

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB -BLIDA-

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de Master

En : Physico-Chimie des milieux dispersés et de formulation

Intitulé

Extraction d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Effet antioxydant, antibactérien, anti-inflammatoire et antalgique

Préparé par

Maatar Razika

Soutenu publiquement le 08 /12 /2015 devant le jury composé de :

Mr. M. Zouikri

MCA

USDB Président

Mr. A. Boulahouche

MAA

USDB Examineur

Mr. A. Ait Yahia

MAA

USDB Directeur de mémoire

Promotion 2014-2015

Remerciement

Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant » de m'avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

Au moment où s'achève ce travail, permettez-moi de remercier du fond du cœur, tous ceux et toutes celles qui, pendant cette période de thèse, m'ont dirigée, soutenue, aidée et encouragée.

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier mon encadreur Monsieur AIT YAHIA maitre assistant à l'université SAAD DAHLAB de BLIDA qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail.

Je remercie vivement Madame HAMZA maitre assistante. A à l'université de BLIDA pour ses conseils très précieux et son aide pendant la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont aussi aux membres de jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail.

Je remercie tous les membres de laboratoire de pharmacotoxicologie du centre de recherche et de développement SAIDAL ALHRACH surtout Madame Azine. K DIRECTRICE de laboratoire et toute l'équipe du laboratoire de chimie département de Chimie Faculté des Sciences

Pour leur aide précieuse.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation et au bon déroulement de ce travail.

Enfin je veux dire merci à tous les enseignants du département de chimie l'université SAAD DAHLAB pour l'aide pendant ma formation d'étude et en particulier Monsieur le professeur y. Bal responsable de notre master.

Dedicaces

Je dédie ce travail a

*Mes très chers parent qui ont toujours été la,et qui m'ont
donné un
magnifique modèle de labeur et de la persévérance. J'espère
qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance
et tout mon amour*

A mes soeures

A mon frère

*A mon promoteur,et tout les personnes du CRD
Et toute l'équipe du laboratoire du département de Chimie,
faculté des Sciences*

A tout les Enseignants

A toutes mes amies et a tous ceux qui me connaissent

A ma chère amie Fatima Elzahra et sa famille

Et enfin a tous ceux que j'aime

RAZIKA

Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
ملخص	
Résumé	
Abstract	
Liste d'abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	

Introduction générale	01
------------------------------------	----

Partie bibliographique

Chapitre I : Les Huiles Essentielles

I. Introduction	02
I.1. Définition des huiles essentielles	02
I. 2.Localisation d'une huile essentielle dans la matière végétale	03
I.3.Propriété physico-chimique des HE	03
I.4. Composition chimiques	03
I.4.1.Terpénoïdes	04
I.4.1.1.Monoterpènes.....	04
I.4.1.2. Sesquiterpènes.....	04
I.4.2.Composés aromatiques.....	05
I.4.3. Composés d'origine diverses.....	05
I.5.Notion de chémotype.....	06
I.6.Activité biologique et utilisation.....	06
I.7.Effet thérapeutique des huiles essentielles.....	07
I.8. Les techniques d'extraction.....	08
I.8.1.La distillation.....	08
I.8.1.1.L'hydrodistillation.....	08
I.8.1.2.Distillation par entraînement à la vapeur d'eau.....	09
I.8.1.3.l'hydrodiffusion.....	09
I.8.2.Extraction par micro-ondes.....	10
I.8.3.Extractions par les solvants et par les graisses.....	10
I.8.4.Extraction au CO2 supercritique.....	11

Sommaire

Chapitre II : Etude phytochimique sur la plante

II.1.Origine du nom	13
II.2.Description botanique	13
II.3.Classification	13
II.3.1.Classification classique	13
II.4.Distribution géographique	14
II.5.Composition chimique du romarin	14
II.6.Principaux constituants	14
II.7.Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin	15
II.8.Utilisation	16

Chapitre III : propriétés antioxydants

III.1.Introduction	18
III.2.Propriétés réductrices	18
III.3.Stress oxydatif.....	18
III.3.1.Qu'est ce qu'un radical libre?	18
III.3.2.Oxygène, espèces réactives de l'oxygène (ERO)	19
III.3.3.Conséquence du stress oxydatif	19
III.4.Antioxydants et systèmes de défense	19
III.4.1.Antioxydants enzymatiques	19
III.4.2.Antioxydants non enzymatiques	20
III.4.2.1.Acide ascorbique (vitamine C)	20
III.4.2.2.Tocophérols (dont la vitamine E)	20
III.4.2.3.Caroténoïdes.....	21
III.4.3. Antioxydants de synthèse	21
III.4.4.Polyphénols naturels comme antioxydants	22
III.4.4.a.Chélation des ions métalliques	23
III.4.4.b.Piégeage des radicaux libres... ..	23

Sommaire

Partie expérimentale

Chapitre IV : Matériels et méthodes

I.A. Objectif du travail	24
I.B. Lieux d'expérimentation	24
I.1. Matériel	24
I.1.1. Matériel végétal	24
I.1.2. Réactifs chimiques et appareillage	25
I.2.Extraction des huiles essentielles	25
I.2.1. Méthodologie	25
I.2.2. processus d'extraction	26
I.3.Évaluation de l'activité antioxydante.....	27
I.3.1.La méthode de piégeage DPPH.....	27
I.3.1.1.Principe.....	27
I.3.1.2.Mode opératoire.....	28
I.3.2. méthode de la β -carotène.....	29
I.3.2.1. Principe.....	29
I.3.2.2. Mode opératoire.....	29
I.3.3.Méthode de FRAP.....	29
I.3.3.1.Principe.....	29
I.3.3.2.Mode opératoire.....	30
I.4. Étude du pouvoir antimicrobien.....	31
I.4.1.Protocole expérimental.....	31
I.4.1.1.L'aromatogramme.....	31
I.4.1.2.Préparation du milieu de gélose.....	32
I.4.1.3.Préparation de l'inoculum.....	32
I.4.1.4.Préparation des disques.....	32
I.4.1.5.Ensemencement.....	32
I.4.1.6.Dépôt des disques.....	32
I.4.1.7.Incubation.....	33
I.4.1.8.Lecture.....	33
I.5.Test d'activité anti-inflammatoire.....	34
I.5.1.Principe.....	34
I.5.2.Mode opératoire.....	34

Sommaire

I.5.3. Expression des résultats.....	35
I.6. Test d'activité antalgique.....	36
I.6.1. Principe.....	36
I.6.2. Mode opératoire.....	36
I.6.3. Expression des résultats.....	36

Chapitre II : Résultats et discussions

II.1. Extraction de l'huile essentielle	38
II.1.1. Teneur et propriétés organoleptiques.....	38
II.1.2. Détermination du rendement en huile essentielle de romarin	38
II.2. Activités anti oxydantes.....	39
II.2.1. Evaluation de la méthode DPPH	39
II.2.2. Evaluation de la méthode du blanchissement de la β -carotène	40
II.2.2.1. Les activités relatives de β -carotène	41
II.2.3. La méthode FRAP	41
II.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne	42
II.4. Test d'activité antalgique in vivo	43
II.5. Test d'activité anti-inflammatoire in vivo	45
Conclusion générale	48

Références bibliographiques

Annexes

الملخص

يعتبر هذا العمل مساهمة منا في دراسة الخواص الجرثومية ، ضد الأكسدة، ضد الألم، و ضد الإلتهاب لزيت الطيار لنبات *Rosmarinus Officinalis* المتواجد بمنطقة البلدية. المرود المتحصل عليه بواسطة جهاز Clevenger يقارب %0,63.

التركيز التحريمي IC_{50} لزيتنا يساوي 2,62mg/ml و هو جد قريب من التركيز التحريمي لـ BHA (1,44mg/ml). كما أن نسبة حمايته لمركب الـ β -carotène تقدر بـ %68.

لاحظنا أن زيتنا الطيار يبدي فعالية كبيرة ضد بكتيريا *Bacillus* (منطقة الكبح = 18mm) وكذلك ضد فطرية *Candida albicans* (منطقة الكبح = 30mm).

اختيار النشاط ضد الألم كشف أن 0,5ml من محلول ذو تركيز 500mg/ml من زيتنا الطيار يؤدي إلى نسبة حماية تقارب %16. ووفقا لطريقة ليفي نتحصل على نسبة انخفاض الإلتهاب تقارب %75.

الكلمات المفتاحية:

Rosmarinus Officinalis، DPPH، β -carotene، FRAP، خاصية ضد الألم، خاصية ضد الإلتهاب

Résumé

Ce travail représente une contribution à l'étude des propriétés microbienne, antioxydante, antalgique et anti-inflammatoire, de l'huile essentielle de la plante *Rosmarinus Officinalis*, de la région de Blida. Le rendement obtenu par hydrodistillation du type clevenger est de 0.63%.

Notre huile présente une concentration inhibitrice "IC50" de 2.62 mg/ml très proche de celui du BHA (1.44mg/ml), et un taux de protection de la β -carotène qui atteint 68.19%.

On n'a constaté que notre huile à une activité antimicrobienne importante contre *Bacillus*, (zone d'inhibition de 18 mm), et une forte activité antifongique contre *Candida albicans* (zone d'inhibition de 30 mm).

Le teste de l'activité antalgique révéla que 0.5ml de la solution à 500mg/ml de notre huile essentielle induit un pourcentage de protection égale à 16,69% et, selon la méthode de Levy, un taux de réduction d'œdèmes de 75,64% pour le test anti-inflammatoire,

Mots clés: *Rosmarinus Officinalis*, DPPH, β -carotène, FRAP, antalgique, anti-inflammatoire.

Abstract

This work represents a contribution to the study of the microbial, antioxidizing, analgesic and anti-inflammatory properties of the essential oil of the plant *Rosmarinus Officinalis* (region of Blida). The yield obtained by hydrodistillation (type Clevenger) is 0.63%.

Our oil presents an inhibitive concentration "IC50" of 2.62 mg/ml very close to that of the BHA (1.44mg/ml), and a rate of protection of β - carotene which reaches 68.19 %.

We noticed that our oil has an important antimicrobial activity against Bacillus, (zone of 18 mm inhibition), and a strong antifungal activity against albicans Candida (zone of 30 mm inhibition).

Tests of the analgesic activity revealed that 0.5ml of the solution in 500mg / ml of our oil leads a percentage of protection equal to 16, 69 % and, according to The method of Levy, a rate of reduction of 75,64 % oedemas for the anti-inflammatory test.

Keywords: *Rosmarinus Officinalis*, DPPH, β -carotene, FRAP, analgesic, anti-inflammatory

Liste des abréviations

AAR: Activité anti-oxydante relative.

Abs : Absorbance.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AGPI : Acide gras polyinsaturés.

AH : Antioxydant.

ATCC: American Type Culture Collection.

BHA: Butyl hydroxyl anisole.

BHT: Butyl hydroxyl toluène.

°C: degré celcius.

DPPH: 2, 2- diphényl picryl-1-hydrazyle.

EOR: Radicaux libres oxygénée.

FRAP: Capacités réductrices ferriques d'antioxydants (Ferric Reducing Antioxydant Power).

Fe³⁺ : Ion ferrique.

Fe²⁺ : Ion ferreux.

Fe(III)- TPTZ : Complexe tripyridyltriazine ferrique.

FeCl₃ : Chlorure ferrique.

h: Heure

HE: Huile Essentielle.

HER : Huile essentielle du romarin.

I% : Taux d'inhibition.

IC₅₀ : Concentration à 50% de DPPH perdu.

Kg: kilogramme

K₃Fe (CN)₆ : Ferricyanure de potassium.

MHE : Quantité d'huile essentielle extraite en g.

MS : Quantité de la matière végétale sèche en g.

m: masse

Liste des abréviations

M : masse molaire

min: minute

mg : milligramme

ml: millilitre

mm: millimètre

pH : Potentiel d'hydrogène.

PR: Pouvoir réducteur.

PI : potentiel d'ionisation

R : Rendement.

R.officinalis L. : Rosmarinus officinalis Linné.

T: Température

TCA : Acide trichloroacétique.

Trpm : Tour par minute.

UV : ultra-violet.

V : Volume.

µl: microlitre

%: pourcentage

α : alpha

β : beta.

Liste des abréviations

Définitions

Analgésique : les analgésiques sont des médicaments utilisés en médecine, ayant pour but d'éliminer la douleur.

Anti-inflammatoire : ce dit d'un produit ayant la propriété de diminuer l'inflammation.

Antioxydant : molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques.

Anti-radicalaire : substance qui intervient ou empêche certains phénomènes de vieillissement.

Carraghénine : mucopolysaccharide sulfaté extrait d'une algue marine.

Crampe : contraction involontaire, douloureuse et transitoire d'un muscle ou d'un groupe musculaire

CRD : Centre de recherche et de développement

Diclofenac : un médicament à effet anti-inflammatoire.

Gram + : Bactérie Gram-positive

Gram - : Bactérie Gram-négative

GPX : Gluthathion Peroxydase

Oedème : accumulation anormale de liquide provenant du sang dans les espaces intercellulaire d'un tissu.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Partie bibliographique		
1	structure de l'isoprène	4
2	Exemple de structures des composants monoterpéniques rencontrées dans les HE	4
3	Exemple de structures des composants sesquiterpéniques rencontrées dans les HE	5
4	Exemple de structures des composés aromatique rencontrées dans les HE	5
5	Exemple de quelque composées diverses rencontré dans les HE	6
6	hydro distillation de type Clevenger.	8
7	distillation par entrainement à la vapeur d'eau.	9
8	Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.	9
9	Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes	10
10	Schéma de principe d'extraction par CO2 supercritique.	12
11	Aspect morphologique de Rosmarinus officinalis L	13
12	Photo de Rosmarinus officinalis L.	14
13	Acide ascorbique (vitamine C)	20
14	Tocophérols (dont la vitamine E)	20
15	Caroténoïdes	21
16	structure chimique d'un polyphénol de synthèse (3,3', 5,5'-Tetra-t-butyl-biphenyl-4,4'-diol)	21
17	structure chimique d'un polyphénol de synthèse dendrimère syringaldehyde	22
18	Illustration d'un mécanisme d'action des polyphénoles : la donation d'hydrogène. le radicale formé devient moins dangereux	22
19	Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques	23
Partie expérimentale		
20	obtention de l'HE par hydrodistillation "montage Clevenger".	26
21	réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant ainsi que leur colorimétrie	27
22	Illustration de la méthode d'Aromatogramme sur boîte Pétri	33
23	Les différentes étapes de l'activité anti-inflammatoire	35
24	Les différentes étapes (A, B, C) de l'activité antalgique	37
25	Photo d'H.E de R. officinalis obtenue par hydrodistillation de type Clevenger.	38

26	Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de Rosmarinus officinalis à différentes Concentrations.	39
27	Évaluation de la dégradation de la couleur de la β -carotène en présences de BHT, BHA, de l'huile essentielle de Rosmarinus Officinalis et du blanc.	40
28	variation de l'absorbance et donc du pouvoir antioxydant de l'huile de R. Officinails en fonction de la concentration de cette dernière dans le mélange du test FRAP	42
29	Moyenne du nombre de crampes pour chaque lot pendant 10 minutes.	44
30	Pourcentage de protection de la douleur pour chaque lot	44
31	Histogramme représentant le pourcentage d'augmentation de l'œdème et de réduction de l'œdème pour les trois lots traités : Lot Témoin, lot de référence, lot essais	46

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Partie bibliographique		
01	Certaines huiles essentielles et leurs utilisations thérapeutiques	7
02	Variations de la composition chimique (composé majoritaire) de l'huile essentielle de Romarin	15
03	oxygène active et l'espèce relative	19
Partie expérimentale		
04	réactifs chimique et appareillage employés	25
05	concentrations des solutions filles et volume prélevé pour leurs préparation	28
06	concentrations des solutions filles pour la méthode FRAP.	30
07	Souches microbiennes testées et leurs références.	31
08	Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de Rosmarinus Officinalis.	38
09	variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration de l'HE de Rosmarinus officinalis	39
10	IC50 de l'huile essentielle et du BHT, BHA, vitamine C	40
11	résultats de l'activité relative de l'huile essentielle et du BHT par rapport au BHA	41
12	variation de l'absorbance en fonction de la concentration de l'huile essentielle dans le mélange du test FRAP	41
13	Diamètre (mm) des zones d'inhibitions de l'huile essentielle de romarin.	42
14	Résultat de l'activité antalgique réalisée sur les trois lots de souris.	43
15	Résultats de l'activité anti-inflammatoire.	45

Introduction générale

Au cours de ces dernières décennies plusieurs chercheurs ont porté une attention particulière aux plantes, leurs extraits et à leurs huiles essentielles, en particulier dans le cadre de la préservation des aliments, sans oublier leurs utilisations dans les domaines pharmacologiques et cosmétiques.

