta vie.

Tu es la personne la plus chère à mon cœur, celle qui m'a toujours soutenu et encouragé. Je suis infiniment reconnaissant pour tout ce que tu as fait et continues de faire pour moi. Ta force, ta sagesse et ton amour inconditionnel sont des sources d'inspiration et de motivation pour moi.

Mère, tu es un modèle de dévouement et de persévérance. Tu as fait tant de sacrifices pour me permettre d'avoir une vie meilleure. Je t'admire profondément et je suis fier d'être ta fille.

Je t'aime du plus profond de mon être, ma mère chérie. Tu es la lumière qui guide ma vie, et je suis infiniment reconnaissant de t'avoir dans ma vie.

Cher père

Tu as été ma source inépuisable de soutien et d'inspiration tout au long de ce parcours académique. Ta présence bienveillante et ton amour inconditionnel m'ont guidé dans les moments de doute et m'ont donné la force de persévérer. Ce mémoire est dédiée à toi, en témoignage de ma gratitude éternelle.

A mes deux frères

Anis et Hamza Vous êtes mes piliers, ma protection et mon soutien dans la vie. Que Dieu vous protège et guide vos pas sur un chemin béni, pavé de succès et de facilité. Votre présence est un réconfort précieux.

A mes petites sœurs

Kaouthar et Namae cheres petits anges, vous êtes la douceur de ma vie. Je souhaite que je puisse être un modèle exemplaire pour vous, et que Dieu vous protège afin que je puisse être fier de vous.

- A mes chers **Sara** et **Zineb** et et toute mes chers tantes et oncles.
- A mes chéris amies depuis le primaire **Ikram ,ihssen** et **oum Marwan**.
- A ma **besty Yasmine** et toutes mes amies, **Razika, Baya, Nabila et Houda**.

A toute ma promo de chimie PN

sayah madjda

Je dédie ce mémoire à ma très chère mère qui a été toujours à mes côtés et m'a toujours soutenu tout au long de ces longues années d'études. En signe de reconnaissance, qu'elle trouve ici, l'expression de ma profonde gratitude pour tout ce qu'elle a consenti d'efforts et de moyens pour me voir réussir dans mes études.

A toute ma famille

Et a tous mes amis

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués et le fruit de votre soutien infaillible,

Merci d'être toujours là pour moi.

Anis

هدف هذا البحث هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للبكتيريا، بالإضافة إلى الوصف الفيزيوكيميائي للزيت العطري المستخلص من نبات " *Salvia rosmarinus* " المقطوف من منطقة تيبازة و دراسة الفحص الفيتوكيميائي و استخراج الزيت العطري من النبات باستخدام طريقة التقطير المائي باستخدام جهاز clévenger حيث بلغت المردودية 1.96%.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام اختبار DPPH أظهرت النتائج أن الزيت العطري لديه نشاط مضاد للأكسدة عالي بقيمة $IC_{50}=0.33$ ملغ/مل في مقارنة مع نشاط الزيوت العطرية المستخرجة في الأبحاث السابقة.

تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات باستخدام تقنية الأنتيبيوغرام. أظهرت النتائج ان الزيت العطري لديه نشاط مضاد للميكروبات مهم ضد (*Staphylococcus Aureus*) و (*Escherichia coli*) بقطر منطقة التثبيت اعتمادا على تراكيز الزيت 100% و 75% و 50% و 25%. قياس منطقة التثبيت لـ *E.coli* تساوي 17 و 15 و 14 و 10 مم على التوالي، و بالنسبة لـ *Staph* مساوية لـ 17 و 10 و 7 و 6 مم على التوالي اعتمادا على التراكيز المختلفة.

تم إجراء فحص فيتوكيميائي لاكتشاف وتحليل المجموعات الرئيسية في أجزاء النبات المختلفة المدروسة بهدف التوصل إلى توصيف دقيق للنبات.

كلمات مفتاحية : نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للبكتيريا، زيت عطري، DPPH، IC_{50} ، فحص فيتوكيميائي.

L'objectif de ce travail est l'évaluation des activités antioxydante et antibactérienne ainsi que la caractérisation chimique de l'huile essentielle extraite de la plante "*Salvia rosmarinus*" récoltée de la zone de Tipaza et déterminer les composants de la plante par le screening phytochimique.

L'extraction de l'huile essentielle à partir de la plante a été effectuée par le procédé d'hydrodistillation en utilisant le montage de Clevenger avec un rendement de l'extraction égale à 1.96 % .

L'évaluation de l'activité antioxydante est déterminée à l'aide du test de DPPH. Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle a une activité antioxydante importante avec $IC_{50}=0.33$ mg/ml.

L'activité antibactérienne est testée par la technique d'Antibiogramme. Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle a une activité antibactérienne importante contre les germes testés (*Staphylococcus Aureus*) et (*Escherichia coli*) avec des diamètres varient entre 10-17 mm pour des différentes concentrations pour E.coli et entre 6-17 mm pour Staph.

Afin de déterminer les principaux indices chimiques dans la plante étudiée, un screening phytochimique des extraits de la plante a été effectué.

Mots Clé :Activité Antioxydante, Activité Antibactérienne , Huile Essentielle, DPPH, IC_{50} , Screening phytochimique.

The objective of this study is the evaluation of the antioxidant and antibacterial activities, as well as the chemical characterization of the essential oil extracted from the « *Salvia rosmarinus* » plant collected from the Tipaza region and determine the components of the plant by screening phytochemical.

The extraction of essential oil from the plant was carried out by the hydrodistillation process using the Clevenger assembly with an extraction yield equal to 1.96%.

The evaluation of the antioxidant activity is determined using the DPPH test. The results obtained show that the essential oil has a important antioxidant activity with an IC50 value equal to 0.33 mg/ml.

The antibacterial activity is tested using the Antibiotic Sensitivity Test (Antibiogram). The results obtained show that the essential oil has significant antibacterial activity against the tested germs (*Staphylococcus Aureus*) and (*Escherichia coli*) with diameters varying between 10-17 mm for different concentrations for E.coli and between 6-17 for Staphylococcus.

In order to determine the main chemical indices in the plant studied, a phytochemical screening of the plant extracts was performed.

Keywords : Antioxidant Activity, Antibacterial Activity, Essential Oil, DPPH, IC50, Phytochemical Screening.

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Propriétés biologiques et composants chimiques de <i>Salvia rosmarinus</i> .	15
Tableau III.1 : Résultats de paramètre physico-chimique de l'huile essentielle.	35
Tableau III.2 : Propriétés organoleptiques de nos huiles essentielles de Tipaza .	36
Tableau III.3 : Analyse phytochimique.	37
Tableau III.4 : Émergence des cercles d'efficacité : Exploration des diamètres d'huile autour des disques de technique d'antibiogramme.	38
Tableau III.5 : Valeurs de taux d'inhibition pour chaque solution..	39

Liste des figures

Figure I.1 : Ordre d'informations dans le premier chapitre.	4
Figure I.2 : Plante Salvia rosmarinus.	6
Figure III.1 : Plante fraîche au moment de récolte.	20
Figure III.2 : Broyage de plante.	21
Figure III.3 : Montage de Clevenger.	22
Figure III.4 : Technique de l'hydrodistillation.	22
Figure III.5 : Solution après l'ajout de PHP.	26
Figure III.6 : Solution après le titrage.	26
Figure III.7 : Saponification de la solution huileuse avec le dosage.	28
Figure III.8 : A) Refroidissement des réactifs B) Coloration des réactifs après l'ajoute des gouttes de PHP.	29
Figure III.9 : Solution avant et après le titrage.	29
Figure III.10 : Dosage de la solution huileuse.	30
Figure III.11 : A) Milieu de culture gélose nutritive. B) Souches préparer pendant 24h.	31
Figure III.12 : Préparation culture bactérienne.	32
Figure III.13 : Préparation des échantillons des huiles de différentes concentrations.	32
Figure III.14 : Évolution de la population bactérienne en avant l'application de disques d'huile essentielle.	32
Figure III.15 : Disposition des boîtes pétris dans une cuve d'incubation avant l'incubation.	33
Figure III.16 : Mesure Ph par un Ph metre.	36
Figure III.17 : Test de l'activité antibactérienne par le blanc en utilisant le solvant DMSO seul signe A.	38
Figure III.18 : Pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations.	40

HE	Huile Essentielle
IE	Indice d'ester
IP	Indice de Peroxyde
Is	Indice de Saponification
PH	Potentiel de l'hydrogène
R	Rendement
Abs	Absorbance
PNP	Phénolphtaléine
VHE	Volume de Huile Essentielle
MVS	Masse de matière Végétale Sèche
IC₅₀	Concentration Inhibitrice médiane
C	Concentration
DPPH	2,2-diphényl-1- picrylhydrazyle

Remerciement	
Dédicaces	
الملخص	
Résumé	
Abstract	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations et nomenclatures	
Introduction générale	1
Chapitre I : Aperçu sue le Romarin - Une Exploration Botanique et Chimique	
I.1. Histoires générale des plantes	3
I.2. Etude Bibliographique de <i>Salvia rosmarinus</i>	4
I.2.1. Présentation générale	4
I.2.2. Taxonomie	5
I.2.3. Description botanique	5
I.2.3.1. Feuilles	5
I.2.3.2. Fleur	7
I.2.3.3. Tige	7
I.2.3.4. Racines	8
I.3. Les huiles essentielles	8
I.3.1. Les facteurs qui influencent la qualité et la composition de l'huile essentielle	9
I.3.1.1. Période de la récolte	9
I.3.1.2. Type de plante	9
I.3.1.3. Conditions de culture	10
I.3.2. Méthodes de récupération des huiles essentielles	10
I.3.2.1. Distillation	10
I.3.2.2. Extraction par CO ₂ supercritique	10
I.3.2.3. L'extraction assistée par micro-ondes	11
I.3.3. Composants chimiques dans les huiles essentielles	12
I.3.3.1. Les flavonoïdes	12
I.3.3.2. Les terpènes	12
I.3.3.3. Les Phénols	13
I.3.3.4. Ester	13

I.3.3.5. Cétone	13
I.3.3.6. Alcool	14
I.3.4. Propriétés biologiques des composants chimiques de l'HE <i>Salvia rosmarinus</i>	14
Chapitre II : Activités biologique, pharmacologique et screening phytochimique	
II.1. Toxicité des huiles essentielles	16
II.2. Activités biologiques	16
II.2.1. Activité antibactérienne	17
II.2.1.1. Définition	17
II.2.1.2 Méthodes d'évaluation d'activité antibactérienne	17
II.3. Activités pharmacologiques	17
II.3.1. Activité antioxydante	18
II .3.1.1. Définition	18
II.3.1.2 Méthode d'évaluation d'activité antioxydante	18
II.4. Screening phytochimique	18
Chapitre III : Evaluation des activités biologiques et screening phytochimique	
III.1. Objectifs de travail	20
III.2. Méthodologie	20
III.2.1.Matière végétal	20
III.2.2. Séchage	20
III.2.3. Broyage	21
III.2.4. Protocole d'extraction par le montage de Clevenger	21
III.2.5. Protocole d'extraction par le montage hydrodistillation simple	22
III.3. Préparation des extraits pour le screening phytochimique	23
III.3.1. Préparation des échantillons	23
III.3.2. Préparation des extraits	23
III.3.3. Screening phytochimique des extraits	24
III.3.3.1. Screening phytochimique des Tannins	24
III.3.3.2. Screening phytochimique des Quinones	24
III.3.3.3. Screening phytochimique des coumarines	24
III.3.3.4. Screening phytochimique des anthraquinones	25
III.3.3.5. Test de Wilstater (test de flavonols et flavanones)	25
III.4. Extraction et évaluation des indices chimique d'HE	25
III.4.1. Rendement de l'extraction	25
III.4.2. Caractères chimiques	25
III.4.2.1. Indice d'acide	25

III.4.2.1.1. Mode opératoire	25
III.4.2.2. Indice de saponification	27
III.4.2.2.1. Mode opératoire	27
III.4.2.3. Indice d'ester	28
III.4.2.3.1. Mode opératoire	28
III.4.2.4. Indice de peroxyde	29
III.4.2.4.1. Mode opératoire	30
III.5. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielles de <i>Salvia rosmarinus</i>	30
III.5.1. Mode opératoire	30
III.6. Evaluation de l'activité antioxydante	33
III.6.1. Mode opératoire	33
III.7. Rendement des indices physico chimiques d'HE	34
III.8. Screening phytochimique	37
III.9. Activité antibactérienne de l'huile essentielle	38
III.10. Activité antioxydante de l'huile essentielle	39
III.10.1. Calcul de pourcentage d'inhibition I % d'huile essentielle	39
III.10.2. Détermination d'IC50	40
Conclusion générale et perspective	41
References	

Introduction générale

Les végétaux se révèlent être de véritables trésors biologiques, des espèces naturelles aux capacités prodigieuses. Ils génèrent des substances biochimiques actives telles que les huiles essentielles (HE), les phénols qu'ils mettent à disposition de l'humanité pour favoriser sa santé et combler ses besoins vitaux (**Djoukeng et al, 2005**). Dans les temps anciens, certaines plantes étaient vénérées pour les vertus qui leur étaient attribuées. Sans se préoccuper des raisons ou des mécanismes sous-jacents, leur efficacité était indéniable, suscitant une fascination magique. À l'heure actuelle, la recherche sur les bienfaits des plantes aromatiques et médicinales connaît une expansion remarquable, notamment dans le domaine des huiles essentielles.

