

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahlab - Blida 1-



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Biotechnologies

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Spécialité : Agro-ressources et impact environnement

Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**

Thème :

**Effet comparatif de l'extrait méthanolique sur l'activité antimicrobienne du
romarin *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Blida**

Soutenu le 11/10/2017

Présenté par :

Somia HOCEINI

Devant le jury:

M^{me} Cherifa	CHAOUIA	MCA	USDB1	Président
M^r Mabrouk	BENMOUSSA	Professeur	USDB1	Examineur
M^{me} F/Z	BENREBIHA	Professeur	USDB1	Promotrice
M^{me} Yamina	MOUAS	Doctorante	USDB1	Co-Promotrice

Année Universitaire 2016-2017

Sommaire

Remerciements	
Résumés	
Glossaire	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Rosmarinus officinalis L.

I. Romarin (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>).....	2
I.1. Classification du Romarin.....	2
I.2. Description botanique.....	2
I.3. Répartition géographique du Romarin.....	4
I.4. Production mondiale.....	4
I.5. Composition biochimique du Romarin.....	4
I.6. Principes actifs du Romarin.....	5
I.6.1. Les acides phénoliques.....	5
I.6.2. Les flavonoïdes.....	5
I.6.3. L'huile essentielle.....	5
I.7. Domaine d'utilisation de la plante.....	6
I.7.1. Industrie agro-alimentaire.....	6
I.7.2. Industrie cosmétique et parfumerie.....	6
I.7.3. La thérapie.....	6
I.8. Propriétés du Romarin.....	7

Chapitre II

Activités Biologiques

II.1. Activité antimicrobienne.....	11
II.2. Activité antioxydante.....	13

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre III

Matériel et méthodes

III.1. Lieux d'expérimentation.....	19
III.2. Présentation de la région d'étude.....	19
III.3. Matériel.....	21
III.3.1. Matériel végétal.....	21
III.3.2. Matériel microbiologique.....	22
III.4. Méthodes.....	24
III.4.1. Préparation des extraits méthanoliques.....	24
III.4.2. Etude de l'activité antimicrobienne.....	25
III.4.3. Etude de l'activité anti-oxydante.....	28
III.4.3.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH.....	28

Chapitre IV

Résultats et discussion

IV.1. Résultats de l'activité antimicrobienne.....	31
IV.2. Discussion de l'activité antimicrobienne.....	38
IV.3. Résultats de l'activité antioxydante.....	40
IV.4. Discussion de l'activité antioxydante.....	46
Conclusion.....	48

Références bibliographiques

Remerciements

Avant tout je remercie Dieu « ALLAH » le tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce travail.

Tout d'abord je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à ma promotrice Madame BENREBIHA F.Z. professeur à l'université Blida 1, département des Biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour ses conseils, ses commentaires et sa bienveillance. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Je remercie également ma Co-promotrice Madame MOUAS Y, Doctorante à l'université Blida 1, département des Biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie pour m'avoir guidée et aidée tout au long de la réalisation de ce mémoire, sa patience, ses orientations et ses conseils judicieux qui m'ont éclairé.

Je remercie Mme CHAOUIA C pour son aide et pour avoir bien voulu présider le jury et examiner ce travail.

Je remercie Monsieur BENMOUSSA d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime mes plus sincères remerciements aux membres de jury qu'ils ont accepté de participer au jury de ma soutenance. Aussi je leur suis reconnaissante de m'avoir accordé de leur temps.

Mes vifs remerciements sont adressés à Monsieur DJAZOULI pour ses précieux conseils.

Mes vives reconnaissances envers tout le personnel du laboratoire d'hygiène de Blida, en particulier Monsieur Djamel et Mme Selma. Ils trouvent ici le témoignage de notre reconnaissance et notre obligeance pour toute l'aide fournie à la réalisation des analyses microbiologiques.

Ma gratitude est exprimée en particulier envers Monsieur BENMAALAM pour ses orientations et ses conseils.

Je remercie de tout mon cœur Mme Chafika pour toute l'aide fournie à la réalisation de l'activité antioxydante et de m'avoir soutenu dans les bons moments, comme dans les périodes de découragement.

Mes remerciements sont adressés, à tous nos enseignants, qui nous ont donné les bases de la science.

Je tiens à exprimer mes sincères gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à tous.

Enfin, ne pouvant citer tous ceux et celles qui m'ont été d'un apport petit ou grand, je leur adresse mes remerciements les plus sincères.

Dédicaces

A mes très chers parents.

Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous porte.

Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices et vos encouragements.

Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation.

A mon unique et adorable sœur LAMIA.

A mon cher frère NASSIM et sa merveilleuse femme Djoher.

A mon aimable frère AMINE.

Pour leur soutien et encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.

A mon cher Epoux.

Pour son soutien quotidien indéfectible, ses encouragements, son dévouement et son appui à toutes mes entreprises.

A ma belle famille

A tous mes amies

Avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.

Somia

Le don d'une plante utile me parait plus précieux que la découverte d'une mine d'or, et un monument plus durable qu'une pyramide.

Bernardin de Saint-Pierre

Voyage à l'île de France, p.58,

Résumé

Le présent travail a pour objectif de tester l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé et d'évaluer l'activité anti-oxydante par le biais du test de piégeage du radical libre diphénylpicrylhydrazyl (DPPH), des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* L. des trois saisons automnale, hivernale et printanière de la région de Blida..

L'activité antimicrobienne a été étudiée vis-à-vis quatre souches microbiennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Les souches testées se sont révélées plus ou moins sensibles aux extraits méthanoliques étudiés.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques du *Rosmarinus officinalis* L. sur des souches (Gram+, Gram⁻) et un champignon (*Candida albicans*) a montré un effet antibactérien surtout sur les souches bactériennes Gram⁺ (*Staphylococcus aureus*) avec la dilution 1/16 : (11mm) dans la saison automnale, (13mm) dans la saison hivernale et (15mm) dans la saison printanière et avec la dilution 1/8 : (12mm), (14mm), (17mm) dans les saisons automnale, hivernale et printanière respectivement et s'est montré non sensible sur *Escherichia coli* avec la dilution 1/16 : (6,5mm) en automne, (7mm) en hiver et (8mm) au printemps, et avec la dilution 1/8 : (7mm) en automne, (8mm) en hiver, il s'est montré sensible au printemps (10mm). Il s'est révélé inactif sur *Pseudomonas aeruginosa* (6mm) et *Candida albicans* (6mm) dans toutes les trois saisons.

Dans le test au DPPH, les résultats ont montré que les extraits méthanoliques testés ont montré une activité antioxydante moins comparées à l'antioxydant de référence (acide ascorbique) (IC₅₀=0.134mg/ml) et que l'extrait méthanolique du romarin récolté au printemps est l'antioxydant le plus efficace (IC₅₀=1.423mg/ml), suivi par celui de l'hiver (IC₅₀=1.821mg/ml) et enfin celui d'automne (IC₅₀=2.64mg/ml).

Mots clés : *Rosmarinus officinalis* L., extrait méthanolique, activité antimicrobienne, activité anti-oxydante, saison, diphénylpicrylhydrazyl (DPPH), IC₅₀.

Abstract

The aim of this work is to test the antimicrobial activity by the diffusion method in agar medium and to evaluate the antioxidant activity by means of the test of trapping of the free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), the methanolic extracts of *Rosmarinus officinalis* L. of the three seasons fall, winter and spring of the region of Blida.

The antimicrobial activity was studied against four microbial strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The strains tested were found to be more or less sensitive to the methanol extracts studied.

Evaluation of the antimicrobial activity of methanolic extracts of *Rosmarinus officinalis* L. on strains (Gram +, Gram-) and a fungus (*Candida albicans*) showed an antibacterial effect especially on Gram + (*Staphylococcus aureus*) bacterial strains with dilution 1/16: (11mm) in the autumn season, (13mm) in the winter season and (15mm) in the spring season and with dilution 1/8: (12mm), (14mm) , winter and spring respectively and was not sensitive on *Escherichia coli* with 1/16: (6.5mm) dilution in autumn, (7mm) in winter and (8mm) in spring, and with dilution 1/8: (7mm) in autumn, (8mm) in winter, it was sensitive to spring (10mm). It was found to be inactive on *Pseudomonas aeruginosa* (6mm) and *Candida albicans* (6mm) in all three seasons. In the DPPH test, the results showed that the methanolic extracts tested showed less antioxidant activity compared to the reference antioxidant (ascorbic acid) ($IC_{50} = 0.134\text{mg / ml}$) and that the methanolic extract of rosemary harvested in spring is the most effective antioxidant ($IC_{50} = 1.423\text{mg / ml}$), followed by that of winter ($IC_{50} = 1.821\text{mg / ml}$) and finally that of autumn ($IC_{50} = 2.64\text{mg / ml}$).

Keywords: *Rosmarinus officinalis* Methanol extract, antimicrobial activity, antioxidant activity, season, diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), IC_{50} .

ملخص

الهدف من هذا العمل هو اختبار النشاط المضاد للميكروبات بواسطة نشر أجار وتقييم النشاط المضاد للأوكسدة من خلال اختبار عزل diphenylpicrylhydrazyl الجذور الحرة (DPPH) ، على مستخلصات الميثانول لإكليل الجبل *L. Rosmarinus officinalis* للفصول الثلاثة الخريف، الشتاء والربيع لمنطقة البلدية .
تم دراسة النشاط البكتيري لأربع سلالات ميكروبية : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. *Staphylococcus aureus*. تم العثور على سلالات اختبار أكثر أو أقل حساسية لمستخلصات الميثانول.

تقييم نشاط مضادات الميكروبات من مستخلصات الميثانول لإكليل الجبل أظهر على سلالات (+غرام - غرام) والفطريات تأثير مضاد للجراثيم وخاصة في (غرام +) (*Staphylococcus aureus*) مع تخفيف 1/16 : (11mm) في فصل الخريف، (13mm) في فصل الشتاء و(15mm) في موسم الربيع و مع تخفيف 8/1 : (12mm) و(14mm) و (17mm) في موسم الخريف والشتاء والربيع على التوالي ولم يظهر أي حساسية ضد *Escherichia coli* مع تخفيف 16/1 : (6.5mm) في الخريف و(7mm) في الشتاء و (8mm) في فصل الربيع، ومع تخفيف 8/1 : (7mm) في الخريف، (8mm) في فصل الشتاء، وكان حساسا في الربيع (10mm) .

وجد أنه غير نشط على *Pseudomonas aeruginosa* (6mm) و *Candida albicans* (6mm) في جميع الفصول الثلاثة.

في اختبار DPPH، أظهرت النتائج أن المستخلصات الميثانولية التي تم اختبارها أظهرت نشاطا مضادا للأوكسدة أقل بالمقارنة مع مضادات الأوكسدة المرجعية (حمض الاسكوربيك) ($IC_{50} = 0.134mg$) وأن مستخلص الميثانول لإكليل الجبل *L. Rosmarinus Officinalis* لفصل الربيع هو مضاد الأوكسدة الأكثر فعالية ($IC_{50} = 1.423mg/ml$)، تليها الشتاء ($IC_{50} = 1.821mg/ml$) وأخيرا الخريف ($IC_{50} = 2.64mg/ml$).

الكلمات المفتاحية : *Rosmarinus officinalis L.* ، مستخلصات الميثانول ، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط المضاد للأوكسدة، موسم، DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) ، IC_{50} .

GLOSSAIRE

Analgésique : apaise ou supprime la douleur.

Antispasmodique : cesse les spasmes, contractions involontaires des muscles et des organes, d'origines nerveuse.

Arbrisseau : plante ligneuse haute de 3 à 5 mètres.

Arbuste : plante ligneuse haute de 1 à 3 mètres.

Asthénie : dépression de l'état général.

Astringent : qui diminue les sécrétions et favorise les cicatrisations.

Antibactérien : Inhibe et détruit les bactéries.

Antidiabétique : Protège contre le diabète.

Antifongique : Actif contre les champignons et les levures.

Anti-inflammatoire : Qui combat les inflammations.

Antimicrobien : Inhibe et détruit les microbes.

Antimutagène : S'oppose aux substances susceptibles d'introduire des mutations.

Antioxydant : Permet aux aliments de résister à l'oxydation et à une détérioration graduelle.

Antiparasitaire : Qui détruit les parasites.

Antiproliférative : Empêche la prolifération d'un phénomène.

Antiseptique : Détruit les microbes et empêche leur développement.

Antispasmodique : Fait baisser la tension et soulage les spasmes musculaires.

Anti-tumorigène : S'oppose aux cellules susceptibles de dégénérer en tumeurs

Cholagogue : facilite l'évacuation des voies biliaires, action bénéfique pour le foie et le tube digestif.

Cholérétique : augmente la sécrétion biliaire.

Diurétique : qui augmente le volume urinaire et l'élimination des chlorures, du sodium.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARP : Pouvoir antiradicalaire

ATCC : American type culture collection=collection américaine des cultures type.

CI₅₀ : Concentration inhibitrice 50%

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

DPPH : 2, 2 diphenyl-1-picrylhydrazyl

MeOH : Méthanol

OMS : organisation mondial de santé

P : Pluviométrie

PAM : Plante Aromatique et Médicinale

UFC : Unité formant colonie

UV : Ultraviolet

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Vue général de l'étendu de romarin.....	03
Figure 02 : Fleurs du romarin	03
Figure 03 : Feuilles lancéolés du romarin.....	03
Figure 04 : Carte de Blida.....	19
Figure 05 : Climatogramme d'Emerger de Blida (1996-2005).....	23
Figure 06 : <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	24
Figure 07 : la méthode d'aromatogramme sur boite de Pétri.....	26
Figure 08 : Structure chimique du radical libre DPPH (2,2 Diphenyle-1-PicrylHydrazyle).....	28
Figure 09 : Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl).....	29
Figure 10 : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des souches d'automne (Dilution 1/16).....	32
Figure 11 : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des souches d'automne (Dilution 1/8).....	32
Figure 12 : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des souches de la saison hivernale (Dilution 1/16).....	33
Figure 13 : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des souches de la saison hivernale (Dilution 1/8).....	34
Figure 14 : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des souches de la saison printanière (Dilution 1/16).....	35
Figure 15 : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des souches de la saison printanière (Dilution 1/8).....	35
Figure 16 : Activité inhibitrice de l'extrait méthanolique de romarin à EMC1.....	36
Figure 17 : Activité inhibitrice de l'extrait méthanolique de romarin à EMC2.....	37
Figure 18 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'Acide Ascorbique.....	41
Figure 19 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la saison de l'automne.....	42
Figure 20 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la saison d'hiver.....	42
Figure 21 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la saison de printemps.....	43

Figure 22 : pourcentage d'inhibition des trois extraits méthanoliques comparés à l'acide ascorbique.....	43
Figure 23 : La concentration inhibant 50 % de la réaction.....	46

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 : Les diamètres d'inhibition et leurs degrés de sensibilités.....	27
Tableau 02 : Résultats de l'aromatogramme.....	31
Tableau 03 : Valeurs des IC ₅₀ et le pouvoir de l'acide ascorbique et l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	45

Références bibliographiques

Adersen, A., Gauguin, B., Gudiksen, L., Jager, A K. (2006) Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol.* 104: 418-422.

Almela, L., Sanchez-Munoz, B., Fernandez-Lopez, J A., Roca, M.J, Rabe, V. (2006) Liquid chromatographic- mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J Chromatography A.* **1120**: 221-229.

Anonyme, 2003. Broad spectrum antimycotic drug for the treatment of ringworm infection in hyman beings. 85(1), 30-34.

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

ATHAMENA S., CHALGHEM I., KASSAH-LAOUAR A., LAROUI S., KHEBRI S., 2010. Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L.* Lebanese Science Journal. Vol 11 (1):72p.

Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. (2000) Bactériologie clinique. 3ème édition Ellipses (Ed) Paris, 602 p.

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

Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W. (2006) The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science.* 73: 413-421.

Bellakhdar, J. (1997) La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis Press (Ed). Paris, 764 p.

Beloued, A. (1998) Plantes médicinales d'Algérie. 2ème Edition. Office des publications universitaires (Ed). Alger, 274p.

- Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Delattre J. 2003** - Radicaux libres et anti-oxydants. *In* : Biochimie Pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires. J. Delattre, G.Durand, J.C. Jardillier, Ed. Médecine-Sciences, Flammarion. 317 p.
- Bérubé-Gagnon, J. (2006)** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Quebec.
- BLOIS M S., 1958.** Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*. (181) : 1199-1200.
- (Boullard, 2001).** Plantes médicinales du monde : réalités et croyances. Paris, ESTEM, 636P.
- BOUGANDOURA N., BENDIMERAD N., 2013.** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*. (9): 15p.
- Bouzid W, Yahia M, Abdeddaim M, Aberkane MC and Ayachi A (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'Aubepine monogyne. *Lebanese Science Journal*. 12(1): 59-69. Bruneval P (2003).
- BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M E., BERSET C., 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. (28): 25-30.
- Bremness, L. (2002)** Plantes aromatiques et médicinales. Bordas (Ed). Paris, 303 p.
- Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C. (2007a)** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*. 100: 553-559.
- CONGO M., 2012.** Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliferative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica* L. (Salvadoraceae).Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso : 42p.
- Correa Dias, P.C., Foglio, M.A., Possenti, A., De Carvalho, J.E. (2000)** Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. *J Ethnopharmacol*. 69: 57-62.
- Diallo D. (2000).** Ethnopharmacological survey of medical plants *in* Mali and phytochemical study of four of them : *Glinus oppositifolus* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae).Thèse de Doctorat, Lausanne ; 221 P.

Djeddi S., Bouchenah N., Settar I. & Skaltsa H. D., “Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria”, *Chem. Natural Comp*, V. 43, n°4, (2007), 487-490.

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

Duarte, M. C.T., Figureueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G, Delarmelina, C. (2005) Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacology.* **97** : 305–311.

Duraffourd C., Lapraz J.C. et R Chemli., 1997. La plante médicinale de la tradition à la science. 1^e congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, 222.

Escott H. K., “Microbiologie”, 2^{ème} Edition française, De Boek, (2006), 2.

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdely C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus de Biologie* 331: 372-379.

Favier A.,2003. Le stress oxydant Interet conceptuel et experimental dans la comprehension des mecanismes des maladies et potentiel therapeutique.l’actualite chimique - novembre-decembre, 108-115.