Ainsi, les huiles essentielles contiennent, selon leurs chémotypes, de multiples constituants qui jouent potentiellement un rôle protecteur contre diverses maladies. L'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis* est connue pour être riche en monoterpènes oxygénés (1,8-cinéole, camphor ...), c'est l'une des premières plantes reconnues comme plante médicinale en Algérie. Elle a été largement utilisée comme antispasmodique et comme ingrédient de saveur et d'arôme en agroalimentaire.

Notre étude consiste à évaluer l'activité antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire et antalgique de l'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis* obtenu par hydrodistillation du type clevenger. Nous aborderons, dans une première partie, les huiles essentielles, l'étude phytochimique sur le romarin et les propriétés antioxydantes des huiles essentielles selon les chapitres I, II et III respectivement.

Dans une deuxième partie, on développera notre partie expérimentale selon deux chapitres, le premier chapitre sera consacré aux matériels utilisés et aux méthodes ou protocole suivi. Dans le deuxième chapitre, l'ensemble de nos résultats sera présenté et discuté.

Et on terminera par une conclusion générale.

Partie bibliographique

Chapitre I

Les Huiles Essentielles

I. Introduction

L'utilisation des traces d'huiles essentielles destinées à rééquilibrer physiquement et psychiquement l'individu remontent à plus de 3000 ans. Toutefois, vers les débuts du 15ème siècle, l'utilisation des huiles essentielles a subi une chute remarquable suite à la découverte, de la pénicilline [1].

Dans les années 50, l'esthéticienne et biochimiste française, Marguerite Maury a introduit le concept des huiles essentielles en massage en créant les premiers services d'aromathérapie en Europe, induisant une nouvelle exigence relative aux choix des végétaux, aux modalités de cueillette et aux techniques d'extraction et de conservation [2]. Aussi, la médecine aromatique décrite par Penel et Franschomme [1], qui, ont étudié au laboratoire, plusieurs huiles essentielles issues de différents végétaux.

De nos jours, l'aromathérapie s'impose comme l'une des thérapies complémentaires les plus performante, non seulement en matière de santé mais également en matière de beauté et d'esthétique par les soins naturels qu'elle peut apporter à notre peau et à notre corps.

I.1. Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydro distillation [3], par pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. [4]. Elles sont très utilisées dans l'industrie des produits cosmétiques, pharmaceutiques et agro-alimentaire [5].

Plus de 2000 espèces de plants sont riches en huiles essentielles, elles sont réparties sur 60 familles dont les principale sont: Lauraceae, Labiatea, Umbelliferae, Rutaceae, Compositae, Myrtaceae et les Pinaceae. [6].

La norme AFNOR NF T 75-006 définit l'huile essentielle comme : un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entrainement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédées physiques.

Depuis sa 9ème édition, la pharmacopée n'utilise plus que le terme (huiles essentielles) pour désigner ces substances appelée aussi dans le langage courant (essence naturelles), ou encore extraits aromatiques de plantes. Le terme (huile) se rapporte au caractère visqueux et hydrophobe de ces substances, et les termes (essentiels) se comprenant comme étant la caractéristique principale de la plante.

Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues [7].

I.2. Localisation d'une huile essentielle dans la matière végétale

Les huiles essentielles se trouvent dans des glandes minuscules situées dans les différentes parties de la plante aromatique [8].

- Dans les feuilles comme le basilic.
- Dans les fleurs comme la rose.
- Dans les fruits comme le citron.
- Dans les graines comme la coriandre.
- Dans l'écorce comme la cannelle.
- Dans les racines pour certaines plantes.

Les huiles essentielles sont souvent localisées sur ou à proximité de la surfaces de la plante. Si l'on écrase la feuille (ou partie concernée) d'une plante aromatique, des petites poches vont se briser laissant s'échapper la substance aromatique. Aussi, la récolte se fait au meilleur moment en fonction des substances que l'on veut extraire et des conditions extérieures (climat, période de l'année ...), car la plante ne développe pas les mêmes composants selon la période de l'année.

I.3. Propriété physico-chimique des HE

- Les huiles essentielles sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides, voire résinoïdes, très odorantes.
- Elles sont habituellement liquides à température ambiante, très volatiles ce qui les différencie des huiles fixes. Leur point d'ébullition varie de 160° à 240°C.
- Elles sont incolores ou jaunes pâles, parfois elles prennent le bleu comme couleur ex : HE d'azulène. Leur densité est inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0.75 à 0.99.
- Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée.
- Elles sont liposolubles, dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels ; solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes et dans la plupart des solvants organiques usuels.
- Ce sont des produits stimulants, employés à l'intérieur, comme à l'extérieur du corps, quelquefois purs, généralement en dissolution dans l'alcool ou un solvant adapté. [9].
- Elles sont composées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15). [10].

I.4. Composition chimiques

Les huiles essentielles sont constituées de mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses. Ainsi l'analyse instrumentale moderne (GC, CG-SM et SM), a permis d'identifier plusieurs centaines de molécules différentes appartenant principalement à deux grands groupes chimiques ; les hydrocarbures terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes) et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane qui sont moins répandus que les précédents. [11].

Elles peuvent renfermer aussi divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils. [9].

I.4.1. Terpénoïdes

Les terpénoïdes sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une entité simple à cinq atomes. [12].

Dans le cas des HE on ne rencontre que les terpènes les plus volatiles : les monoterpènes et les sesquiterpènes. [9].

I.4.1.1. Monoterpènes

Constituants les plus simples de série, les monoterpènes sont issus du couplage de deux unités « isopréniques » (**figure 1**). Il peuvent être : acycliques (myrcène , ocimène) , monocycliques (α et γ -terpinène , p-cymène) ou bicycliques (pinène , camphène, ocimène). Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (citrus). Les variations structurales justifient l'existence de nombreuses molécules : alcools (geraniol , α - terpineol , barnéol , trans – franésol) , phénols (thymol) , aldéhydes (citronellal) , cétones (carvone , β - vetivone) , esters (acétate de cédryle) , (1,8 – cinéole).(**figure 2**) [10].

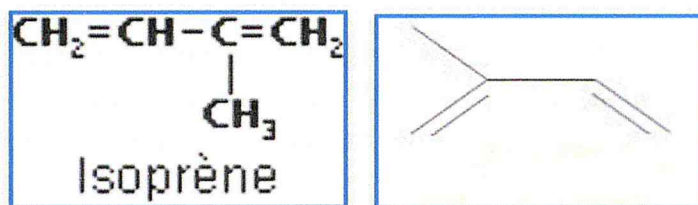
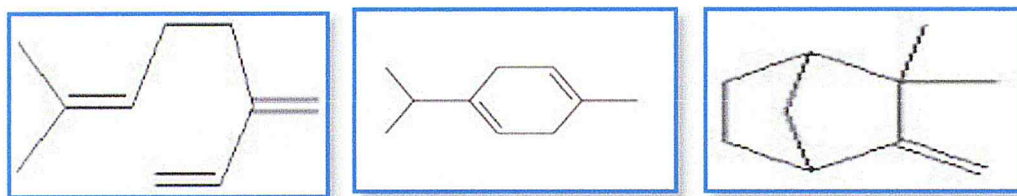


Figure 1: structure de l'isoprène.

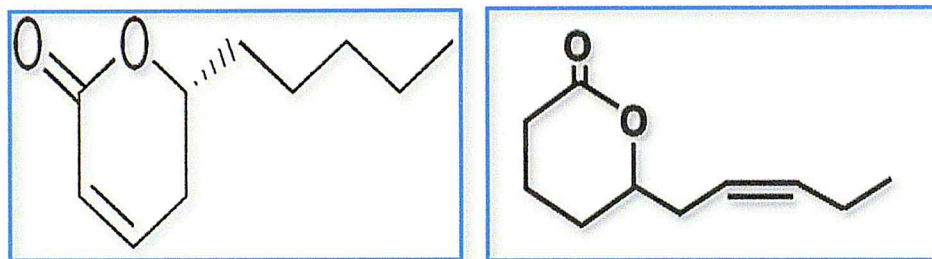


Acyclique : Myrcène Monocyclique : Y-terpinène Bicyclique : Camphène

Figure 2: Exemple de structures des composants monoterpéniques rencontrés dans les HE.

I.4.1.2. Sesquiterpènes

Ce sont des hydrocarbures de formule C₁₅, soit une fois et demie la molécule des terpènes (C₁₀H₁₆). Un grand nombre de sesquiterpènes sont des constituants habituels des huiles essentielles des végétaux supérieurs, ils peuvent intervenir dans les propriétés pharmacologiques attribuées à ces fractions volatiles. [10].



Massoialactone

-jasminlactone

Figure 5: Exemple de quelques composés divers rencontrés dans les HE.

I.5. Notion de chémotype

Un chémotype, ou encore race chimique, désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce. Certaines espèces de plantes, de champignons ou de micro-organismes, présentent des variations chimiques de leur métabolite secondaire en fonction des influences de leurs écosystèmes (altitude, humidité, ensoleillement, biotope, etc.), bien que leur morphologie ainsi que génétique ne soit pas substantiellement transformées. Ainsi une espèce donnée d'eucalyptus peut donner une essence à dominante, cinéol-1,8, spathulénol ou pinène (alpha) [12].

Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents, présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables.

I.6. Activité biologique et utilisation

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcool, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leur effets synergiques [13].

Plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales, en particulier leurs pouvoirs antifongique [14, 15, 16], antibactériens [17, 18], antioxydants [19] et insecticides [20, 21, 22].

Les composés possédant la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre d'action sont les phénols : le thymol, le carvacrol et l'eugénol.

Le carvacrol est le plus actif de tous ; reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et comme arôme alimentaire dans les boissons.

Le thymol est l'ingrédient actif des rince-bouches.

L'eugénol est utilisé dans les produits cosmétiques, alimentaires et buccodentaires.

Ces trois composés ont un effet antibactérien contre un large spectre de bactéries : *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*. [23,24].

Les alcools mono terpéniques viennent immédiatement après les phénols, en terme d'activité antibactériennes, les plus connus sont : le géranol, le linalool, le thujanol, le myrcénol, le terpinéol, le menthol et le pipéritol.

Les aldéhydes monoterpéniques sont également quelque peu bactéricides, les plus couramment utilisés sont le néral, le géranial, le citronellal et le cuminal [25].

Les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques sont très intéressées par les propriétés de ces composés d'autant plus qu'il s'agit d'aromatisation naturelles. Beaucoup de chercheurs à travers le monde étudient leur potentiel en tant qu'agents de conservation [26].

La plupart des composés cités, sont également de très bons agents antifongiques. Le thymol, le carvacrol, et l'eugénol sont encore ici les composés les plus actifs. Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons : Candida (C.albicans) ; Aspergillus (A. niger, A. flavus, A. fumigatus), pénicillium chrysogenum, et bien d'autres [21].

Des études fondamentales ont également montré que les alcools et lactones sesquiterpéniques avaient une activité antifongique.

KURITA et col [27,28] ont classé les composés purs selon leur activité antifongique vis-à-vis de sept champignons. Cette activité est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance, déterminée par simple observation macroscopique. L'activité antifongique décroît selon le type de fonction chimique.

(+) phénols > Alcools > Aldéhydes > Cétones > Ethers > Hydrocarbures (-).

I.7.Effet thérapeutique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont largement utilisées en thérapie, les effets thérapeutiques les plus répandus dans les huiles essentielles sont résumés dans le tableau 01.

Tableau 01 : Certaines huiles essentielles et leurs utilisations thérapeutiques [29].

Huile essentielle de la plante	Utilisation thérapeutique
Romarin	Soulage la fatigue, les douleurs musculaires, les problèmes respiratoires.
Basilic	Diminue l'anxiété, améliore la concentration de la digestion, soulage les maux de tête.
Camomille	Contre la dépression et les insomnies, soulage les problèmes de peau.
Citron	Améliore la circulation, soulage les problèmes respiratoires.
Coriandre	Soulage la nervosité et les douleurs rhumatismales, améliore la digestion.
Lavande	Soulage les insomnies, les indigestions, les maux de tête, les douleurs musculaires.

Menthe poivrée	Soulage la fatigue, les irritations cutanées.
Rose	Soulage les stress, soulage les maux de tête.

I.8. Les techniques d'extraction

I.8.1. La distillation :

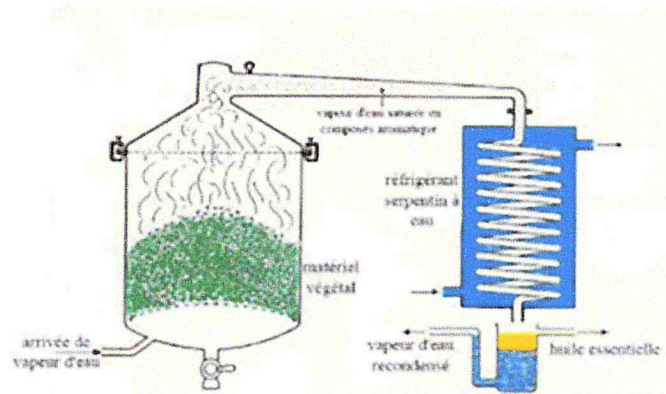
La technique d'extraction des huiles essentielles, utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est, de loin, la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures [30]. Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydro distillation, l'hydro diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

I.8.1.1. L'hydrodistillation : Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat. Cette technique est la plus couramment utilisée dans le laboratoire pour l'extraction des huiles essentielles, elle consiste à faire bouillir la matière végétale avec de l'eau dans un ballon, les matières volatiles sont condensées par la circulation de l'eau froide dans un réfrigérant par la suite on recueille cette eau. Généralement pour l'hydrodistillation on utilise l'appareil de type Clevenger. (**figure 6**) [31].



Figure 6: hydrodistillation de type Clevenger.

I.8.1.2. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau : Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau (**figure 7**). La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante [30].



Entraînement à la vapeur d'eau

Figure 7 : distillation par entraînement à la vapeur d'eau.

I.8.1.3. l'hydrodiffusion : Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: « essence de percolation » (**figure 8**). [30 ; 31].

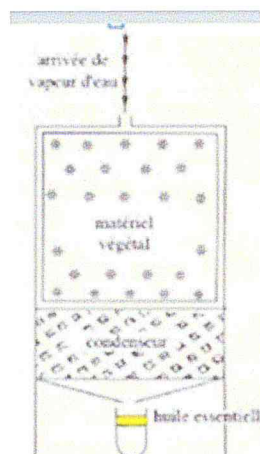


Figure 8 : distillation par hydrodiffusion.

I.8.2.Extraction par micro-ondes

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide (**figure 9**). Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. En guise d'exemple, l'extraction par microondes de deux kilos de *Menthapiperita* permet d'obtenir environ 1% d'huile essentielle en 15 minutes alors que deux heures d'hydro distillation sont nécessaires pour obtenir un rendement similaire à partir de la même masse de plante [32]. La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par microondes.

Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées [33; 34] Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées [32 ; 35].

L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée [36 ; 37 ; 34].

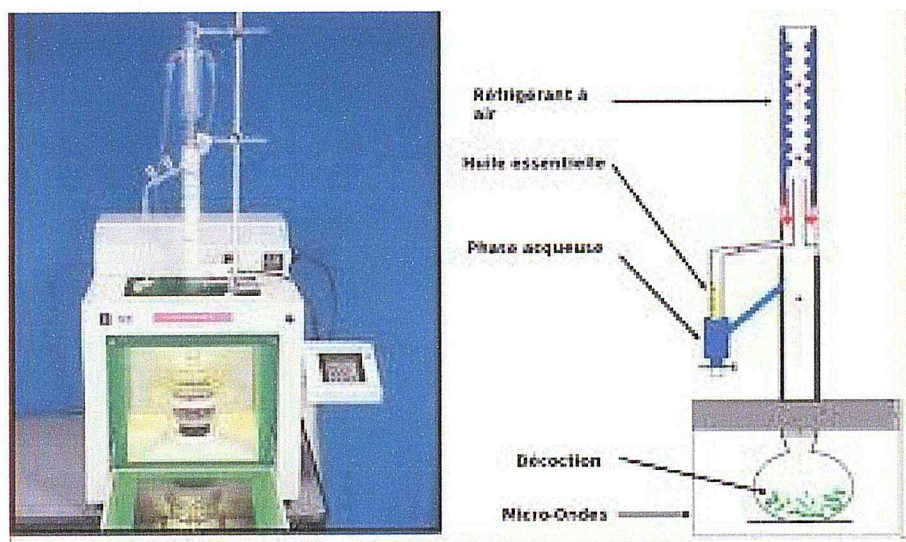


Figure 9 : Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes.