Les propriétés bioactives des HE et des extraits ont été largement corroborées par leur abondance considérable en composés terpéniques et aromatiques dont la diversité structurale est remarquable. (**Djoukeng et al, 2005**)

L'application des huiles essentielles s'étale sur de nombreux domaines comme agroalimentaire, médical et pharmaceutique...etc. L'importance d'utilisation est due à la richesse de ces extraits en terpènes, alcools, esters, phénols, éthers, aldéhydes, cétones, peroxydes, et des sulfates.

En raison de son climat méditerranéen humide et de la composition unique de ses sols, l'Algérie regorge d'une abondante biodiversité florale, comprenant une pléthore de plantes médicinales et aromatiques prospérant à l'état naturel. Dans cette optique, notre intérêt s'est porté vers l'étude approfondie des espèces végétales de l'Algérie.

Au fil de nos recherches, nous avons choisi de nous pencher sur l'étude d'une plante aromatique spécifique, à savoir le romarin de la famille des Lamiacées. Les spécimens de cette espèce ont été soigneusement récoltés dans les régions montagneuses du nord de l'Algérie dans la zone Tipaza.

Vu l'impact du climat, de l'emplacement et de la saison de récolte sur les composants de la plante de romarin, nous procédons à un screening phytochimique d'une plante fraîche. Ces analyses nous fournissent des informations sur les composés chimiques présents dans la plante étudiée, et la présence de ces composants constitue une preuve des activités biologiques de l'huile essentielle de cette plante. Ainsi, l'objectif de cette étude consiste à investiguer les activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle extraite de la plante *Salvia rosmarinus*.

Notre travail est organisé en trois chapitres, qui nous permettent d'explorer différentes facettes de l'huile essentielle de romarin et de la plante elle-même :

- Le premier chapitre donne un aperçu sur le romarin, en explorant ses aspects botaniques et chimiques, ainsi que les méthodes d'extraction de son huile essentielle.
- Le deuxième chapitre se concentre sur le screening phytochimique de la plante étudiée, en mettant particulièrement l'accent sur les activités biologiques des huiles essentielles, telles que leur potentiel antibactérien et antioxydant.
- Le troisième chapitre représente la contribution de ce travail et donne en détail les différentes activités effectuées allant de l'extraction de l'huile essentielle à l'évaluation des analyses physico-chimiques et screening phytochimique jusqu'à la démonstration de l'activité antioxydante et antibactérienne présente dans notre huile essentielle.

Enfin, notre manuscrit se termine avec une conclusion générale et des perspectives.

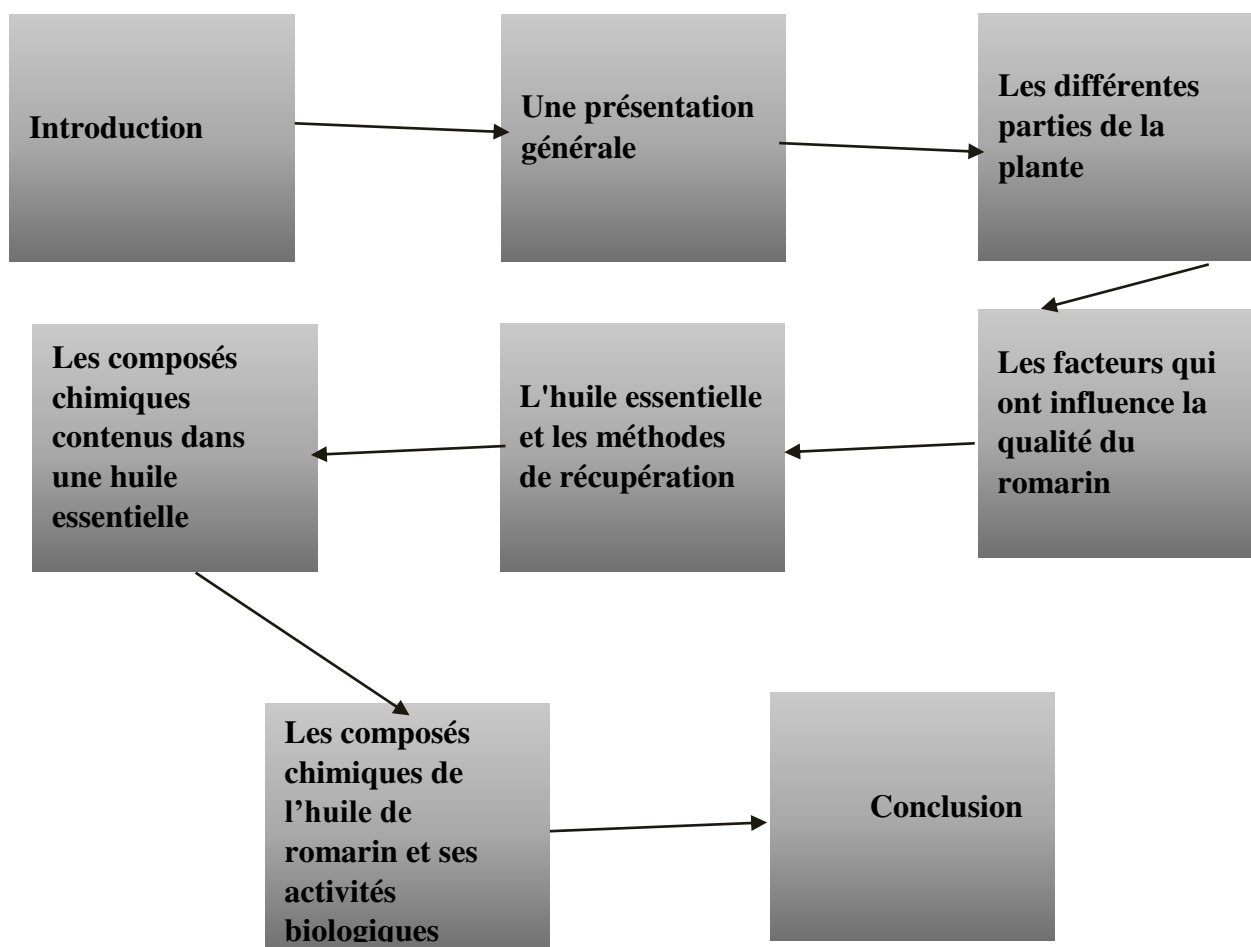


Figure I.1 : Ordre d'informations dans le premier chapitre.

I.1. Histoire générale des plantes :

L'utilisation des plantes remonte à l'Antiquité, où elles étaient utilisées à des fins médicales, alimentaires, religieuses, décoratives et industrielles. Parmi les civilisations anciennes qui ont largement utilisé les plantes figuraient les civilisations égyptiennes, babyloniennes, indiennes, chinoises, grecques et romaines. (MacGregor ,2010)

En Egypte ancienne, ils utilisaient des herbes et des plantes dans la médecine et croyaient en leur pouvoir thérapeutique, et certaines plantes étaient considérées comme sacrées. Ils ont également utilisé les plantes dans les cosmétiques, la fabrication de parfums et la décoration des tombes. (Leslie ,2020)

Dans la civilisation babylonienne, ils utilisaient des plantes dans l'industrie, la fabrication de papier et de tissus, et les jardins et les parcs étaient très importants dans leur culture.

Dans la civilisation indienne, les plantes étaient utilisées dans la médecine naturelle, les offrandes religieuses et la fabrication de colorants.

Dans la civilisation chinoise, les plantes étaient utilisées dans la médecine traditionnelle, l'agriculture et la fabrication d'outils et d'ustensiles ménagers (DrBensky,2004).

Dans la civilisation grecque, ils utilisaient des plantes dans la médecine, le traitement et la fabrication d'outils agricoles, et le philosophe Aristote considérait les plantes comme faisant partie de la nature et de l'univers. **(Dr Laouisset, 2014)**

Dans la civilisation romaine, les plantes étaient utilisées dans la médecine, la cosmétique, la fabrication d'outils et de décorations, et les jardins étaient considérés comme une source de repos et de tranquillité.

L'utilisation des plantes fait partie de l'histoire de l'humanité et les gens continuent de les utiliser largement dans la vie quotidienne. **(Neil MacGregor, 2010)**

I.2. Etude Bibliographique de *Salvia rosmarinus*:

I.2.1. Présentation générale :

Le romarin est connu sous plusieurs noms dans différentes cultures et langues, notamment:

- le nom scientifique officiel de la plante : *Salvia rosmarinus*.
- En français: L'herbe aux couronnes.
- En anglais: rosemary.
- En arabe : اكليل الجبل **(Healthline équipe, 2020)**

(*Salvia rosmarinus*) est une plante aromatique arbustive persistante appartenant à la famille des Lamiacées, qui pousse dans les régions tempérées et chaudes autour de la mer Méditerranée. La plante se distingue par ses feuilles étroites vertes, vives et ses petites fleurs bleues ou violettes régulières.



Figure I.2 : Plante *Salvia rosmarinus* .

Le romarin se distingue par son parfum fort et son goût distinctif, utilisé dans la préparation de nombreux plats et boissons. Cette plante a de nombreux avantages pour la santé, car elle contient des composés naturels bénéfiques pour le système nerveux, digestif et respiratoire. **(Dr Smith ;Pr Williamson, 2012)**

I.2.2. Taxonomie :

La première classification botanique du romarin (*Salvia rosmarinus*) a été effectuée par Carl Von Linné, également connu sous le nom de Carl Linnaeus, dans son ouvrage « Species Plantarum » en 1753. Linnaeus a classé le romarin dans la famille des Lamiacées (anciennement appelée Labiées), qui comprend également d'autres plantes aromatiques et médicinales telles que la menthe, la sauge et le thym.

Classification selon Tropicos :

Famille : Lamiacées (Lamiaceae)

Règne : Plante

Nom non scientifique (Nom commun) : Romarin

Division : Magnoliophyta

Ordre : Lamiales

Classe : Magnoliopsida

I.2.3. Description botanique :

Le romarin (*Salvia rosmarinus*) est un arbuste persistant qui peut atteindre jusqu'à 2 mètres de hauteur. Ses feuilles sont coriaces, linéaires et mesurent entre 2 et 4 cm de longueur. Elles sont vert foncé sur la face supérieure et blanches ou gris argenté sur la face inférieure en raison de la présence de poils fins. Les fleurs du romarin sont bleues, mauves, roses ou blanches et sont disposées en épis axillaires, atteignant environ 2 à 3 cm de longueur. (Aikaterini et al ,2019)

I.2.3.1. Feuilles :

Les feuilles de romarin sont persistantes, linéaires et ont des bords incurvés vers l'intérieur. Elles sont de couleur vert foncé sur la face supérieure et gris clair sur la face inférieure. La surface des feuilles présente de petites crêtes et contient une huile aromatique qui donne l'odeur du romarin. Les feuilles sont généralement opposées et disposées par groupes de trois. La feuille de romarin est composée de plusieurs parties différentes qui fonctionnent en harmonie pour produire la feuille complète, notamment :

- Les cellules brune.
- Les cellules vert.
- Le tissus cellulaire.
- Les glandes odoriférantes.

Les cellules brunes : Ce sont des cellules contenant un pigment brun, présentes dans la couche supérieure de la feuille, une cellule végétale brune est une cellule qui contient un

pigment brun, appelé la mélanine, qui lui donne une couleur brune. La mélanine est produite par des organites appelés mélanoplastes qui sont présents dans la cellule. Les cellules brunes se trouvent généralement dans la couche supérieure des feuilles, où elles aident à absorber la lumière solaire et à protéger la plante contre les dommages causés par l'excès de lumière. Ces cellules peuvent également aider à réguler la température de la plante et à stocker des nutriments. (**J.D. Mauseth, 2020**)

Les cellules vertes : Cellules vertes sont un type de cellules végétales qui contiennent des chloroplastes, le site de la photosynthèse qui utilise l'énergie solaire pour convertir le dioxyde de carbone et l'eau en sucres et en oxygène. En plus des chloroplastes, ces cellules contiennent plusieurs autres parties telles que le noyau, les mitochondries, les parois cellulaires, etc. (**Alberts et al, 2017**)

Le tissu cellulaire : Il s'agit du tissu contenant des cellules de formes et de fonctions variées, qui transporte les éléments nutritifs, l'eau et d'autres éléments vers le reste de la plante.