Farooqi et al., Cultivation of Spice Crops, 2005.

Fernandez-Lopez, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Perez-Alvarez, J.A., Kuri, V. (2005) Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science.* 69: 371-380.

Fouché J.G., Marquet A et Hambuckers A., 2000. Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament. *Observatoire du Monde des Plantes* Sart-Tilman.

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

Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S A. (2007) Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science.* 76: 172-181.

Gonzalez-Trujano, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., DecigaCampos, M., Lopez-Munoz, F.J. (2007) Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol.* 111: 476-482.

Grégory C., 1988. Encyclopédia Universalis, Aolto Anabaptisme, Corpus 1, France S.A.

Guerin-Fauble V, et Carret G. (1999). L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées Nationales GTV- INRA.

Haloui, M., Louedec, L., Michel, J.B, Lyoussi, B. (2000) Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. *J Ethnopharmacology.* 71: 465-472. Harrorne, J.B., Williams, C.A. (1972) Flavonoid patterns in the fruits of The Umbelliferae. *Phytochemiatry.* 11: 1741-1750.

ISERIN P., 2001. Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse VUEF, 2 éme Ed., Paris : 14,275.

Iserin P, Masson M et Restellini J P, 2007. Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins .Ed Larousse, pp14

Koechlin-Ramonatxo,C. (2006).Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutritionclinique et métabolisme*,**20** : 165–177.

Kosar, M., Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. (2005) Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species.

Leung, A.Y. and S. Foster. 1996. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons.

L'huillier, A. (2007) Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat. Toulouse.

Lopes-Lutz, D., S. Alviano, D., S. Alviano, C., P. Kolodziejczyk, P. 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry*, 69 :1732-1738.

Luis, J.C., Martin Perez, R., Valdes Gonzalez, F. (2007) UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. *Food Chem.* 101: 1211-1215.

MAATAOUI B S., HMYENE A., HILALI S., 2006. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal.* (1):3-8.

Mareno M., Bersani C., Comi G. (1999). Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using bioimpedometric method. *J. Food Protect*, 62 : pp 1017-1023.

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

Mata, A.T., Proenc, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Araujo, M.E.M. (2007) Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.* 103: 778-786.

Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., Roura, S.I. (2005) Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT.* 38: 565-570.

MOLYNEUX P., SONGKLANAKARIN J., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *SciencesTechnology .Vol 26* (2): 211-219.

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

Nassu, R.T., Guaraldo Goncalves, L.A., Azevedo Pereira da Silva, M.A., Beserra, F.J.(2003) Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. *Meat Science.* 63: 43-49.

Nauciel, C. (2000) Bactériologie médicale. Masson (Ed).Paris, 276p.

Nostro A., Germanò M. p., D'Angelo V., Marino A. et Cannatelli M.a. (2000) Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lettres en microbiologie appliquée*. 30 (5), p379.

Okamura, N., Haraguchi, H., Hashimoto, K., Yagi, A. (1994) Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*. 37: 1463-1466.

(Oluwatuyi M., Kaatz G. W., Gibbons S., 2004. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, London/Detroit, 2004, 65: 3249-3254.

(Panda H0. (2009). *Aromatic Plants Cultivation, Processing And Uses*.

Poletti, A. (1988) *Fleurs et plantes médicinales*. 2ème Edition. Delachaux & Niestlé (Ed). Paris, 222p.

(Ponce et al., 2003). Ponce A.G., Fritz R., del Valle C.E., Roura S.I. (2003): Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 36: 679–684.

POPOVICI 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*.

Prakash D., Singh B.N., Upadhyay G. (2007): Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry*, 102: 1389–1393.

QUEZEL P. et SANTA S., 1963. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome II, édition du centre national de la recherche scientifique, Paris (France): 591.

(Rameau J-C (2008). *Flore forrestiere française : Région méditerranéenne*.

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

Rolland Y., “Antioxydants naturels végétaux”, OCL., V. 11, n°6, (2004), 419-424.

Sagdic O, Kuscu A, Ozcan M, Ozcelik S (2002). Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol*. 19:473-480.

Schnaubelt K. (1998) Advanced Aromatherapy. Vermont:Healing Arts Press.

Sebranek, J.G., Sewalt, V.J.H., Robbins, K.L., Houser, T.A. (2005) Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Science*.69: 289-296.

Singletary, K., MacDonald, C., Wallig, M. (1996a) Inhibition by rosemary and carnosol of 7,12- dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Letters*. 104: 43-48.

Slamenova, D., Kuboskova, K., Horvathova, E., Robichova, S. (2002) Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and FPG sensitive sites in mammalian cells treated with H₂O₂ or visible light-excited Methylene Blue. *Cancer Letters*.177: 145-153.

Sotelo-Felix, J.I., Martinez-Fong, D., Muriel, P., Santillan, R.L., Castillo, D., Yahuaca, P.(2002) Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat .*J Ethnopharmacology*. 81: 145-154.

Stefanovits-Bányai É., Tulok M.H., Hegedûs A., Renner C. & Varga I.S. (2003). Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. *Acta Biologica Szegediensis*, **47**, 111-113.

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

Teusher E., Robert A., Annelis L. (2005). 1000 plantes aromatiques, Edition Lavoisier. pp 195, 310-313, 416-122.

Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G., Fu, Y.J. (2008) Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chem*. 108: 1019-1022.

Weckesser, S., Engel, K., Simon-Haarhaus, B., Wittmer, A., Pelz, K., Schempp C.M. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*. (in press).

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

Annexe 01 : Matériel non biologique

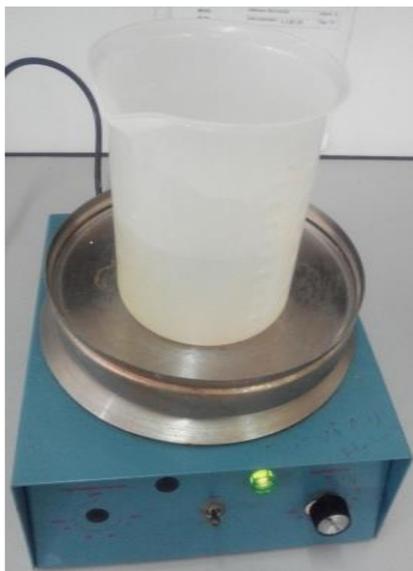
	Activité Antimicrobienne	Activité Antioxydante
Matériels de laboratoire	<ul style="list-style-type: none">- Agitateur, Autoclave et étuve pour stérilisation, Bec bunsen, Etuve d'incubation.- Boite de Pétri, disques stériles (6mm)- Ecouvillons stériles, pipettes Pasteur, pipettes graduées de 1 ml et 10 ml stériles, micropipette (20 à 200μL), pince de laboratoire , portoir, papier filtre, poire ,seringue de 5 cc à 10 cc ,tubes à essai stériles, para film.	<ul style="list-style-type: none">- Spectrophotomètre-Agitateur Baro Magnétique.-Balance de précision.-Seringue stériles en verre de 1 ml.-Fioles.-Tubes à essai en verre.
Réactifs	<ul style="list-style-type: none">-Extraits méthanoliques du Romarin	<ul style="list-style-type: none">-Extraits méthanoliques du Romarin
Solvants	<ul style="list-style-type: none">-Eau physiologique.-Eau distillé.-(DMSO).	<ul style="list-style-type: none">-Eau physiologique.-Eau distillé.- DPPH
Milieus de culture	<ul style="list-style-type: none">-Milieu Muller Hinton.-Milieu Sabouraud.	

Annexe 02 :

Tableau 04 : Caractéristiques des souches microbiennes testées.

Souches bactériennes testés	Type	Souches	Habitat	Pouvoir pathogène
Bactérie	Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i> AT CC 25923	- Le tube digestif. - Les fosses nasales.	-Staphylococcie cutanées, sous-cutanées et muqueuses, osseuses, pulmonaire, toxi -infection alimentaire, entérocolites aigue.
	Gram-	<i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922	-Le tube digestif	-Différentes formes de diarrhées, dysenterie, rôle des enterotoxines, de l'endoxine, des adhesine, certains de ces facteurs sont également impliqués dans des infections des tissus profonds.
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	- Eau et sols humides - Surface des végétaux.	Infection pulmonaire peut être primitive ou secondaire à une septicémie. Infections urinaires, oculaires et pulmonaires.
Champignon	Levure	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-Sur la peau. -les voies génitales féminines -Dans la bouche -tube digestif les intestins).	la douleur et de l'inflammation infections touchent la peau, la bouche.

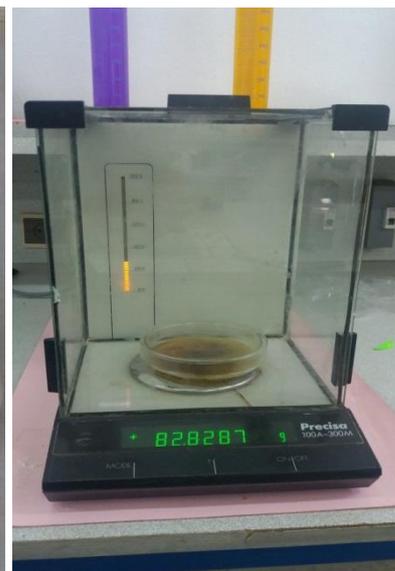
Annexe 03 : Appareillage de laboratoire.



Agitateur Baro magnétique



Balance



Balance de précision



Etuve



Etuve de stérilisation



Etuve d'incubation



Agitateur



Rotavapor

Annexe 04 : Etapes de la réalisation de l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques dans les dilutions 1/16 et 1/8.

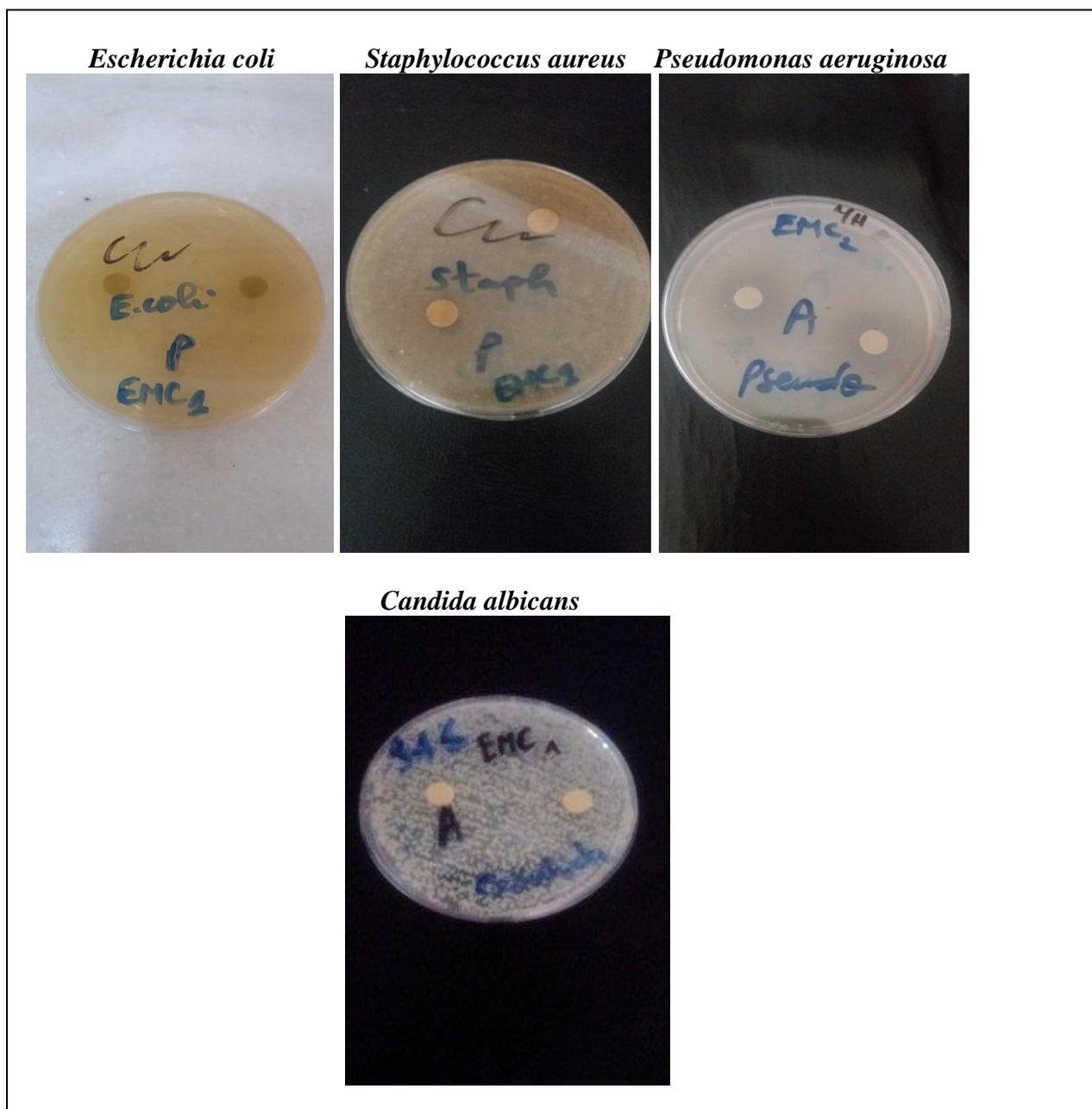


Figure 24 : Effet antimicrobien des extraits méthanoliques de Romarin des trois saisons automnale, hivernale et printanière vis-à-vis des souches microbiennes (EMC1= 62.5mg/1ml DMSO).

Escherichia coli



Staphylococcus aureus



Pseudomonas aeruginosa



Candida albicans



Figure 25 : Effet antimicrobien des extraits méthanoliques de Romarin des trois saisons automnale, hivernale et printanière vis-à-vis des souches microbiennes (EMC2=120mg/1ml DMSO).

Annexe 05: Matériels de l'activité antioxydante de Romarin.



Spectrophotomètre



Solution de DPPH



Micropipette 1000 ul

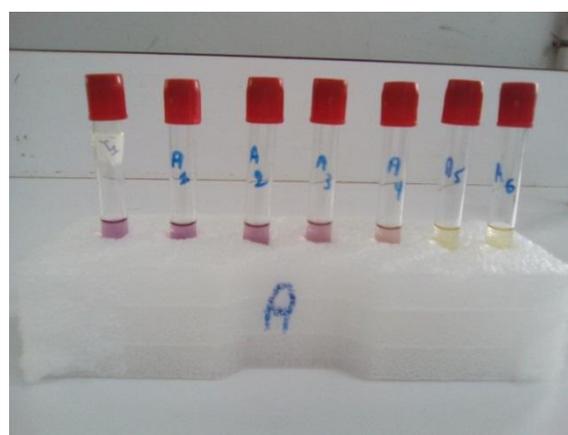


Micropipette 10-100 ul

Virage de la couleur en présence de DPPH :



Acide ascorbique



Extrait méthanolique saison d'Automne

Un grand nombre des plantes, aromatiques, médicinales, des plantes épices et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme l'antimicrobienne et l'antioxydante demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales. Ces plantes représentent une nouvelle source des composés actifs.

Depuis la nuit des temps, les extraits des plantes ont toujours été utilisés en médecine dans différents pays du monde pour leurs effets bénéfiques (**ISERIN, 2001**).

Dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, on s'est intéressé aux espèces de la famille des Lamiacées. La majorité des plantes qui appartiennent à cette famille sont des plantes aromatiques (**SENER, 2008**).

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

Dans ce contexte et afin de valoriser notre patrimoine national diversifié et riche, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une espèce de la famille des Lamiaceae (*Rosmarinus officinalis* L.).

Le choix de cette espèce végétale s'est basé sur son utilisation fréquente dans nos traditions locales culinaires et médicinales.

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé et l'anti-oxydante par le test au DPPH des extraits méthanoliques de Romarin recueillis des trois saisons automnale, hivernale et printanière de la région de Blida.

I. Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) :

Le romarin est une plante des coteaux arides, garrigues et lieux rocheux de la région méditerranéenne et même un peu plus au sud jusqu'aux confins sahariens (**Boullard, 2001**).

En Algérie : c'est l'une des plantes les plus populaires, on la trouve dans plusieurs régions.

Depuis l'antiquité, il est employé pour améliorer et stimuler la mémoire.

Les anthropologues et les archéologues ont découvert que le romarin a été employé comme vertus médicinales, culinaires et cosmétiques en Egypte, Mesopotamia, Chine et en Inde antiques (**Stefanovits-Benyai et al., 2003**).

I.1. Classification du Romarin :

Selon **Quezel et Santa (1963)**, le Romarin est classé comme suit :

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Embranchement : Spermaphyte

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Dialypétales

Ordre : Lamiales (Labiales)

Famille : Lamiaceae

Genre : *Rosmarinus* L

Espèce : *Rosmarinus officinalis* L.

I.2. Description botanique :

Le romarin appartient à la famille des Labiées ou lamiacées. Elle se présente sous forme d'arbuste, sous arbrisseau ou herbacée (**Figure 01**). Mesurant environ de 0.8 à 2 m de hauteur

(Gonzalez- Trujano et al., 2007) et est couverte d'une écorce grisâtre. Elle se divise en nombreux opposés. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches *Rosmarinus officinalis albiflorus*), hermaphrodites, visibles de janvier en mai (**Figure 02**). Elles sont groupées à l'extrémité des rameaux à la base des feuilles. Les feuilles opposées décussées insérées sur une tige à section carrée, étroites, lancéolées, linéaires, à bords roulés en dessous, sont vertes foncé et luisantes à la face supérieure (**Figure 03**).

La floraison commence dès le mois de février (janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril-mai. Comme pour la plus part des lamiacées, le fruit est un tétrakène (de couleur brune), ovoïde, est entouré par un calice persistant et sec. Il attire les insectes (entomophiles) pour assurer la pollinisation (**Grégory, 1988**).



Figure 01 : Vue général de l'étendu de romarin (Sandeep, 2014).



Figure 02 : Fleurs du romarin (René, 2008).



Figure 03 : Feuilles lancéolés du romarin (Shama, 2014).