I.8.3.Extractions par les solvants et par les graisses

Certains procédés d'extraction ne permettent pas d'obtenir des huiles essentielles à proprement parler mais des concrètes. Il s'agit d'extraits des plantes obtenus au moyen de

solvants non aqueux. Ces derniers peuvent être des solvants usuels utilisés en chimie organique (hexane, éther de pétrole) mais aussi des graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par des corps gras) ou même encore des gaz. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres [31-38]. Dans le cas des extraits à l'aide de corps gras, un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. La solution alcoolique ainsi récoltée est refroidie jusqu'à -10 °C pour en séparer les cires végétales qui se solidifient. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé "absolu" et sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle [39].

L'extraction à l'aide des solvants organiques pose un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutique et agro-alimentaire [40].

I.8.4.Extraction au CO₂ supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO₂ supercritique. Au-delà du point critique ($P = 73,8$ bars et $T = 31,1\text{ °C}$), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. Cette technique présente énormément d'avantages. Tout d'abord, le CO₂ supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puisqu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation [41]. En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective aux composés odorants et ainsi obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargés en molécules non volatils. Ainsi, la température et la pression à ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est 60 °C et 60 bars [42]. Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité [43] et qui respecterait intégralement l'essence originelle de la plante.

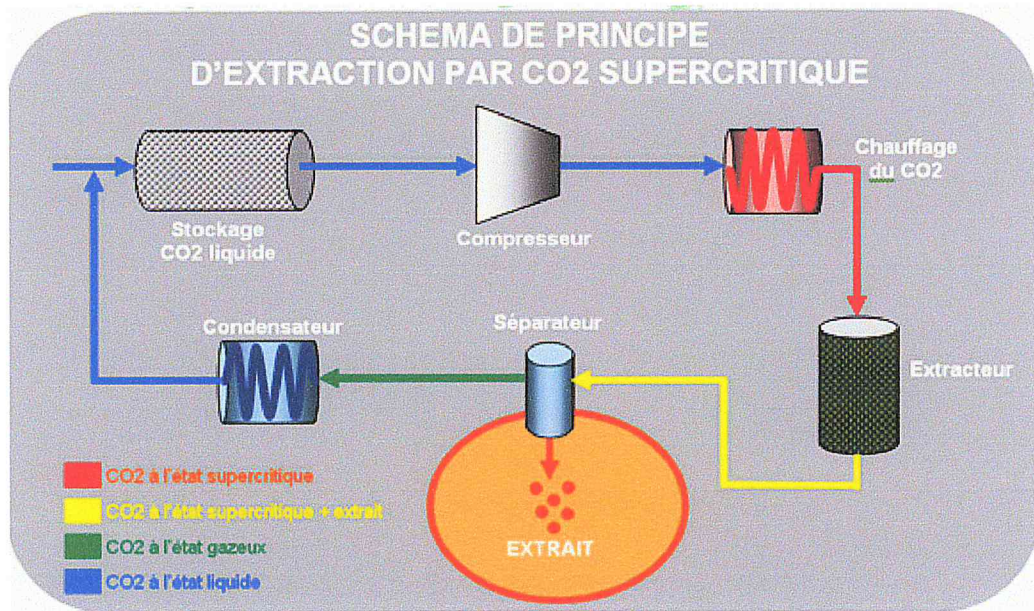


Figure 10 : Schéma de principe d'extraction par CO₂ supercritique.

Chapitre II

Etudes phytochimique sur la plante

II.1.Origine du nom

Le mot romarin (*Rosmarinus*) dérive du latin «Ros» rosée et «Marinus» : marin ou de marin.

II.2.Description botanique

Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées, peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur, il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril – mai. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches *Rosmarinus officinalis albiflorus*). Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base. Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tetrakène (de couleur brune) [44].

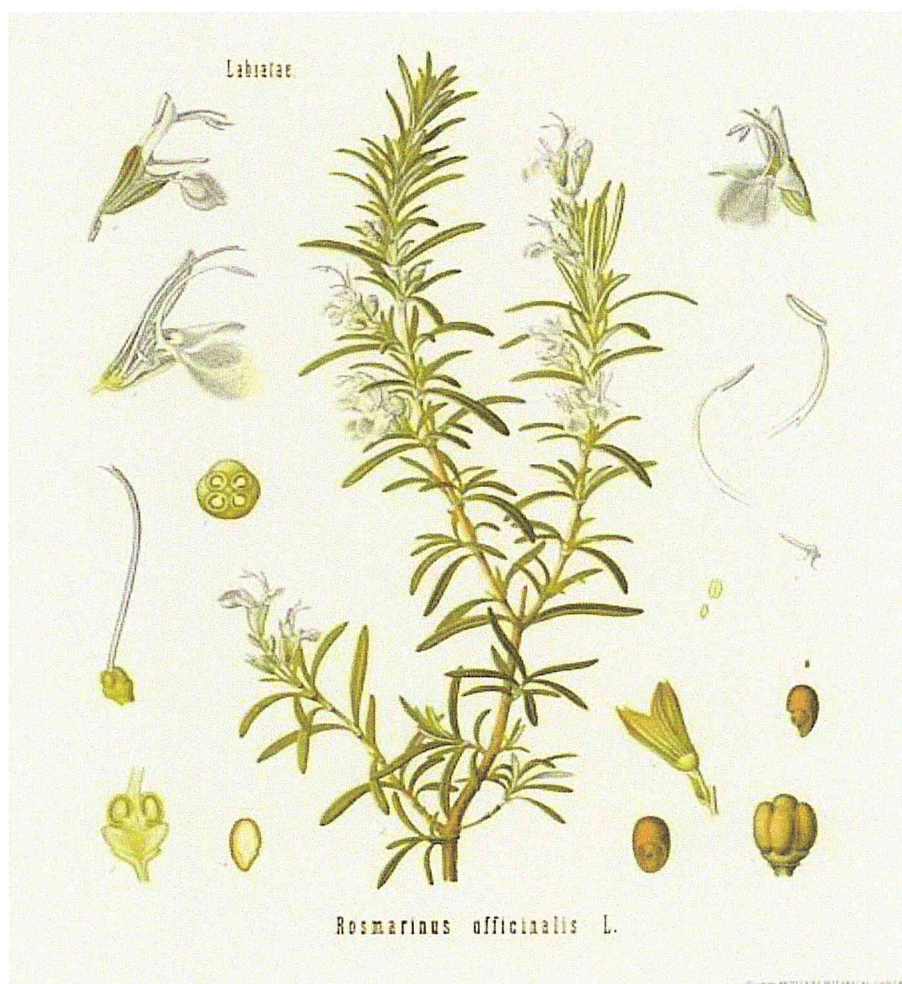


Figure 11: Aspect morphologique de *Rosmarinus officinalis* L. (Köhler, 1897) [44].

II.3. Classification

II.3.1. Classification classique

Règne : Plantae

Division : Magnoliopsida

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : Rosmarinus

Espèce : Rosmarinus officinalis

II.4. Distribution géographique

Le romarin se trouve dans toutes les contrées mondiales, plus particulièrement sur le pourtour méditerranéen, de préférence dans les lieux secs et arides, exposés au soleil, à l'état sauvage il se trouve sur des sols calcaires. [45].



Figure 12: Rosmarinus officinalis L. (Photo: Ouibrahim, 2012) [46].

II.5. Composition chimique du romarin

L'huile essentielle du romarin (1 à 2% dans la plante) contient : de l' α -pinène (7 à 80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 38%), de l'eucalyptol (1 à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène. [47].

En plus de l'huile essentielle on trouve dans le romarin : 2 à 4% de dérivés triterpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol ; des lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadial, des acides phénoliques, des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque, des acides gras organiques. [48].

L'acide citrique, glycolique et glycérique, des stérols, de la choline, du mucilage [49] et de la résine [50].

Le criblage phytochimique de l'extrait ethanologique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence des flavonoïdes, des tannins et des saponines, et l'absence des alcaloïdes détecté dans l'extrait aqueux. Les flavonoïdes détectés par la chromatographie sur couche mince (CCM) sont la quercétine et le kaempférol [51].

II.6.Principaux constituants

Les composés majoritaires de l'huile essentielle du Romarin varie d'une région à l'autre (voir le tableau 01). On trouve le 1-8 cinéole, le camphre, le pinène, le linalol et le limonène.

Tableau 02 : Variations de la composition chimique (composé majoritaire) de l'huile essentielle de Romarin. [47]

Composé majoritaire	%	Origine
α -pinène	23,10	ALGERIE (Tlemcen)
Camphre	14,40	
B-pinène	12,20	
Camphor	14,6	ALGERIE (Alger)
1,8-cinéole	12,2	
β -Caryophyllene	10,9	
Borneol	10,6	
α -pinène	14,90	IRAN(Tehran)
Linalool	24,90	
Pipéritone	23,70	
α -pinène	10,20	TURQUIE (Iznir)
1,8-cinéole	61,40	
α -pinène	11,40	MAROC
1,8-cinéole	50,20	
Camphre	09,10	
α -pinène	13,50	SERBIE(Vojvodina)
Limonène	21,70	
Camphre	21,60	
α -pinène	19,43	Chine
1,8-cinéole	27,23	
Camphre	14,26	
Camphene	11,52	
β -pinène	06,62	

II.7. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin

Cette plante est utilisée en médecine en raison de ses différentes propriétés :

- Antispasmodiques, diurétiques, hépatoprotectrices, soulagement des désordres respiratoires [52].
- Antibactériennes, antimutagéniques, antioxydantes, chémopréventives [53].
- Anti-inflammatoires, antimétastatiques [54].
- Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires [55] et la prolifération des tumeurs cutanées [56].

D'autres études montrent que les composants du romarin inhibent les phases d'initiation et de promotion de cancérogénèse [57] le Carnosol du romarin possède une activité antivirale contre le virus du SIDA (HIV) [58] alors que l'acide carnosique a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1 [59].

De plus, le romarin est l'une des herbes les plus utilisées comme antioxydant dans l'industrie alimentaire seul

II.8. Utilisation

Le romarin est souvent cultivé pour son huile aromatique et considéré utile pour contrôler l'érosion du sol. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique [51].

Dans le Mexique et le Guatemala, il est employé principalement comme remède de post-partum et traite également les problèmes respiratoires et les infections de la peau.

En Espagne, l'huile du romarin est très populaire pour beaucoup de genres de douleur, y compris les douleurs musculaires rhumatismales et traumatiques [60].

Au Maroc, l'infusion des feuilles est utilisée comme apéritif, cholagogue, stomachique et emménagogue. En usage externe, les cataplasmes faits avec les compresses de la décoction concentrée sont appliqués comme vulnéraires. La poudre des feuilles est saupoudrée comme cicatrisant et antiseptique.

La fumigation du romarin est indiquée pour calmer les maux des dents. Depuis quelques décennies, l'huile essentielle du romarin est utilisée en massage sédatif dans les rhumatismes et la sciatique. Les feuilles séchées servent à conserver la laine de l'attaque des mites [49].

En Turquie, la décoction de feuilles du romarin a été traditionnellement employée pour traiter les diabétiques [61].

L'infusion des feuilles est tonique, antitussive, carminative, antiasthmatique, fébrifuge, et anti-paralytique [62]. On le recommande dans les asthénies, les troubles du foie, contre les dyspepsies atoniques ainsi que contre les céphalées et les migraines d'origine nerveuse, les vertiges et les troubles de mémoire [63].

Il a été également employé en tant qu'analgésique, antiépileptique, diurétique, [64] ainsi que pour traiter l'ictère et sa fumée a été employée contre la peste [60].

L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, parfums, désodorisants, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires [62].

Chapitre III

Propriétés antioxydantes

III.1. Introduction

Toutes les matières grasses subissent, au cours de leur conservation ou de leur transformation, des altérations de type oxydatif lorsqu'elles sont extraites de leur contexte de protection naturelle. L'auto-oxydation des lipides est un phénomène purement chimique très complexe, mettant en jeu des réactions radicalaires capables de s'auto entretenir et qui ne nécessitent que la présence d'oxygène atmosphérique. Elle est responsable de la formation de produits chimiques nuisibles aussi bien pour la santé des animaux que de l'homme.

Dans les industries agroalimentaires, le formulateur tient compte du fait que l'oxydation des corps gras est un phénomène spontané dont la cinétique d'apparition peut être accélérée ou ralentie sous l'effet de différents paramètres, dont l'ajout d'antioxydant.

Par ailleurs, les substances naturelles douées d'activité antioxydante présentent un intérêt socio-économique très important dans le domaine de la recherche biopharmacologique. Plusieurs laboratoires à travers le monde se sont orientés vers la recherche des substances bioactives et leur valorisation.

III.2. Propriétés réductrices

Le potentiel d'ionisation (PI) d'une molécule est l'énergie minimale qu'il faut lui fournir pour lui arracher un électron. Plus un composé aromatique est substitué par des groupements donneurs d'électrons, plus son PI est faible et plus son caractère réducteur est grand. Il peut alors subir une oxydation mono-électronique qui conduit au radical correspondant. [65].

III.3. Stress oxydatif

Des molécules prooxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Toute fois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant [66,67].

III.3.1. Qu'est-ce qu'un radical libre ?

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (libre) en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé [68].

III.3.2. Oxygène, espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Notre organisme a besoin d'énergie pour fonctionner correctement. Les cellules transforment les nutriments apportés par l'alimentation en énergie et en eau. Cette transformation génère environ 2% de molécules d'oxygène [69]. L'oxygène est à l'origine de la formation de dérivés plus réactifs appelés espèces réactives de l'oxygène [70].

Tableau 3 : oxygène actif et espèces relatives

Radicals	Non-radicals
$O_2^{\bullet -}$ superoxide	H_2O_2 hydrogen peroxide
HO^{\bullet} hydroxyl radical	1O_2 singlet oxygen
HO_2^{\bullet} hydroperoxyl radical	O_3 ozone
L^{\bullet} lipid radical	LOOH lipid hydroperoxide
LO_2^{\bullet} lipid peroxy radical	Fe=O iron-oxygen complexes
LO^{\bullet} lipid alkoxy radical	HOCl hypochlorite
NO_2^{\bullet} nitrogen dioxide	
$^{\bullet}NO$ nitric oxide	
RS^{\bullet} thiyl radical	
P^{\bullet} protein radical	

III.3.3. Conséquence du stress oxydatif

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN [71], les lipides (peroxydation), les protéines ...etc. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, cancer, diabète...) et la dégradation des cellules et des tissus.

III.4. Antioxydants et systèmes de défense

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat [72].

III.4.1. Antioxydants enzymatiques

Pour faire face à ces attaques, les organismes ont développé des systèmes d'action antioxydante qui visent :

1. à éliminer les espèces réactives de l'oxygène et les catalyseurs de leur formation.
2. à induire la synthèse des antioxydants.
3. à augmenter l'activité des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées.

Trois types d'enzymes antioxydantes sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène [73].

- a- Les superoxyde dismutases (SOD) qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène [74,75].
- b- La catalase qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau permettant l'élimination de celui-ci [76,77].
- c- La glutathion peroxydase (GPX) qui décompose aussi le peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion comme donneur d'hydrogène [78].

III.4.2. Antioxydants non enzymatiques

Ce sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs. Ils peuvent se comporter comme des piègeurs de radicaux libres par les interventions directes sur les molécules prooxydantes ou indirectement, en chélatant les métaux de transition. Ce type d'antioxydants possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Du fait de leur petite taille, ils peuvent en effet pénétrer facilement au cœur des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques. Parmi les antioxydants naturels de faible poids moléculaire, on peut citer les plus connus et les plus importants ci-dessous :

III.4.2.1. Acide Ascorbique (vitamine C)

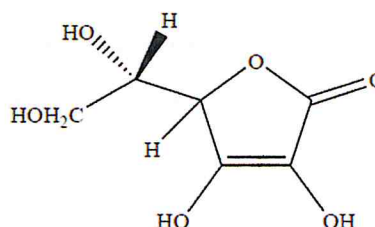


Figure 13 : Acide Ascorbique (vitamine C)

III.4.2.2. Tocophérols (dont la vitamine E)

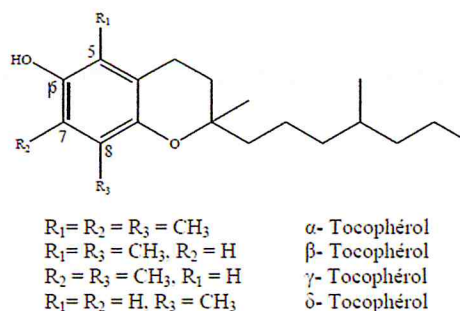


Figure 14 : Tocophérols (dont la vitamine E)

Et le polyphénol dendrimère de synthèse syringaldehyde (**figure 17**)

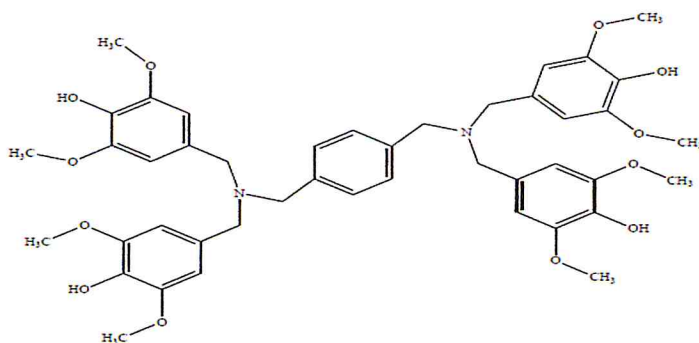


Figure 17 : structure chimique d'un polyphénol de synthèse dendrimère syringaldehyde

III.4.4. Polyphénols naturels comme antioxydants

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants [80,81] qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène (**figure 18**). Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyles des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote, en fin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu.