La feuille de romarin contient un tissu cellulaire caractérisé par la présence d'une seule couche de cellules de surface plates s'étendant dans la direction des feuilles. (**Evert et Eichhorn, 2012**)

Les glandes odoriférantes: Les glandes odoriférantes dans les plantes sont composées de cellules spéciales appelées « cellules d'huiles essentielles » (Oil cells) ou « cellules sécrétrices » (Secretory cells), et se trouvent dans des zones spécifiques de la plante telles que les feuilles, les fleurs, les racines, les fruits, les tiges, les herbes et les épices. Ces glandes diffèrent par leur forme, leur taille, leur emplacement et leur nombre selon la plante et le type d'huile essentielle produite. (**Goffman, 2000**)

Les cellules d'huiles essentielles sont composées d'une membrane cellulaire mince qui entoure le liquide odorant produit à l'intérieur, et ce liquide contient différentes composantes d'huiles essentielles qui donnent à la plante son parfum distinctif et qui transportent différents bienfaits pour la santé. (**Goodrich et Huxley, 1890**)

Le fonctionnement des glandes odoriférantes dans les plantes diffère également. Certaines glandes produisent continuellement des huiles essentielles tout au long de la croissance de la plante, tandis que d'autres produisent des huiles essentielles à des moments spécifiques de la croissance tels que les fleurs et les fruits, et d'autres encore sécrètent des huiles essentielles en réponse à des dommages ou des blessures de la plante comme moyen de défense. (**Adams. R, 2007**)

En général, les glandes odoriférantes dans les plantes sont considérées comme des parties importantes qui affectent la qualité et la quantité d'huiles essentielles produites et qui déterminent leurs utilisations industrielles et médicales (**Duke, 2002**)

I.2.3.2. Fleur :

Les fleurs de *Salvia rosmarinus* se composent de grappes de fleurs contenant de nombreuses petites fleurs en forme de tube. L'anatomie de la fleur de romarin se compose de plusieurs parties, notamment :

Le calice : Qui est la partie extérieure de la fleur et se compose de 4 à 5 pétales soudés en forme de tube qui protègent les parties reproductives internes de la fleur.

La partie mâle : Qui se compose de grains de pollen contenant les cellules reproductrices masculines de la plante. Il se trouve dans la partie supérieure des grappes de fleurs.

La partie femelle : Qui se compose de l'ovaire contenant les ovules qui seront fécondés par les cellules reproductrices mâles de la plante pour former la graine. Il se trouve dans la partie inférieure des grappes de fleurs.

Le pédoncule : Qui relie la fleur à la plante et transporte les tissus qui fournissent les nutriments et l'eau à la fleur. (**Michael G et D. Mauseth, 2018**)

Il convient de noter que l'anatomie de la fleur de romarin peut varier légèrement selon le type de plante.

Les fleurs de *Salvia rosmarinus* font partie de romarin, elles ne diffèrent donc pas beaucoup de sa composition chimiques elle poussent sur les branches latérales de la plante, ce sont de petites fleurs de couleur violette ou bleu clair. Les fleurs contiennent de nombreuses composantes chimiques utiles, notamment des huiles essentielles, des tanins, des acides organiques et des alcaloïdes sont utilisées dans de nombreuses applications médicales, cosmétiques et alimentaires, car elles contiennent des propriétés antioxydantes, antibactériennes, améliorent la digestion, la mémoire et la concentration. (**François Couplan,2009**)

I.2.3.3. Tige :

Le tronc principal des branches de romarin est composé de tissu ligneux (xylème) et de tissu conducteur (phloème). Le tronc est recouvert d'une couche externe appelée écorce, qui contient les vaisseaux cutanés qui protègent le tronc contre les dommages externes.

Les branches latérales se ramifient à partir du tronc principal et sont composées de tissu ligneux et de tissu conducteur similaire au tronc principal. Les branches sont également dotées d'une couche d'écorce externe qui contribue à leur protection et à leur alimentation.

Les petites branches se ramifient à partir des branches latérales et sont composées de tissu végétatif qui contient des cellules en croissance et en reproduction constantes. Les petites branches portent également des feuilles et des fleurs qui contribuent à la photosynthèse et à la production de graines.

Le tissu ligneux dans les branches comprend différents types de cellules, y compris des fibres ligneuses et des tubes ligneux, qui soutiennent les branches et transportent l'eau et les éléments nutritifs vers les feuilles et les fleurs. Les branches contiennent également du tissu conducteur qui transporte les substances organiques des feuilles vers le reste de la plante.

(Katherine Esau, 1965)

I.2.3.4. Racines :

Les racines du romarin sont des racines ligneuses et fibreuses qui poussent sous la surface du sol. Elles sont composées de plusieurs parties importantes, notamment :

Radicelle (radicule) : C'est la première partie de la racine qui pousse à partir de la graine et se développe en système racinaire principal.

Racine principale (racine primaire) : Elle pousse à partir de la radicelle et constitue la partie principale de la racine. La racine principale s'étend dans le sol et aide à l'absorption de l'eau et des nutriments.

Racines latérales : Elles poussent à partir de la racine principale et forment des ramifications latérales. Les racines latérales augmentent la capacité de la plante à absorber l'eau et les substances nutritives, et renforcent sa stabilité dans le sol.

Poils absorbants (poils racinaires) : Ces petits poils fins sont très importants pour l'absorption de l'eau et des nutriments du sol. Les poils absorbants augmentent la surface d'absorption et améliorent la capacité de la plante à absorber les substances nutritives.

Cortex : C'est une couche protectrice qui entoure la racine principale et la protège. Le cortex contient des cellules de stockage d'amidon, d'eau et d'autres substances nutritives.

Méristème apical racinaire : c'est la zone vivante située à l'extrémité des racines, qui contient les cellules en croissance responsables du développement de la racine. **(Esau, 1965)**

I.3. Les huiles essentielles :

Les huiles essentielles, sont des extraits naturels concentrés contenant des composés chimiques actifs extraits de différentes parties des plantes telles que les feuilles, les racines, les fleurs, les fruits, les graines, les bois et les racines. Ces huiles sont qualifiées en raison de leur puissante fragrance naturelle qui confère à chaque huile un parfum unique et des caractéristiques distinctes.

Les huiles essentielles se distinguent par leur composition chimique complexe, qui comprend une variété de composés actifs tels que des alcools, des cétones, des esters, des aldéhydes, des phénols, des terpènes, et bien d'autres. Ces composés contribuent aux propriétés aromatiques uniques et aux effets thérapeutiques des huiles essentielles.

Les huiles essentielles sont utilisées dans le domaine des soins naturels, de l'aromathérapie et de la beauté. Elles offrent des bienfaits pour la santé tels que l'amélioration de l'humeur, la réduction du stress et de l'anxiété, l'amélioration de la circulation sanguine, le soulagement de la douleur et de l'inflammation, ainsi que l'amélioration du sommeil et de la relaxation.

Les huiles essentielles ont un potentiel thérapeutique. elle peuvent avoir des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, apaisantes pour le système nerveux et stimulantes pour le système immunitaire. Chaque huile essentielle a ses propres effets uniques, certaines pouvant aider à améliorer la concentration et l'attention, tandis que d'autres peuvent aider à apaiser les nerfs et favoriser la relaxation.

Il est important d'utiliser les huiles essentielles avec prudence et sous la supervision d'un professionnel, car elles sont hautement concentrées et peuvent avoir des effets secondaires lorsqu'elles sont utilisées de manière incorrecte. De plus, les femmes enceintes, les enfants et les personnes ayant des conditions médicales particulières doivent consulter leur médecin avant d'utiliser des huiles essentielles. (Ann Worwood,1991)

I.3.1. Les facteurs qui influencent la qualité et la composition de l'huile essentielle:

I.3.1.1. Période de la récolte : La période de récolte est l'un des facteurs les plus importants qui influent sur la qualité de l'huile essentielle de *Salvia rosmarinus*. Il a généralement un impact direct sur la concentration des composés chimiques actifs dans la plante. Il est préférable de récolter le romarin pendant sa période de floraison, lorsque les plantes sont dans leur meilleur état pour libérer des quantités plus élevées d'huiles essentielles.(Bouzabata et al. 2018)

I.3.1.2. Type de plante : Il existe différentes variétés de romarin, chacune ayant sa propre composition chimique. Chaque type peut avoir ses propres composants chimiques uniques, ce qui affecte les propriétés de l'huile finale. Il est donc important de choisir les plantes appropriées et certifiées pour obtenir une huile de romarin de haute qualité. (Grosso et al. 2013)

I.3.1.3. Conditions de culture : Les conditions de culture jouent un rôle crucial dans la qualité de l'huile essentielle de romarin. Le romarin nécessite des conditions de croissance optimales, telles qu'un sol de qualité, une bonne ventilation et une exposition adéquate au soleil. Les plantes doivent être exemptes de pesticides et de maladies pour garantir l'obtention d'une huile de romarin de haute qualité. (Chang et al, 2021)

En résumé, le moment de la récolte approprié, le choix des variétés adaptées et la fourniture des bonnes conditions de culture sont des facteurs clés pour obtenir une huile essentielle de romarin de haute qualité et une composition distinctive.

I.3.2. Méthodes de récupération des huiles essentielles:

I.3.2.1. Distillation:

L'hydrodistillation : Est une méthode d'extraction des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques. Elle implique le chauffage des plantes avec de l'eau, ce qui génère de la vapeur d'eau. Cette vapeur d'eau traverse ensuite les plantes et entraîne les composés aromatiques volatils, y compris les huiles essentielles. Le mélange de vapeur d'eau et d'huiles essentielles est ensuite refroidi et condensé, permettant ainsi de séparer l'huile essentielle de l'eau distillée. (Faucon, 2003)

L'entraînement à la vapeur d'eau : Est une méthode d'extraction des huiles essentielles qui implique l'utilisation de la vapeur d'eau pour chauffer la matière première végétale et libérer les composés aromatiques volatils. La vapeur d'eau est ensuite refroidie et condensée pour former un mélange d'eau et d'huile essentielle qui peut être séparé par décantation ou par un processus de distillation secondaire.

Cette méthode est couramment utilisée pour extraire des huiles essentielles à partir de plantes fragiles ou sensibles à la chaleur, telles que la lavande, la camomille et la menthe poivrée.

L'Hydrodiffusion : Diffère de la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau en termes de concept de passage des vapeurs de haut en bas à travers les matières premières végétales, ce qui peut potentiellement influencer l'efficacité et la composition de l'extraction des substances volatiles. (Keville et Green, 2009)

I.3.2.2. Extraction par CO₂ supercritique :

L'extraction par méthode de CO₂ supercritique est une technique utilisée pour extraire des composés volatils et non volatils à partir de divers matériaux, tels que les plantes, les aliments, les produits pharmaceutiques et les cosmétiques. Le CO₂ (dioxyde de carbone) est

utilisé comme solvant d'extraction dans un état supercritique, c'est-à-dire à une température et une pression supérieures à son point critique.

La méthode d'extraction par CO₂ supercritique offre plusieurs avantages par rapport à d'autres méthodes d'extraction, tels que l'utilisation de solvants organiques. Ces avantages comprennent une extraction sélective, une meilleure préservation des composés sensibles à la chaleur, une absence de résidus de solvants et une facilité de séparation du solvant et de l'extrait. (Parthiban et al, 2017)

Le processus d'extraction par CO₂ supercritique implique les étapes suivantes :

Compression : Le CO₂ est comprimé pour atteindre un état supercritique, où il exhibe des propriétés intermédiaires entre celles d'un gaz et d'un liquide.

Extraction : Le CO₂ supercritique est passé à travers le matériau contenant les composés souhaités. Le CO₂ agit comme un solvant en extrayant les composés cibles du matériau.

Séparation : L'extrait est séparé du CO₂ supercritique en abaissant la pression. Le CO₂ revient à son état gazeux, laissant l'extrait derrière lui.

Collecte : L'extrait est collecté et peut être utilisé pour diverses applications.

I.3.2.3. L'extraction assistée par micro-ondes :

L'extraction assistée par micro-ondes est un procédé qui permet de récupérer une substance d'une matrice en utilisant des micro-ondes pour faciliter le transfert vers une phase liquide appropriée, appelée milieu d'extraction. Cette technique est applicable à différents types d'extraction, tels que l'extraction liquide-liquide et l'extraction solide-liquide.

Les solides utilisés dans ce procédé peuvent inclure des graines, des herbes, des feuilles, des coques de fruits, des fleurs, et d'autres. Pour améliorer l'extraction, ces solides peuvent être broyés préalablement afin d'obtenir une poudre. Ensuite, ces solides sont immergés dans un solvant. Le mélange est ensuite placé dans un récipient fermé et soumis à l'irradiation des micro-ondes.

Le comportement de l'ensemble dépend de la sensibilité aux micro-ondes du milieu d'extraction, de la matrice solide et des substances à extraire. Si le milieu d'extraction est sensible aux micro-ondes, comme c'est le cas avec l'eau, la matrice solide est chauffée par conduction à travers ce milieu, ce qui permet de solubiliser les substances à extraire. Ce processus est similaire à l'extraction conventionnelle, mais il est plus rapide.

Dans le cas où seule la matrice solide est sensible aux micro-ondes, elle est chauffée préférentiellement, ce qui entraîne une augmentation de sa température et donc de la pression à l'intérieur. Cela conduit à la rupture de la matrice et à une libération rapide des substances à extraire.

Si ce sont uniquement les substances à extraire qui sont sensibles aux micro-ondes, elles se diffuseront vers le milieu d'extraction en raison de la différence de température entre elles et ce milieu.