I.3. Répartition géographique du Romarin :

Le Romarin est originaire du sud de l'Europe notamment des régions de la méditerranée, on le trouve dans tout le sol Algérien (**Quezel et Santa, 1963**), dans l'Espagne, le sud de la France, l'Italie, la Grèce (**Teusher et al., 2005**). On le trouve principalement dans les terrains arides et ensoleillés, comme les garrigues, les maquis et les rocailles. Il n'apprécie pas sécheresse trop importante mais se contente de l'humidité du littoral, d'où il pourrait tenir son nom (« rosée de mer » en latin).

Il est réparti entre le niveau de la mer et 650 mètres d'altitude (**Rameau et al., 2008**). Parfois jusqu'à 1500 mètres d'altitude (**Panda, 2009**).

I.4. Production mondiale :

Le Romarin est cultivé à large échelle en Espagne, en Tunisie, au Maroc, en Italie, en France, en Algérie, au Portugal principalement pour en extraire de l'huile essentielle (**Panda, 2009**). La production mondiale d'huile essentielle de Romarin atteint 200 à 300 tonnes en 2005 (**Faarooqi et al., 2005**).

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

I.5. Composition biochimique du Romarin :

La sommité fleurie et les feuilles du romarin contiennent essentiellement des flavonoïdes, des acides phénoliques (en particulier de l'acide rosmarinique) et une huile essentielle à laquelle il doit son action stimulante (**Oluwatuyi, 2004**).

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

Okamura et al., (1994) ont pu isoler de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles du romarin trois flavonoïdes glycosylés, lutéoline 3'-O-(4''-O acétyl)- -D-glucuronique, et lutéoline 3' -O-(3''-O-acétyl)- -D-glucuronide), ainsi que l'hespéridine.

En 2006 Almela et ses collaborateurs ont identifié par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), dans les extraits méthanoliques du romarin issus de différentes matières (romarin sauvage et distillé) des composés classés en trois groupes : les diterpènes, les flavonoïdes et les acides phénoliques, les structures des diterpènes ont été reliées à l'acide carnosique. Les flavonoïdes dérivent de deux flavons apigénine et la lutéoline : genkwanine; méthoxytecto-chrysin; homoplantaginine; scutellareine; cirsimaritin et 6-hydroxylutéoline-7-glucoside. L'acide rosmarinique était le seul acide phénolique identifié.

Les résultats de l'analyse d'HPLC élaborée par (Kosar et al., 2005) et (Luis et al., 2007) ont montré respectivement la composition suivante : lutéoline-glucoside : 2.90 mg/g ; naringine-glucoside : 7.16 mg/g ; lutéoline : 2.45 mg/g ; apigénine 1.80 mg/g.

L'acide vanillique 0.004 mg/g ; l'acide caféique 0.012 mg/g ; naringine 0.570 mg/g ; l'acide rosmarinique 2.080 mg/g ; hispiduline 0.020 mg/g ; cirsimaritin 0.080 mg/g ; carnosol 0.580 mg/g ; acide carnosique 12.180 mg/g.

I.6. Principes actifs du Romarin :

Les principaux constituants du Romarin responsables des différentes propriétés sont :

I.6.1. Les acides phénoliques : principalement l'acide carnosique, acide vanillique, carnosol, acide rosmarinique....ils ont une grande action antimicrobienne qui change d'une variété du Romarin à une autre. Ce qui témoigne du changement de la teneur en polyphénols (Moreno et al., 1999).

I.6.2. Les flavonoïdes : Cette plante est très riche en flavonoïdes dont 07 sont principaux : lutéoline, ériocitrine, hespiridine, diosmine, isoscutellarin 7-O glucoside, hispidulin 7-O glucoside, genkwanine. Ces composés sont localisés dans les feuilles, les fleurs, les racines et les tiges. Leur concentration change durant l'évolution de la plante. (Del Bano et Castillo, 2004), (Okamura et al., 1994).

I.6.3. L'huile essentielle :

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.

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 : l'acide citrique, glycolique et glycérique, des stérols, de la choline, du mucilage (**Bellakhdar, 1997**) et de la résine (**Beloued, 1998**).

I.7. Domaine d'utilisation de la plante :

I.7.1. Industrie agro-alimentaire

Les extraits végétaux de Romarin présentent un pouvoir antioxydant important et peuvent être appliqués à la conservation des aliments et des huiles lipidiques (**Leung et Foster, 1996 ; Ozcan, 1999**). Ces propriétés sont dues aux acides polyphénoliques (rosmarinique, caféique) (**Piozzi, 1996 ; Ozcan, 1999**).

I.7.2. Industrie cosmétique et parfumerie

Au 19^{ème} siècle l'essence de *Romarin* servait à la préparation de la très célèbre eau de Cologne de la reine de Hongrie. Aujourd'hui elle rentre dans la composition, de savonnerie, détergents, crèmes et la plupart des eaux de Cologne; le taux d'utilisation maximum est rapporté à 1% dans la dernière catégorie (**Leung et Foster, 1996**).

I.7.3. La thérapie

Le Romarin était déjà cité en médecine arabe classique pour ses propriétés hépatotrope, diurétique et emménagogue qui sont dues aux présences des flavonoïdes à savoir des glucosides de la lutoline, de l'apigénone, et peut être de méthyl-4'-genkwanine en synergie avec les acides phénoliques (**Piozzi, 1994 ; Piozzi, 1996**).

Les feuilles de Romarin sont utilisées dans la phytothérapie européenne pour les brûlures d'estomac et thérapie d'appui, des maladies rhumatismales ; en usage externe pour les problèmes de circulation ; en bains, l'herbe est utilisée comme stimulant externe pour l'accroissement sanguin fourni à la peau. C'est aussi un bon excitant de cuir chevelu (**Leung et Foster, 1996**).

Les effets cholagogues (faciliter l'évacuation de la bile) et cholérétique (augmenter la sécrétion de la bile) du Romarin semblent en relation avec la présence de nombreux acides

phénoliques signalés dans beaucoup de labiées, et qui sont ici les acides : caféique, chlorogénique, néochlorogénique, rosmarinique. (Piozzi , 1994., Leung et Foster, 1996 ., Deans et al ; 1998).

Les diterpènes phénoliques présentant dans le *Romarin* tels que l'acide carnosique et le carnosol ont des effets d'inhibition contre des virus de HIV-1 (Paris et al., 1993). Et certains cancers et d'autre entrants dans cette fraction ont un effet carcinologique (Schwarz et Ternes 1992 ; Leung et Foster, 1996 ; Deans et al., 1998).

I.8. Propriétés du Romarin :

Le romarin est une herbe médicinale bien connue et considérablement évaluée, largement répandue dans les produits pharmaceutiques et la médecine traditionnelle.

Le romarin est très apprécié pour ses propriétés aromatiques, anti-oxydantes, antimicrobiennes et anti-tumorales.

- **Activité antibactérienne :**

Plusieurs auteurs ont rapporté que certains composés présents dans les extraits du romarin possèdent des propriétés antibactériennes (Georgantelis et al., 2007).

Les effets des extraits aqueux et méthanoliques du Romarin sur la croissance du *Streptococcus sobrinus* et sur l'activité extracellulaire de l'enzyme glucosyltransferase ont été étudiés par Tsai et al., (2007). Les résultats ont suggéré que les extraits du Romarin peuvent empêcher la lésion de la carie en inhibant la croissance du *Streptococcus sobrinus* et peuvent aussi éliminer les plaques dentaires par suppression de l'activité de la glucosyltransférase.

Afin de chercher de nouveaux antibiotiques et des agents antimicrobiens, une autre étude a été élaborée par examiner les effets antimicrobiens des extraits des composés isolés de certaines plantes, sur l'ensemble de 29 bactéries et levures avec pertinences dermatologiques. La croissance de 28 sur 29 germes a été empêchée par cet extrait.

L'extrait obtenu par dioxyde de carbone (CO₂) supercritique du Romarin, a présenté un large spectre antimicrobien.

L'examination du Carnosol, acide carnosique, acide ursolique, a montré que seule l'acide carnosique a une activité antibactérienne (Weckesser et al., in press).

Celiktas et al., (2007a) ont testé l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques du romarin, rassemblé de trois différentes régions et pendant quatre intervalles de l'année. Leurs résultats ont indiqué que les bactéries testées étaient sensibles aux huiles essentielles, partiellement aux extraits méthanoliques et que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles diffèrent selon les variations régionales et saisonnières.

Les 3 extraits commerciaux du romarin étaient actifs contre onze bactéries portées par les aliments (**Fernandez-Lopez et al., 2005**). Le *vibrio parahaemolyticus* porté par les fruits de mer infectés est inhibé par la suspension du romarin à 30 C° (**Yano et al., 2006**).

Les résultats d'**Abutbul** viennent suggérer l'utilisation du romarin comme traitement contre les maladies causées par le *Streptocoque iniae*, la bactérie qui cause des pertes économiques significatives dans l'industrie d'aquaculture dans le monde entier (**Abutbul et al., 2004**).

- **Activité antifongique :**

La biosynthèse de l'aflatoxine a été inhibée totalement par l'huile essentielle de Romarin à une concentration de 450 ppm selon les résultats indiqués, le potentiel de cette huile essentiel en tant que préservatif naturel contre *l'Aspergillus parasiticus*. (**Rasooli et al., 2008**).

- **Activité antivirale :**

L'évaluation de l'activité antivirale de l'extrait commercial du Romarin a indiqué qu'il y'a une inhibition de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) aux concentrations très basses, qui ont été également cytotoxiques. Cependant le carnosol a montré une activité (anti-HIV) à une concentration modérée qui n'était pas cytotoxique. (**Aruoma et al., 1996**).

- **Activité anti-oxydante :**

L'activité anti-oxydante du Romarin est connue depuis environ 30 années. (**Nassu et al., 2003**).

En raison de ses propriétés anti-oxydantes, le Romarin est largement accepté en tant qu'une des épices dont l'activité anti-oxydante la plus élevée. (**Wang et al., 2008**).

Divers modèles d'essai expérimentaux ont été employés pour la caractérisation des propriétés anti-oxydantes des extraits aqueux, de quatre herbes appartenant à la famille de *Lamiacée* : *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* et *Thymus vulgaris*. Les extraits ont montré des degrés variables d'activité dans tous les essais utilisés (**Dorman et al., 2003**).

Plusieurs auteurs ont étudié l'utilisation des extraits du Romarin comme antioxydants pour conserver les produits à base de viande : (**Nassu et al., 2003**) ; (**Balentine et al., 2006**) ; (**Fernandez-Lopez et al., 2005**) ; (**Sebranek et al., 2005**)

- **Effet anti-carcinogène :**

Grace à certains composants (Carnosol, Rosmaridiphénol, Rosmanol et l'acide rosmarinique), le Romarin est considéré comme une thérapie contre le cancer. (**Atik bekkara et al., 2007**).

L'étude élaborée par (**Singletary, 1996 a**) a démontré que l'extrait commercial du romarin et le carnosol sont des inhibiteurs des tumeurs mammaires, provoquées par le dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) chez les rats.

Slamenova et al., (2002) ont mentionné que l'exposition des cellules traitées par deux types d'oxydants (le bleu de Méthylène excité par la lumière visible, et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)), aux différentes concentrations de l'extrait éthanolique du romarin dilué dans le milieu de culture, a comme résultat une réduction de l'activité génotoxique de ces oxydants.

- **Effet anti-acétylcholinestérase :**

Des extraits aqueux et méthanoliques de 11 plantes utilisés dans la médecine traditionnelle Danoise pour l'amélioration de la mémoire, ont été examinés pour évaluer leur activité inhibitrice d'acétylcholinestérase en utilisant la méthode colorimétrique d'Ellman.

L'extrait méthanolique du Romarin a montré une inhibition modérée (17%) de l'enzyme à une concentration de 0.1 mg/ml. (**Adsersen et al., 2006**).

- **Effet hypoglycémiant :**

Les observations après l'administration orale de différentes doses de l'extrait éthanolique du Romarin à 3 groupes de lapins (lapins ayant une glycémie normale, lapins ayant une

hyperglycémie provoquée par l'administration oral du glucose, lapins diabétiques d'alloxane) ont clairement montré que cet extrait exerce une activité hypoglycémiante et anti-hyperglycémiante remarquable à une dose de 200 mg/kg (**Bakirel et al., 2008**).

- **Effet anti-hépatotoxique :**

De nombreuses études ont été réalisées pour étudier l'effet anti-hépatotoxique du Romarin. Le travail de **Sotelo-Felix et al., (2002)** a été concentré pour l'évaluation de l'efficacité de l'extrait méthanolique du Romarin pour normaliser certains paramètres histologiques et biochimiques du foie, après l'ingestion d'un hépatotoxine le tétrachlorure de carbone (CCl₄). Les résultats ont indiqué que cet extrait a empêché la peroxydation lipidique, l'inflammation, la nécrose, normalisé les taux de la bilirubine, glycogène et l'activité de l'alanine aminotransférase et enfin il a augmenté l'activité du glutathion S-transférase (GST).

- **Autres effets :**

les effets anti-nociceptifs de l'extrait éthanolique des pièces aériennes du romarin, ont été étudiés par **Gonzalez-Trujano et al., (2007)** en employant différents modèles expérimentaux de la douleur. La comparaison des résultats obtenus avec ceux du tramadol et de l'acide acétylsalicylique a montré que, les extraits possèdent une activité anti-nociceptive et anti-inflammatoire très importante, ce qui renforce l'utilisation médicinale traditionnelle de cette plante.

L'extrait hydro-éthanolique du romarin a diminué les lésions ulcéraives produit par, l'indométhacine, l'éthanol et la réserpine chez les rats (**Correa Dias et al., 2000**).

Haloui et al., (2000) ont indiqué que les extraits aqueux du romarin ont une activité diurétique et un effet considérable sur l'excrétion urinaire d'eau et des électrolytes (Na⁺, K⁺ Cl⁻) à une dose de 8%.

II.1. Activité antimicrobienne :

Effet antimicrobien :

Ces dernières années, il y'a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les micro-organismes résistants aux antibiotiques.

Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives et le criblage systématique des micro-organismes ou les plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles.

En particulier, l'activité antimicrobienne d'huiles et des extraits de plantes ont formé la base de beaucoup d'applications, y compris, pharmaceutiques, médecine, thérapie naturelle et la conservation des aliments (**Sagdic et al., 2002**).

Caractérisations des souches bactériennes utilisées :

Staphylococcus aureus :

Les staphylocoques sont des cocci à gram positif qui tendent à se grouper en amas (**Nauciel, 2000**) irrégulier à la façon d'une grappe de raisin (**Avril, 2000**).

Staphylococcus est un germe aérobie- anaérobie facultatif (**Avril, 2000**), doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ces colonies. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales, possède une coagulase, ce qui le distingue de la plus part des espèces de staphylocoques.

La bactérie est très ré pondue chez l'homme et dans de nombreuses espèces animales.

Chez l'homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses et des zones cutanées humides.

Pseudomonas aeruginosa :

Le genre pseudomonas est fait de bacilles mobiles aérobies stricts, se cultive facilement sur les milieux usuels. *Pseudomonas aeruginosa* (ou bacille pyocyanique) se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ces colonies (**Nauciel, 2000**).

C'est une bactérie ubiquiste qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et des divers animaux.

Entérobactéries :

Constituent une famille de bactéries très importantes comportant de nombreux genres subdivisés eux-mêmes en espèces. Ce sont des bacilles à gram négatif dont la plupart sont mobil, grâce à de flagelles. Ils cultivent facilement sur les milieux usuels et sont aéroanaérobies facultatifs.

Comme son nom l'indique, les entérobactéries sont pour la plus part des bactéries qui colonisent l'intestin. En dehors du tube digestif, elles peuvent être transitoirement présents sur différentes parties du revêtement cutanéomuqueux.

Les espèces les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* et *Yersinia*. Les autres bactéries de la famille des entérobactéries se comportent généralement comme des bactéries opportunistes souvent impliquées dans les infections nosocomiales, en particulier urinaires. Parmi elles, on peut mentionner les genres *Proteus*, *Klebsiella*, *Entérobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella*, *Citrobacter*. La plus part de ces bactéries produisent des B-lactamases et sont résistantes à de nombreux antibiotiques.

***Escherichia coli* :**

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

Candidose :

Les plus fréquentes des levures provoquent des affections cosmopolites atteignant la peau, les angles, les cavités naturelles et les divers viscères par hémodyssémination (Moulinier, 2003).

Selon la littérature, la recherche des produits naturels actifs contre les espèces de *Candida* a accrue sensiblement en 10 dernières années, approximativement la recherche était sur 258 espèces de plantes, appartenant à 94 familles (Duarte et al., 2005).

***Candida albicans* :**

Levure non pigmentée, non capsulée, à bourgeonnement multiple et formant un pseudo-mycélium et du mycélium vrai. Saprophyte endogène de la lumière intestinale humaine et des cavités génitales par contiguïté (femme).

III.2. Activité Antioxydante :

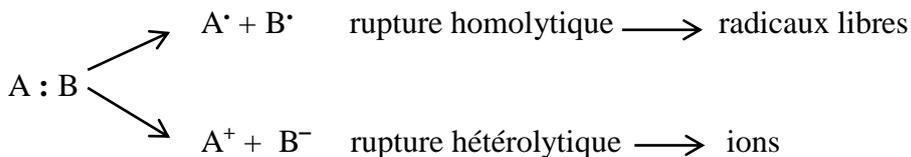
Historique :

Radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, R. Gerschman puis D. Hartman évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement.

En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant la SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier, 2003**).

Définition d'un radical libre :

La majeure partie de la toxicité de l'oxygène provient de la formation de radicaux libres, c'est-à-dire, selon la définition proposée par Halliwell et Gutteridge, d'espèces capables d'existence indépendante, contenant un ou plusieurs électrons non appariés dits électrons célibataires, ces radicaux peuvent se former par transferts mono-électroniques ou par scission homolytique de liaison covalente selon le schéma suivant : (**Bonnefont-rousselot et al., 2003**).



Après une rupture homolytique, chacun des deux électrons intervenant dans la liaison entre les atomes A et B gagne l'orbitale externe de ces atomes, qui deviennent alors des radicaux libres (**Bonnefont-rousselot *et al.*, 2003**).

Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant un à une autre molécule : ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants.

En jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'électrons, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milliseconde) (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Bien que le terme de radical libre ait souvent été assimilé à une espèce réactive ou à un oxydant, il est important de signaler que tous les radicaux libres ne sont pas forcément des oxydants. De même que, tous les oxydants ne sont pas des radicaux libres (**Diallo, 2005**).