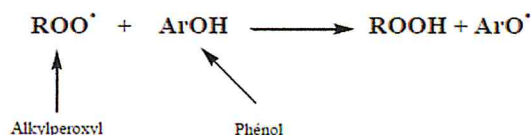


Figure 18 : Illustration d'un mécanisme d'action des polyphénols : la donation d'hydrogène. le radical formé devient moins dangereux

Suite à l'interaction avec les espèces réactives initiales, la forme radicalaire de l'antioxydant est produite, ayant une plus grande stabilité chimique que le radical initial. L'interaction des groupes hydroxyle de composés phénoliques avec les électrons du noyau benzénique donne aux molécules des propriétés particulières, le plus notamment la capacité à générer des radicaux libres, où le radical est stabilisé par la délocalisation. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques impliqués dans la production de radicaux libres. [80]

Les polyphénols peuvent agir selon divers mécanismes :

- a- Chélation des ions métalliques;
- b- Piégeage des radicaux libres.

III.4.4.a. Chélation des ions métalliques

Le cuivre et le fer libres (existant lors de surcharges générales ou localisées) génèrent des radicaux hydroxyles, très réactifs, à partir de l'espèce peu réactive H_2O_2 [82]. Prenons à titre d'exemple le Fer qui existe dans deux états d'oxydation distincts : les ions ferreux et les ions ferriques. L'ion ferrique (Fe^{3+}) est biologiquement la forme inactive du fer. Cependant, il peut être réduit à la forme active Fe^{2+} selon les conditions, en particulier le pH. Il peut être oxydé, produisant des radicaux hydroxyles.



III.4.4.b. Piégeage des radicaux libres

Les composés phénoliques ont des propriétés antioxydantes en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène, le processus est radicalaire [83]. Ils interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par la donation rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres selon un mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire (figure 19). Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées. [81].

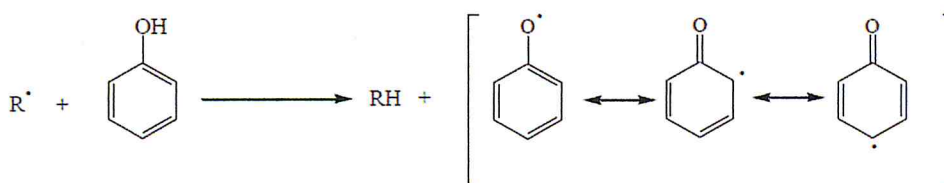
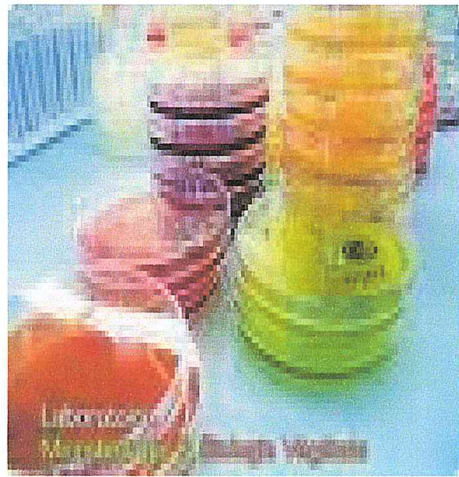


Figure 19 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.

Partie Experimentale

Matériel et Méthodes



I.A. Objectif du travail

La famille des lamiacées inclue plusieurs genres qui sont connus pour être des herbes médicinales et culinaires comme la menthe (*mentha*), le Romarin (*Rosmarinus*), le basilic (*ocimum*), la sauge (*salvia*), la marjolaine et l'origan (*origanium*), le thyme (*thymus*) et la lavande (*lavandula*). Elles présentent selon leurs chémotypes des propriétés antibactériennes, antifongiques, antioxydantes, anti-inflammatoires et antalgiques très intéressantes, et qui les placent au-devant des plantes choisies pour remplacer ou former des mélanges moins toxiques avec les antioxydants de synthèse.

Nous allons, dans la partie expérimentale de notre travail, évaluer ses différentes propriétés pour l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* de la région de Blida (au piémont de Chéréa). Cette huile sera obtenue par hydrodistillation du type Clevenger. Aussi, l'effet antioxydant de l'huile sera comparé à celui de quelques composés purs qui, selon la littérature, forment généralement le chémotype du romarin.

I.B. Lieux d'expérimentation

Vu la diversité de nos travaux, à savoir l'étude de différentes activités de la plante, nous avons réalisé ces derniers dans différents laboratoires. Ils se présentent comme ci-dessous :

- L'extraction des huiles essentielles ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante ont été réalisées au sein du laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse de l'ENS de Kouba et le laboratoire de graduation du département de chimie, faculté des sciences, de l'université de Blida-1.
- L'étude de l'activité antimicrobienne a été réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène et de contrôle alimentaire de la wilaya de Blida.
- L'étude de l'activité Anti-inflammatoire et Antalgique ont été réalisées au niveau du laboratoire pharmacotoxicologique de SAIDAL ELHARACH.

I.1. Matériels

I.1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de notre étude provient de la plante *Rosmarinus officinalis*, les deux parties de cette plante : aérienne (tiges et feuilles) sont ciblées dans cette étude.

Les récoltes ont été réalisées pendant l'année courante (2015) dans le piémont de la chaîne montagneuse de Chréa, wilaya de Blida, Algérie, dans une zone où aucun fertilisant ou pesticides chimiques ne sont utilisés ou le risque d'autres sources de contaminations et de pollution.

I.1.2. Réactifs chimiques et appareillage

L'ensemble des réactifs chimiques utilisés au cours de notre expérimentation sont présentées dans le tableau 4 suivant :

Tableau 4 : réactifs chimique et appareillage employés.

		Réactifs chimiques	Appareillage
Extraction des huiles essentielles		NaCl, Na ₂ SO ₄	Clevenger, chauffe ballon, ballon.
Activité antimicrobienne		Milieu de culture : Miller Hinton et sabouraud,	Autoclave, étuve, bec benzen, boîtes pétri, papier Watmen.
P'activité antioxydante	La méthode du DPPH :	Éthanol, DPPH, eau distillée	spectrophotomètre UV-Visible, vortex, agitateur magnétique, centrifugeuse, pH mètre
	La méthode de β-carotène :	β -carotène, tween 40, chloroforme, acide linoléique, éthanol	
	La méthode FRAP :	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , TCA, FeCl ₃ , K ₃ Fe(CN) ₆	
Activité anti-inflammatoire		Caraghénine à 1%, eau physiologique Déclofénac	Seringue Balance analytique Balance pour animaux
Activité Antalgique		Acide acétique à 1%, eau physiologique	Seringue

I.2.Extraction des huiles essentielles

I.2.1. Méthodologie

Les différentes parties de la plante récoltée en avril et en mai ont été nettoyées à l'aide d'une brosse pour éliminer le reste de terre et de poussière ainsi que d'autres impuretés. Après 21 jours de séchage à l'air libre, à température ambiante autour de 21°C, à l'abri de la lumière et dans un endroit sec, la plante est soumise à un broyage et à un tamisage avant chaque extraction.

I.2.2. Processus d'extraction

Il existe différents procédés d'extraction des HE (distillation, solvants volatils, expression à froid et CO₂ supercritique) mais, seuls quelques-uns assurent une bonne qualité finale. Dans notre cas, les huiles essentielles ont été extraites par Hydrodistillation en utilisant un appareil du type Clevenger préconisé par la pharmacopée européenne (figure 20). Le Clevenger permet de condenser les vapeurs formées au cours de cette ébullition dans son réfrigérant pour former deux phases distinctes : une phase organique qui représente l'huile essentielle pure, et une phase aqueuse ou l'hydrolat qui représente l'HE mélangée avec l'eau.

Cette méthode d'extraction consiste à porter à ébullition 100g de matière végétale, dans un ballon rempli à 2/3 de son volume par de l'eau distillée, pendant trois heures après l'apparition de la première goutte. [84]

La phase organique est récupérée directement et séchée par l'agent desséchant Na₂SO₄.

Le rendement d'extraction est calculé suivant la formule ci-dessous:

$$R (\%) = (M_{HE} / M_{MV}) \times 100$$

Avec : **R** : Rendement d'extraction; **M_{HE}**: masse de l'huile essentielle; **M_{MV}** : masse de la matière végétale. L'HE récupérée est conservée dans des tubes Vial propres et secs en verre teinté, fermés de façon étanche, stockage à -4°C à l'abri de la lumière



Figure 20 : Obtention de l'HE par hydrodistillation "montage Clevenger".

I.3.Évaluation de l'activité antioxydante

Les herbes aromatiques consommées quotidiennement dans les régions méditerranéennes, sont une source naturelle de composés phyto-chimiques issus du métabolisme secondaire et qui sont doués d'une activité antioxydante. [85].

Dans le but d'évaluer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et pour mieux l'estimer, trois méthodes basées sur trois principes différents pour l'évaluation de cette activité sont réalisées, la méthode de : piégeage du radical DPPH, le blanchiment de la β -carotène et la méthode FRAP.

I.3.1.La méthode de piégeage du DPPH

I.3.1.1.Principe

Cette méthode est basée sur la réduction du radical DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle) qui possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure 25). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et le DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. [86]. Cette délocalisation donne également lieu à la couleur violet foncé, caractérisé par une absorbance dans une solution d'éthanol à environ 517 nm.

Quand une solution de DPPH est mélangée avec une substance antioxydante qui peut céder un atome d'hydrogène, cela donne lieu à la forme réduite DPPH-H (2) avec perte de cette couleur violette en faveur d'une couleur jaune pâle. [87].

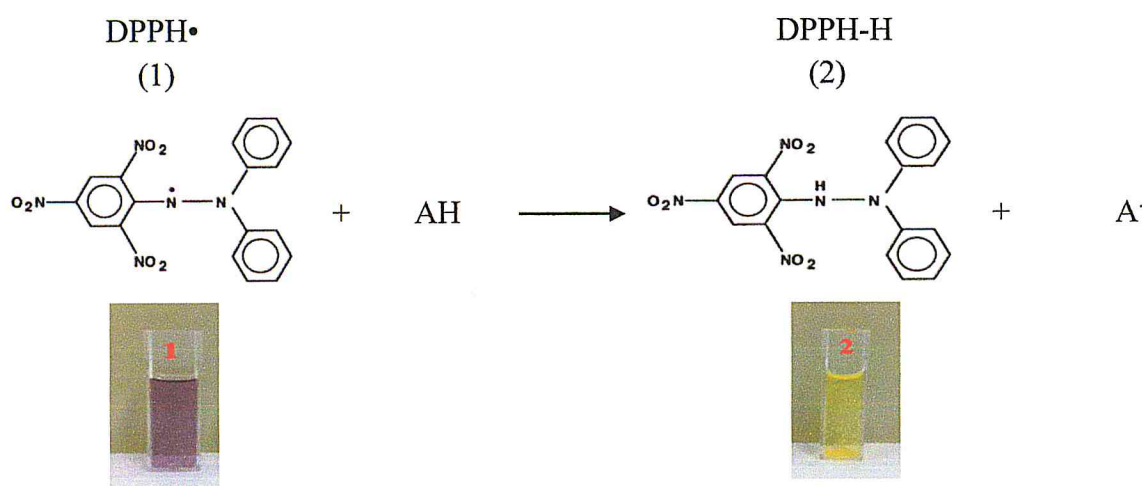


Figure 21 : Réaction de réduction d'un radical DPPH en présence d'un antioxydant ainsi que leur colorimétrie.

I.3.1.2. Mode opératoire

- Préparation de la solution de DPPH d'une concentration de 4mg/ 100ml d'éthanol.
- Mettre dans des tubes à essai des volumes différents soit : 10µl, 20µl, 30µl, 40µl, 50µl, 100µl, 150µl et 200µl, de la solution mère d'HE de concentration 200mg/1ml d'éthanol, ces volumes sont complétés à 1ml par de l'éthanol. Aux solutions obtenues, on ajoute 1ml de la solution de DPPH/éthanol.
- Le mélange réactionnel est agité vigoureusement et incubé pendant 30 min à l'abri de la lumière et de l'oxygène atmosphérique.
- Les absorbances sont mesurées à 517nm, par spectrophotométrie UV-Visible, pour chaque solution contre un blanc ne contenant que l'éthanol. [88].
- Le BHT a été utilisé comme antioxydant de synthèse de référence.
- La capacité de l'antioxydant à piéger le radical libre est estimée en pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans l'éthanol. Le pourcentage d'activité antioxydante a été déterminé selon l'équation suivante :

$$AA \% = ([Abs_{control} - Abs_{éch}] / Abs_{control}) \times 100$$

AA : activité antioxydante, Abs_{éch} : absorbance à 517 nm de l'échantillon HE/DPPH/Ethanol.

Abs_{control} : absorbance à 517 nm du mélange DPPH/Ethanol.

Les différentes concentrations des solutions filles (SF), préparées à partir de la solution mère de 200mg/ml, ainsi que, les volumes prélevés pour cet effet sont données dans le tableau 5.

Tableau 05: concentrations des solutions filles et volume prélevé pour leurs préparation

Volume prélevés (µl)	10	20	30	50	150	200	300
Concentration de la SF (mg/ml)	1	2	3	5	15	20	30

Le paramètre IC₅₀ (concentration équivalente à 50% de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (couleur), elle a été calculée par régression linéaire à partir des graphes des taux d'inhibition.

I.3.2. méthode de la β -carotène

I.3.2.1. Principe

Cette méthode se base sur la décoloration de la β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par le Tween 40. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induits un retard de la cinétique de décoloration de la β -carotène.

C'est une méthode sensible, rapide et simple, qui consiste à suivre, par spectrophotométrie UV-Visible, la décroissance de l'absorbance à 490 nm de la forme réduite de la β -carotène. Si la couleur jaune persiste, cela indique la présence des substances antioxydantes. [89].

I.3.2.2. Mode opératoire

- L'émulsion de β -carotène/acide linoléique a été préparée par solubilisation de 0,5mgde β -carotène dans 1ml du chloroforme. 25 μ l d'acide linoléique et 200mg de Tween 40 ont été additionnés, le chloroforme a été complètement évaporé, par la suite 100ml d'eau distillée saturée en oxygène (O_2) ont été ajoutés.
- A patire d'une solution mere de l'huile essentielle, de concentration 100mg/ml d'éthanol, nous avons préparé une solution fille de concentration 3mg/ml.
- 350 μ L de la solution fille ou de la solution d'antioxydant de référence (BHT ou BHA) (de concentration 3mg/ml d'éthanol) ont été additionnés à 1ml de la solution précédente.
- Un autre tube a été aussi préparé dans les mêmes conditions, sans antioxydant (contrôle négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 μ l d'éthanol.
- La cinétique de l'activité a été suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 2heures. L'activité antioxydante relative de l'HE (Act_{re}) a été calculée selon l'équation suivante :

$$Act_{re} \% = \frac{abs_{ech\ t}}{abs_{Réf\ t}} \times 100$$

$Act_{re} \%$: activité relative de l'HE ; abs_{ech} : absorbance de l'échantillon au temps t ; $abs_{Réf}$: absorbance soit du BHT ou du BHA au temps t .