Comparée aux techniques d'extraction conventionnelles telles que Soxhlet, Twisselmann, etc., l'extraction assistée par micro-ondes présente plusieurs avantages. Elle est plus rapide, nécessite moins de solvants et permet, si nécessaire, d'utiliser des températures plus élevées. **(Priscilla et al, 2013)**

I.3.3. Composants chimiques dans les huiles essentielles :

Les propriétés curatives de certaines huiles sont largement reconnues. Il est essentiel de comprendre la composition des huiles pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme.

I.3.3.1. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques présents dans la plupart des plantes. Ils contribuent, entre autres, à la coloration des fleurs et des fruits en jaune ou en blanc. Les flavonoïdes sont dotés d'un large éventail d'actions et possèdent de nombreuses vertus médicinales. Ils agissent comme des antioxydants et jouent un rôle essentiel dans le maintien d'une bonne circulation sanguine.

Certains flavonoïdes possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, antivirales et offrent une protection pour le foie. **(Couplan. F, 2009)**

I.3.3.2. Les terpènes :

Les terpènes sont des composés organiques présents dans de nombreuses plantes, notamment les plantes à fleurs et les conifères. Ces composés sont responsables des arômes distinctifs que nous associons à diverses variétés de plantes, comme les agrumes, les pins et les fleurs. Outre leur rôle dans la création d'odeurs agréables, les terpènes jouent également un rôle important dans la protection des plantes contre les parasites et les prédateurs. De plus, de nombreuses études suggèrent que les terpènes peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine.

Les terpènes sont une classe de composés organiques volatils produits par de nombreuses plantes. Ils sont constitués d'isoprène, une unité structurale de base, et peuvent varier considérablement en termes de structure chimique. Plus de 20 000 terpènes différents ont été identifiés à ce jour, et ils sont classés en plusieurs groupes principaux, tels que les monoterpènes, les sesquiterpènes et les diterpènes, en fonction du nombre d'unités d'isoprène qu'ils contiennent.

Les terpènes sont responsables des arômes et des saveurs distinctifs que nous associons à certaines plantes. Par exemple, le limonène est un terpène que l'on trouve dans les agrumes, et il contribue à leur odeur caractéristique. Le pinène, quant à lui, est présent dans les pins et donne à ces arbres leur parfum boisé. Les terpènes jouent un rôle essentiel dans l'industrie des arômes et des parfums, où ils sont utilisés pour ajouter des notes spécifiques aux produits. Les terpènes peuvent avoir des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et antimicrobiennes. Par exemple, le linalol, présent dans la lavande et plusieurs autres plantes, a montré des effets relaxants et anxiolytiques. De même, le bêta-caryophyllène, trouvé dans le poivre noir et le cannabis, a démontré des propriétés anti-inflammatoires. **(Bhaskar et Gupta, 2017)**

I.3.3.3. Les Phénols :

Il existe une grande variété de phénols, allant des composés simples tels que l'acide salicylique, qui est synthétisé pour produire de l'aspirine, à des substances plus complexes telles que les composés phénoliques associés aux glucosides. Les phénols ont des propriétés anti-inflammatoires et antiseptiques. On pense que les plantes les produisent pour se protéger contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques, tels que l'acide rosmarinique, sont fortement anti-inflammatoires et antioxydants, et peuvent également avoir des propriétés antivirales. **(Couplan. F, 2009)**

I.3.3.4. Ester :

Les esters sont une classe de composés chimiques dérivés des acides carboxyliques et des alcools. Ils sont formés par la réaction d'estérification, qui implique la combinaison d'un acide carboxylique et d'un alcool en présence d'un catalyseur, généralement un acide ou une base. La structure des esters comprend un groupe ester, qui est formé par la liaison d'un atome d'oxygène à la fois à un groupe alkyle provenant de l'alcool et à un groupe acyle provenant de l'acide carboxylique. Cette liaison est généralement représentée par le symbole "-COO-". Les esters sont largement utilisés dans de nombreux domaines, notamment dans l'industrie alimentaire pour conférer des arômes et des saveurs agréables, dans l'industrie des parfums et des cosmétiques pour leurs propriétés odorantes, ainsi que dans l'industrie pharmaceutique et chimique pour la synthèse d'ébullition élevée, une faible solubilité dans l'eau et une odeur caractéristique. Ils ont également des propriétés physiques utiles dans diverses applications. **(Clayden et al, 2012)**

I.3.3.5. Cétone :

Les cétones sont caractérisées par la présence d'un groupe carbonyle (C=O) lié à deux atomes de carbone. Le groupe carbonyle est situé au milieu de la chaîne carbonée, ce qui

distingue les cétones des aldéhydes, où le groupe carbonyle est situé à l'extrémité de la chaîne.

Les cétones sont largement présentes dans la nature et se trouvent dans de nombreux produits alimentaires et substances chimiques. Certaines cétones sont utilisées comme solvants dans l'industrie, tandis que d'autres sont utilisées comme matières premières dans la synthèse de divers produits chimiques et médicaments. Les cétones peuvent également être utilisées comme arômes et parfums dans les produits alimentaires, les boissons et les produits de soins personnels. (Clayden et al, 2012)

I.3.3.6. Alcool :

Les alcools sont une classe de composés organiques caractérisés par la présence d'un groupe fonctionnel hydroxyle (-OH) lié à un atome de carbone. Ce groupe hydroxyle confère aux alcools leurs propriétés chimiques et physiques distinctives. Les alcools peuvent être classés en fonction du nombre d'atomes de carbone et de la structure de la chaîne carbonée à laquelle le groupe hydroxyle est attaché.

Les alcools peuvent être trouvés dans diverses sources naturelles, tels que les fruits, les légumes, les plantes et les microorganismes. Ils sont également synthétisés à des fins industrielles et pharmaceutiques.

Les alcools sont caractérisés par leurs propriétés de solubilité dans l'eau, leur capacité à former des liaisons hydrogène et leur réactivité chimique. Ils peuvent participer à des réactions d'oxydation, de substitution nucléophile et de formation d'esters, entre autres, en tant que composés chimiques polyvalents, les alcools sont utilisés dans de nombreux domaines, notamment comme solvants, réactifs chimiques, ingrédients dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques, carburants, et dans la production d'alcools éthylique (éthanol), qui est une boisson alcoolisée courante.

Il est important de noter que la toxicité et les effets des alcools sur le corps varient en fonction de leur structure chimique, de leur concentration. Certains alcools peuvent avoir des effets nocifs sur la santé lorsqu'ils sont consommés en excès ou dans des conditions inappropriées. (Clayden et al, 2012)

I.3.4. Propriétés biologiques des composants chimiques de l'HE *Salvia rosmarinus* :

Le tableau ci dessous donne les principaux composants qui se trouvent dans l'huile essentielle extraite de la plante *Salvia rosmarinus* avec leurs principales activités.

Chapitre I: Aperçu sur le Romarin - Une Exploration Botanique et Chimique

Tableau I.1: Propriétés chimiques et biologiques de Salvia rosmarinus.

PARTIE DE PLANTE	TYPE D'EXTRAITS	METABOLITES SECONDAIRES		PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES RECONNUES	Ref
		Familles chimiques	Composants chimiques		
Feuilles	Huiles essentielles de feuilles de romarin	Flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> • Apigénine • Lutéoline • Diosmétine • Génistéine 	Propriété antioxydante et anti-inflammatoire	(Maria Angeles Rosillo , 2018)
		Terpènes	<ul style="list-style-type: none"> • Alpha-pinène • Camphène • Cinéole (ou eucalyptol) • Camphre • Bornéol 	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulante, antibactérienne • Expectorante, anti microbienne • Antiseptique, anti-inflammatoire • Analgésique , anti-inflammatoire • Antispasmodique, anti-inflammatoire 	(Fazia Azi et al , 2017)
		Phénols	<ul style="list-style-type: none"> • Carnosol • Acide rosmarinique • Acide caféique • Acide p-coumarique 	Anti-inflammatoire, antimicrobiennes et antioxydante	(H.Aroucha, 2017)
		Esters	Acétate de bornyle Acétate de bornéyle Acétate d'isobutyle	<ul style="list-style-type: none"> • Analgésiques • Anti-inflammatoire • Antibactérien • Relaxante • Apaisantes 	(Chitra Rawat , 2021)
		Cétone	Camphre (Camphor) Cinéole (Eucalyptol)	<ul style="list-style-type: none"> • Analgésiques, anti-inflammatoires et antiseptiques. • Soulager les symptômes de la congestion nasale et de la toux 	(V. Renuka , 2014)
		Alcool	<ul style="list-style-type: none"> • 1,8-cinéole (ou eucalyptol) • Alpha-terpinéol • Bornéol • Linalol 	<ul style="list-style-type: none"> •Antiseptiques, expectorantes et anti-inflammatoires •Antibactériennes, antifongiques et anti-inflammatoires. •Antiseptiques, analgésiques et anti-inflammatoires. •Relaxantes, apaisantes et analgésiques 	(J. Musah ,2017)

II.1. Toxicité des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ne peuvent pas être utilisées sans prendre de risques, comme tous les produits naturels. Il est important de comprendre que le fait qu'une substance soit naturelle ne garantit pas sa sécurité pour l'organisme. Cette précaution est d'autant plus essentielle étant donné que l'utilisation des huiles essentielles devient de plus en plus répandue.

Certaines huiles essentielles peuvent être dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou phototoxique (huiles d'agrumes contenant des furocoumarines). Certaines huiles essentielles ont également des effets neurotoxiques. Les cétones, telles que l' α -thujone, sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux. De plus, certaines huiles essentielles contiennent des composés susceptibles de favoriser la formation de cancers. Cependant, ces résultats sont sujets à controverse, car le processus de métabolisation de ces composés peut varier chez les individus. **(Smith et al., 2000)**

II.2. Activités biologiques :

Depuis des siècles, les plantes aromatiques et les épices sont utilisées dans la cuisine pour leur saveur, mais aussi pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques. Des herbes telles que l'origan, le thym, la sauge, le romarin et les clous de girofle sont couramment utilisées comme ingrédients alimentaires. Les huiles essentielles extraites de ces plantes ont toutes une caractéristique commune : elles sont riches en composés phénoliques tels que l'eugénol, le thymol et le carvacrol, qui possèdent une forte activité antibactérienne. Parmi eux, le carvacrol est le plus puissant. Connu pour être non toxique, il est utilisé comme conservateur et arôme alimentaire dans les boissons, les friandises et d'autres préparations. Le thymol est l'ingrédient actif des rince-bouches, tandis que l'eugénol est utilisé dans les produits cosmétiques, alimentaires et dentaires.

Les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques sont très intéressées par les propriétés de ces composés, d'autant plus qu'ils sont d'origine naturelle. Ainsi, de nombreux chercheurs dans le monde étudient leur potentiel en tant qu'agents de conservation. De plus, la plupart de ces composés sont également de puissants agents antifongiques. Le thymol, le carvacrol et l'eugénol sont particulièrement efficaces dans ce domaine.

Avec l'émergence de microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques, les huiles essentielles antimicrobiennes offrent une alternative sérieuse à la médecine antibiotique pour traiter les infections. **(Samar houri , 2019)**

II.2.1. Activité antibactérienne :

II.2.1.1. Définition:

L'activité antibactérienne est la capacité d'une substance à tuer ou à inhiber la croissance des bactéries. Les agents antibactériens agissent en ciblant les mécanismes spécifiques des bactéries, ce qui les rend efficaces dans le traitement des infections bactériennes. Les antibiotiques agissent en ciblant les processus de synthèse des protéines et des acides nucléiques dans les bactéries, tandis que les antiseptiques et les désinfectants agissent en perturbant la membrane cellulaire des bactéries.

II.2.1.2 Méthodes d'évaluation d'activité antibactérienne:

Méthode d'antibiogramme: L'antibiogramme est une méthode de laboratoire pour évaluer la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques. Il implique la culture des microorganismes sur une boîte de Petri contenant un milieu de culture spécifique, puis le placement de disques d'antibiotiques sur la surface de la boîte. En observant la croissance des microorganismes et la formation de zones d'inhibition autour des disques, on peut déterminer la sensibilité ou la résistance aux antibiotiques. Cela aide les professionnels de la santé à choisir le traitement antibiotique le plus approprié et à lutter contre la résistance aux antibiotiques. (Marlène. A et al, 2021)

II.3. Activités pharmacologiques :

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles font l'objet d'études massives ces derniers temps. Le stress oxydatif, qui survient lorsqu'il y a un déséquilibre entre la production de radicaux libres et les enzymes antioxydantes, est lié à l'apparition de maladies telles que l'alzheimer, l'artériosclérose et le cancer. Pour prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules, il est recommandé de rechercher dans l'alimentation des apports supplémentaires de composés antioxydants tels que la vitamine C, l'a-tocophérol, le BHT, etc.