Principaux radicaux libres et leurs origines :

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (**Favier, 2003**).

Du point de vue de la terminologie, il est souvent fait mention d'espèces réactives de l'oxygène. Ces espèces incluent non seulement des radicaux libres dérivés de l'oxygène : anion superoxyde (O_2^-), radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), radical hydroperoxyde ($\text{HO}_2\cdot$), radical peroxyde ($\text{RO}_2\cdot$), radical alcoxyde ($\text{RO}\cdot$), mais d'autres espèces non radicalaires dérivées de l'oxygène : peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), acide hypochloreux (HOCl), Ozone (O_3), Oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), peroxyde d'azote (ONOO^-) (**Bonnefont-rousselot *et al.*, 2003**), qui ne sont pas réactives mais peuvent être des précurseurs de radicaux (**Favier, 2003**).

Par ailleurs, tous les radicaux libres ne sont pas des dérivés de l'oxygène, par exemple le monoxyde d'azote ($\cdot\text{NO}$) est un radical libre dérivé de l'azote (**Bonnefont-rousselot *et al.*, 2003**).

Rôles des radicaux libres :

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles qui à part la phagocytose, ont été découvertes récemment.

Les radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes (**Favier, 2003**), à la production énergétique, au règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire (**Ardestani et Yazdanparast, 2007**).

Définition du stress oxydant :

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence et en faible quantité et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents.

Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé stress oxydant (**Favier, 2003**).

Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant selon ses habitudes alimentaires, son mode de vie, ses caractéristiques génétiques ou l'environnement dans lequel il vit (**Diallo, 2005**). L'importance des dommages du stress oxydant dépend de la cible moléculaire, de la sévérité de l'effort et du mécanisme par lequel l'effort oxydant est imposé (**Aruoma, 1999**).

Origine du stress oxydant:

Cette rupture d'équilibre, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines.

L'organisme peut avoir à faire face à une production beaucoup trop forte pour être maîtrisée, qui sera observée dans les intoxications aux métaux lourds, les ischémies/reperfusions suivant des thromboses (**Favier, 2003**), le dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale, l'activation de systèmes enzymatiques, la libération de fer libre à partir des protéines chélatrices ou d'une oxydation de certaines molécules (**Pincemail, 2002**).

Les radicaux libres sont produits pendant l'irradiation, par la lumière UV, par rayons X

et par les rayons γ , sont des produits des réactions métal-catalysées, sont présent comme des polluants dans l'atmosphère, sont produits par des neutrophiles et des macrophages pendant l'inflammation, sont des sous-produits des réactions mitochondrie-catalysées de transport d'électron et d'autres mécanismes (**Valko et al., 2006**).

L'ingestion d'alcool est suivie par la formation de radicaux libres, également des antibiotiques, des anticancéreux. L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme (**Mohammedi, 2006**). Enfin, une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant (**Pincemail, 2002**).

Généralement, le stress oxydant sera la résultante de plusieurs de ces facteurs et se produira dans un tissu et un type cellulaire bien précis, objet de la défaillance et non pas dans tout l'organisme (**Favier, 2003**).

Les conséquences du stress oxydant :

L'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires, induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information. (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**)

La toxicité des EOR s'exerce également sur les protéines. Les EOR sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, la cystéine et la méthionine. Les EOR sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques.

L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des EOR. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN, mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont « réparées » entraînent à long terme des altérations géniques (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

Si la chimie de l'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les EOR attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage.

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de

protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogénèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression (**Favier, 2003**).

Les maladies liées au stress oxydant :

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux.

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré.

Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**).

Définition d'un antioxydant :

On désigne par antioxydant toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat (**Diallo, 2005**).

Principaux antioxydants :

- **Les antioxydants endogènes :**

La production physiologique d'ERO, est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (SOD, CAT, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone, ...) et de protéines (transferrine, ferritine, ...).

Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (**Pincemail, 2002**).

- **Les antioxydants exogènes :**

Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes en :

- ❖ **Médicaments :**

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antihyperlipoprotéïnémiques, les bêta-bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés anti-oxydantes.

- ❖ **Antioxydants naturels :**

La vitamine C ou acide ascorbique :

C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E.

La vitamine E ou tocophérol :

Prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes.

Le sélénium :

Les effets bénéfiques de cet oligo-élément sur l'organisme ne sont connus que depuis un quart de siècle. Il neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure). Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers.

Le β -carotène :

Outre l'activité pro vitaminique A, possède la capacité de capter l'oxygène singulet.

Les flavonoïdes :

Les relations structure-activités anti-oxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité anti-oxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation.

Les tanins :

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation.

Les coumarines :

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes.

Les phénols :

Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales (**Diallo, 2005**).

L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité antimicrobienne et anti-oxydante des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* L. de l'écotype de Blida, collectés des trois saisons automnale, hivernale et printanière.

III.1. Lieux d'expérimentation :

Notre étude s'est déroulée sur une période de six mois, de janvier au juin 2017. Les différentes expérimentations ont été effectuées au niveau de :

- La préparation des extraits méthanoliques s'est effectuée au laboratoire de physiologie végétal au niveau de département de Biotechnologie, université Saad Dahleb de Blida1.
- L'étude de l'activité antimicrobienne est réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène et de contrôle alimentaire de la wilaya de Blida.
- L'étude de l'activité antioxydante est réalisée au niveau du laboratoire de projet de fin d'études au département de biologie, université Saad Dahleb de Blida1.

III.2. Présentation de la région d'étude :

- **Situation géographique de la région :**

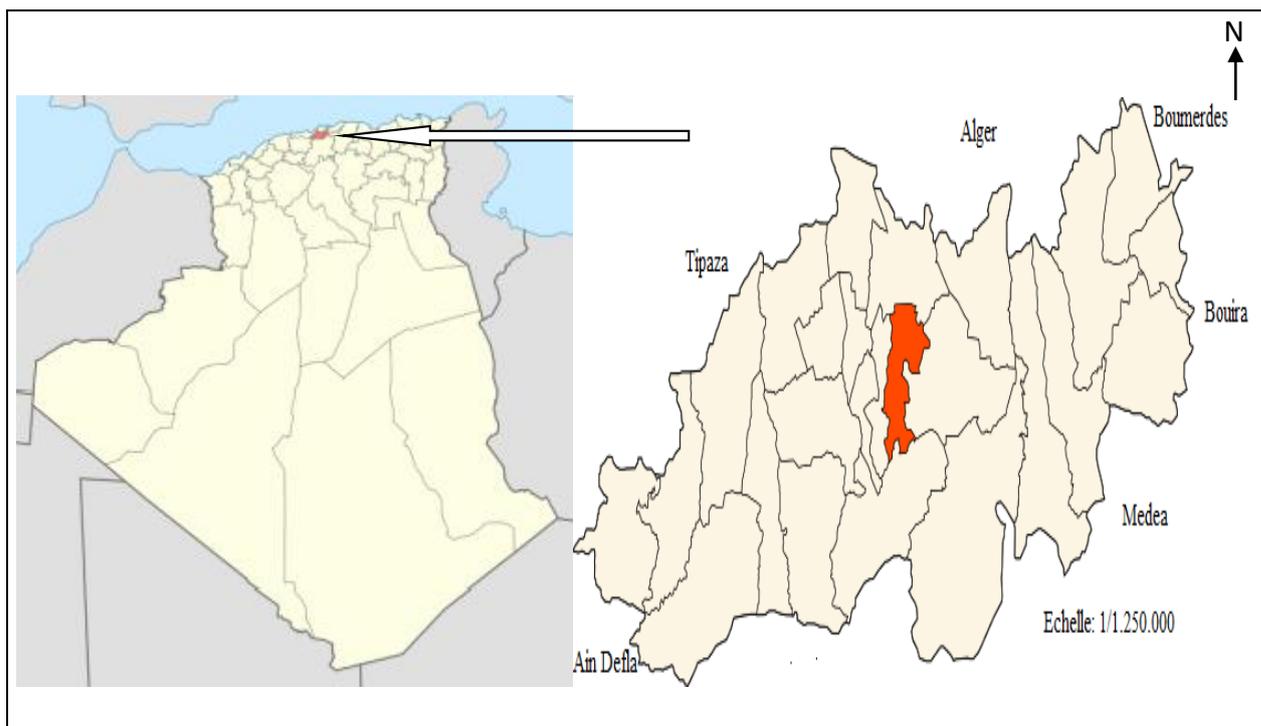


Figure 04 : Carte de Blida (Source : Carte Microsoft 2006)

La zone de prélèvement des échantillons se situe dans la station expérimentale de la faculté

des sciences de la nature et de la vie de l'université SAAD DAHLAB de Blida 1.

Notre station se situe au bas de piedmont de l'atlas blideen, elle est limitée à l'est par la commune de Soumaa, à l'ouest par la commune d'Ouled Yaich, au nord par la commune de Guerouaou, au sud par le mont de Chrea. Ainsi elle fait partie des plaines de la Mitidja comme étant la plus vaste plaine sublittoral de l'Algérie, elle s'étend sur une longueur de 100Km, et une largeur de 5 à 20 km, sa superficie est de 140 000hectares.

Elle est limitée au nord par la ride de sahel, qui l'isole de la mer méditerranéenne, au nord-ouest par djbelChenoua, et la retombe de la chaine de ben Mraade, avec le djbelZaccor formant ainsi la plaine.

Au sud par l'atlas mitidjien, constitué de chainons de Zaccor (800m), et l'atlas blideen proprement dit avec 160m au pic de Mouzaya et 1692m au djbel de Guerroumen.

A l'est ce sont les hauteurs et les collines de basses Kabylie qui forment la plaine

La plaine ne s'ouvre directement sur la mer que sur quelques kilomètres séparent l'oued Reghaia et l'oued Boudouaou, elle constitue une vaste carène dissymétrique sur fond incliné (Tunguy, 1977).

- **Données édaphiques :**

D'après les travaux qui ont été réalisés par (**Ait Ourabe, 2000**) sur les paramètres physiques, chimiques et physico-chimiques des différentes parcelles de la station expérimentale il ressort ce qui suit :

-Texture : équilibrée a limoneuse.

-Structure : polyédrique moyennement développée et dépourvue de calcaire.

- La teneur en matière organique et en moyenne avec rapport C/N compris entre 4,3 et 23,8.

- Un sol poreux et perméable.

- Un pH neutre entre 6,5 et 7,5.

- Le complexe absorbant est saturé dans tous les horizons.

- Une capacité d'échange cationique (C.E.C) comprise entre 11 et 26,7meq/100g de sol

- Le sol renferme des bonnes réserves minérales notamment en phosphore assimilable et en potassium assimilable.

- La teneur en azote est faible.

- **Les caractéristiques climatiques :**

L'Atlas tellien protège la ville des vents secs du sud en provenance des Hauts Plateaux. Cette protection permet à la région de bénéficier d'un climat méditerranéen propice à l'agriculture (BABO D., 2010).

- **La température**

Par rapport aux données du tableau 03 on remarque que le maximum du mois le plus chaud se situe au mois d'aout, avec une moyenne de 26.5°C. Le minimum du mois le plus froid caractérise le mois de février, avec une moyenne de 11.7°C.

Les mois d'Avril et Mai sont caractérisés par des températures douces dont les moyennes se varient entre 20 et 25°C, favorables au développement végétal.

- **Pluviométrie :**

L'eau est un facteur dominant pour la croissance et le développement des végétaux. Du point de vue développement, (Halimi, 1984), a remarqué que au niveau de l'Atlas blidien, il existe une relation étroite entre la période végétative et les précipitations, c'est à dire que les phases de développement des plantes se déroulent en même temps que les régimes pluviaux adéquats. Nous pouvons constater que les précipitations moyennes annuelles sont de 596.50 mm. Les mois qui reçoivent une pluviométrie minimale sont : juin, juillet, aout et septembre, tandis que la pluviométrie maximale est constatée durant les mois de novembre, décembre, Janvier, février. Le mois le plus sec de l'année est juillet avec une pluviosité de 2,00 mm, par contre le mois le plus arrosé est novembre avec une hauteur moyenne de précipitation égale à 93,1 mm. Les mois d'Avril et Mai ont reçus des précipitations moyennes situant entre 40 et 70 mm.

- **Indice d'aridité :**

L'indice d'aridité (De Martonne, 1923) est défini comme le rapport entre la hauteur moyenne des précipitations annuelles et la moyenne des températures annuelles, Il nous renseigne sur le climat d'une région donnée, l'indice mensuel est donné par la formule :

$$IA = P / (T + 10).$$

- **P** → La moyenne mensuelle de la pluviométrie.

- **T** → La température mensuelle moyenne.

- **IA** → L'indice mensuel d'aridité

Avec :

- **IAI < 10** étage aride

- $10 < IA < 20$ semi-aride
- $IA > 20$ étage humide

L'aridité traduit des conditions climatiques caractérisées par la faiblesse des précipitations moyennes annuelles (moins de 350 mm d'eau par an) et par le fort déficit de celles-ci par rapport à l'évapotranspiration potentielle. L'aridité augmente quand l'indice diminue (faible pluie et/ou température élevée) quand :

$IA < 20 \rightarrow$ Risque de sécheresse.

L'aridité se manifeste surtout par ses conséquences :

- Edaphiques: extrême dénuement de la végétation, raréfaction et adaptation des êtres vivants.
- géomorphologiques : processus d'érosion et d'accumulation spécifiques, pauvreté des sols.

- **Quotient pluviométrique d'Emberger :**

- Les conditions climatiques d'une région sont synthétisées par la valeur du quotient pluviométrique d'Emberger. Ce quotient est déterminé par la relation suivante:

$$Q = 3.43 \times P / (M - m)$$

- **P**: précipitations annuelles en mm;
- **M-m** : amplitude thermique;
- **M**: moyenne des maxima du mois le plus chaud;
- **m** : moyenne des minima du mois le plus froid
- $Q = 3.43 \times P / (M - m)$
- $Q = 3.43 \times 595.1 / (32.7 - 5)$
- $Q = 73.68$

Il est égal à **73.68** pour Blida ainsi, la zone d'étude se situe dans l'étage sub-humide à hiver très chaud, selon le climatogramme d'Emberger (**Figure 06**).

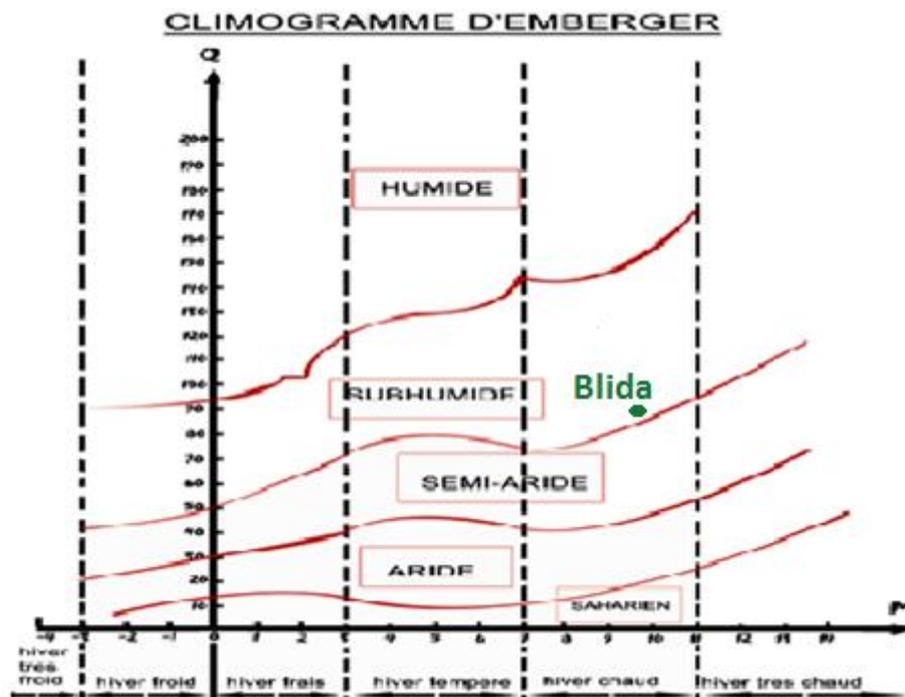


Figure 05 : Climatogramme d'Emberger de Blida (1996-2005).

Selon le climatogramme d'Emberger, la région de Blida se situe dans l'étage sub-humide à hiver chaud.

III.3. Matériel :

III.3.1. Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé est cultivé, il est formé par des rameaux des sommités de *Rosmarinus officinalis* L.

Les échantillons ont été recueillis dans la station expérimentale de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université SAAD DAHLAB de Blida, des trois saisons : automnale (Décembre/2016), hivernale (Février/2017) et printanière (mi-avril/2017).

On a pris au hasard des arbustes sains, sur lesquels on a pratiqué l'échantillonnage. Ainsi récoltés, les échantillons sont laissés sécher dans un endroit sec et aéré, à température ambiante pendant une semaine pour éviter le développement des micro-organismes et à l'abri de la lumière afin de garder l'aspect biochimique des molécules. Ils ont été étendus en une seule couche sur les paillasses et tournés de temps en temps. Devenues sèches, les parties utilisées sont récupérées dans des sacs propres en papier.



Figure 06 : *Rosmarinus officinalis* L. (originale 2017).

III.3.2. Matériel microbiologique :

L'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques étudiés a été réalisée au niveau de Laboratoire de microbiologie de laboratoire d'hygiène de Blida, sur quatre microorganismes référenciés par la norme internationale de la pharmacopée européenne.

Les souches testées sont largement rencontrées dans diverses pathologies chez l'homme. (Tableau 02) (Annexe 02).

III.4. Méthodes :

III.4.1. Préparation des extraits méthanoliques :

Les feuilles sèches de romarin ont été broyées et conservées dans des flacons en verre, hermétiquement fermés, à basse température. Une prise de 10g de la poudre végétale a été mise à

macérer dans 100 ml de méthanol sous agitation pendant 24 heures à une température $25 \pm 2^\circ\text{C}$. L'extrait obtenu a été filtré et évaporé à sec sous pression réduite à 50°C au rotavapeur. Le résidu sec est repris par 3 ml du méthanol et conservé à température -18°C jusqu'à son utilisation (Falleh et al, 2008).