I.3.3. Méthode de FRAP

I.3.3.1.Principe

Elle est universelle, peut être appliquée aussi bien chez les plantes que dans les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux, cette méthode est basée sur la réduction du fer ferrique Fe^{3+} présents dans le complexe ferrocyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux Fe^{2+} . La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique en couleur

bleue vert du fer ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700nm. [90]

•Préparation de la solution tampon

Elle est préparée à partir des deux solutions ci-dessous :

- 125,5ml de KH_2PO_4 (di-hydrogénophosphate de potassium) à M/15 (9,08g de KH_2PO_4 par litre).
- 74,5ml de Na_2HPO_4 (di-sodium hydrogène phosphate) à M/15 (8,47g de Na_2HPO_4 par litre).

•Préparation des solutions mères

Les solutions utilisées sont décrites comme suit :

- Solution de $FeCl_3$ (0,1%) :1g de $FeCl_3$ dans 1000ml d'eau distillée.
- Solution $K_3Fe(CN)_6$ (1%) :10g de $K_3Fe(CN)_6$ dans 1000ml d'eau distillée.
- Solution de trichloracétique (10%) :100g de TCA dans 1000ml d'eau distillée.
- Solution de l'échantillon 40mg de l'huile essentielle dans 1 ml d'éthanol.

I.3.3.2.Mode opératoire

- Dans des tubes à essai, on a préparé des solutions filles à partir d'une SM de concentration (40mg/ml), les concentrations correspondantes sont résumées dans le tableau 6 :

Tableau 6 : concentrations des solutions filles pour la méthode FRAP.

Volume prélevé de la SM (μ l)	0	10	20	40	60	80	100	120	140	160
Volume a complété avec l'Ethanol (μ l)	200	190	180	160	140	120	100	80	60	40
Concentration de la SF (mg/ml)	0	2	4	8	12	16	20	24	28	32

- On rajoute 1ml de $K_3Fe(CN)_6$ puis 1ml d'une solution tampon de pH = 6,6.
- l'ensemble est chauffé à 60°C au bain-marie pendant 20min, après refroidissement, on ajoute 1ml de TCA.
- le mélange est, par la suite, centrifugé à une vitesse de 3000 tr/min pendant 10min.
- On prélève 1ml de surnageant, auquel on ajoute 1ml d'eau distillées et 0,1ml de $FeCl_3$ (la coloration vire au bleu).
- Enfin nous réalisons, pour l'échantillon ainsi préparé, la mesure de la DO à 700nm. [91]. Ces mesures sont répétées trois fois pour chaque concentration afin de prendre la valeur moyenne.

I.4. Étude du pouvoir antimicrobien

Dans le but d'évaluer le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle, nous avons testé cette dernière sur six micro-organismes. (2 bactéries Gram-, 2 bactéries Gram+, 2 levures et 2 champignons).

Les souches utilisées proviennent de l'institut pasteur, ils sont choisis pour leur fréquence élevée à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité.

Le tableau suivant illustre : le nom, et la référence, des micro-organismes utilisés.

Tableau 7 : Souches microbiennes testées et leurs références.

Souches	Espèces bactériennes	Gram	Référence ATCC
Bactéries	<i>Escherichia coli</i>	(-)	25922
	<i>Staphylococcus aureus</i>	(+)	25923
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(-)	27853
	<i>Bacillus ceureus</i>	(+)	6633
Champignons	<i>Aspergillus flavus</i>	(+)	2035
	<i>Candida albicans</i>	(+)	24433

Le principe, de l'analyse microbiologique, consiste à mettre à chaque fois une souche microbienne en contact avec l'huile essentielle à différentes concentrations, et ce dans un milieu de culture solide (préalablementensemencé) approprié pour chaque microorganisme. Dans notre étude nous avons mis en évidence le pouvoir antimicrobien de notre huile essentielle par la méthode de l'aromatogramme (ou diffusion sur milieu gélosé).

I.4.1. Protocole expérimental

I.4.1.1. L'aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme. Elle permet de déterminer l'activité des huiles essentielles à inhiber la croissance des germes cibles. Cette méthode repose sur le pouvoir de diffusion des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri, qui va nous permettre de mettre en évidence l'effet antibactérien des huiles essentielles sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de ces huiles essentielles, par la mesure du diamètre d'inhibition autour du disque de cellulose imprégné de nos huiles essentielles. [92]

I.4.1.2. Préparation du milieu de gélose

On fait fondre les milieux Muller Hinton et Sabouraud dans un bain-marie à 95°C, après on verse aseptiquement dans des boîtes de pétri à raison de $\frac{3}{4}$ du volume total de la boîte, on laisse refroidir et solidifier sur la paillasse.

I.4.1.3. Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture jeune des bactéries, champignons et levures, on réalise des suspensions troubles selon le protocole suivant :

- On casse l'extrémité d'une pipette pasteur et on fait passer rapidement sur la flamme.
- On ouvre la boîte pétrie contenant le germe, et on prélève aseptiquement 3 à 4 colonies isolées et identiques.
- On débouche le tube contenant 10mL d'eau physiologique stérile et on fait déposer les colonies prélevées.
- On fait passer l'ouverture du tube contenant la suspension de germe à la flamme avant de la refermer.
- On soumet le tout à une agitation au vortex.
- On réalise une première lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un densimètre qui doit être égale à 05 CFU/ml ; si la valeur trouvée durant la première lecture est supérieure à 05 CFU/ml, on l'ajuste tout en ajoutant de l'eau physiologique, si elle est inférieure à la valeur maximale, dans ce cas, on doit ajouter des colonies et on fait une deuxième lecture.
- On recommence toutes ces opérations avec tous les autres germes testés.

I.4.1.4. Préparation des disques

Les disques sont fabriqués à partir du papier Wattman N° 3, avec un diamètre de 9mm par l'emporte-pièce. Ensuite, ces disques sont mis dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).

I.4.1.5. Ensemencement

Après solidification du milieu de culture, la suspension bactérienne à tester est étalée sur la surface du milieu de culture sous forme de strie serrée dans des boîtes pétries contenant soit 20 ml du mélange Muller Hinton (pour les boîtes destinées à tester les bactéries) soit 20 ml du mélange Sabouraud (pour les boîtes destinée à tester les champignons et les levures).

I.4.1.6. Dépôt des disques

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier wattman (trois disques par boîte) sont déposés sur le milieu de culture précédemment inoculé avec le microorganisme choisi, puis imbibés par 45µl d'huile essentielle de *Rosmarinus*

Officinalis. Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 4h pour que l'huile essentielle puisse diffuser.

I.4.1.7. Incubation

Les boîtes ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h pour les boîtes qui sontensemencées de bactéries et 48 heures pour cellesensemencées par les champignons et les levures.

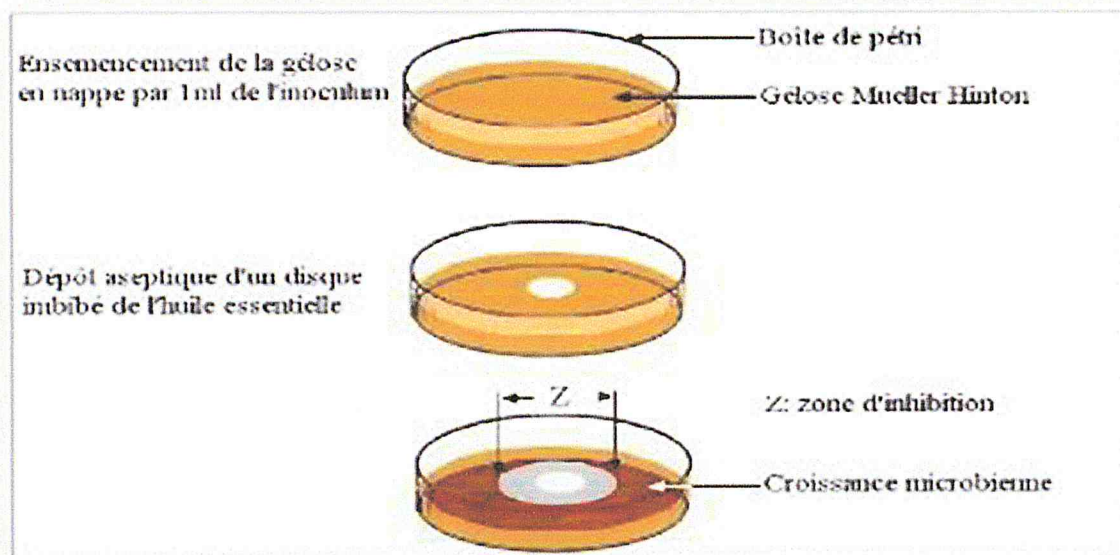


Figure 22 : Illustration de la méthode d'Aromatogramme sur boîte Pétri.

I.4.1.8. Lecture

La lecture s'effectue après l'incubation par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition (le diamètre du disque inclus), la lecture se fait à l'aide d'un pied à coulisse. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition. [93].

- **Non sensible (-) ou résistante** : diamètre < 8 mm.
- **Peu sensible (+)** : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- **Sensible (++) ou intermédiaire** : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- **Extrêmement sensible (+++)** : diamètre \geq 20 mm.

I.5. Test d'activité anti-inflammatoire

La mise en évidence de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon la méthode de Levy. [94]

I.5.1. Principe

L'injection de la Carraghénine sous l'aponévrose plantaire de la patte de la souris, provoque une réaction inflammatoire qui peut être, réduite par un produit anti-inflammatoire. Cette étude permet de comparer la réaction de l'œdème plantaire après administration de dose différente de produit anti-inflammatoire et de produit de référence correspondante.

I.5.2. Mode opératoire

Le test consiste à évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'HE issue de la partie aérienne de *Rosmarinus Officinalis* à une concentration de 500mg/kg, sur l'œdème des pattes postérieures provoquées par l'injection d'une solution de la Carraghénine à 1 % chez les souris.

La préparation de la solution de la Carraghénine à été faite par une dilution de 1mg de la Carraghénine dans 100ml d'eau physiologique. Les souris albinos sont réparties en 3 lots de 6 souris dont le poids corporel est compris entre 18g et 23g.

Au temps T_0 on a administré aux trois lots des suspensions suivantes:

Lot témoin : chaque souris reçoit 0,5 ml d'eau physiologique.

Lot essai 1 : chaque souris reçoit 0,5 ml de l'HE à la dose 500mg/kg

Lot essai 2 : chaque souris reçoit 0,5 ml du produit de référence Clofenal (Déclofénac de sodium à 2mg/kg)

Chronologie du test :

Au temps $T_0 + 30\text{min}$: La solution de la Carraghénine à 1% est injectée sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche sous un volume de 0,025ml à toutes les souris mises en expérience. (Figure 25).

Au temps $T_0 + 4\text{h}$: Après avoir sacrifié les souris ayant été soumises à une forte concentration d'éther diéthylique, on coupe les pattes postérieures à hauteur de l'articulation et on les pèse sur une balance analytique.

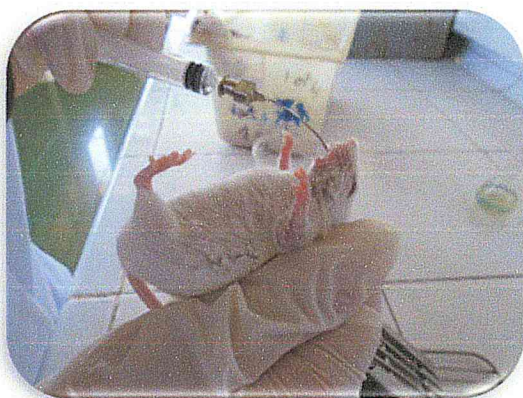
I.5.3. Expression des résultats [95].

- On calcule la moyenne arithmétique des poids de la patte gauche et la patte droite pour chaque lot.
- On calcule le pourcentage d'augmentation des poids de la patte, à savoir le pourcentage d'œdème et le pourcentage de réduction d'œdème, par les formules suivantes :

$$\% \text{ d'œdème} = \frac{\text{moyenne des poids de la patte gauche} - \text{moyenne des poids de la patte droite}}{\text{moyenne des poids de la patte droite}}$$

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème essai}}{\% \text{ de l'œdème témoin}} \times 100$$

Les figures 23 schématisent chronologiquement les travaux effectués



Administration des solutions préparées par voie orale



Injection de la carraghénine à 1% sous l'aponévrose des pattes gauches



Sacrifice des souris par l'éther diéthylique



Coupure des pattes postérieures à la hauteur de l'articulation

Figure 23 : Les différentes étapes de l'activité anti-inflammatoire.

I.6. Test d'activité antalgique

I.6.1. Principe

Réduire par des substances antalgiques la douleur provoquée chez les souris par l'injection d'une substance irritante capable d'entraîner des mouvements de torsion. Nous avons utilisé le test de la torsion (**Writhing test**) pour l'évaluation de l'activité antalgique périphérique de l'huile essentielle. [96].

I.6.2. Mode opératoire

Le test consiste à évaluer l'effet antispasmodique de l'HE issue de la partie aérienne de *Rosmarinus Officinalis* à une concentration de 500mg/kg, par l'injection d'une solution d'acide acétique à 1 % chez les souris.

La préparation de la solution d'acide acétique (1%) a été faite par une dilution de 1mg d'acide acétique dans 100ml d'eau distillée.

Les animaux ont été répartis au hasard en 03 lots de souris chacun. Et chaque lot de souris a été traité comme suit :

Lot témoin : chaque souris reçoit par voie orale de l'eau physiologique à raison de 0.5ml.

Lot de référence: chaque souris reçoit par la même voie une solution d'un médicament antispasmodique: Spasfon (Phloroglucinol. hydraté ; ampoule injectable 40mg/4ml ; Laboratoire LAFON, France) ;

Lot essai 1 : chaque souris reçoit par voie orale 0,5ml du produit à tester à la dose active bibliographique (*Rosmarinus Officinalis* à la dose 500mg/kg).

Trente minutes après les différents traitements, une injection de 0.2 ml d'une solution à 1 % d'acide acétique a été faite par voie intrapéritonéale dans chaque souris. Le syndrome douloureux se caractérise par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorsale abdominale.

Après injection de la solution d'acide acétique et un temps de latence de 5 minutes, nous avons compté, pour chaque souris, le nombre de torsions pendant 10 minutes.

I.6.3. Expression des résultats

L'activité antispasmodique est exprimée par le pourcentage de réduction du nombre de spasmes chez les souris traitées par rapport aux témoins selon la formule suivante :

$$\% \text{ de protection} = \frac{\text{moyenne de crampe de témoin} - \text{moyenne de crampe de l'essai}}{\text{moyenne de crampe de témoin}} \times 100$$

Les figures 24 indiquent les différents traitements infligés aux souris.



(A): Administration du produit à tester.



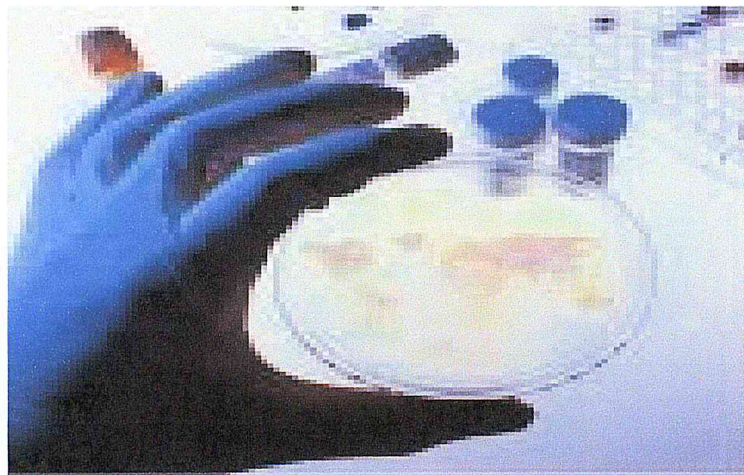
(B) : Injection de l'acide acétique.



(c) : Le comptage des crampes.

Figure 24 : Les différentes étapes (A, B, C) de l'activité antalgique.

Résultats et discussions



Dans cette partie, nous exposons l'ensemble de nos résultats et leur discussions qui portent sur l'extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*, ainsi que l'évaluation de son activité antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire et antalgique.

II.1. Extraction de l'huile essentielle

II.1.1. Teneur et propriétés organoleptiques

L'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis*, extraite par la technique d'hydrodistillation du type Clevenger, présente les caractéristiques organoleptiques regroupées dans le tableau 8. La figure 25 illustre notre huile.

Tableau 8: Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis*.

	Aspect	Couleur	Odeur
Selon L'AFNOR	Liquide mobile, limpide	Presque incolore à jaune pâle	Caractéristique fraîche, plus ou moins camphrée selon l'origine
Huile essentielle Extraite	Liquide mobile Limpide	Jaune clair	Camphrée

Les paramètres organoleptiques de notre huile essentielle sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR. [97]



Figure 25 : Photo d'H.E de *R. officinalis* obtenue par hydrodistillation du type Clevenger.