Les huiles essentielles de cannelle, romarin, clou de girofle, origan et thym contiennent des composés antioxydants puissants. Leur activité est liée à leur structure phénolique, car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices qui jouent un rôle essentiel en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes. L'activité antioxydante des huiles essentielles peut également être attribuée à certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques tels que le linalol, le 1,8-cinéole, le géraniol/néral, le citronellal, l'isomenthone, la menthone, ainsi que quelques monoterpènes comme l' α -terpinène, le γ -terpinène et l' α -terpinéol. (Edris, 2007)

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour traiter des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite. Plusieurs études ont, par exemple, démontré l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Salvia rosmarinus*. Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation. Un autre exemple est l'huile essentielle de géranium, ainsi que le linalol et son acétate, qui ont montré une activité anti-inflammatoire sur des oedèmes de pattes de souris induits par le carraghénane. Les huiles essentielles représentent donc une nouvelle option dans le traitement des maladies inflammatoires. (Olga.R ,2018)

II.3.1. Activité antioxydante :

II .3.1.1. Définition:

L'activité antioxydante est la capacité d'une substance à neutraliser les radicaux libres dans notre corps. Les radicaux libres sont des molécules instables qui peuvent endommager nos cellules et causer des maladies comme le cancer, les maladies cardiaques et le vieillissement prématuré. Les antioxydants, tels que ceux présents dans les huiles essentielles, aident à prévenir ces dommages en neutralisant les radicaux libres.

Les huiles essentielles sont des extraits naturels de plantes qui contiennent une variété de composés bénéfiques pour la santé. Ces composés, tels que les terpènes et les phénols, ont des propriétés antioxydantes qui peuvent aider à protéger notre corps contre les dommages des radicaux libres. Par exemple, l'huile essentielle de romarin contient du carnosol, un composé antioxydant puissant qui peut aider à prévenir le cancer et les maladies cardiaques.

II.3.1.2 Méthode d'évaluation d'activité antioxydante :

Piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) : Le test DPPH permet de mesurer le pouvoir anti radicalaire de molécules pures ou d'extraits végétaux dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant (AH, composés phénoliques généralement) à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH°, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle. (Brand-Williams W, 1995)

II.4. Screening phytochimique :

Le screening phytochimique est une méthode de recherche qui consiste à identifier les molécules actives présentes dans les plantes. Cette technique s'est avérée être un outil précieux pour la découverte de nouveaux médicaments. En effet, de nombreuses substances naturelles ont des propriétés thérapeutiques intéressantes et peuvent être utilisées pour traiter

différentes maladies. Les différentes étapes du screening phytochimique, telles que l'extraction, la purification et l'identification des composés actifs, sont toutes importantes pour assurer le succès de cette méthode.

le screening phytochimique offre de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes de recherche de médicaments. Elle est moins coûteuse, plus rapide et plus respectueuse de l'environnement. De plus, elle peut être utilisée pour découvrir de nouveaux médicaments pour des maladies pour lesquelles il n'existe pas encore de traitement efficace.

Partie 1 : Matériels et méthodes

III.1. Objectifs de travail :

Le présent travail contribue à la valorisation d'une plante aromatique et médicinale endémique anciennement utilisée en médecine traditionnelle «*Salvia rosmarinus*». Afin de réaliser cette étude, les objectifs suivants ont été fixés :

- L'extraction d'huile essentielle par hydrodistillation en utilisant le montage de Clevenger.
- La caractérisation physicochimique de l'huile de *Salvia rosmarinus*.
- L'évaluation de l'activité biologique antibactérien de l'huile essentielles de *Salvia rosmarinus*.
- Screening chimiques de plante de *Salvia rosmarinus*.
- L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Salvia rosmarinus*.

III.2. Méthodologie:

III.2.1.Matière végétal :

L'huile essentielle étudiée est extraite à partir de la plante *Salvia rosmarinus* sèche de région "Tipaza".



Figure III.1 : Plante fraîche au moment de récolte.

Prétraitement de la plante :

Les feuilles de la plante étudiée ont subi dans une étape de prétraitement avant l'étape principale d'extraction.

III.2.2. Séchage :

On réalise le séchage des feuilles de romarin dans un environnement sombre et sec. Le temps de cette opération varie selon plusieurs facteurs tels que l'épaisseur des feuilles, leur humidité initiale, ainsi que la température et l'humidité de l'environnement.

Généralement, il faut entre 1 et 2 semaines pour sécher complètement les feuilles de romarin. L'endroit doit être suffisamment sec pour éviter la formation de moisissure ou de champignons sur les feuilles, d'où l'avantage d'un environnement sombre pour préserver la qualité des feuilles.

Pendant le processus de séchage, nous disposons sur une surface plate et propre, on laisse de l'espace entre les feuilles afin d'avoir une bonne ventilation et un séchage homogène. En vérifiant régulièrement les feuilles pour surveiller le processus de séchage. Lorsqu'elles deviennent friables, se rétrécissent considérablement et sont généralement sèches au toucher, elles peuvent être considérées comme prêtes. Retirez alors les feuilles du lieu de séchage et conservez-les dans des récipients hermétiques, dans un endroit frais, sec et à l'abri de la lumière directe du soleil. (Temps nécessaire pour séchage complet est 15 jours).

III.2.3. Broyage :

Pour faire le broyage de romarin sec avec un mortier :

1. Placez la plante sèche dans un mortier sans surcharger.
2. Broyez-les avec un pilon en mouvements circulaires jusqu'à obtenir une poudre fine.
3. Conservez la poudre dans un récipient hermétique.



Figure III.2 : broyage de plante.

III.2.4. Protocole d'extraction par le montage de Clevenger :

L'extraction de HE de la plante est effectuée en suivant le mode opératoire ci-dessous:

A. Matériel :

- Balance
- Broyeur
- Ballon de 1L
- Clevenger
- Chauffe ballon

- les tubes verre ombré



Figure III.3 : Montage de Clevenger.

B. Produits chimiques :

- $MgSO_4$
- Pierre ponce
- Eau distillée

C. Méthode d'extractions :

Voici un mode opératoire pour extraire de l'huile essentielle à partir de 100 g de romarin broyé en utilisant l'appareil de Clevenger :

Préparez l'appareil de Clevenger puis Mettez 100 g de romarin dans le récipient et ajoutez de l'eau distillée au niveau recommandé (2/3). Fixez le réfrigérant à l'appareil et allumez l'appareil pour chauffer le romarin. La vapeur d'eau emporte l'huile essentielle et se condense, formant un mélange hétérogène qui s'écoule dans une partie du Clevenger. puis l'huile flotte à la surface de l'hydrolat. Récupérez l'hydrolat puis l'huile et ajoutez un desséchant ($MgSO_4$). Puis filtrez pour séparer l'huile du desséchant.

III.2.5. Protocole d'extraction par le montage hydrodistillation simple :

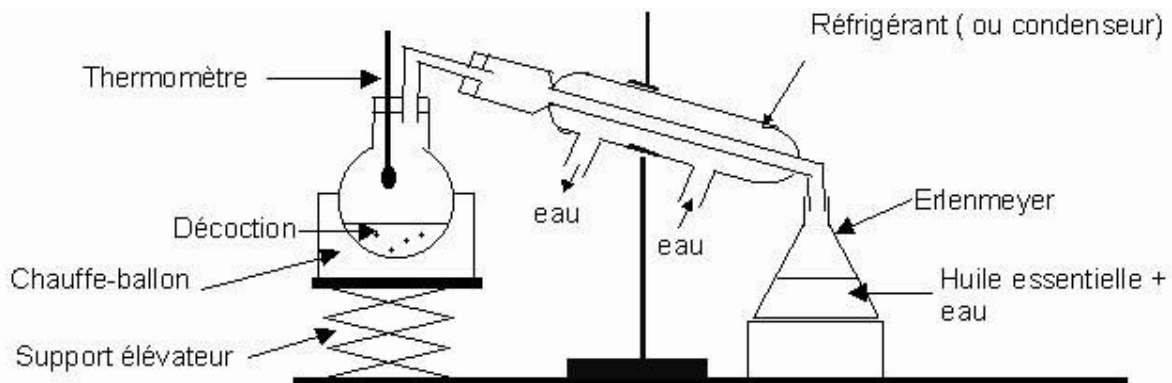


Figure III.4 : Technique d'hydrodistillation.

Matériel :

- Balance
- Ballon de 1L
- Réfrigérant droit
- Chauffe ballon
- Flacon de récupération
- Bécher, les tubes (verre ombré)

A. Produits chimiques :

- $MgSO_4$
- Pierre ponce
- Eau distillée

III.3. Préparation des extraits pour le screening phytochimique :

III.3.1. Préparation des échantillons :

Les échantillons (feuilles, fleurs, tiges,) sont séchés dans un endroit sec, aérées à l'abri de la lumière pendant deux semaines et broyées à l'aide d'un broyeur.

Matériel :

100g matière végétale

150 ml **méthanol**, 150 ml **éther de pétrole**, 150 ml **dichlorométhane**

Fragments de magnésium

5ml **HCl concentré**, 25ml **gélatine à 1%**, 50ml **NaOH 10 %**, 50ml **KOH 10 %**, 50 ml

(NH_3 , H_2O) 25 %

Réactif de Mayer, Erlenmayer , Tubes à essais .

III.3.2. Préparation des extraits :

L'extrait végétal hydro-alcoolique (A) :

Dans un erlenmayer on fait macérer, à température ambiante, pendant 24 heures, 10 g du matière végétale dans 100 ml de mélange méthanol-eau (70/30).

Filtrer le mélange à l'aide d'un papier Whatman et récupérer le filtrat.

L'extrait d'éther de pétrole :

Introduire 10g du matière végétale dans un erlenmeyer et ajouter 100 ml d'éther de pétrole.

Laisser reposer pendant 10 minutes.

Filtrer le mélange à l'aide d'un papier Whatman et récupérer le filtrat.

L'extrait dichlorométhane (C) :

Introduire 10 g de matière végétale dans un erlenmeyer et ajouter 100 ml de dichloromethane. Laisser reposer pendant 10 minutes.

Filtrer le mélange à l'aide d'un papier Whatman et récupérer le filtrat.

III.3.3. Screening phytochimique des extraits :

Les différentes réactions chimiques ont pour objectif de rechercher les principaux groupes et familles chimiques dans la plante sèche ainsi que l'extrait de la partie aérienne. Cette caractérisation chimique préliminaire se fait dans des tubes à essais en utilisant différents protocoles avec plusieurs produits chimiques.

Les résultats qualitatifs sont classés en :

- Réaction très positive +++ : Présence confirmée.
- Réaction positive ++ : présence modérée.
- Réaction plus au moins positive + : présence en tant que trace.
- Réaction négative - : absence.

III.3.3.1. Screening phytochimique des Tannins :

On met dans 2 tubes 2 ml de l'extrait dont :

- Le premier tube (Témoin).
- Dans le 2^{ème} tube additionner 4 à 5 gouttes de gélatine à 1 %

La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques avec précipitation dans les tests de gélatine.

III.3.3.2. Screening phytochimique des Quinones :

On met dans 2 tubes 2 ml de l'extrait dont :

- Le premier tube (Témoin).
- Dans le 2^{ème} tube on ajoute NaOH 10 %.

Après agitation, l'apparition d'une coloration qui vire au jaune, rouge ou violet de la phase aqueuse confirme la présence des quinones

III.3.3.3. Screening phytochimique des coumarines :

Un fragment de l'extrait est dissout dans 2 ml d'eau chaude. Après refroidissement la solution est partagée dans 2 tubes à essai :

- Tube 1 : témoin
- Tube 2+ 0.5ml d'ammoniaque (25 % NH₄OH)

L'apparition d'une fluorescence intense du tube 2 sous lumières UV 365 montre la présence des coumarines.

III.3.3.4. Screening phytochimique des anthraquinones :

On met dans deux tubes 2 ml de l'extrait dont :

- Le premier tube (Témoin).
- Dans le 2^{ème} tube On ajoute KOH 10 %.

Après agitation, la présence des Anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse en rouge.

III.3.3.5. Test de Wilstater (test de flavonols et flavanones) :

On met dans deux tubes 2,5 ml de l'extrait hydro-alcoolique (A) dont :

- Le premier tube (Témoin).
- Dans le 2^{ème} tube on met 0,5 ml de l'HCl concentré.

On ajoute tout doucement quelques fragments de magnésium, on laisse agir sous la hotte.

L'apparition d'une couleur qui vire vers le rouge pourpre (Flavonols) ou le rouge violacées (Flavonones et Flavonols) confirme l'existence des flavonoïdes.

III.4. Extraction et évaluation des indices chimique d'HE:

III.4.1. Rendement de l'extraction :

Le rendement de huile essentielle (HE) est calculé en comparant le volume d'HE obtenu avec le poids de la matière végétale utilisée. Dans notre étude, nous exprimons le rendement en millilitres pour 100 grammes de matière végétale fraîche. Cela permet de comparer facilement les rendements entre différentes plantes ou conditions d'extraction. La formule utilisée est :

$$R = (\text{Masse d'HE récupérée} / \text{Masse de la matière végétale}) \times 100.$$

III.4.2. Caractères chimiques :

III.4.2.1. Indice d'acide:

L'indice d'acide (IA) mesure la quantité de potasse nécessaire pour neutraliser les acides libres dans 1g de l'huile essentielle, exprimée en milligrammes (mg). Cela évalue la quantité d'acides dans l'huile. Les IA plus élevés signifient plus d'acides, affectant la qualité et la conservation de l'huile essentielle. La réaction chimique utilisée est : Acide + KOH → Sel + Eau. Un IA élevé peut indiquer une mauvaise qualité ou une stabilité réduite de l'huile essentielle.