Les extraits ont été repris avec le Dimethylsulfoxyde (DMSO). Des dilutions en série de 1/2 à 1/16 ont été ensuite réalisées pour obtenir des concentrations de 500 à 62.5mg/ ml.

Les concentrations testées :

- C1 = 62.5mg/ml (62.5mg de l'extrait méthanolique dans 1ml de DMSO).
- C2 = 120 mg/ml (120 mg de l'extrait méthanolique dans 1 ml de DMSO).

III.4.2. Etude de l'activité antimicrobienne :

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de romarin de la région de Blida, nous avons utilisé la méthode d'aromatogramme, c'est une méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé.

a. Principe :

Méthode de mesure in vitro du pouvoir antimicrobien des extraits végétaux. Cet examen est donc l'équivalent d'un antibiogramme ou les antibiotiques sont remplacés par des extraits méthanoliques. La technique consiste à utiliser les disques de papier imprégnés de différents produits à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencé avec une suspension de germes à étudier (**Figure 08**).

Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelées zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus le germe en question est résistant

On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité (**Gueriner Carret, 1999**).

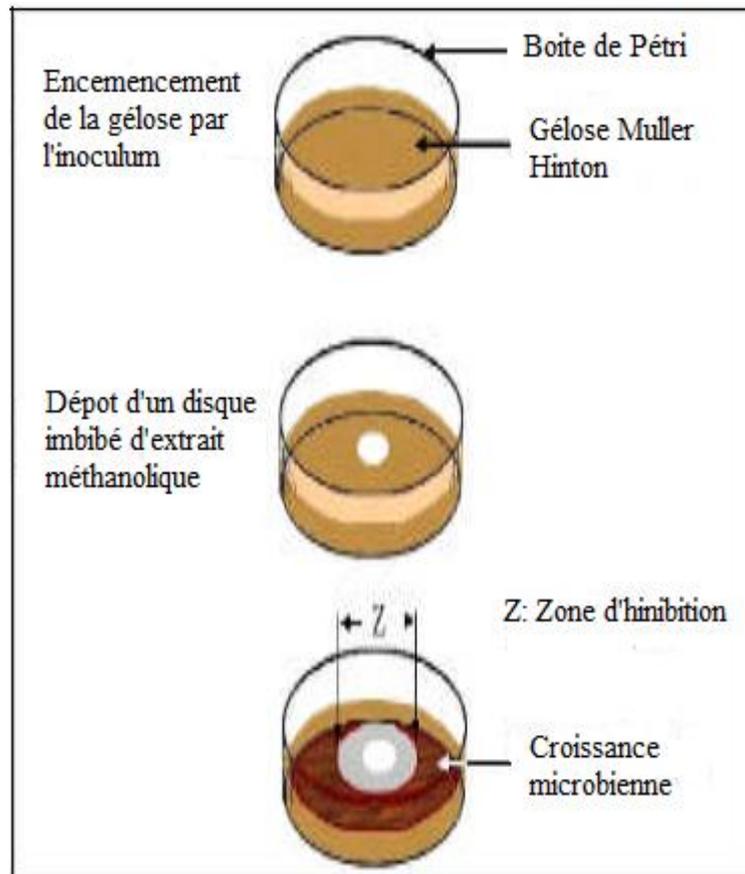


Figure 07 : la méthode d'aromatogramme sur boîte de Pétrie (**Pibiri, 2006**).

b. Préparation de l'inoculum :

- A partir d'une culture pure et jeune de germes de 18 à 24h (bactéries, levures) à tester sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une pipette pasteur, quelque colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger la pipette pasteur dans 5 ml d'eau physiologique stérile.
- Agiter la suspension microbienne (bien homogénéiser) à l'aide d'un agitateur. Son opacité doit être équivalente à 0,5Mc pour les bactéries et 1,5Mc pour les champignons.
- Ajuster l'inoculum, soit en ajoutant quelques colonies, s'il est trop faible, ou l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

c. Ensemencement :

- Les milieux des cultures utilisées sont Muller Hinton (M-H) pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons et les levures.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension microbienne.

- L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sécher de haut en bas, en stries serrées, répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétri de 45° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

d. Incubation et lecture :

- L'incubation est faite dans une étuve à 35°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25°C durant 48 h pour les levures.
- Observer l'absence ou la présence de zone claire autour des disques.
- Mesurer le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle.
- Le diamètre des zones d'inhibition (ZI), nous permet d'estimer la résistance ou la sensibilité des différents germes testés par les extraits méthanoliques, pour classer les germes nous avons utilisé les normes (**Tableau 04**) établies par **Ponce et al.,(2003)**.

Tableau 01 : Les diamètres d'inhibition et leurs degrés de sensibilités (**Ponce et al., 2003**).

Diamètre d'inhibition	Degré de sensibilité
Inférieur à 8 mm	non sensible ou résistante -
Entre 9-14 mm	sensible +
Entre 15-19 mm	très sensible ++
Supérieur à 20 mm	extrêmement sensible +++

e. Dispositif expérimental

Pour chaque souche bactérienne les essais (tests) ont été répétés deux (02) fois pour chaque extrait méthanolique (automne, hiver et printemps) soit 12 essais au total.

L'analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée par le logiciel Excel.

III.4.3. Etude de l'activité anti-oxydante :

L'activité anti-oxydante des extraits méthanoliques de la plante *Rosmarinus officinalis* L. a été effectuée au niveau du laboratoire des projets de fin d'études (PFE) de Département de vétérinaire de l'université SAAD DAHLAB, Blida1.

Afin d'évaluer l'activité anti-oxydante des extraits méthanoliques testés, on a utilisé la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

III.4.3.1. Méthode de piégeage du radical libre DPPH :

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité anti-oxydante des composés phénoliques (BLOIS, 1958; BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont, d'azote (Figure 08) (POPOVICI et al., 2009).

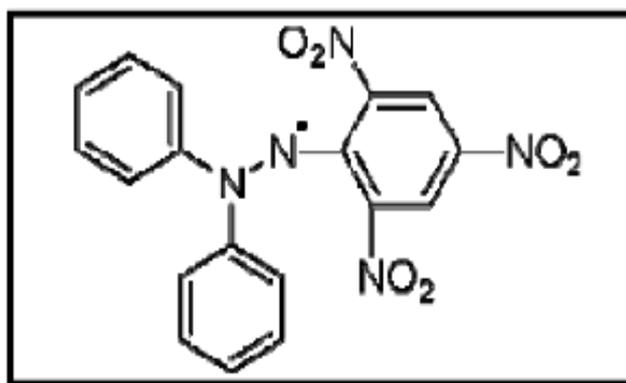


Figure 08 : Structure chimique du radical libre DPPH
(2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle)
(POPOVICI et al., 2009).

a. Principe :

La réduction du radical libre DPPH° (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm

provoquée par les antioxydants (MOLYNEUX, 2004). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Figure 09) (MAATAOUI *et al.*, 2006).

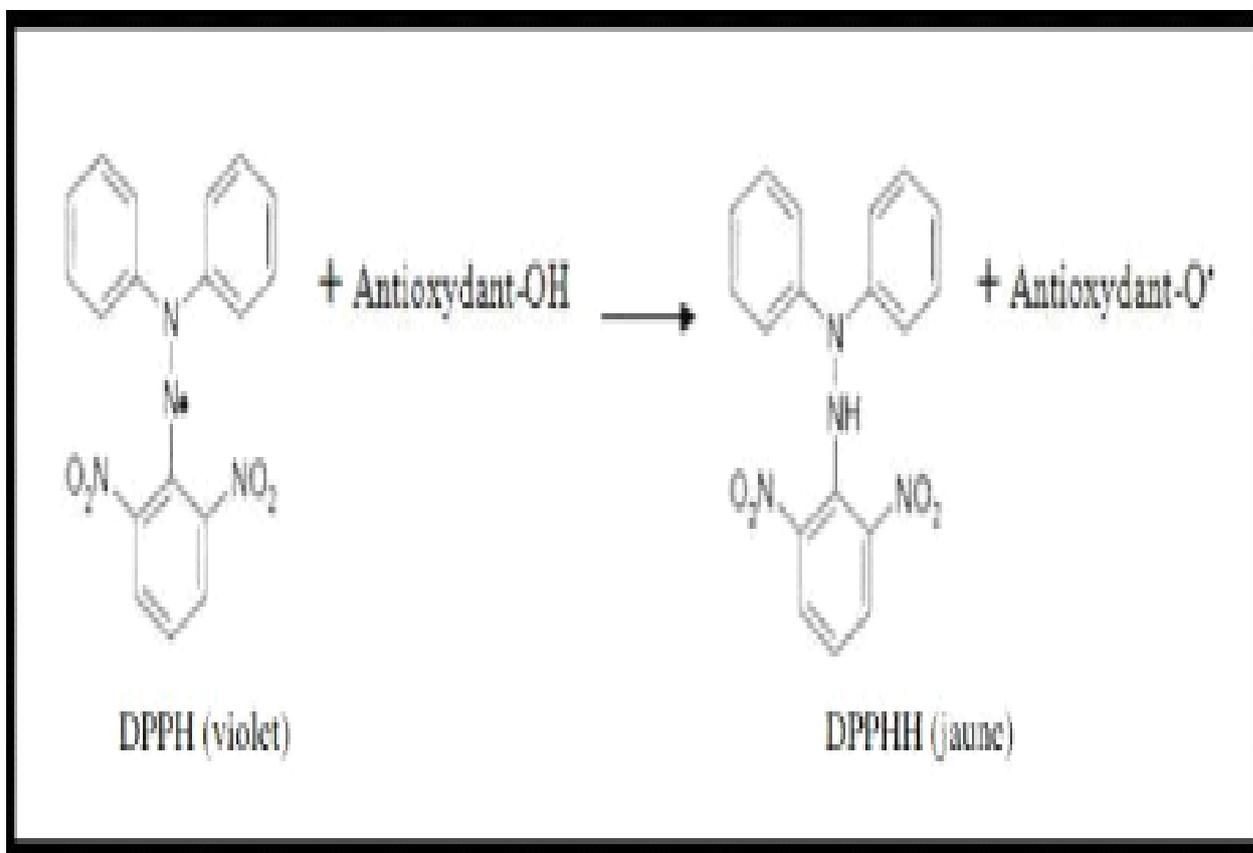


Figure 09 : Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl) (CONGO, 2012).

b. Dosage :

L'activité du piégeage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par LOPES-LUTZ *et al.* (2008) (ATHAMENA *et al.*, 2010). 50µl de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanoïque du DPPH (0,025g/l). Parallèlement, un témoin négatif est préparé en mélangeant 50µl de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant

standard; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration (**BOUGANDOURA, 2013**).

c. L'expression des résultats :

En présence d'un antioxydant la force d'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stœchiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés (**Markowicz Bastos *et al.*, 2007**).

Les résultats peuvent être exprimés en tant que l'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$I \% = [1 - (\text{Abs Échantillon} - \text{Abs Contrôle négatif})] \times 100$$

% : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).

Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon ;

Abs Control négatif : Absorbance du control négatif ;

Les valeurs des concentrations pour inhiber ou réduire 50% de la concentration initiale du DPPH (CI50) ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

Les différents résultats obtenus sont présentés et discutés. Notre but est de voir s'il existe un effet saisonnier sur l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits méthanoliques du *Rosmarinus officinalis* L.

IV.1. Résultats de l'activité antimicrobienne :

Evaluation de L'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques de Romarin :

Les résultats des zones d'inhibition sont représentés dans le tableau 10.

Tableau 02 : Résultats de l'aromatogramme (diamètres des zones d'inhibition en mm de chaque dilution).

Souches	Diamètre des zones d'inhibition (mm)					
	EMC1 (1/16)			EMC2 (1 /8)		
	Automne	Hiver	Printemps	Automne	Hiver	Printemps
<i>Escherichia coli</i>	6.5 (-)	7 (-)	8 (-)	7 (-)	8 (-)	10 (+)
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 (+)	13 (+)	15 (++)	12 (+)	14 (+)	17 (++)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 (-)	6 (-)	6 (-)	6 (-)	6 (-)	6 (-)
<i>Candidas albicans</i>	6 (-)	6 (-)	6 (-)	6 (-)	6 (-)	6 (-)

- EMC1 : extrait méthanolique de romarin à concentration C1=62.5mg/1ml DMSO).
- EMC2 : extrait méthanolique de romarin à concentration C2=120mg/1ml DMSO).

Le diamètre des zones d'inhibitions nous permet d'estimer la résistance ou la sensibilité des différentes souches testées en adoptant la méthode de **MOREIRA & al, 2005**.

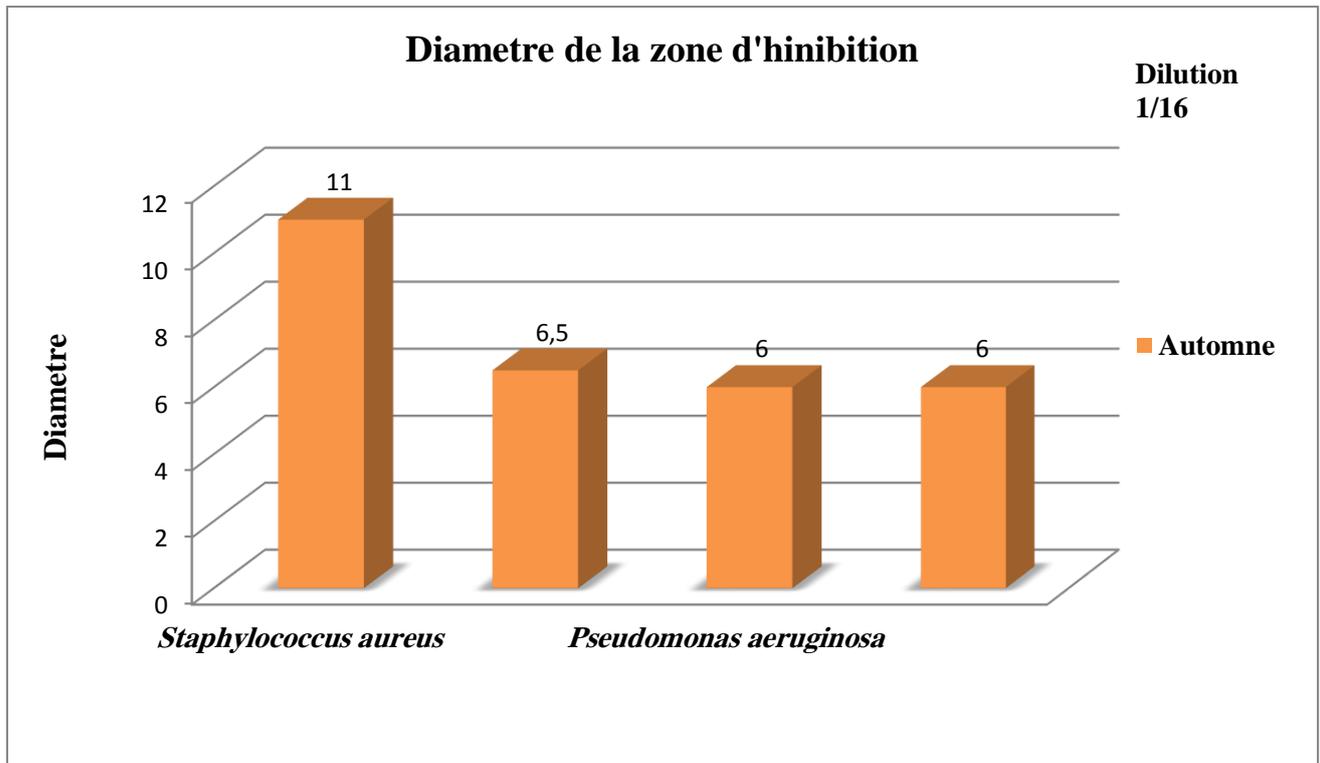


Figure 10 : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des souches d'automne (Dilution 1/16).

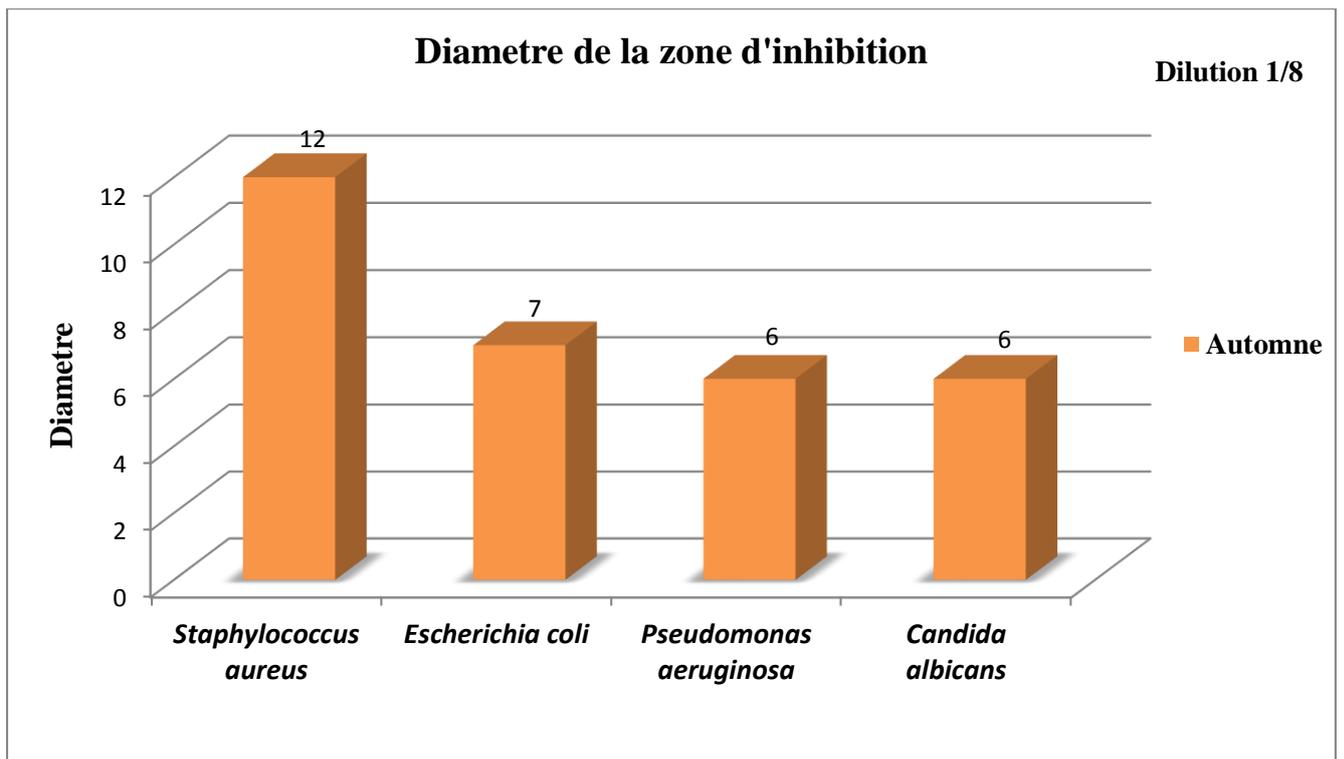


Figure 11 : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des souches d'automne (Dilution 1/8)

Les diamètres des zones d'inhibition des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* de la saison automnale sont compris entre 6 mm et 11 mm pour la dilution 1 /16 et entre 6 mm et 12 mm pour la dilution 1 /8.