II.1.2. Détermination du rendement en huile essentielle de romarin

Le rendement moyen obtenu après extraction de l'huile de *Rosmarinus officinalis* est de 0,63%. Ce dernier est conforme aux normes AFNOR (0,5-2), toutefois la valeur obtenue est proche des pourcentages faibles. Cela peut être dû aux différents facteurs qui rentrent en jeu, parmi eux on cite la nature du sol, la période de la récolte, la durée de séchage et le mode d'extraction.

II.2. Activités anti oxydantes

II.2.1. Evaluation de la méthode DPPH

La figure 26 illustre l'efficacité de l'huile essentielle à piéger le radical DPPH, traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations. D'après les résultats, l'évolution de l'activité anti-radicalaire est dose-dépendante, car elle augmente avec l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle dans le milieu réactionnel. Le tableau 9 montre bien cela.

Tableau 9 : variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration de l'HE de *Rosmarinus officinalis*

C (mg/ml)	1	2	3	5	15	20	30
AA(%)	20,71	36,05	57,20	59,4	58,27	60,16	60,5

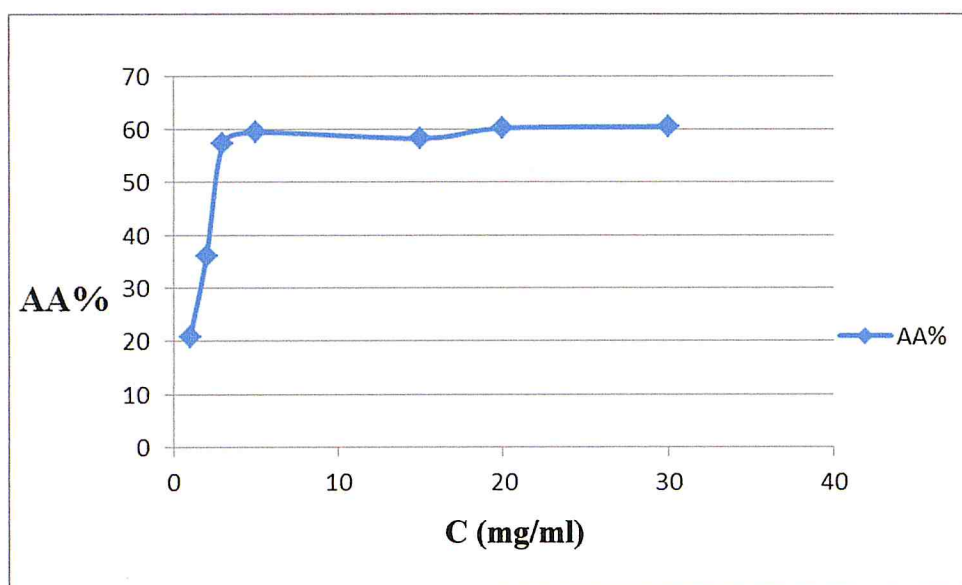


Figure 26 : Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* à d.ifférentes Concentrations.

Le pourcentage d'inhibition augmente progressivement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'enrayement presque total du DPPH présent dans le milieu. Le tableau 10 donne l'IC₅₀ correspondants respectivement au BHT, BHA, vitamine C et à l'HE.

Tableau 10: IC₅₀ de l'huile essentielle et du BHT, BHA, vitamine C

	IC 50 (mg/ml)
BHT	0,17
BHA	1,44
Vit C	0,22
HER. M	2,63

La valeur de l'IC₅₀ est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (Activité antioxydante AA%) d'un composé, car elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu. Plus la valeur d'IC₅₀ est faible, plus l'activité anti-radicalaire d'un composé est appréciable.

Le potentiel anti-radicalaire global de l'huile essentielle testée a été inférieur à celui des antioxydants de synthèse, elle présente un IC₅₀ de 2,63 mg/ml soit une activité 15 fois moins que celle du BHT (0,17 mg/ml) et 12 fois moins que l'activité du vit C. Toutefois, elle reste comparable à celle du BHA (presque 2 fois moins). Ainsi, on peut conclure qu'elle présente une activité antioxydante très satisfaisante. Cela permettra, selon la dose minimale autorisée, de substituer le BHA par notre huile essentielle ou de former avec cette dernière un mélange moins toxique, dans différentes formulations pharmaceutiques et/ou alimentaire.

II.2.2. Evaluation de la méthode du blanchissement de la β -carotène

En se basant sur le suivi, par spectrophotométrie UV-visible, de la décroissance de l'absorbance à 490 nm de la forme réduite de la β -carotène, nous avons obtenu les courbes de la figure 27

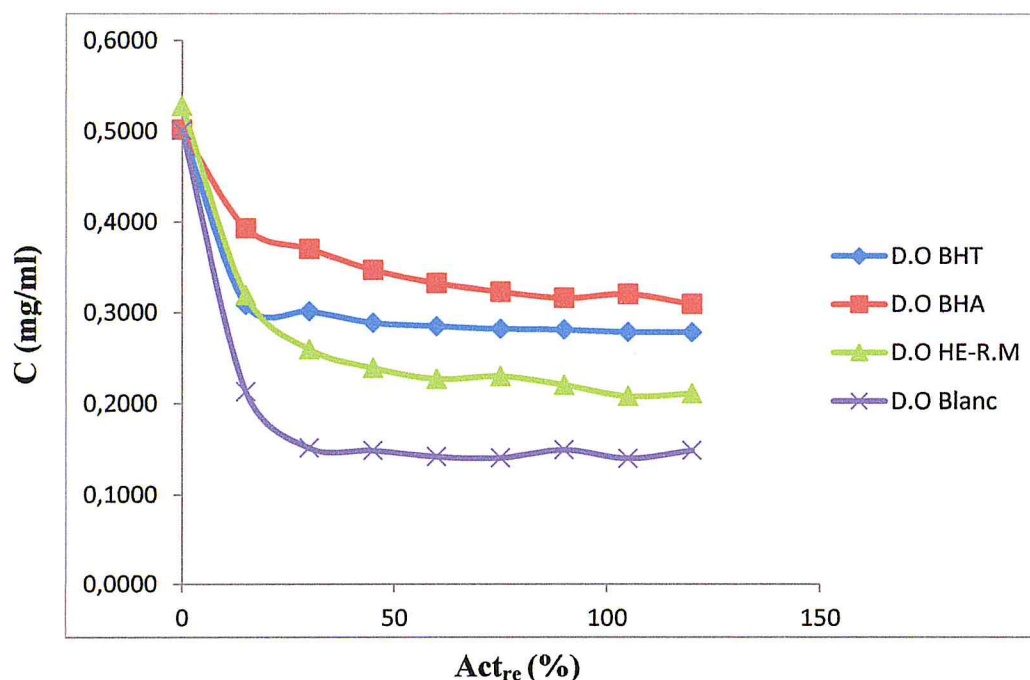


Figure 27 : Évaluation de la dégradation de la couleur de la β -carotène en présence de BHT, BHA, de l'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis* et du blanc.

L'examen de ces courbes montre qu'elles ont tendance à s'incliner et de tendre vers de faibles valeurs.

Nous remarquons, selon la vitesse de décroissance des absorbances et de la formation du palier, que le BHA présente une meilleure protection de la β -carotène, il est suivi respectivement par le BHT et l'huile essentielle.

II.2.2.1. Les activités relatives de β -carotène

Dans le but de déterminer le degré d'activité antioxydante de notre HE par rapport à l'activité antioxydante du BHA, on a calculé l'activité relative, même chose pour le BHT. L'ensemble des résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 11: résultats de l'activité relative de l'huile essentielle et du BHT par rapport au BHA

$Act_{re} (HE)\%$	$Act_{re} (BHT)\%$
68.19	89.98

Les résultats du tableau 11 montrent clairement que, l'huile essentielle du romarin présente une activité appréciable, elle tend vers celle du BHT.

II.2.3. La méthode FRAP

L'application de cette méthode sur notre huile essentielle a donné des résultats présentés sous forme d'absorbance mesurée à 760 nm, ces dernières sont données dans le tableau 12 suivant :

Tableau 12: variation de l'absorbance en fonction de la concentration de l'huile essentielle dans le mélange du test FRAP

C (mg/ml)	$ABS_{moy} (\%)$
2	0.274
4	0.307
8	0.329
12	0.380
16	0.488
20	0.559
24	0.616
28	0.725
32	0.752

La figure 28 ci-dessous indique clairement que le pouvoir réducteur sur le fer ferrique en fer ferreux varie linéairement avec la variation de la concentration en huile essentielle. Cela est en accord avec les résultats des deux méthodes précédentes.

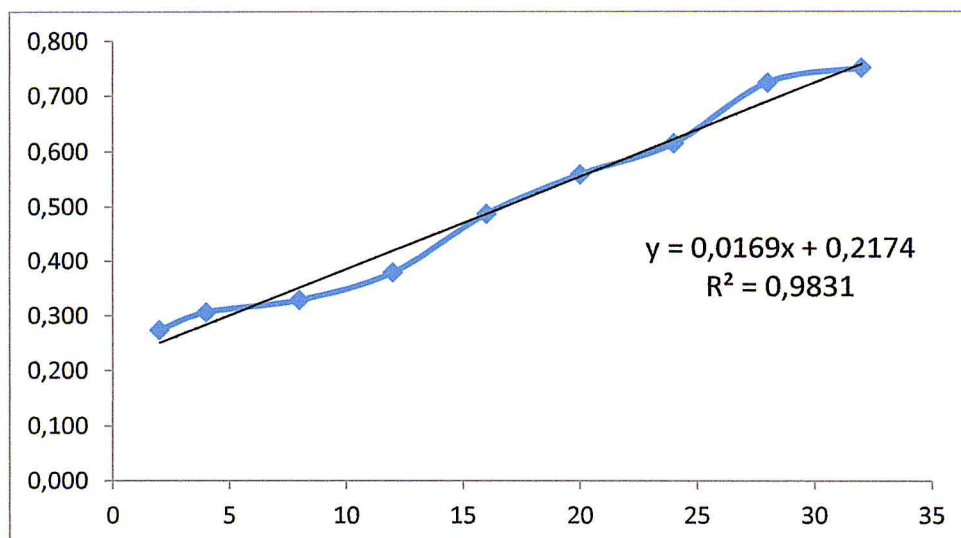


Figure 28 : variation de l'absorbance et donc du pouvoir antioxydant de l'huile de *R. Officinails* en fonction de la concentration de cette dernière dans le mélange du test FRAP.

II.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton).

L'activité antibactérienne de notre huile essentielle est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits à tester vis-à-vis de six germes pathogènes d'origine hospitalière (*Escherichia-coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aspergillus flavus* et *Candida albicans*) après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 13 et illustrés dans l'annexe 1.

Tableau 13 : Diamètre (mm) des zones d'inhibitions de l'huile essentielle de romarin.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Candida albicans</i>
Zone d'inhibition (mm)	13	18	7	8	20	30
Sensibilité	Sensible	Sensible	Moins sensible	Moins sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible

Il est connu dans la littérature [98] que l'HE de Romarin présente une activité antimicrobienne contre *E. coli*, *Bacillus* et *Staphylococcus aureus*. Et que l'activité antibactérienne des huiles essentielles est due à la présence des alcools à longues chaînes et des composés phénols qui inhibent la croissance des bactéries.

Selon la lecture des résultats du tableau 13 notre HE a une activité antimicrobienne importante contre *Bacillus* et l'*Escherichia coli*, elle présente pour ces dernières une zone

d'inhibition correspondant respectivement à 18 mm et 13 mm. La zone d'inhibition de *staphylococcus aureus* est égale à 8 mm, celle de *Pseudomonas* est égale à 7 mm. Ces valeurs montrent une sensibilité moyenne de ces germes cibles vis-à-vis de notre huile. Ceci est certainement dû à la présence des composés, généralement majoritaire, de L'HE de Romarin à savoir le 1,8-cinéole, suivi du camphre, de l' α -pinène et du bicyclo-3.1.1 -heptane. De ce fait, nos résultats concordent avec les données bibliographiques. [99]

Pour *Candida albicans* et *Aspergillus flavus*, le diamètre d'inhibition est de l'ordre de 30 mm et de 20 mm, ce qui nous laisse conclure que notre HE possède une activité fortement inhibitrice sur ces souches. Cette activité antifongique de l'huile essentielle de *R.officinallis* peut être expliquée par la présence de composés oxygénés monoterpéniques, qui agissent comme des antiseptiques et antimicrobiens. [100]

II.4. Test d'activité antalgique in vivo

L'activité antalgique de l'huile essentielle de romarin a été évaluée par le dénombrement des crampes ou des contractions abdominales induites chez les souris par injection intra-péritonéale de l'acide acétique.

Au début on a travaillé avec des doses faibles, comparables à celles du produit de référence, nous avons remarqué l'absence presque totale de l'activité antalgique. Ceci nous a poussé à augmenter la dose jusqu'à 500mg/ml car on avait, malheureusement, droit à une seule manipulation de plus.

Chaque lot de souris a été préalablement traité par voie orale avec de l'eau distillée, l'HE de *Rosmarinus officinalis*, et du produit de référence (Spasfon). Après une ½ heure, les souris des trois lots reçoivent une injection intra- péritonéale d'acide acétique à 1%.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 14

Tableau 14 : Résultat de l'activité antalgique réalisée sur les trois lots de souris.

Nombre de souris	Témoin (Eau physiologique)	La référence (Spasfon)	L'essai (HE)
S1	42	1	48
S2	21	1	21
S3	10	0	37
S4	39	2	24
S5	25	1	0
S6	19	1	0
Moyenne de crampe	26	1	22
%de protection	0%	96,15%	16,69%

Nous rapportons dans les figures 29 et 30 les résultats de cette activité antispasmodique de *Rosmarinus officinalis* en comparaison avec un antispasmodique de référence : Spasfon®

(Phloroglucinol.hydraté). L'activité antispasmodique a été exprimée par le nombre de contractions en dix minutes. Le pourcentage de diminution des contractions pour chaque lot a été calculé par la formule citée précédemment.

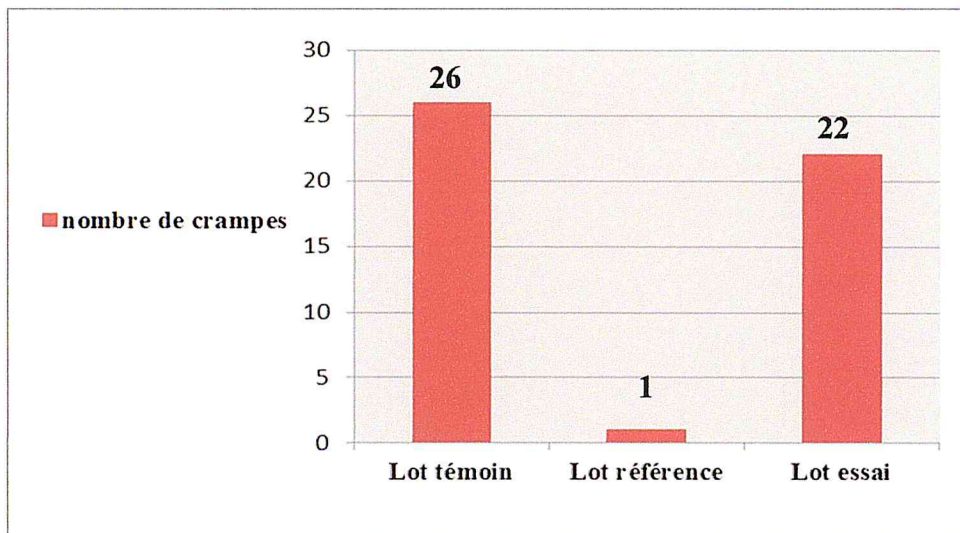


Figure 29: Moyenne du nombre de crampes pour chaque lot pendant 10 minutes.

