

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention Du Diplôme Master académique en
Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Agro-ressource et impact environnement

Thème

Activité biologique et antimicrobienne des huiles
essentielles de romarin *Rosmarinus officinalis L.* de la
région de Blida

Présenté par :

Hamdani Abdelhafid

Devant le jury :

Mme CHAOUIA C.	M.C.A	Université BLIDA 1	Président de jury
Mme BENRBIHA F.Z.	Professeur	Université BLIDA 1	Promotrice
Mme MOUAS Y.	Attachée de recherche	Université BLIDA 1	Co-promotrice
Mr BENMOUSSA M.	Professeur	Université BLIDA 1	Examineur

Année universitaire : 2016-2017

Remerciements

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

Nos remerciements vont en particulier à : Mme BENRBIHA F.Z. notre promotrice, Professeur à l'Université Blida 1 ; Blida , que nous la remercions vivement pour son soutien, ses conseils précieux et ses critiques qui nous ont aidés au sein du laboratoire.

Mme CHAOUIA. C. Professeur à l'Université Blida 1 Blida, que nous remercions pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury. Mr BENMOUSSA M. Professeur à l'Université Blida 1, Blida, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Mme MOUAS Y. Doctanrante, notre co promotrice à l'Université Blida 1, Blida, qu'elle trouve ici l'expression de notre gratitude pour ses conseils et ses critiques qui nous ont aidés au sein de notre expérience.

Nous adressons encore nos remerciements à : L'ensemble des membres du département d'agronomie ; L'ensemble des membres de laboratoire SAIDAL (Médéa), de laboratoire d'hygiène(Blida), et l'institut national de Gendarmerie de criminologie (INCC) de Bouchaoui (Alger), qui ont contribué par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable. Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail, trouvent ici nos sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie. Très cordialement.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail : Aux deux être les plus chers au monde, qui ont souffert nuit et jour pour nous couvrir de leur amour, mes parents.

A mon père "BELKACEM " pour son patient avec moi et son encouragement.

A ma source de bonheur, la prunelle de mes yeux, ma mère " DJAMILA". Que le bon ALLAH vous garde en bonne santé.

Je dédie aussi ce modeste travail :

A mes sœurs : KENZA, DJAZIA, et NABILA.

A mes frères : REDHA et ABDELLAH.

A ma chère femme ma LOULOU, qui m'a accompagné toutes ces circonstances amour terme et de dévotion leur aidée et encouragée pendant cette Période de thèse.

A toutes mes amies, à toute la promotion.

A tous ceux que j'aime et que je respecte.

Résumé

Rosmarinus officinalis L. est une plante médicinale qui s'adapte bien aux conditions climatiques semi-aride et aride. Son huile essentielle est largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

L'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de l'espèce par hydro-distillation a permis d'obtenir un rendement de 0,31%, conforme au standards international. L'analyse chimique de l'huile essentielle par CG/SM a permis d'identifier 25 composés terpéniques, dont les constituants majoritaires sont : α -Pinene (20,43%), Camphre (19,13%), Barneol (11,37) et Veбенone (12,13).

L'évaluation de L'activité antimicrobienne sur 6 souches (3 gram – et 1 gram +), une moisissure et une levure, a montré un effet antibactérien intéressant sur les souches à (gram -) principalement *E.coli*(16mm) et s'est montré résistante sur *Staphylo* (8mm) (gram+), et un effet antifongique important vis-à-vis *candida* (10 mm) et *aspergillus* (12 mm).

L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant la méthode de réduction de radical libre DPPH, en comparaison avec l'antioxydant synthétique l'acide ascorbique(témoin). L'huile essentielle de romarin et l'acide ascorbique ont pu réduire le radical DPPH avec des valeurs de CI50 de 0.146 mg/ml et de 0.107 mg/ml, respectivement. L'huile essentielle est dotée d'un potentiel anti radicalaire et anti-oxydant modérée par rapport aux antioxydants standards employés (acide ascorbique)

Mots clés : Romarin, Huile essentielle (HE), CGMS, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

ملخص

Rosmarinus officinalis L هو نبات طبي يتكيف بشكل جيد مع الظروف المناخية شبه القاحلة والقاحلة. ويستخدم زيتها الأساسي على نطاق واسع في صناعة المستحضرات الصيدلانية ومستحضرات التجميل. وأدى استخراج الزيت الأساسي من الجزء الجوي عن طريق التقطير المائي إلى تحقيق عائد قدره 0.31 في المائة، وفقا للمعايير الدولية. وقد حدد التحليل الكيميائي للزيت العطري من قبل CG/SM، 25 مركب *terpéniques* ، والمكونات الرئيسية منها: (α -Pinene(20.43%) ، Camphre(19.13%) ، Barneol (37 ، 11) و Vebeone(12 ، 13) .