D'après les résultats nous constatons que *Staphylococcus aureus* (11mm) pour la dilution 1/16 et (12mm) pour la dilution 1/8 est légèrement sensible vis-à-vis notre extrait méthanolique.

Escherichia coli (6.5mm) pour la dilution 1/16 et (7mm) pour la dilution 1/8 est non sensible vis-à-vis l'extrait méthanolique.

Pseudomonas aeruginosa (6mm) et *Candida albicans* (6mm) ont montré une résistance vis-à-vis nos extraits méthanoliques et cela dans les dilutions 1/16 et 1/8.

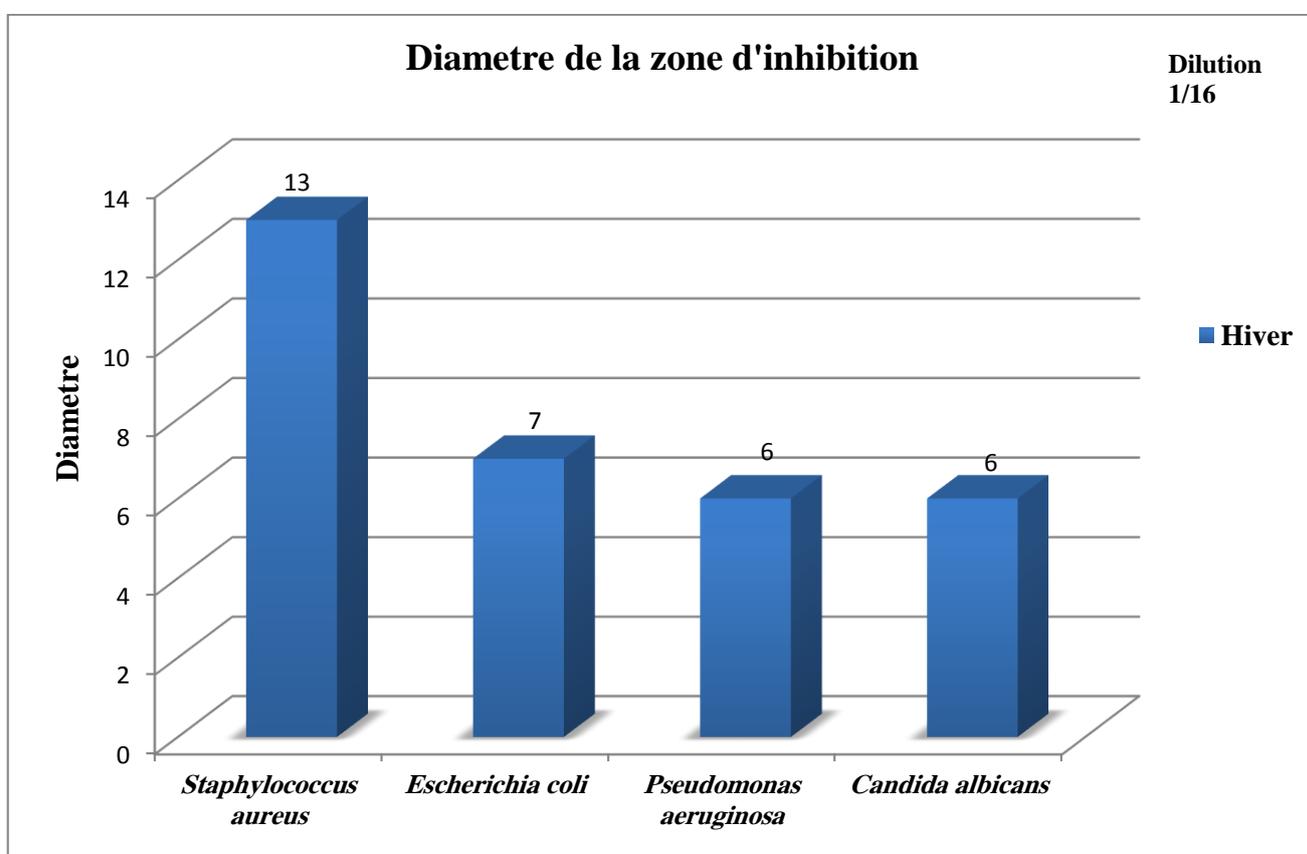


Figure 12: Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des souches de la saison hivernale (Dilution 1/16).

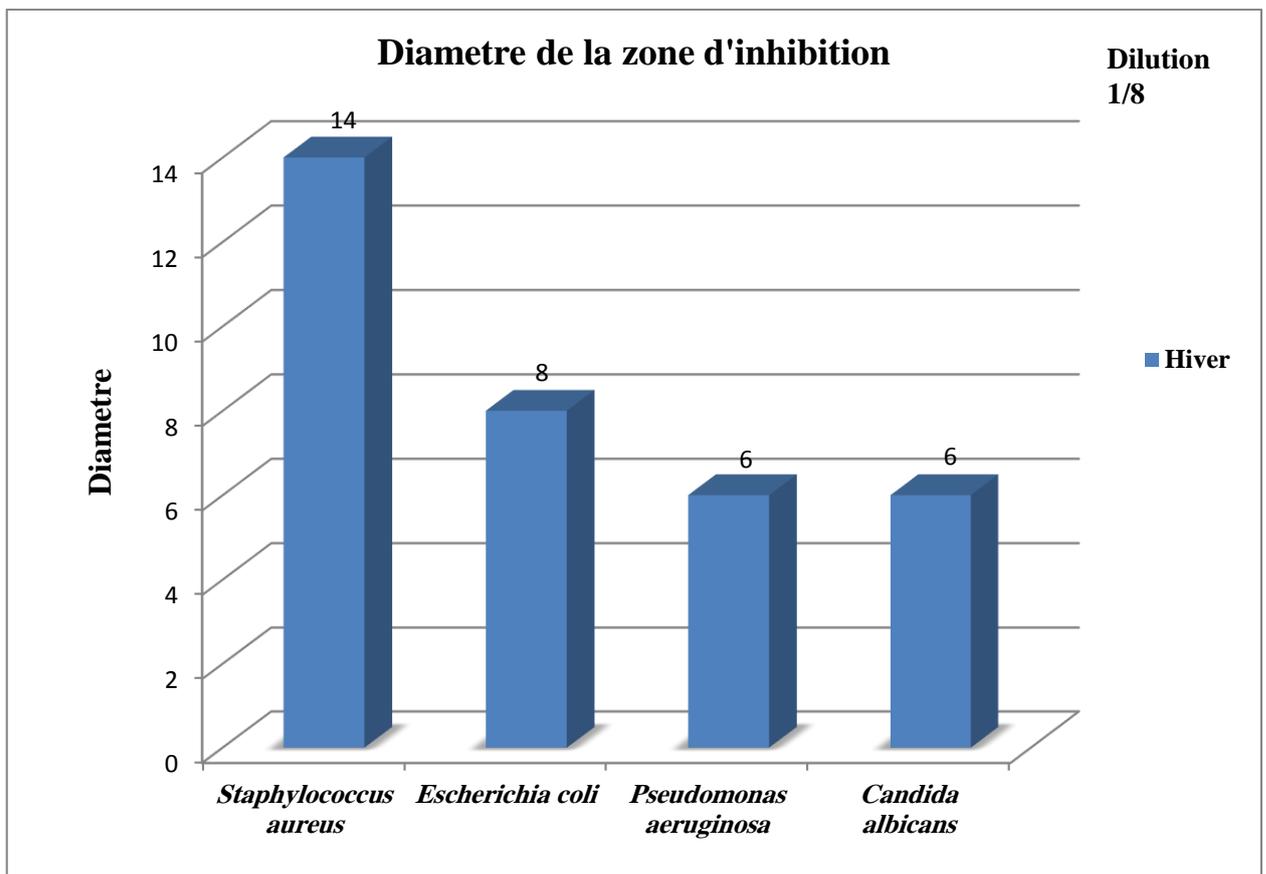


Figure 13 : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des souches de la saison hivernale (Dilution 1/8).

Les diamètres des zones d'inhibition de l'extrait méthanolique de romarin de la saison hivernale sont compris entre 6mm et 13mm pour la dilution 1/16 et entre 6mm et 14mm pour la dilution de 1/8.

Ces résultats montrent que *Staphylococcus aureus* est légèrement sensible vis-à-vis l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* avec (13mm) pour la dilution de 1/16 et (14mm) Pour la dilution de 1/8.

Escherichia coli (7mm) pour la dilution 1/16 et (8mm) pour la dilution 1/8 est non sensible vis-à-vis notre extrait méthanolique.

Pseudomonas aeruginosa (6 mm) et *candida albicans* (6 mm) ont montré une résistance vis-à-vis nos extraits méthanoliques et cela dans les dilutions 1/16 et 1/8.

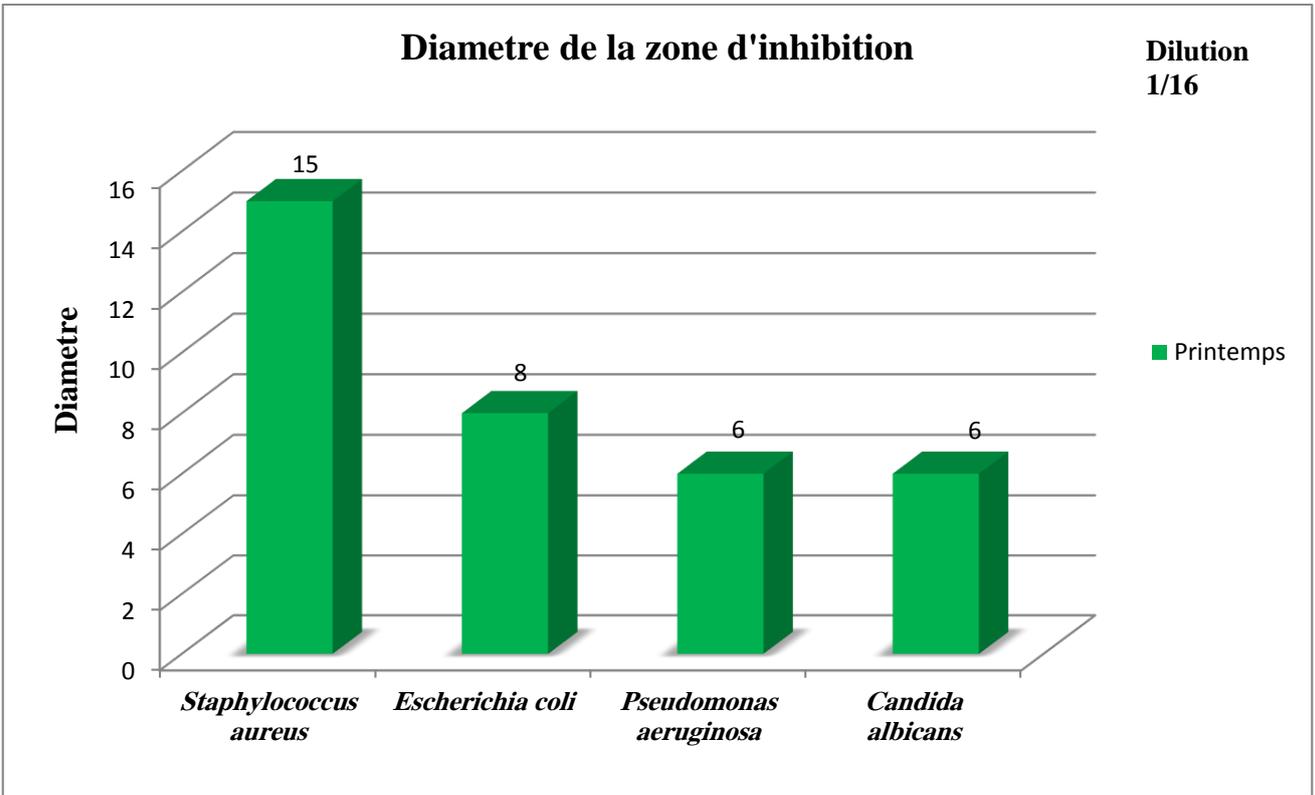


Figure 14 : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des souches de la saison printanière (Dilution 1/16).

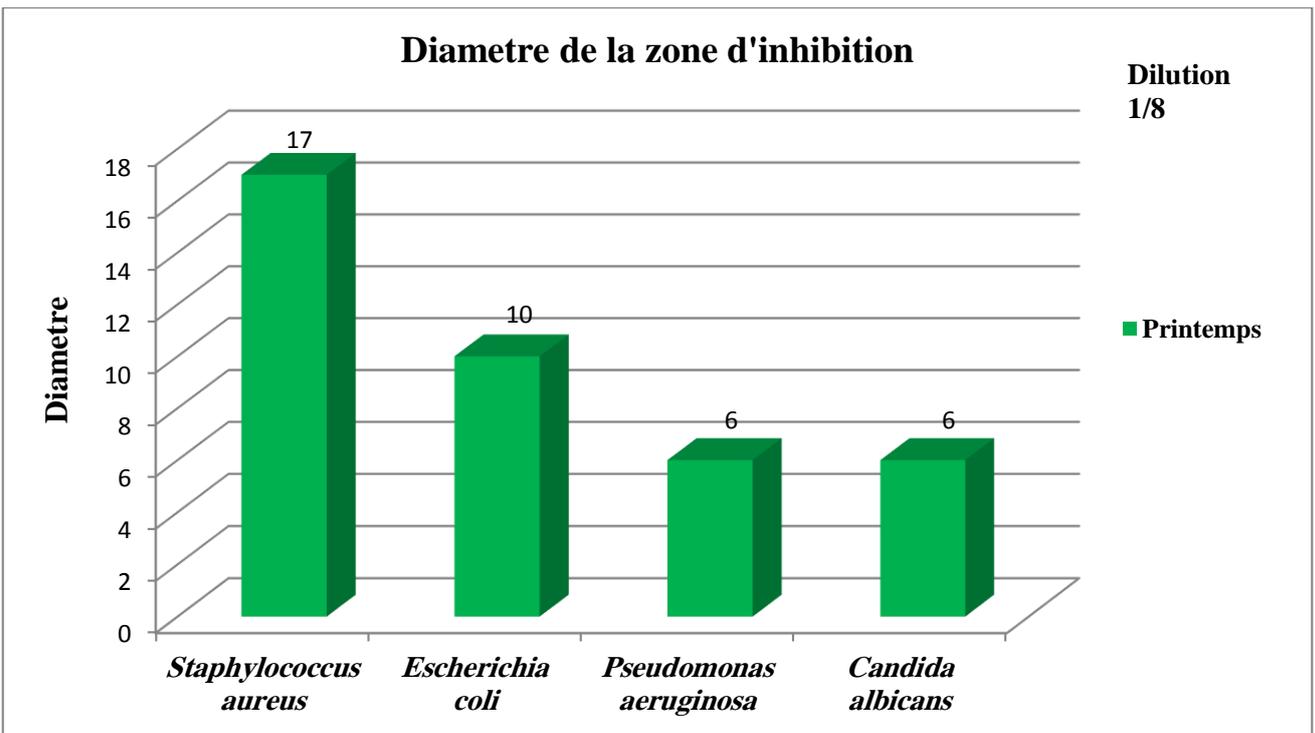


Figure 15 : Histogramme représentant les résultats d'aromatogramme des souches de la saison printanière (Dilution 1/8).

Les diamètres des zones d'inhibition de l'extrait méthanolique de romarin de la saison de printemps sont compris entre 6 mm et 17 mm pour la dilution 1/16 et entre 6 mm et 17 mm pour la dilution 1/8.

Les résultats montrent que *Staphylococcus aureus* est modérément sensible à l'extrait méthanolique de Romarin avec une zone d'inhibition de (15mm) à la dilution de 1/16 et (17mm) à la dilution de 1/8.

Escherichia coli (8mm) pour la dilution 1/16 n'est pas sensible à l'extrait méthanolique de Romarin (8mm) et pour la dilution 1/8 a montré une sensibilité (10mm) vis-à-vis l'extrait méthanolique.

Pseudomonas aeruginosa (6 mm) et *candida albicans* (6 mm) ont montré une résistance vis-à-vis nos extraits méthanoliques et cela dans les dilutions 1/16 et 1/8.

Comparaison des résultats :

Les résultats sont représentés sous forme d'histogramme (**Figure 16, 17**).