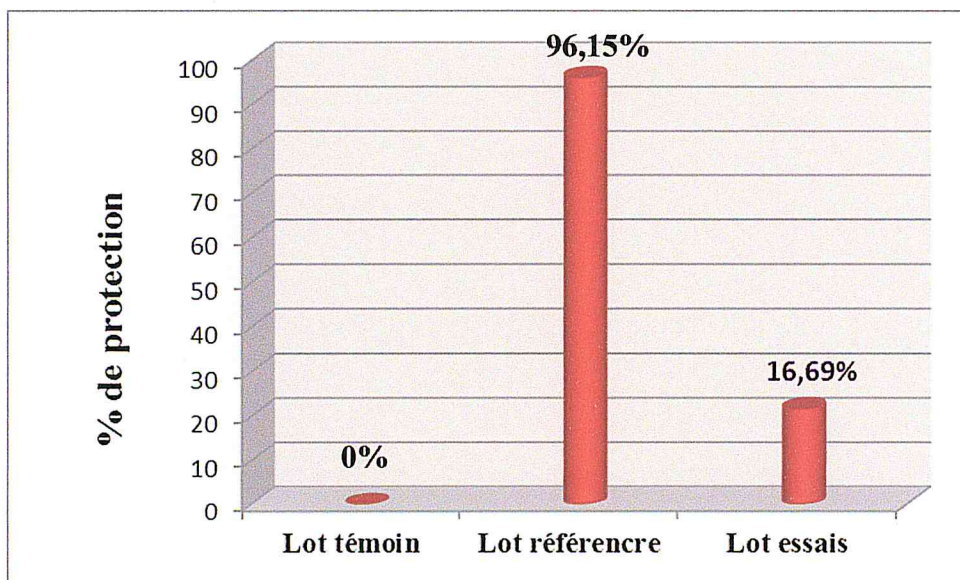


Figure 30 : Pourcentage de protection de la douleur pour chaque lot.

D'après les résultats que nous avons obtenus, il apparaît que le lot de souris traitées avec le médicament (témoin positif) a présenté le nombre de contractions le plus faible (1 spasme par 10 minutes). En revanche, le lot traité avec l'eau physiologique (témoin négatif) a présenté le nombre de contractions le plus élevée (26 spasmes par 10 minutes). Concernant notre huile, le nombre de contractions est égal à 22 spasmes (figure 29).

Nous observons que l'HE à 0,5 ml a induit un pourcentage de protection égale à 16,69% par rapport à celui obtenu par le traitement à base du produit de référence (Spasfon ®) avec

96,15% et le témoin (0%) (Figure 30), ce qui explique que l'HE étudiée présente un pouvoir de protection modéré contre les douleurs provoquées chimiquement.

Selon [101, 102] les carbures monoterpéniques comme le camphène et cétones monoterpéniques comme Le Camphre agissent directement sur le système nerveux. Leur action peut aller jusqu'à une action anesthésique locale ou analgésique.

De plus, une étude malienne récente a estimé que la présence des carbures et des cétones monoterpéniques pourrait impliquer des activités biologiques intéressantes, notamment antiproliférative et antalgique. [103]

II.5. Test d'activité anti-inflammatoire in vivo

Du moment que, l'activité antalgique a nécessité une concentration de 500mg/ml pour avoir seulement 16.96% d'activité, et selon le nombre d'essais permis, nous avons utilisé, dès le départ, la concentration de 500mg/ml.

Après l'administration de l'eau physiologique, le produit de référence (Clofénal), et l'HE de *Rosmarinus officinalis* à des souris chez lesquelles, nous avons provoqué une inflammation, par l'injection de la carraghénine à 1%, dans la surface plantaire des pattes postérieure. Nous avons mesuré les poids des pattes postérieures en (g) chez les trois lots.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 14 et illustré par les histogrammes des figures 31.

Tableau 15: Résultats de l'activité anti-inflammatoire.

Témoin (Eau physiologique)		La référence (Clofénal)		Huile Essentielle	
Poids pattes gauches (g)	Poids pattes droites (g)	Poids pattes gauches (g)	Poids pattes droites (g)	Poids pattes gauches (g)	Poids pattes droites (g)
0,158	0,144	0,173	0,130	0,147	0,140
0,193	0,155	0,164	0,150	0,141	0,130
0,220	0,162	0,149	0,131	0,128	0,144
0,190	0,146	0,169	0,158	0,146	0,139
0,247	0,162	0,163	0,138	0,152	0,123
0,207	0,158	0,147	0,121	0,120	0,103
La moyenne =0,203	La moyenne =0,154	La moyenne =0,160	La moyenne =0,138	La moyenne =0,139	La moyenne =0,129

% d'œdème= 31,82%	% d'œdème=15,94%	% d'œdème=7,75%
	% de réduction de l'œdème =50%	% de réduction de l'œdème =75,64%

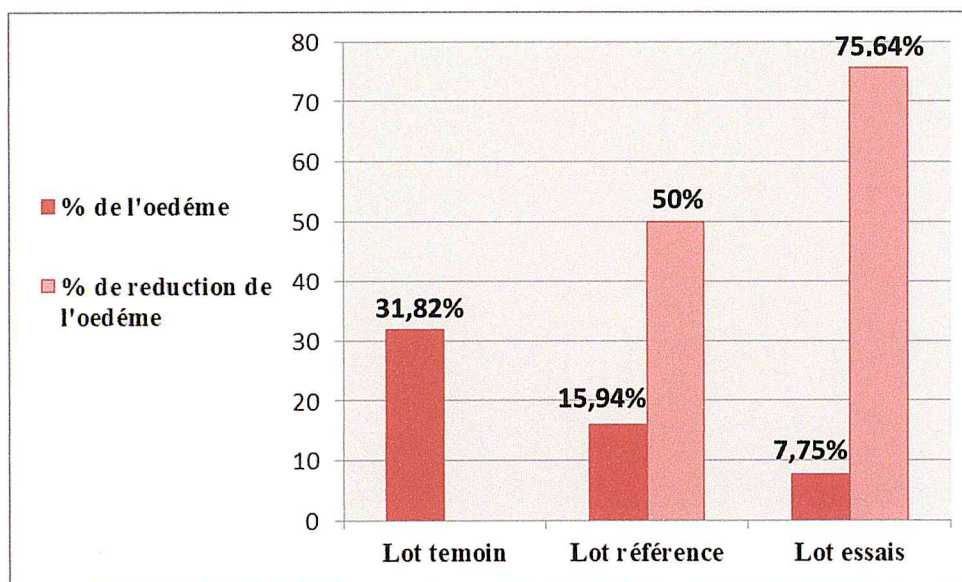


Figure 31 : Histogramme représentant le pourcentage d'augmentation de l'œdème et de réduction de l'œdème pour les trois lots traités : Lot Témoin, lot de référence, lot essais

L'administration par la voie orale de la carraghénine, entraîne une augmentation significative du pourcentage de l'augmentation du volume des pattes gauches par rapport aux pattes droites, des souris témoins, de groupe standard et celle de groupes traités par l'HE; après les 30min de l'expérimentation. Ce qui prouve bien que la carraghénine à induit une réaction inflammatoire engendrant un œdème.

Au cours de ce teste, nous avons constaté une diminution d'œdème (figure) chez les lots témoins, produits de référence (Clofénal), et l'HE de *Rosmarinus officinalis*, respectivement de 31,82%, 15,94% et de 7,75%, préalablement provoqués par l'injection de la carraghénine.

Dans les quatre heures qui ont suivi le traitement, nous avons remarqué que l'HE à 0,5ml a induit un taux de réduction d'œdèmes avec 75,64% pour l'HE. Ce taux est fortement supérieur à celui obtenu suite au traitement à base de Diclofénac®. En effet, ce dernier a provoqué une réduction d'œdèmes de 50% (figure 31).

Au regard de ces résultats, nous avons remarqué que l'HE de *R. officinalis* possède un effet anti-inflammatoire attribué à leur contenu en principe actif, en particulier les terpènes (les aldéhydes terpéniques comme le néral, le géranial). [104]

Dans le même volet, de nombreux travaux semblent indiquer que les dérivés triterpéniques (les esters) comme l'acétate de bornyle et les aldéhydes sont pourvus un bon pouvoir anti-inflammatoire. [105, 106]

Toutefois, il nous reste à déterminer la dose létale de notre huile essentielle, afin de pouvoir minimiser la concentration utilisée de notre huile.

Conclusion générale

À l'issue du présent travail qui représente une contribution à l'étude des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes de la plante médicinale de la flore Algérienne, *Rosmarinus officinalis*, de la région de Blida, nous sommes arrivés à des résultats qui nous ont permis de mettre en évidence l'activité biologique de l'huile essentielle de cette plante, obtenu par hydrodistillation du type Clevenger dont le rendement est de 0.63%.

En faisant appel à trois méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant on a pu trouver que :

Notre huile essentielle présente, selon la méthode du DPPH (piégeage des radicaux libres) un IC_{50} de 2,63mg/ml. Ce dernier, est seulement, deux fois plus petit que l' IC_{50} de l'antioxydant de synthèse BHA (1.44mg/ml).

Selon la méthode du blanchiment de la β -carotène, nous avons remarqué que le BHA présente une meilleure protection de la β -carotène, il est suivi par le BHT et l'huile essentielle. En comparant les activités antioxydantes du BHT (89.98%) et de l'huile essentielle (68.19%) nous avons observé que l'activité de ce dernier tend vers celle du BHT.

Concernant les résultats de la méthode FRAP (chélation des ions métalliques) elles sont en parfait accord avec les résultats des deux précédentes méthodes. Toutefois, on note que l'ordre de classement du pouvoir antioxydant, entre les antioxydants de synthèse BHA et BHT, et inversé en passant de la méthode du DPPH à celle du blanchiment de la β -carotène.

Le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a été mis en évidence par la méthode de l'aromatogramme. Nous avons testé cette dernière sur six micro-organismes à savoir *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aspergillus flavus* et *Candida Albicans*. On a constaté que notre huile a une activité antimicrobienne importante contre les souches *Pseudomonas* et *Escherichia coli*, (zone d'inhibition de 18mm et de 13mm respectivement), et de façon moins importante contre les souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus* (zone d'inhibition de 8mm et de 7mm respectivement). Ceci, confirme la présence majoritaire des monoterpènes oxygénés dans notre huile, et comme la stipule la littérature.

Aussi, notre HE possède une activité fortement inhibitrice contre les germes cibles *Candida Albicans* et *Aspergillus flavus* (zone d'inhibition de 30mm et de 20mm respectivement). Cette forte activité antifongique ne peut être due qu'à la même classe de composés cités précédemment.

En ce qui concerne l'activité pharmacologique, nous avons confirmé que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* possède un pouvoir anti-inflammatoire par le biais de la méthode de Levy. L'HE à 0,5ml (500mg/ml) a induit un taux de réduction d'œdèmes avec 75,64% pour L'HE. Il reste à tester des concentrations plus faibles.

De même, l'activité antalgique, de l'huile essentielle de romarin, a été évaluée par le dénombrement des crampes ou des contractions abdominales induites chez les souris par injection intrapéritonéale de l'acide acétique. L'HE à 0,5 ml a induit un pourcentage de protection égale à 16,69%. Ce taux reste modéré par rapport à celui du produit de référence (spasfon ®) avec 96,15%.

Références bibliographiques

[1]: Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de magister en chimie organique présenté par Hamidi Abdelrazeg .Université kasdi Merbah-Ourgla.promotion 2013.

[2]: Atik bekkara, F., Bousmaha, L., Taleb bendiab, S.A., Boti, J.B., Casanova J. "chimique de l'huile essentielle de Rosmarinus officinalis L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen". Biologie & Santé. 7: 6-11, 2007.

[3]: J.Paolini, (Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de corse .Discipline) .Chimie organique et analytique. (12-12-2005).

[1]: Pierre de Larochequet, « La Nature au service de la vie, les essences végétales naturelles », Paris, 2ème édition, 1999.

[2]: Lesley Bremness, « Les plantes aromatiques et médicinales », collection l'oeil nature, édition Bordas. Paris, 1996.

[3]: Oakes R. S., Clifford A. A., Rayner C. M. "The use of supercritical fluids in synthetic organic chemistry ", J. Chem. Soc. 1, 917-941, 2001

[4]: Angus S., Amstronng B., de Reuck K. M., "International thermodynamic table of the fluid state: carbon dioxide", vol. 3, IUPAC, Pergamon Press, Oxford, 1976.

[5]: Eckert C. A., Knutson B. L." Molecular charisma in supercritical fluids. Fluid Phase Equilibria" , 83, 93-100, 1993.

[6]: Luque de Castro M.D., Valcarcel M., Tena M.T., in Analytical supercritical fluid extraction. Springer laboratory, Berlin, p 321 (1994).

[7]: Jitaru M., Lowy D. A., Toma M., Toma B. C., Oniciu L." Electrochemical reduction of carbon dioxide on flat metallic cathodes", Journal of Applied Electrochemistry.875-989, 27, 1997.

[8]: BRUNETON, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, techniques et documentation ,2ème édition .Lavoisier(France) ,422-266, (1993).

[9]: BEKHCHILC, ABDELOUAHID.D. "Les huiles essentielles, Edition office des publications universitaires". 2010. BRUNETON.J. Pharmaconiosie, phytochimie , plantes médicinales. Ed. Tec & Doc. ; p: 461-769. 1999

[10]: Afssaps 2008 Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles.

[11]: ROUX, RONALD. L. PRIOR, XIANLI .WU, AND KAREN. Conseil en aromathérapie. 2ème Edition : Pro- Officina : (31, 14, 15) pp. 2008. SCHAICH. "Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements", J. Agric. Food Chem. 53, 4290-4302, 2005.

[12]: Shama HMIRI1, Mouhamed RAHOUTI, Zakaria HABIB, Bader SATRANI, Mouhamed GHANMI et Mustapha el AJJOURI –"évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles de Mentha Pulegium et d'eucalyptus Camaldulensis dans la lutte

Références bibliographiques

biologique contre les champignons responsable de la détérioration des pomme en conservation bulletin de la société royale des sciences de liège" , vol 80,p.824-836,2011.

[13]: Dorman H.J.D. et al, "Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatil oil, Journal of applied Microbiology", 88: 308-316, 2000.

[14]: MOLEYER V. and NARASIMHAM P; "Antifungal activity of some essential oil components, Food Microbiology", 3,331-336, 1986,

[15]: SOLIMAN K .M. and BADEAA R.I., «effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi", FOOD Chem Toxicol, 40, 1669-1675,2002.

[16]: JAZET DONGMO P.M., TATSADJIUE L.N., TCHINDA SONWA E., KUATE J., AMVAM ZOLLO P.H., and MENUT C., "Essential oil of Citrus aurantifolia from Cameroon and their antifungal activity against Phaeoramularia angolensis", African Journal of Agricultural Research, 4(4), 354-358, 2009.

[17]: BOURKHISS M., HANACH M., BOURKHISS B., OUHSSIN M., et CHOUCHE A, "composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de Tetraclinis articulata (Vahl) du Maroc. Afrique science", 3 (2), 232-242, 2007.

[18]:MAGINAM.D.A ., DALMARCO E.M., WISNIEWSKI A.,SIMIONATTO E.L., DALMARCO J.B., PIZZOLATTI M.G., and BRIGHENTE I.M.C., (2009), chemical "composition and antibacterial activity of essential oils of Eugenia specie"s, J. Nat. Med., 63,345-350, (2009) .

[19]: BOUZOUITA N., KACHOURI F., BEN HALIMA M. et CHARBOUNI M.M. "composition chimique et activités antioxydants, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de Juniperus phoenicea", J. Soc. Chim. Tunis., 10,119-125, (2008).

[20]: ERLER F., ULUG I., and YALCINKAYA B. "Repellent activity of essential oils against Culex pipiens, Fitoterapia", 77, 491-494, (2006).

[21]: TANG G.W., YANG C.G., and XIE L.D., "Extraction of Trigonella foenum-gracum L. by supercritical fluid CO₂ and its contact toxicity to Rhyzopertha dominica (fabricius) (coleopteran: Bostrichidae)", J. Pest. Sci , 80,151-157., (2007).

[22]: CHENG S., HUANG C., CHEN Y., YU J., CHAN W., and CHANG S., (2009), "chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species", Bioresour Technol, 100, 452-456; (2009).

[23]: Pauli, A." Antimicrobial properties of essential oil constituent. Int. J. Aromather". 11,126-133. 2001

[24]: Fabian, D., Sabol, M., Damaraské, K., Bujnékova, D. "Essential oils – their antimicrobial activity against Escherichia coli and effect on intestinal cell viability". Toxicol in vitro 20, 1435-1445; 2006.