III.4.2.1.1. Mode opératoire :

Protocole pour déterminer l'indice d'acide (IA) d'une huile essentielle :

Matériel nécessaire :

- Huile essentielle à analyser
- Alcool éthylique (éthanol)

- Solution d'hydroxyde de potassium (KOH) de concentration connue (0,1) M
- Phénolphthaléine comme indicateur coloré
- Burette graduée
- Pipette graduée
- Bécher
- Fiole jaugée
- Eau distillée

Protocole :

Préparer une solution de KOH connue, comme (0,1) M et mesurer précisément 1,00 g d'huile essentielle, puis dissolver l'huile essentielle dans de l'alcool éthylique jusqu'à obtenir une solution homogène. Après remplir une burette avec la solution de KOH et ajouter quelques gouttes de phénolphthaléine à la solution d'huile essentielle. Commencer la titration en ajoutant la solution de KOH goutte à goutte tout en agitant jusqu'à un changement de couleur. Puis liser le volume de KOH utilisé sur la burette et noter.



Figure III.5 : Solution après l'ajout de PHP.

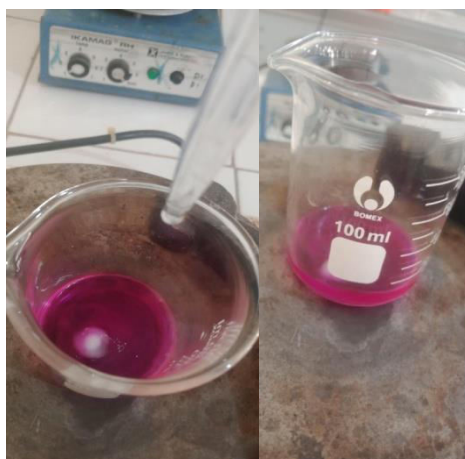


Figure III.6 : Solution après le titrage.

Formule de l'indice d'acide :

$$\text{IA} = (\text{Volume de KOH utilisé en mL}) \times (\text{Facteur de normalité de KOH}) \times (\text{masse molaire}) / (\text{Masse d'huile essentielle utilisée en g}).$$

Le résultat est l'indice d'acide de l'huile essentielle, généralement exprimé en mN (millinormal).

III.4.2.2. Indice de saponification :

III.4.2.2.1. Mode opératoire :

Matériel nécessaire :

- Balance analytique
- Éprouvette graduée
- Burette
- Pipette
- Bécher

Réactifs :

- Huile essentielle de romarin
- Hydroxyde de potassium (KOH)
- Éthanol (alcool à 95 %)
- Phénolphtaléine (indicateur)
- Solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0,1 M
- Solution de sulfate de sodium (Na_2SO_4) à 10 % (pour neutraliser les produits chimiques)

Préparer une solution de KOH en dissolvant 5 g de KOH dans 100 ml d'eau distillée et diluer 100 ml d'éthanol (alcool à 95 %) avec 100 ml d'eau distillée pour préparer la solution d'éthanol, puis peser environ 1 g d'huile essentielle et mélanger l'huile essentielle avec 25 ml de la solution d'éthanol. Ajouter quelques gouttes de phénolphtaléine pour que l'indicateur devienne rose. Après débiter le titrage en ajoutant la solution de KOH avec une burette jusqu'à ce que la couleur rose de l'indicateur reste constante pendant 30 secondes, signalant l'achèvement de la réaction de saponification et noter le volume de solution de KOH utilisé en ml.

Formule de l'indice de saponification (IS) :

$$\text{IS} = (\text{Volume (ml)} \times \text{Concentration (0,1 M)}) \times (\text{masse molaire}) / \text{Masse de l'huile essentielle de romarin (g)}.$$



Figure III.7 : Saponification de la solution huileuse avec le dosage.

III.4.2.3. Indice d'ester :

L'indice d'ester mesure en milligrammes de KOH nécessaire pour neutraliser les acides libres issus de l'hydrolyse des esters dans un gramme d'huile fixe. Cela indique la quantité d'esters dans l'huile, évaluant ainsi sa qualité et pureté. Il permet de déterminer la quantité d'acides gras libres dans l'huile fixe, une information cruciale pour diverses applications industrielles..

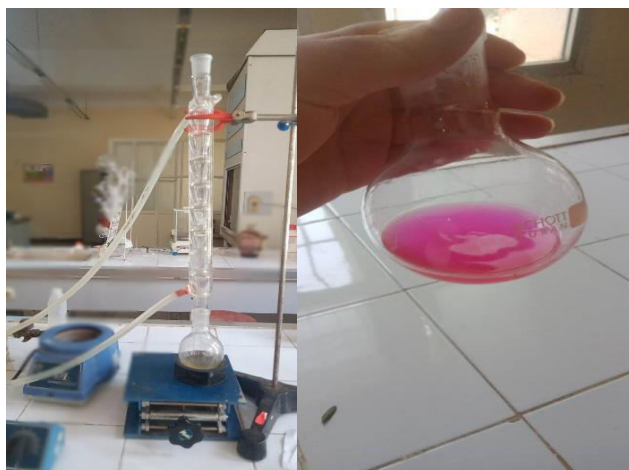
III.4.2.3.1. Mode opératoire :

Le protocole pour déterminer l'indice d'ester de l'huile est donnée ci dessous :

Matériel et produits :

- Balance analytique
- Burette
- Réfrigérant
- Chauffe-ballon
- Bécher et ballon en verre
- Solution éthanolique de KOH 0,5 M
- Eau distillée
- Solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 0,5 M
- Pipettes ou burettes graduée
- Solution d'indicateur (la phénolphtaléine)

Préparer une solution de KOH de 0,5 M dans de l'éthanol et peser précisément 0,5 g d'huile. Puis dans un ballon en verre, placer l'huile, ajoutez lentement 12,5 ml de la solution de KOH, puis chauffer pendant une heure, laisser refroidir et ajoutez 10 ml d'eau et 3 gouttes de phénolphtaléine.



A) B)
Figure III.8 : A) Refroidissement des réactifs B) Coloration des réactifs après l'ajoute des gouttes de PHP.

Pour le titrage :

Utiliser une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 0,5 M pour neutraliser l'excès de KOH dans l'échantillon. Ajouter lentement l'HCl à l'échantillon tout en agitant jusqu'à ce que la couleur rose de l'indicateur disparaisse.

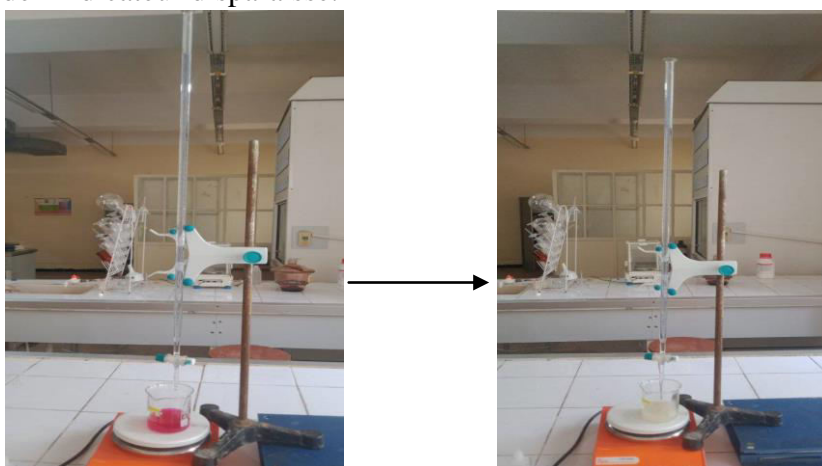


Figure III.9 : Solution avant et après le titrage.

Formule de Indice d'ester (IE) :

$$IE = 28.05 / m (V - V') - IA$$

Où V est le volume d'HCl pour l'échantillon, V' est le volume d'HCl pour l'essai à blanc, IA est une correction potentielle, et m est la masse de l'huile testée en grammes. Cela vous donne l'indice d'ester de l'huile.

III.4.2.4. Indice de peroxyde :

L'indice de peroxyde mesure la concentration de peroxyde dans un produit en microgrammes actifs de peroxyde par gramme. Il est déterminé en utilisant la méthode de réaction avec l'iodure de potassium pour libérer de l'iode. Cette mesure est essentielle pour

évaluer la stabilité et la qualité des produits contenant du peroxyde, comme les produits chimiques, les cosmétiques et les aliments.

III.4.2.4.1. Mode opératoire :

Mesurer 0,5 g d'huile essentielle dans un bécher, puis ajouter 2,5 ml de chloroforme et 3,75 ml d'acide acétique, puis 0,25 ml de solution saturée de KI. Boucher et agiter. Laisser reposer à l'abri de la lumière pendant 5 minutes. Après ajouter 18,75 ml d'eau distillée pour diluer. Préparer une solution de thiosulfate de sodium de 0,01M et commencer la titration avec la solution de thiosulfate jusqu'à la décoloration complète de la solution, utilisant de l'amidon comme indicateur et noter le volume de solution de thiosulfate utilisé.

Formule de l'Indice de Peroxyde (IP) :

$$\text{IP} = (\text{Volume de thiosulfate} \times \text{Normalité}) \times 1000 / \text{Masse de l'échantillon en kg.}$$

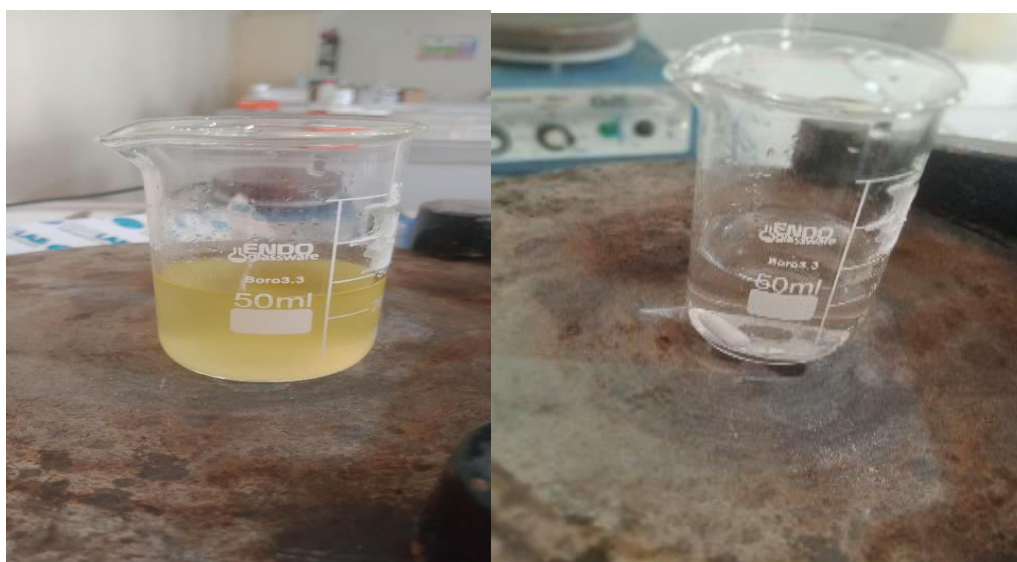


Figure III.10 : Dosage de la solution huileuse.

III.5. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielles de *Salvia rosmarinus*:

III.5.1. Mode opératoire :

A. Etape 1 : Préparation de bactéries à étudier.

Pour préparer une culture bactérienne à utiliser dans les analyses d'activité antibactérienne, on suit les étapes de la préparation d'une souche bactérienne pure suivants :

Choix de la souche bactérienne :

Sélectionner la souche bactérienne appropriée en fonction de l'objectif de notre étude ou de notre analyse, on avait choisi deux souches la première est *Staphylococcus aureus* et la deuxième est *Escherichia coli*.

Réactivation de la souche :

À partir du stock de la souche, prélever une petite quantité de chaque souche bactériennes en utilisant une boucle d'incubation stérile.

Inoculer la souche dans un milieu de culture approprié gélose nutritive et incuber-le à la température appropriée une nuit (généralement entre 35 °C et 37 °C).