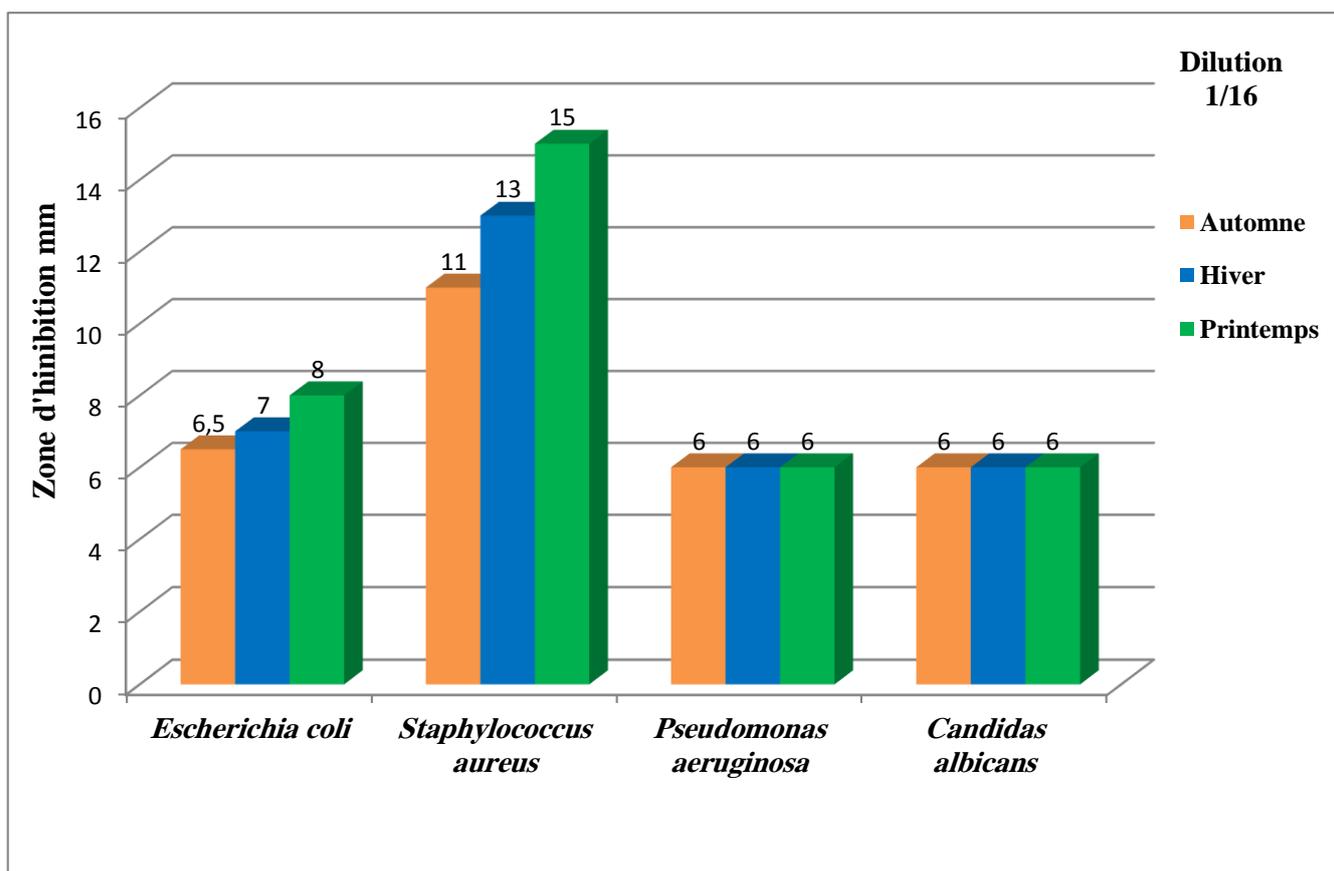


Figure 16 : Activité inhibitrice de l'extrait méthanolique de romarin à EMC1.

Les résultats de la **figure 19** de l'extrait méthanolique du romarin pour la dilution de 1/16 a montré une légère activité inhibitrice pour les deux saisons automne et hiver pour *Staphylococcus aureus* alors qu'en printemps elle était fortement inhibitrice (15mm), avec une différence de +4 mm entre l'automne et le printemps.

Escherichia coli a montré une résistance pour les trois saisons automne (6.5mm), hiver (7mm), et printemps (8mm).

Pseudomonas aeruginosa (6mm) et *Candida albicans* (6mm) ont montré une résistance vis-à-vis l'extrait méthanolique de Romarin et cela aux trois saisons automnale, hivernale et printanière.

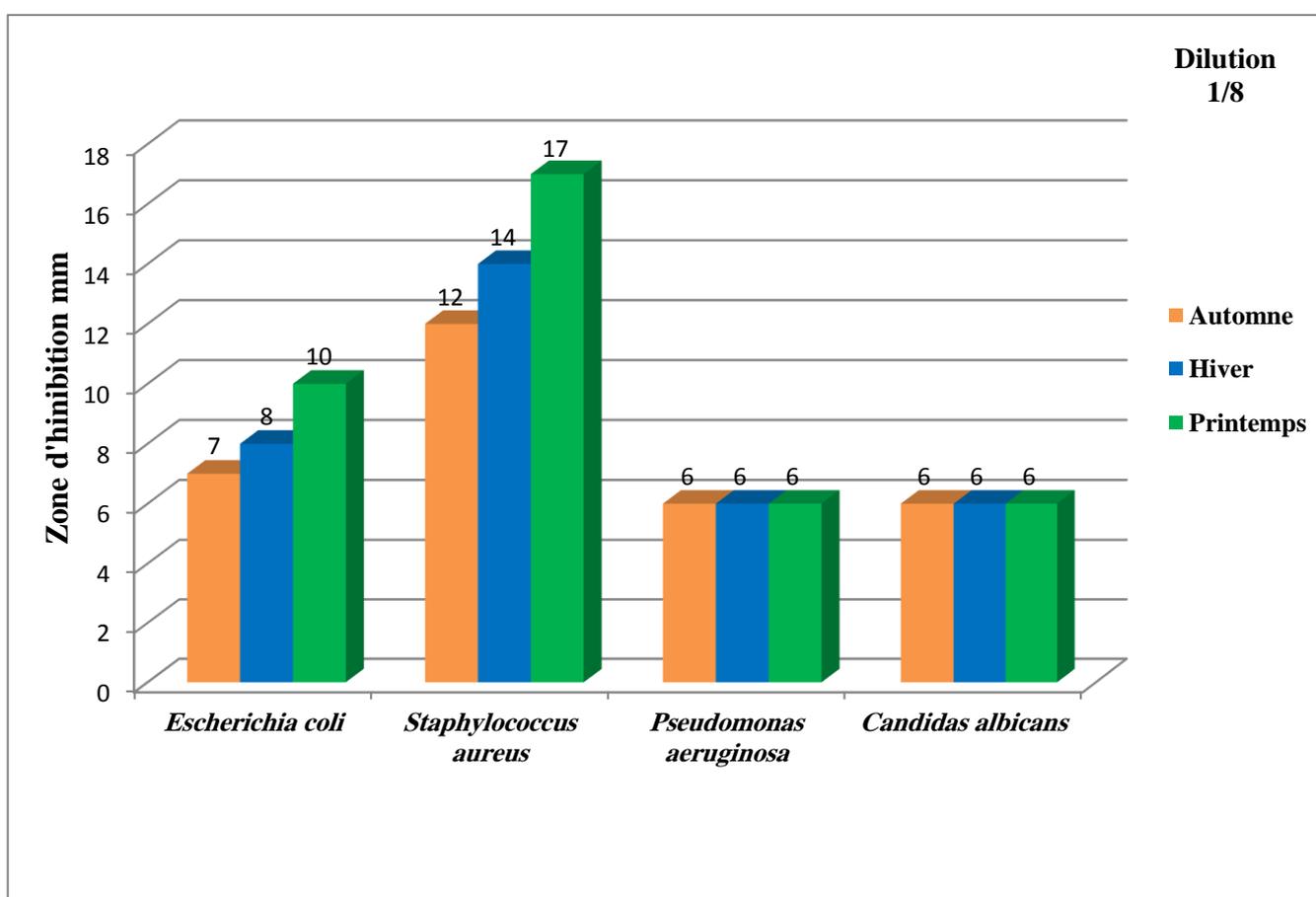


Figure 17 : Activité inhibitrice de l'extrait méthanolique de romarin à EMC2.

D'après les résultats de la figure et pour la dilution de 1/8, nous avons remarqué que *Staphylococcus aureus* a montré pour la saison d'automne ((12mm) et pour la saison d'hiver

(14mm) une légère activité inhibitrice alors que pour la saison de printemps une activité fortement inhibitrice (17mm) vis-à-vis l'extrait méthanolique du romarin.

Escherichia coli a montré une résistance pour les deux saisons automnale (7mm), hivernale (8mm), et une activité légèrement inhibitrice au printemps (10mm).

Pseudomonas aeruginosa (6mm) et *Candida albicans* (6mm) ont montré une résistance vis-à-vis l'extrait méthanolique de Romarin et cela aux trois saisons automnale, hivernale et printanière.

IV.2. Discussion de l'activité antimicrobienne :

L'examen des résultats révèle que les échantillons étudiés ont montré une activité antibactérienne contre les bactéries testées à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* et la levure *Candida albicans* qui se sont montrée résistantes. **(Figure16, 17).**

Nous remarquons que les souches bactériennes Gram (+) paraissent plus sensibles aux extraits méthanoliques testées que les bactéries Gram (-).

Des études ont montré que les plantes de la famille des Lamiacées, notamment le romarin, l'origan, la sauge, le thym et le basilic ont une activité contre de nombreux agents pathogènes d'origine alimentaire : *Staphylococcus aureus*.

- D'après les résultats obtenus, on constate que *Staphylococcus aureus* (Gram⁺) a montré une sensibilité aux extraits méthanoliques du Romarin des trois saisons, cette sensibilité est importante à la saison printanière et ce pour les deux concentrations 62.5mg/1ml DMSO et 120mg/1ml DMSO.

- *Escherichia coli* (Gram⁻) n'a montré aucune sensibilité aux extraits méthanoliques du Romarin aux deux concentrations 62.5mg/1ml DMSO et 120mg/1ml DMSO dans les saisons automnale et hivernale sauf à la concentration 120mg/1ml DMSO à la saison printanière, une légère inhibition a été remarqué.

- *Pseudomonas aeruginosa* (Gram⁻) est résistante aux extraits méthanoliques du Romarin aux deux concentrations 62.5mg/1ml DMSO et 120mg/1ml DMSO et cela aux saisons automnale, hivernale et printanière.

- *Candida albicans* est résistante aux extraits méthanoliques pour les différentes concentrations 62.5mg/1ml DMSO et 120mg/1ml DMSO aux saisons automnale, hivernale et printanière.

Les résultats ont montré que les souches bactériennes testées sont plus ou moins sensibles vis-à-vis les extraits méthanolique du Romarin, donc on peut dire que nos extraits sont actifs sur les souches bactériennes testées, sauf *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* qui sont résistantes.

Cette résistance de *Pseudomonas aeruginosa* contre les extraits méthanoliques testées est due à l'imperméabilité de la paroi de cette bactérie (**Djeddi et al, 2007**). En effet, cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa membrane externe.

Les bactéries Gram (+) protègent leur membrane avec une paroi épaisse, le composant majeur de la paroi est un polymère complexe de sucres et d'acides aminés, appelé le peptidoglycane. C'est un composant essentiel qui donne à la bactérie sa forme et sa rigidité que ce soit chez les bactéries Gram (+) ou chez les bactéries Gram (-) (**Escott, 2006**).

Les bactéries Gram (-) adoptent une forme différente pour protéger leur membrane cytoplasmique, elles fabriquent une structure particulière, la membrane externe, située à l'extérieur du peptidoglycane et qui se distingue des autres membranes biologiques, ce qui lui confère la capacité de résister aux agents chimiques nocifs. C'est une structure à deux feuillets mais le feuillet externe contient un composant unique en plus des phospholipides ; il s'agit du lipopolysaccharide bactérien, molécule complexe rencontrée uniquement chez les bactéries Gram (-) (**Escott, 2006**).

- Il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de la souche fongique *Candida albicans*, ces champignons possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antifongique de l'extrait méthanolique du romarin.

IV.3. Résultats de l'activité antioxydante :

Méthode de piégeage de radical libre DPPH :

L'effet antioxydant exprime la capacité de réduction des radicaux libres. L'activité antioxydante des extraits méthanoliques et de l'antioxydant standard (Vitamine C) par le piégeage du radical libre DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune pâle (DPPH-H) (Figure dans l'Appendice A) mesurable à 517nm. Le virage vers cette coloration et l'intensité de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire (**Rolland Y., 2004**).

Pourcentage d'inhibition :

Les résultats obtenus montrent que l'évolution de l'activité antiradicalaire est dose-dépendante. En effet, le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration que ce soit du standard (vit C) ou des extraits méthanoliques du romarin des trois saisons automnale, hivernale ou printanière jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'épuisement presque total du DPPH• présent dans le milieu réactionnel.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH• en sa forme non radicalaire.

Afin de mettre en évidence l'activité antioxydante de *Rosmarinus officinalis L.* une courbe d'étalonnage réalisée par l'acide ascorbique a été tracée (**Figure 21**).

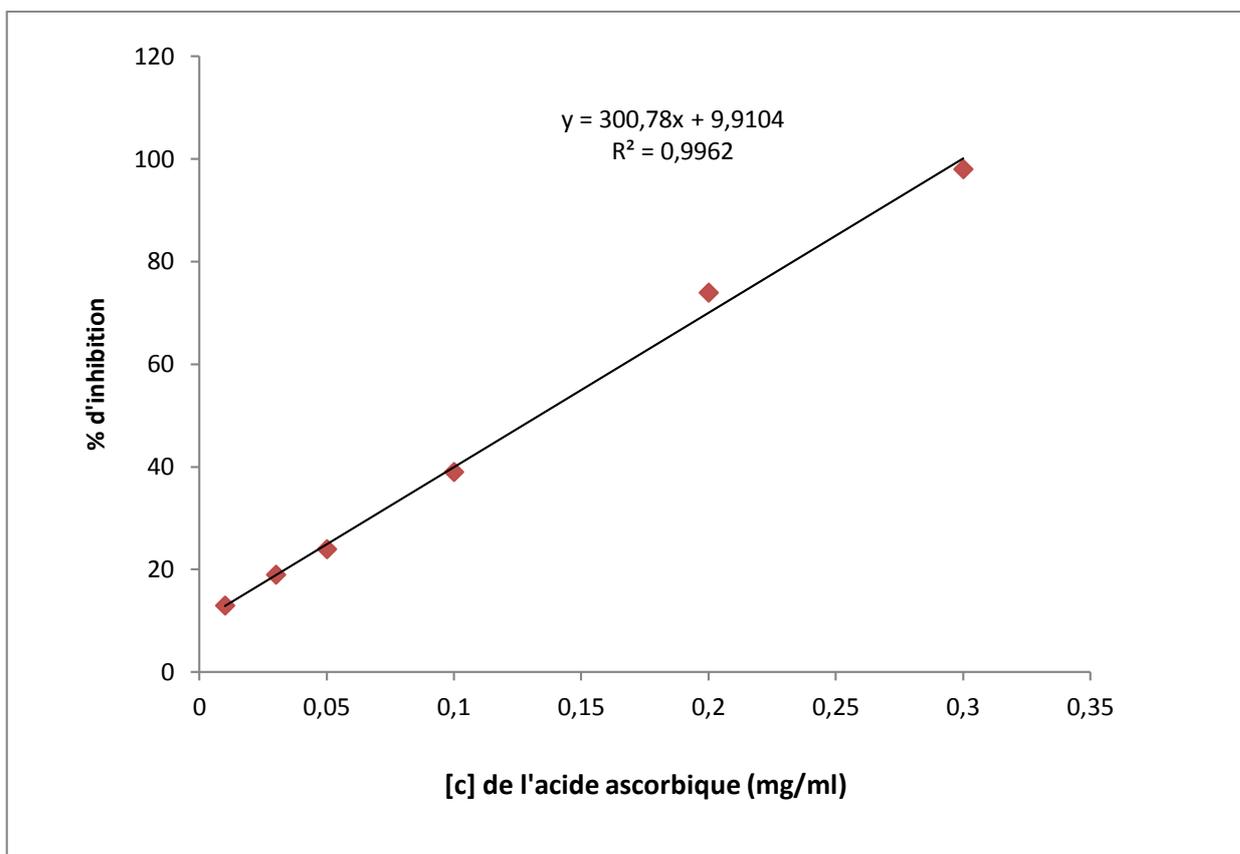


Figure 18: Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.

Les figures (19, 20, 21) et l'annexe 01 correspondants rapportent les résultats du pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique et des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthode de piégeage du radical libre DPPH.

Les extraits testés ont provoqué une diminution plus ou moins importante de l'absorbance à 517nm selon leurs concentrations.

D'après les régressions linéaires, il apparaît que l'augmentation de la concentration de l'extrait méthanolique entraîne l'augmentation de l'activité antioxydante par le piégeage du radical libre DPPH. La plus forte activité est de 94% avec une concentration de 11 mg/ml et la plus faible activité est de 34% avec une concentration de 1mg/ml.

Les figures (19, 20, 21) montrent que l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* présente un pourcentage d'inhibition le plus élevé, il est supérieur à 90% à des concentrations de l'ordre de 4.2 mg/ml pour le printemps et 4.05 mg/ml pour l'hiver et 4.01 mg/ml pour l'automne.

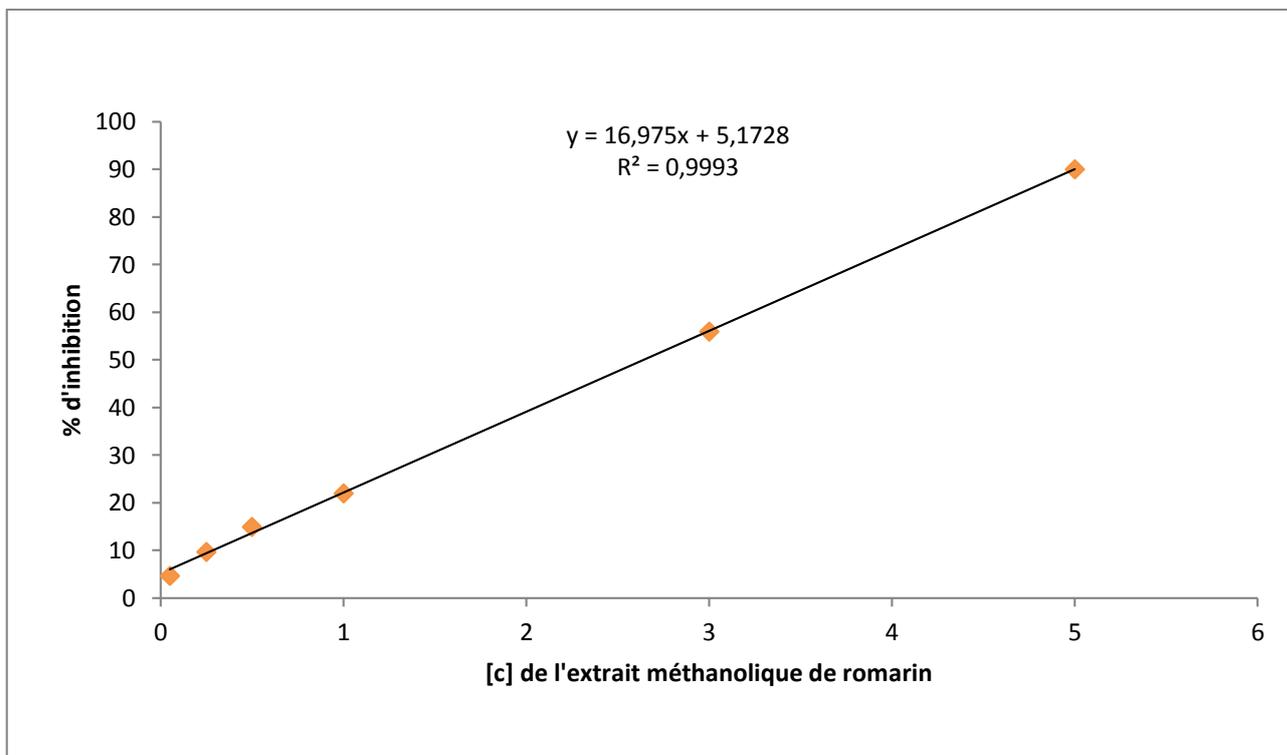


Figure 19 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la saison de l'automne.