Références bibliographiques

- [25]: Onawunmi G.O. et al, "antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf, *J. Ethnopharmacol*", 12(3): 279-86; Dec1984
- [26]: Burt, S. "Essential oils: their antibacterial properties and potential application in food a review. *Int. J. food Microbiol*". 94,223-253; 2004.
- [27]: N. Kurita., M. Miyaji, R. Kurane., Y.Takahara. "Antifungal activity of components of essential oils. *Agric. Biol. Chem*". 45 (4), 945; 1981.
- [28]: N. Kurita., M. Miyaji., R. Kurane., Y.Takahara., K. Ichimura. "antimicrobial activity of dalmatian sag oil from differents regions of the Yugoslav Adriatic coas"t. *Agric. Biol. Chem* 43 (11), 2365; 1979
- [29]: PARIS, M, HURABIELLE, M. "Abrégé de matière médicale (pharmacognosie)", Tonnel.Ed.Masson (Paris ,New York). 259. Lavoisier(France).1981.
- [30]: Franchomme, P.; Pénoël, D. "L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles". Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p; 1990.
- [31]: IQBAL A., FARRUKH A. & MOHAMMAD O., "Modern phytomedecine, turning Medicinal Plants into drugs". Edition: WILEY VCH: 360 p; 2006.
- [32]: Mengel, P.; Beh, D.; Bellido, G.M.; Monpon, B. VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums Cosmétiques Arômes* 114, 66-67 ; 1993.
- [33]: Bendahou, M.; Muselli, A.; Grignon-Dubois, M.; Benyoucef, M.; Desjobert, J.M.; Bernardini, J.F.; Costa, J. "Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation". *Food Chem.* 106,132-139; 2007
- [34]: Lucchesi, M.E.; Smadja, J.; Bradshaw, S.; Louw, W.; Chemat, F. 2007. "Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil". *J. Food Engineer.* 79, 1079- 1086.
- [35]: Lucchesi, M.E.; Chemat, F.; Smadja, J. "Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation". *J. Chromatogr. A* 1043, 323-327; 2004.
- [36]: Chemat, F.; Lucchesi, M.E.; Smadja, J.; Favretto, L; Colnaghi, G.; Visinoni, F. "Microwave accelarated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach". *Anal. Chim. Acta* 555,157-160; 2006
- [37]: Flamini, G.; Tebano, M.; Cioni, P.L; Ceccarini, L; Ricci, A.S.; Longo, I. "Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Lauras nobilis*. L and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven". *J. Chromatogr. A* 1143, 36-40 ; 2007.
- [38]: Robert, G. "Les Sens du Parfum". Osman Erolyle MultiMedia Paris.224p. 2000.

Références bibliographiques

- [39]: Proust, B. "Petite Géométrie des Parfums". Éditions du Seuil. Paris. 126p, 2006.
- [40]: PBruneton, J. Pharmacognosie. "Phytochimie des plantes médicinales". 2eme édition. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 915 p ; 1999.
- [41]: Pellerin, P. "Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour and perfume industry". *Perfum. Flavor.* 16,4, 37-39. 1991.
- [42]: Richard, H. "Épices et Aromates" Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339 p; 1992.
- [43]: Wenqtang, G.; Shufen, L.; Ruixiang, Y.; Shaokun, T.; Can, Q. "Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods". *Food chem.* 1001, 1558-1564; 2007.
- [44]: 2008.L'encyclopédie libre (enligne).
- [45]: Ibañez E., Kubátová A., Señoráns F. J., Cavero S., Reglero G. et Hawthorne S. B. "Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosmariny Plants". *Journal of Agricultural and Food Chem.*, 51 (2): 375-382; 2003.
- [46]: Thèse présentée à l'université aboubaker belkaid faculté des sciences laboratoires produits naturels par MR Makhloufi Ahmed pour obtenir le grade de doctorat d'état en biologie.
- [47]: Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto K. ET Y a g h i A. "Flavonoids in Rosmarinus officinalis leaves. *Phytochemistry*", 37 (5): 1463-1466; 1994.
- [48]: Yang R. Y., Lin S. et Kuo G. "Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species". *Asia of pacific journal of clinical nutrition.* 17 (S1): 275-279.008.
- [49]: Bellakhdar, J. "La pharmacopée marocaine traditionnelle". Ibis Press (Ed). Paris,764 p. (1997)
- [50]: Beloued, A. "Plantes médicinales d'Algérie". 2ème Edition. Office des publications universitaires (Ed). Alger, 274p.1998
- [51]: Gonzalez-Trujano, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M., Lopez-Munoz,F.J. "Evaluation of the antinociceptive effect of Rosmarinus officinalis L. using three different experimental models in rodents". *J Ethnopharmacol.* 111: 476-482. 2007
- [52]: Lemonica I. P., Damasceno D. C. et Di-Stasi L. C. "Study of the embryo toxic effects of an extract of Rosmary (Rosmarinus officinalis)". *Brazilian journal of medical and biological research.* 29 (2): 223-227.1996.
- [53]: Ibañez E., Cifuentes A., Crego A. L., Señoráns F. J., Cavero S. et Reglero G. "Combined use of supercritical fluid extraction, Micellar electrokinetic chromatography and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from

Références bibliographiques

Rosmary (*Rosmarinus officinalis* L)". *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 48 (9): 4060-4065.

[54]: Cheung S. ET Tai J. 2007. "Anti-proliferative and antioxidant properties of rosmarinic acid in *Rosmarinus officinalis*". *Oncotherapy reports*. 17 (6): 1525-1531.2007

[55]: Singletary K.W. et Nelshopen J.M. "Inhibition of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) induced mammary tumorigenesis and of in vivo formation of mammary DMBA-DNA adducts by rosemary extract". *Cancer letters*. 60 (2) : 169-175.1991.

[56]: Huang M. T., Ho C. T., Wang Z. Y., Ferraro T., Lou Y. R., Stanber K., Ma W., Hoffman L., Besseau S., Geoffroy P., Rizenthaler C., Meyer D., Lepierre C., Pollet B. et Legrand M. "Silencing of Hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis". *Plant cell*. 16 (4): 1446-1465.1994

[57]: Offord E. A., Macé K., Ruffieux C., Malnoë A. ET Pfeifer A. M. "Rosmarinic acid inhibits benzo [a] pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis*". 16 (9): 2057-2062; 1995.

[58]: Aruoma O. I., Spencer J. P., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A., Butler J. et Halliwell B. "An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosmarinic acid and provençal herb". *Food and Chemical Toxicology* 34 (5):456.1996.

[59]: Paris A., Strukelj B., Renko M., Turk V., Pukl M., Umek A. et Korant B. D. "Inhibition effects of rosmarinic acid on HIV-1 protease in cell free assays". *Journal of natural products*. 56 (8): 1426-1430.1993.

[60]: Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M. "Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences". *J Ethnopharmacol*.107: 157-160.2006.

[61]: Bakirel, T., Bakirel, U., Ustuner Keles, O., Gunes Ulgen, S., Yardibi, H. "In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits". *J Ethnopharmacol*. 116: 64-73.2008.

[62]: Arnold, N., Valentini, G., Bellomaria, B., Laouer, H. "Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. From Algeria and *R. Officinallis* L. from other countries". *J.essent.Oil Res*. 9: 167-175.1997.

[63]: Poletti, A. (1988) "Fleurs et plantes médicinales". 2ème Edition. Delachaux & Niestlé (Ed). Paris, 222p.

[64]: Soyal, D ., J i n d a l , A ., S i n g h , I., Goyal, P.K. "Modulation of radiation - induced biochemical alterations in mice by rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract".*Phytomedicine*.14: 701-705. 2007.

Références bibliographiques

- [65]: NKHILI, Ez-Z. "Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du fer et du cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant". Thèse de Doctorat : Université de CADI AYYAD – MARRAKECH. (2009).
- [66]: Christophe, P. & Christophe S. (2011). "Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain". Edition Springer, p 84. 2011.
- [67]: Papazian, L. & Roch, A. (2008). "Le syndrome de détresse respiratoire aiguë", Edition Springer, p 153.2008.
- [68]: Goudable, J. & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants". Nutrition Clinique et Métabolisme 11,115-120. 1997.
- [69]: Edeas, M. "Les secrets de santé du thé : c'est naturel, c'est ma santé. Alpen Editions s.a.m., p 18.2005.
- [70]:Ichai, C., Quintard, H. & Orban, J.-C." Désordres métaboliques et réanimation : de la physiopathologie au traitement", Edition Springer, p 427.2011.
- [71]: Hadj Salem, J. "Extraction, Identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique". Thèse de Doctorat : Université de LORRAINE.2009.
- [72]: Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M.-P., Hasselmann, M. & Leverve, X. "Traité de nutrition artificielle de l'adulte". Edition Springer, p 255.2006.
- [73]: Pelletier, E., Campbell, P. G. C. & Denizeau, F. "Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement". Edition PUQ, p 182.2004
- [74]: Droillard, M.-J. & Paulin, A. (1990). "Isozymes of Superoxide Dismutase in Mitochondria and Peroxisomes Isolated from Petals of Carnation (*Dianthus caryophyllus*) during Senescence". Plant Physiology 94 (3), 1187-1192.
- [75]: Arisi, A.-C. M., Cornic, G., Jouanin, L. & Foyer, C. H. (1998). "Overexpression of iron superoxide dismutase in transformed poplar modifies the regulation of photosynthesis at low CO₂ partial pressures or following exposure to the prooxidant herbicide methyl viologen". Plant Physiology 117 (2), 565-574.
- [76]: Yoshimoto, M., Sakamoto, H., Yoshimoto, N., Kuboi, R. & Nakao, K. (2007). "Stabilization of quaternary structure and activity of bovine liver : Catalase through encapsulation in liposomes". Enzyme and Microbial Technology 41, 849–858.
- [77]: Nicholls, P. (2012). Classical catalase: "Ancient and modern". Archives of Biochemistry and Biophysics 525, 95–101.
- [78]: Bédane, C. (2008). Photodermatologie : "Photobiologie cutanée, photoprotection et photothérapie. Edition Wolters Kluwer France, p 20.

Références bibliographiques

- [79]: Lee, C. Y., Sharma, A., Cheong, J. E. & Nelson, J. L. (2009). "Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenols" . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 6326-6330.
- [80]: Laughton, M. J., Halliwell, B., Evans, P. J., Robin, J. & Houlst, S. (1989). "Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin". *Biochemical Pharmacology* 38 (17), 2859-2865.
- [81]: Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I. & Özyurt, D. (2007). "Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay". *Molecules* 12, 1496-1547.
- [82]: Boudon, C. (2001). "Traite(c) de nutrition artificielle de l'adulte". Edition Springer, p 238.
- [83]: Sökmen, B. B., Aydın, S. & Kınalıoğlu, K. (2012). "Antioxidant and antibacterial properties of a lichen species" *Diploschistes scruposus* (Schreb.) Norman. *IUFS Journal of Biology* 71(1), 43-51.
- [84]: BEGUM.J, NAZRUL.M, BHUIYAN.I, UDDIN.J.C, NUZMUL.M. HOQUE and NURAL.M,A 2008."Antimicrobial Activity of Essential Oil from Seeds of *Carum carvi* and Its Composition.*Bangladesh J Microbiol*", Volume 25, Number 2, December 2008, pp 85-89
- [85]: BOUROUF.A, LOUAILECHE.H, BEY MOSTEPHA.B et MOUHOUBI.Z., 2009 "Activités antioxydante et anti-radicalaire d'extraits aqueux de quatre herbes aromatiques".
- [86]: POPVICI.C, SAYKOVA.I, TYLKOWSKI.B. 2009 "Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH" ; *Revue de génie industriel* 2009, 4, 25-39.
- [87]: MOLYNEUX.P. S .2004 "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity". *J. Sci. Technol.* Vol. 26 No. 2 Mar.-Apr. 2004.
- [88]: Bougandoura N. Bendimerad N,(2012). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanoliques de *Satureja Calamintha* ssp. *Nature et technologie* .p 14-19.
- [89]: CILLARD. 2007 "le pole de compétitivité agroalimentaire en Bretagne les antioxydants sont-ils nos alliés santé ? Interview du Professeur Josiane". *lettre nutrition santé* juin 2007 /N°6.
- [90]: LAGUERRE.M, LÓPEZ-GIRALDO 2007. "Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante, *oclvol*". 14 n° 5 septembre-octobre 2007, P283.
- [91]: BOURKHISS.M, HNACH.M, PAOLINI.J ², COSTA.J ², FARAH.A et SATRANI. B. 2010 *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 79,p. 141 – 154. "Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *tetraclinis articulata*(vahl) masters du maroc".
- [92]: Pharmacopée Européenne., 2002. Conseil de l'Europe. 3ème édition. Paris.

Références bibliographiques

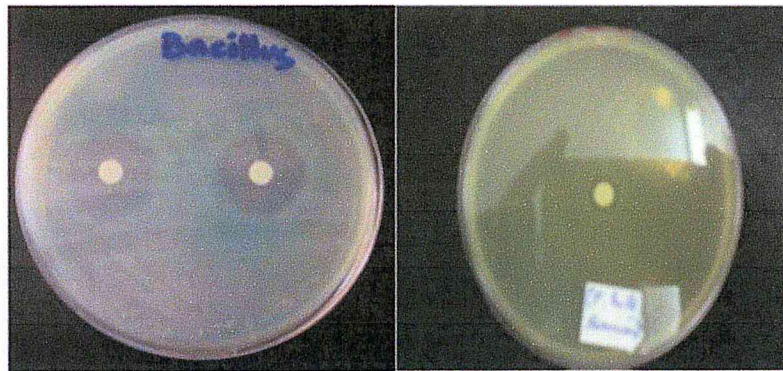
- [93]: Mutai C., Bii C., Vagias C., Abatis D et Roussis V., 2009. "Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and Lupane triterpenes"- *Journal of Ethnopharmacology*. doi: 10.1016/j.jep.02.007.
- [94]: Berkan T., Ostunes I., Iermiolu F et Ozer A., 1991: "Anti-inflammatory analgesic and antipyretic effects of an aqueous extract of *neute, planta medical*", pp: 375.
- [95]: K.J.Naidoo, J.Chen,J.L.M.Jansson, G.Wildmalm, A.Maliak, *J.Phys.Chem B*, 2004, 108, 4236.
- [96]: Ouédraogo N, Lompo M, Sawadogo RW, Tibiri A, Hay AE, Koudou J, Guissou IP., 2012. "Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *PterocarpuserinaceusPoir.(Fabaceae)*". *Phytothérapie*, 10(5), pp: 286-292.
- [97]: AFNOR, (1992) : Recueil des normes françaises ; huiles essentielles.
- [98]: SKOCIBUSIC M., Bezic, N.,Dunkic, V., (2006) : *Food Chem.*, (96),20-28.
- [99]: Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M., 2010. "Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis L.* varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities". *Food Chem. Toxicol.* 48, 3144–3152.
- [100]: Cavaleiro C, Pinto E, Gonçalves MJ, Salgueiro L. "Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains". *J Appl Microbiol* 2006;100:1333—8.
- [101]: Bennett, A., Kenneth, G., Stockely, E., Stockely, H.L., 1975. "Modulation by prostaglandins of contractions in guinea pig ileum". *Prostaglandins* 9, 377–384.
- [102]: Nakahata, N., Ono, T., Nakanishiet, H., 1984. "Possible involvement of a product of the 5-lipoxygenase pathway in mediation of indomethacin induced inhibition of cholinergic transmission in guinea pig ileum". *European Journal of Pharmacology* 104, 133–138.
- [103]: Moss, M., Cook, J., Wesnes, K., Duckett, P., 2003. "Aromas of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults". *International Journal of Neuroscience* 113, 15–38.
- [104]: Altinier G, Sosa S, Aquino RP, Mencherini T, Della Loggia R, Tubero A. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis L.* *J Agric Food Chem* 2007;55:1718—23.
- [105]: Al-Sereiti, M.R., Abu-Amer, K.M., Sen, P., 1999. "Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis Linn.*) and its therapeutic potentials". *Indian Journal of Experimental Biology* 3, 124–130.
- [106]: Aqel, M.B., 1991. "Relaxant effect of the volatile oil of *Rosmarinus officinalis* on tracheal smooth muscle". *Journal of Ethnopharmacology* 33, 57–62.

Annexes



Escherichia Coli

Staphylococcus Aureus

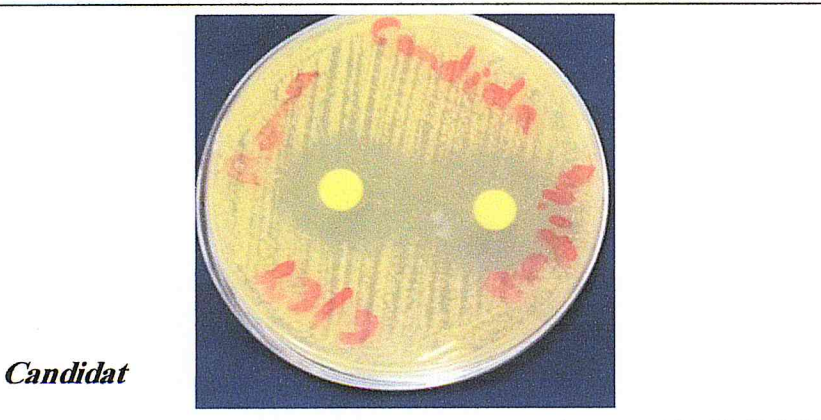


Bacillus

Pseudomonas aeruginosa



Aspergillus flavus



Candidat

Aromatogrammes des bactéries testées avec notre huile essentielle