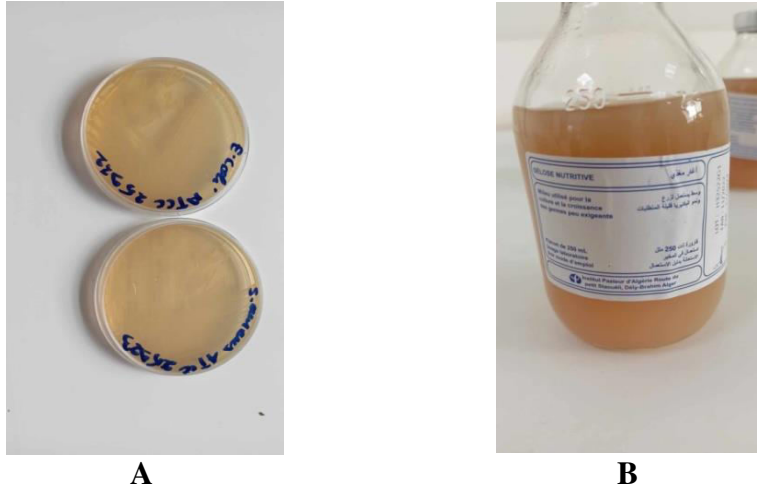


Figure III.11 : A) Milieu de culture gélose nutritive. B) Souches préparer pendant 24h.
Etape 2 : Evaluation de l' activité antibactérienne:

On réalise un test d'activité antibacterienne, en utilisant une huile essentielle de romarin diluée dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) avec quatre échantillons différents (25 %, 50 %, 75 % et 100 % de huile essentielle).

Matériel :

- Huile essentielle de romarin
- DMSO (diméthylsulfoxyde)
- Milieu de culture approprié (GELOSE MUELLER HINTON)
- Inoculum bactérie (Staphylococcus et Escherichia coli préparer dans l'étape 1)
- Plaques de culture stériles
- Ecouvillon stériliser.
- Disques d'antibiotiques stériles
- Incubateur à température appropriée

1. Préparation de l'inoculum :

Prélever une colonie isolée de la souche bactérienne à tester en utilisant un écouvillon stérile. Préparer l'inoculum en diluant la culture bactérienne prélevé des souches d'étape 1 dans un sérum salé jusqu'à atteindre une densité cellulaire souhaitée.



Figure III.12 : Préparation culture bactérienne.

2. Préparation des dilutions de l'huile essentielle de *Salvia rosmarinus* :

Diluer l'huile essentielle de romarin dans du DMSO pour obtenir la concentration souhaitée. On prépare 4 concentrations de huile essentielle 25 % , 50 % , 75 % et 100 %.



Figure III.13 : Préparation des échantillons des huiles de différentes concentrations.

3. Préparation des plaques de culture :

- Verser l'agar Mueller-Hinton ou un autre milieu de culture approprié dans des plaques de Petri stériles.
- Laisser l'agar se solidifier à température ambiante ou dans un incubateur.

4. Dispersion de l'inoculum :

- Déposer l'inoculum sur la surface de l'agar Mueller-Hinton dans la plaque de culture.
- Utiliser un écouvillon stérile pour étaler l'inoculum de manière uniforme sur toute la surface de l'agar, en effectuant des mouvements en zigzag.

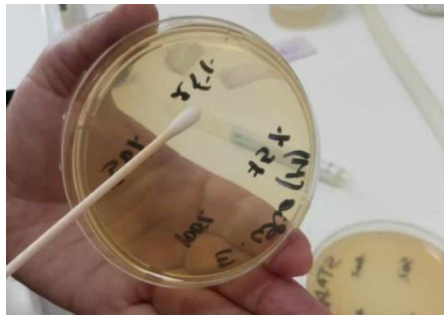


Figure III.14 : Évolution de la population bactérienne avant l'application de disques d'huile essentielle.

5. Application des échantillons d'huile essentielle diluée de *Salvia rosmarinus* :

- Placer un disque d'antibiotique stérile dans chaque concentration d'huile essentielle diluée dans la DMSO au déjà préparé sur la surface de l'agarensemencé, à une certaine distance les uns des autres.

6. Incubation :

- Inoculez la souche dans un milieu de culture approprié gélose nutritive et incubez-le à la température appropriée pendant une nuit (généralement entre 35 °C et 37 °C).

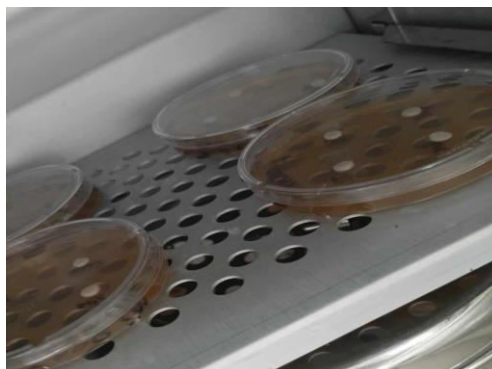


Figure III.15 : Disposition des boîtes pétris dans une cuve d'incubation avant l'incubation.

- Après l'incubation, observer les zones d'inhibition de croissance autour des disques d'huile essentielle de romarin diluée.

- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition en millimètres à l'aide d'une règle ou d'un dispositif de mesure.

- Comparer les résultats avec un témoin négatif (DMSO seul) ou, avec des antibiotiques de référence appropriés afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Salvia rosmarinus*.

III.6. Evaluation de l'activité antioxydante :

La méthode utilisée est la réduction du radical libre DPPH.

III.6.1. Mode opératoire :

A. Matériel :

- Spectroscopie UV-visible
- Agitateur magnétique
- Les tubes à essais
- Les micropipettes

B. Produit chimique :

- Ethanol
- DPPH

1. Préparation de la solution de DPPH :

On pèse 3 mg de DPPH et on dissout dans 100 ml d'éthanol, sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante, puis on mesure l'absorbance initiale de cette solution Abs à 517 nm.

2. Préparation de la solution mère :

On prend 50 µl de notre HE est mélangée avec 990 µl d'éthanol.

3. Préparation des solutions filles :

- Nous allons préparer des solutions diluées à partir de la solution mère à différentes concentrations : 10, 30, 40, 70 et 150,200 µl, ces dernières seront complétées par l'éthanol jusqu'à 1000 µl, puis ajoutée à chaque solution 1000 µl de la solution de DPPH.

- On mesure l'absorbance à 517 nm de chaque solution.

Le pourcentage d'activité antioxydante (I%) est calculé selon la formule suivante :

$$I (\%) = [(Abs\ blanc - Abs\ éch) / Abs\ blanc] \times 100$$

Abs blanc : est l'absorbance du DPPH au temps zéro avant l'addition de l'échantillon.

Abs éch: est l'absorbance de l'échantillon testé après 30 min d'incubation.

Les concentrations en huile essentielle en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracées afin d'obtenir IC50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour réduire la concentration du DPPH• initiale de 50%.

Partie 2 :Résultats et discussions :

III.7. Rendement des indices physico chimiques d'HE :

Calculer de rendement:

Le rendement "R" de l'extraction de notre huile essentielle, par le dispositif clewenger, a été calculée par l'équation suivante:

$$Rendement = (MHE / MVS) \times 100$$

Où :

Rendement est exprimé en pourcentage.

VHE : Volume d'huile essentielle obtenue.

MVS : Masse de la matière végétale sèche utilisée dans le processus d'extraction.

le rendement le plus élevé a été observé avec l'échantillon récupéré de la plante Tipaza (1.96%) par appareil clivenger et (0.02%) par hydrodistillation On remarque que le rendements par appareil de clewenger est très bon par contre le rendement par hydrodistillation simple et très faible. Le rendement est élevé aux période de printemps (mars).

Résultats de caractère physique ou chimique:

Tableau III.1: Résultats de caractère physico-chimique de l'huile de *Salvia rosmarinus*

Indice	Acide	Saponification	Ester	Peroxyde
Valeur (mgKOH/g)	2.8	1.9	252.41	10

-L'indice d'acide d'un corps gras est une mesure chimique qui permet de déterminer la présence d'acides gras libres ou liés. Il constitue un critère important pour évaluer la pureté, la fraîcheur et la qualité de l'huile. En outre, il fournit des informations sur l'éventuelle altération, dégradation et oxydation de l'huile au fil du temps. En somme, l'indice d'acide est un indicateur précieux pour évaluer la qualité et la durée de conservation d'une huile. L'indice d'acide d'une huile essentielle de 2,8 indique la concentration d'acides gras libres présents dans l'huile. Plus l'indice d'acide est élevé, plus il y a d'acides gras libres et plus l'huile est susceptible d'être altérée, dégradée ou oxydée.

-Dans le cas de l'indice d'acide de 2,8, cela suggère que l'huile essentielle présente une faible concentration d'acides gras libres. Cela peut indiquer une bonne qualité, une pureté et une fraîcheur de l'huile. Une faible teneur en acides gras libres est généralement préférable, car cela signifie que l'huile a subi peu de détérioration chimique et d'oxydation.. (Lion, 1955)

-L'indice de saponification d'un corps gras est une indication de la longueur des acides gras qui le composent. Plus l'indice de saponification est élevé, plus la chaîne carbonée des acides gras est courte.(Lion,1955). La valeur obtenue d'indice de saponification est 1,9 suggère une faible longueur de chaîne carbonée des acides gras constituant la substance grasse. Cela peut indiquer la présence d'acides gras à chaîne courte, qui ont moins de carbones dans leur structure. Les acides gras à chaîne courte ont généralement moins de 10 à 12 carbones.

- L'indice d'ester mesure la concentration d'esters d'acides gras, qui sont des composés formés par la réaction entre les acides gras et les alcools, tandis que l'indice de saponification évalue la quantité totale d'acides gras présents dans l'huile, qu'ils soient sous forme d'esters ou d'acides gras libres, une valeur plus élevée de l'indice d'ester par rapport à l'indice de saponification indique que la majorité des acides gras de l'huile de romarin se trouvent sous forme d'esters. Cela suggère une faible concentration d'acides gras libres, qui sont des acides gras non liés à d'autres composés et cette caractéristique peut être considérée comme positive, car une faible quantité d'acides gras libres dans l'huile de romarin peut contribuer à sa stabilité et à sa qualité, en réduisant les risques d'oxydation et de détérioration pendant le stockage.

-Les huiles peuvent subir une réaction d'oxydation en présence d'oxygène et de certains facteurs tels que les rayons UV, l'eau, la chaleur et des traces de métaux (Judde, 2004). Cette réaction d'oxydation, également appelée auto-oxydation ou rancissement aldehydique,

commence par la formation de peroxydes ou d'hydroperoxydes. Cela se produit lorsque des molécules d'oxygène se fixent sur le carbone en position α par rapport à une double liaison d'acides gras insaturés présents dans les glycérides (Choe et Min, 2006). En d'autres termes, l'oxydation des huiles conduit à la formation de peroxydes ou d'hydro peroxydes par l'ajout d'oxygène sur les acides gras insaturés. Cette réaction d'oxydation peut entraîner des changements indésirables dans les huiles, tels que la détérioration de la qualité, la perte de saveur et d'arôme, ainsi que la formation de composés indésirables, tels que les aldéhydes.

Ces facteurs d'oxydation, tels que les UV, l'eau, la chaleur et les traces de métaux, accélèrent le processus d'oxydation des huiles.

-Donc, une valeur d'indice de peroxyde plus faible indique donc que l'huile essentielle de romarin a été moins exposée à des conditions favorisant l'oxydation, telles que l'oxygène, la chaleur, la lumière ou d'autres facteurs d'oxydation. Cela suggère une meilleure stabilité et une plus longue durée de conservation de l'huile essentielle.

les caractères physique:

Les propriétés organoleptiques de notre huile essentielle de la zone de Tipaza les informations sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau III.2 : Propriétés organoleptiques de nos huiles essentielles de Tipaza.

Aspect	Liquide lipides
Couleur	Jaune pâle
Odeur	Forte
Gout	Amère

Les résultats caractéristique physique de pH :




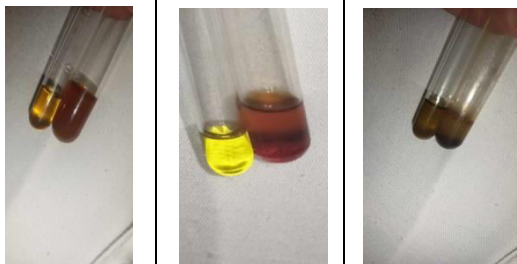
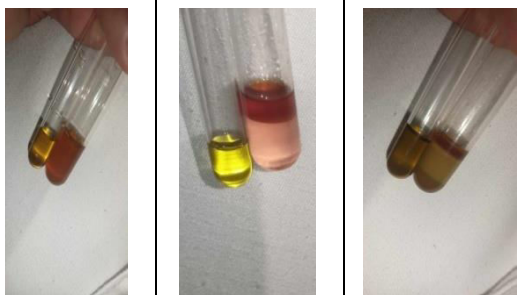
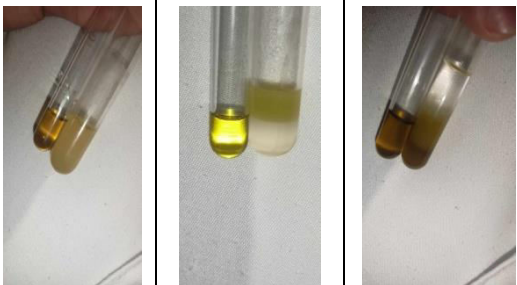
Figure III.16 : mesure pH par un pH metre.

Le pH d'une huile essentielle de romarin égal à 4,37 indique qu'elle est légèrement acide.

III.8. Screening phytochimique:

Les résultats de l'analyse phytochimique des extraits sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau III.3 : Analyse phytochimique.