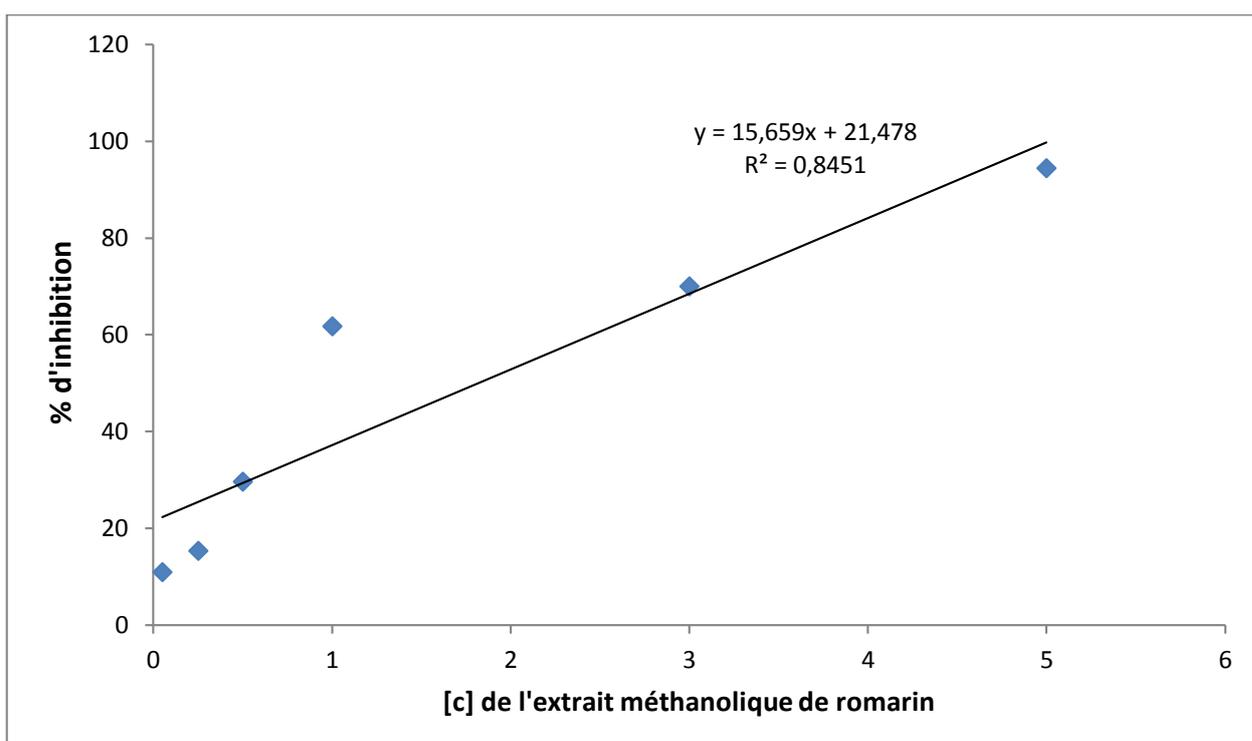


Figure 20 : Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la saison d'hiver.

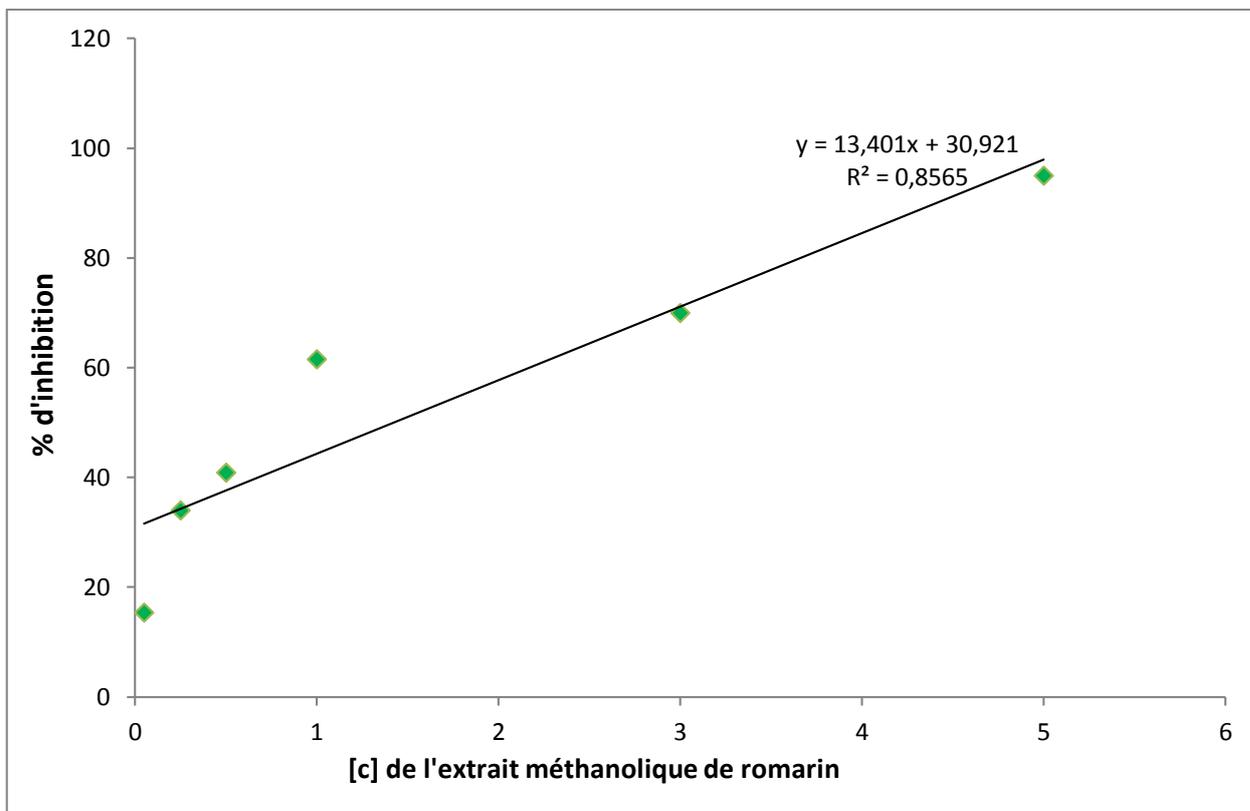


Figure 21: Variation de l'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la saison de printemps.

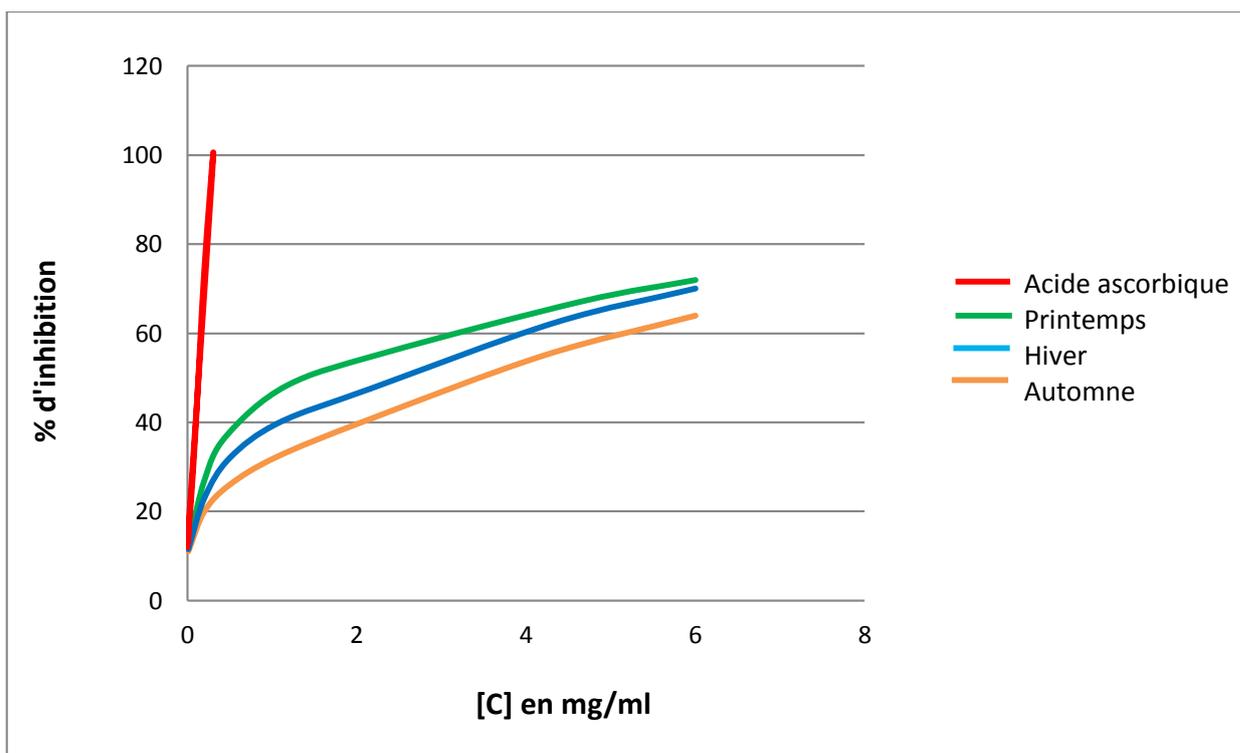


Figure 22: pourcentage d'inhibition des trois extraits méthanoliques comparés à l'acide ascorbique

D'après la **figure 22**, on remarque que l'activité antioxydante de l'acide ascorbique est supérieure à celle de l'extrait méthanolique étudiée. Cette étude nous renseigne sur la capacité antioxydante des extraits méthanoliques du *Rosmarinus officinalis* et la puissance des antioxydants à capter ses radicaux libres.

D'après les résultats obtenus, l'évolution de l'activité antiradicalaire de l'acide ascorbique et les extraits méthanoliques est dose dépendante, car elle augmente avec l'augmentation des concentrations dans le milieu réactionnel.

Le pourcentage d'inhibition augmente graduellement ou progressivement avec la concentration jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'enrayement presque total du DPPH• présent dans le milieu (**Figure 22**).

On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'extrait méthanolique du romarin de la saison printanière est le plus élevé par rapport à celui de la saison hivernale et que le pourcentage d'inhibition pour l'extrait méthanolique de l'automne est le plus bas et cela pour toutes les concentrations utilisées.

Détermination de la valeur IC₅₀ :

L'IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%.

Les valeurs d'IC₅₀ sont déterminées graphiquement, un exemple de calcul est schématisé dans la figure

La capacité antioxydante de nos extraits méthanoliques est déterminée à partir des IC₅₀, paramètres couramment utilisés pour mesurer l'activité antioxydante. C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH dans une période de temps définie. Une valeur faible d'IC₅₀ correspond à une activité antioxydante plus élevée de l'extrait (**Prakash et al., 2007**).

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

- Le calcul d'IC₅₀ : il définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution.

Les valeurs de l'IC₅₀ des trois saisons étudiées de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* (**Tableau 05**) ont été estimées en utilisant la courbe de régression linéaire :

$$y = ax + b$$

Où

$$y = 50\% \text{ (pourcentage de réduction de DPPH)}$$

x : IC₅₀ (concentration en mg/ml)

- Le calcul du pouvoir antiradicalaire : (ARP) qui est inversement proportionnel à l'IC₅₀.
(ARP=1/IC₅₀)

Tableau 03 : Valeurs des IC₅₀ et le pouvoir de l'acide ascorbique et l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis*.

		IC ₅₀ (mg/ml)	ARP
Saisons	Automne	2.640	0.378
	Hiver	1.821	0.549
	Printemps	1.423	0.702
	Acide ascorbique	0.134	7.462

Les valeurs des IC₅₀ trouvées pour les trois extraits méthanoliques testés et l'acide ascorbique sont représentées dans la **figure 23**.

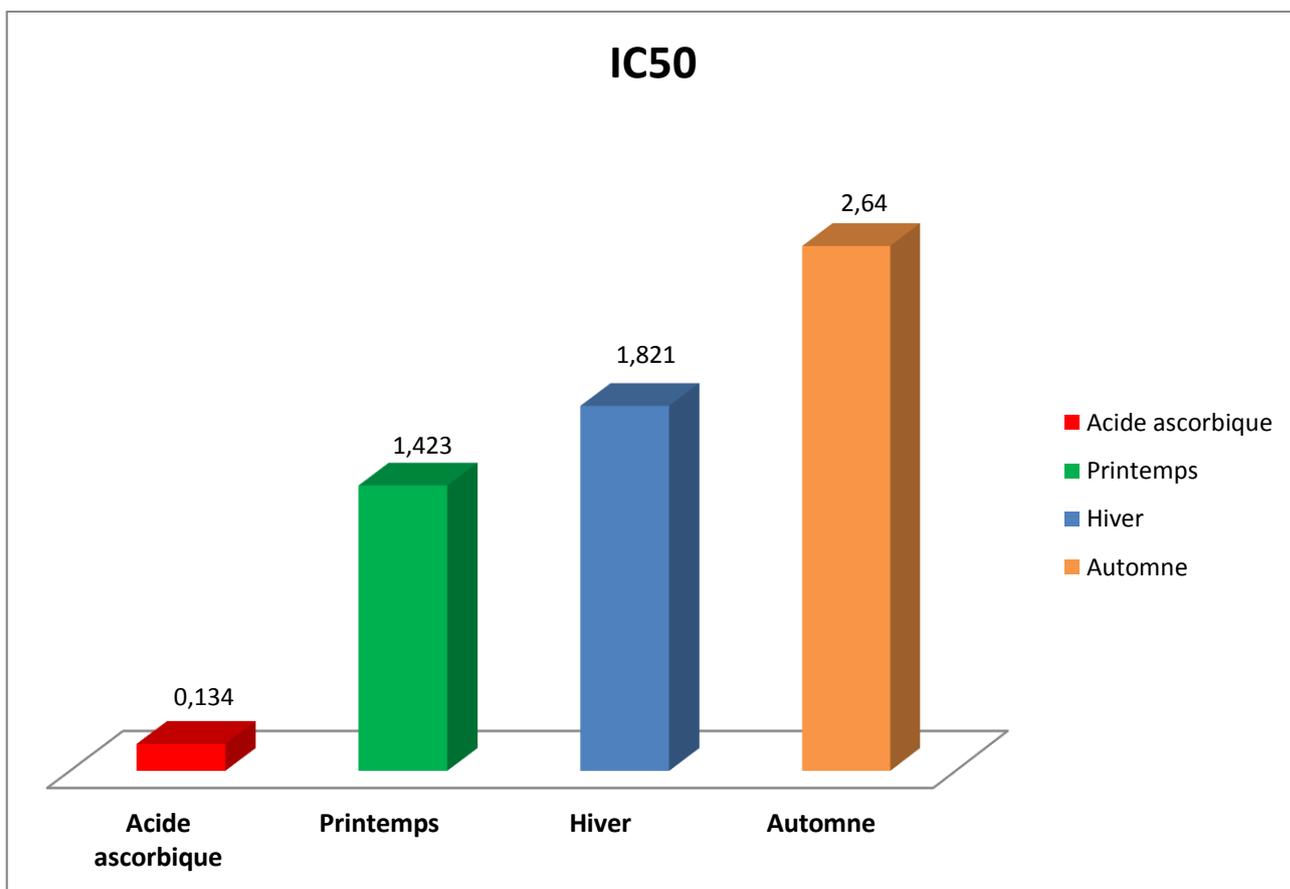


Figure 23: La concentration inhibant 50 % de la réaction.

À des fins comparatives un antioxydant standard est utilisé (l'acide ascorbique). Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec IC₅₀ de l'ordre de 0,134 mg/ml. La valeur IC₅₀ de l'acide ascorbique est conforme avec celle de (Talbi, H et al, 2014).

IV.4. Discussion de l'activité antioxydante :

D'après les résultats, le potentiel antiradicalaire des extraits méthanoliques des saisons automnale, hivernale et printanière testés est inférieur à celui de l'antioxydant standard utilisé (Vit C).

Les résultats présentés dans la **Figure 26** de l'activité antiradicalaire des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* montrent un IC₅₀ (Concentration inhibant 50% de la réaction) égal à 1,423 mg/ml pour la saison printanière et 1,821 mg/ml pour la saison hivernale et enfin 2,64 mg/ml pour la saison d'automne.

Plus la valeur de l'EC₅₀ est faible, plus l'activité antioxydante d'un composé est appréciable.

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

Les différences trouvées dans les études de l'activité antioxydante peuvent être en rapport avec la méthode utilisée pour extraire les composés antioxydants, la méthode d'évaluation et la nature hydrosoluble ou liposoluble de l'antioxydant (**Gachkar et al., 2007**).

D'après **Bouzid & al (2011)**, plusieurs facteurs influencent le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport antioxydant/DPPH*, type de solvant et le pH) et le profil phénolique en particulier.