Les composés	Solvant d'extraction Présence / Absence			Coloration et observation		
	Methanol + Eau (70/30)	Ether de petrole	Dichloro methane			
Flavonoïdes	+++	/	/			
Quinones	+	+	-			
Anthraquinones	+	++	+			
Tanins	+++	++	+			

Les résultats obtenus à partir de l'étude phytochimiques des extraits de feuilles de romarin montrent que les flavonoïdes, tanins se trouvent avec des grandes quantités, les quinones anthraquinones se trouvent avec des petites quantités.

III.9. Activité antibactérienne de l'huile essentielle :

Tableau III.4 :Émergence des cercles d'efficacité : Une exploration des diamètres d'huile autour des disques de technique d'antibiogramme.



Boîte	Diamètre (mm)			
	100%	75%	50%	25%
 E.coli	17	15	14	10
 Staphylococcus aureus	17	10	7	6



Figure III.17 : Test de l'activité antibactérienne par le blanc en utilisant le solvant DMSO seul signe A. (site web)

- L'utilisation de DMSO (diméthylsulfoxyde) dans les tests d'antibiogramme peut avoir un effet sur la sensibilité des bactéries aux agents antibactériens testés. Le DMSO est parfois utilisé comme solvant pour dissoudre certains composés, notamment les agents antibactériens, afin de faciliter leur application sur les disques ou les plaques de culture. Cependant, il est important de noter que le DMSO lui-même n'a pas d'activité antibactérienne significative. Son rôle principal est de permettre une meilleure diffusion et une meilleure distribution de l'agent antibactérien sur la surface de la culture bactérienne. L'ajout de DMSO dans un test d'antibiogramme ne devrait donc pas entraîner de résultats antibactériens positifs par lui-même. La substance antibactérienne testée est celle qui est censée fournir une activité inhibitrice contre les bactéries.

- En observant les résultats, nous pouvons voir une diminution du diamètre d'inhibition de croissance bactérienne à mesure que la concentration d'huile essentielle de romarin diminue. Cela suggère que la concentration d'huile essentielle utilisée a un effet direct sur l'efficacité de l'antibiogramme. Une concentration plus élevée d'huile essentielle de romarin est plus efficace pour inhiber la croissance des bactéries *E. coli*.

Les résultats observés montrent Les résultats montre que l'huile essentielle de romarin a une activité antibactérienne significative contre *E. coli* et *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres d'inhibition en fonction de la concentration utilisée respectifs de (10-17 mm) et (6-17 mm).

III.10. Activité antioxydante de l'huile essentielle :

III.10.1. Calcul de pourcentage d'inhibition I % d'huile essentielle :

Dans notre travail nous avons étudié l'activité antioxydante de la plante de *Salvia rosmarinus* de la région de Tipaza, les valeurs I% calculé sont remplie dans le tableau ci-dessous:

Tableau III.5 : Valeurs de taux d'inhibition pour chaque solution.

V(ul)	C(mg/ml)	I %
10	0,43	59,5
30	1,29	72,7
40	1,72	84,06
70	3,01	94,94
150	6,45	95,82
200	8,6	96,37

Après l'évaluation de l'activité antioxydante les valeurs de taux d'inhibition obtenues ont permis de tracer la courbe représentée ci-dessous :

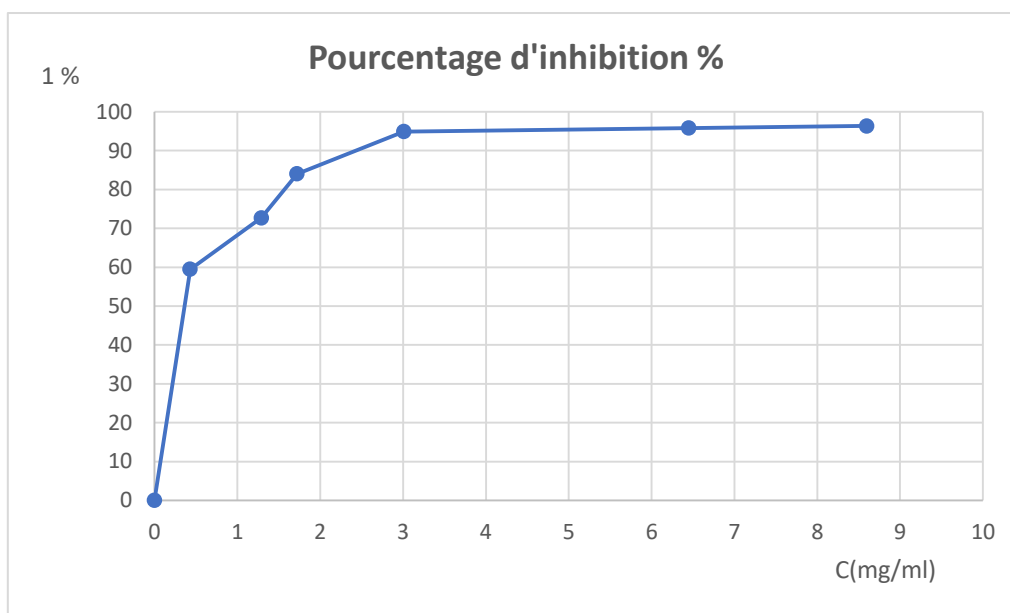


Figure III.18 : Pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations.

Le graphique représente le pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle en fonction de la concentration de *Salvia rosmarinus*. Ce qui permet de déterminer le pourcentage d'inhibition obtenu en fonction des concentrations utilisées ainsi que la valeur d'IC50.

Les pourcentages d'inhibition de notre plante augmentent de manière proportionnelle avec la concentration jusqu'à une valeur maximale égale à 96,37% .

III.10.2. Détermination d'IC50:

Nous pouvons constater que l'HE de *Salvia rosmarinus* de Tipaza à une activité antioxydant très élevé car elle à l'IC50 faible (0.33 mg.ml^{-1}).

Conclusion générale et des perspectives

La diversité florale de l'Algérie est particulièrement riche en plantes aromatiques et médicinales, parmi lesquelles on trouve de nombreuses espèces endémiques. Ces plantes offrent un potentiel considérable en tant que sources de produits à forte valeur ajoutée. Leur variété permet de constituer un important réservoir de produits, notamment des huiles essentielles, qui possèdent diverses propriétés et peuvent ainsi trouver de multiples applications commerciales, que ce soit dans l'industrie de la parfumerie, de l'alimentation, ou encore dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux.

Pour explorer les composés chimiques présents dans le romarin ainsi que leurs propriétés biologiques. Les plantes fraîches de romarin ont été soumises à un screening phytochimique, les résultats obtenus ont révélé une bonne abondance de flavonoïdes, de tanins et d'antraquinones dans l'échantillon étudié. Ces composés photochimiques sont connus pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé, notamment leurs effets antioxydants, antibactériens et anticancéreux potentiels. Leur présence en quantités significatives suggère que cet échantillon pourrait être prometteur en termes de potentiel thérapeutique, il est intéressant de noter l'absence de quinones dans l'échantillon. Leur absence dans cet échantillon indique une caractéristique favorable, car cela réduit le risque d'effets indésirables associés à ces composés.

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée à l'aide de deux méthodes, à savoir l'extraction par cleverger et l'hydrodistillation, donnant des rendements respectifs de 1,96% et 0,02%.

Pour caractériser l'huile essentielle de romarin, une série d'analyses chimiques a été effectuée. Les résultats obtenus ont révélé un indice d'acide égale à 2,8, l'indice d'ester de 252,41, l'indice de saponification égale à 1,9, l'indice de peroxyde égale à 10 et un pH de 4,37. Ces résultats fournissent des informations précieuses sur la composition chimique de l'huile essentielle et sa qualité.

En outre, l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de romarin a été réalisée en utilisant deux souches bactériennes, à savoir *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Différentes concentrations d'huile essentielle ont été testées, et les diamètres d'inhibition des disques ont été mesurés. Les résultats montrent que l'huile essentielle de romarin a une activité antibactérienne significative contre *E. coli* et *Staph*, avec des diamètres d'inhibition en fonction de la concentration utilisée respectifs de (10-17 mm) et (6-17 mm).

Enfin, une évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée en utilisant la méthode du DPPH a démontré que l'huile essentielle de *Salvia rosmarinus* de Tipaza présente un potentiel prometteur en tant qu'antioxydant. En effet, avec un IC50 égale a 0.33 mg/ml, cette huile essentielle a démontré une forte capacité à neutraliser les radicaux libres. Ces découvertes ouvrent des perspectives intéressantes pour l'utilisation de cette huile essentielle dans divers domaines.

En perspectives, il serait intéressant de poursuivre ce travail afin de :

- Optimiser les méthodes d'extraction pour obtenir de meilleurs rendements et une meilleure qualité de l'huile essentielle de romarin.
- Approfondir l'évaluation des activités biologiques du romarin, telles que l'activité antifongique, anti-inflammatoire et anticancéreuse.
- Comprendre les mécanismes d'action des composés actifs du romarin pour exploiter leur potentiel thérapeutique.

- Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18(6), 1334-1335.
- Aikaterini A. Lada-Minopoulou ; Ioannis E. Vardavakis et Ioannis P. Trouillas (2019) « *Rosmarinus officinalis* » : « A Brief Review of Its Taxonomy, Botany, and Ethnopharmacology ».
- Alberts, B et Bray, D. (2017). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. Publié par Garland science, USA, 1400 P.
- Bouzabata (2018) « *Rosmarinus officinalis* L ». essential oil : Antioxidant and antimicrobial properties ».
- Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C., (1995). Use a free radical method to evaluate antioxydant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Bhaskar, N., & Gupta, A. K. (2017). : « *Terpènes : Chemistry, Biological Role, and Therapeutic Applications* ». Springer.
- Chitra Rawat 2021 « Pharmacological activities of esters : A review ».
- Clayden, J., Greeves, N., et Warren, S. (2012) :« *Organic Chemistry* ». Oxford university press, Royaume-Uni. 1283P.
- Couplan, F. (2009): « *Petit Larousse des plantes médicinales* ». Publié par Larousse, Paris, France, 400 P.
- Dan Bensky (2004) : « *Chinese Herbal Medicine* ». Eastland press, Seattle, Washington, USA, 1000 P.
- Duke, J. A. (2002) : « *Handbook of medicinal herbs* ». CRC press, Boca Raton, USA, 800 P.
- Caroline Laouisset (2014) « *The Greeks and Plants* ».
- John Smith et le Professeur Elizabeth Williamson, (2012) : « *Mediterranean Plants and Nutrition* ».
- Edris, A.E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.* 21, 308-323.
- Esau, K. (1965): « *Plant Anatomy* ». Publié par Jhon Wiley and Sons, New Jersey, USA, 700 P.
- Goffman, F. D. (2000). *The McGraw-Hill Encyclopedia of World Bioscience* (Vol. 6). McGraw-Hill.
- Goodrich, J., & Huxley, T. H. (1890). The anatomical structure of the secretory apparatus of the Rosaceae. *Transactions of the Linnean Society of London*, 4(5), 263-298.
- Grosso (2013)« *Chemical Composition and Antioxidant Properties of Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils Influenced by Harvest Time and Extraction Method ».

- H. Aroucha (2017) « Pharmacological activities of phenolic compounds from natural sources ».
- James D. Mauseth (2020): « Botany : An Introduction to Plant Biology ».
- Karma Yeshe, Phurpa Wangchuk (2022) : « Herbal Biomolecules in Healthcare Applications ».
- Kathi Keville et Mindy Green (2009) : « Aromatherapy : A Complete Guide to the Healing Art ».
- LorryLeslie (2020) : « The Ancient Egyptian Herbal ».
- Mauseth, M. G. (2018). : « Botany : An Introduction to Plant Biology ».
- Michel Faucon (2003) : « Aromathérapie : Science et Aromathérapie ».
- Michael G. Mauseth (2020) : « Botany : An Introduction to Plant Biology ».
- Neil MacGregor (2010) : « A History of the World in 100 Objects ».
- Parthiban, P., Kanchi, S., et Rupasinghe, H. P. V. (2017) : « Supercritical CO₂ Extraction of Bioactive Compounds : Fundamentals, Applications, Economic Perspectives ».
- Prakash Parthiban, Suvardhan Kanchi et H.P. Vasantha Rupasinghe (2017) « Supercritical CO₂ Extraction of Bioactive Compounds : Fundamentals, Applications, Economic Perspectives ».
- Priscilla C. Veggi, Julian Martinez et M. Angela A. Meireles, (2013) : « Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds Theory and Practice ».
- Ray F. Evert, Susan E. Eichhorn (2012) : « Raven Biology of Plants ». Publié par W.H Freeman and company, New York, USA, 800 P.
- Smith, C.K.; Moore, C.A.; Alahi, E.N.; Smart, Â.T.; Hotchkiss, S.A. 2000. Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168,189-99.
- Worwood, V. A. (1991) : « The Complete Book of Essential Oils and Aromatherapy ». Publié par New World Libery, Californie, USA, 400P.
- Zermane, A., Meniai, A. H., Larkeche, O., et Barth, D. (2012) : « Extraction and Modeling of Algerian Rosemary Essential Oil using Supercritical CO₂ : Effect of Pressure and Temperature ».