أظهر تقييم النشاط المضاد للميكروبات على 6 سلالات (3 غرام - 1 غرام +)، القالب والخميرة، تأثير مضاد للجراثيم مثير للاهتمام على سلالات *E.coli*(16mm) - GRam () وكان مقاوما *Staphylo*(8mm) Gram + () ، وتأثير مضاد للفطريات المهم ضد *candida*(10 mm) و *aspergillus*(12 mm).

تم تقييم النشاط المضاد للأوكسدة باستخدام طريقة خفض الجذور الحرة DPPH ، بالمقارنة مع حمض الاسكوربيك (الشاهد) المضاد للأوكسدة الاصطناعية، وكان الزيت الأساسي من إكليل الجبل حمض الاسكوربيك قادرا على الحد من DPPH Radical مع قيم IC50 من 0.146 ملغ / مل و 0.107 ملغم / مل، على التوالي. الزيوت الأساسية لديها معتدلة المضادة الراديكالية ومضادات الأوكسدة المحتملة بالمقارنة مع مضادات الأوكسدة القياسية المستخدمة (حمض الاسكوربيك).

الكلمات المفتاحية : *Rosmarinus officinalis* ، الزيوت الأساسية (HE) ، CG/SM ، نشاط مضاد للميكروبات، نشاط مضاد للأوكسدة.

Summary

Rosmarinus officinalis L. is a medicinal plant that adapts well to semi-arid and arid climatic conditions. Its essential oil is widely used in the pharmaceutical and cosmetic industry.

Extraction of the essential oil from the aerial part of the species by hydro-distillation resulted in a yield of 0.31%, in accordance with international standards. The chemical analysis of the essential oil by GC / MS identified 25 terpenic compounds, the majority of which are: α -Pinene (20.43%), Camphor (19.13%), Borneol (11, 37) and Verbenone (12, 13).

Evaluation of the antimicrobial activity on 6 strains (3 gram - 1 gram +), a mold and yeast, showed an interesting antibacterial effect on *E.coli* (16mm) (gram -) strains and was shown resistant on *Staphylo* (8mm) (gram +), and an important antifungal effect against *candida* (10 mm) and *aspergillus* (12 mm).

The antioxidant activity was evaluated using the free radical reduction method DPPH, in comparison with the synthetic antioxidant ascorbic acid (witness). Essential oil of rosemary and ascorbic acid were able to reduce the DPPH radical with values of IC₅₀ of 0.146 mg / ml and 0.107 mg / ml, respectively. The essential oil has a moderate anti-radical and antioxidant potential compared to the standard antioxidants used (ascorbic acid).

Key words: Rosemary, Essential oil (HE), CGMS, antimicrobial activity, antioxidant activity.

Sommaire

Remerciements

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Partie I : Etude bibliographique

Chapitre I : Généralités sur le romarin

1. Le romarin <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	5
1.1. Caractéristique botanique.....	5
a. Systématique	6
b. Principaux constituants	6
1.2. Habitat	7
1.3. Utilisation	7
2. Propriétés du romarin <i>Rosmarinus officinalis</i>	8
2.1. Activité antibactérienne	8
2.2. Activité antifongique	8
2.3. Activité antivirale	9
2.4. Activité ovicide	9
2.5. Activité Anti-oxydante	9
2.6. Effet anti-cancérogène	9
2.7. Effet anti-acétylcholinestérase	9
2.8. Effet hypoglycémiant	10
2.9 Effet anti-hépatotoxique	10
3. Composition biochimique du romarin	10

Chapitre II : Les huiles essentielles

1. Historique	12
2. Définition	12
3. Classification	13
4. Répartition et localisation	13
4.1. Répartition	13
4.2. Localisation	13
5. L'extraction des huiles essentielles	14
5.1. Distillation	15
5.1.1. <i>Technique d'hydrodistillation</i>	15
5.1.2. Entrainement à la vapeur d'eau	16
5.1.3. Hydrodiffusion.....	17
5.2. L'extraction à froid	18
5.3. L'extraction par solvants volatils	18
5.4. L'extraction par micro-ondes	19
5.5. Extraction par du CO ₂ supercritique	20
6. Caractéristiques des huiles essentielles	21
6.1. Propriétés physicochimiques des huiles essentielles	21
7. La composition des huiles essentielles	22
7.1. La composition biochimique des huiles essentielles	22
7.1.1. Les terpénoïdes	22
a. Les alcools	22
b. Les aldéhydes	22
c. Les cétones	23
d. Les acides et les esters	23
7.1.2. Les composés aromatiques	23
7.1.3 Les composés d'origines diverses	24
Les chémotypes	24

8. Utilisation des huiles essentielles	24
9. Toxicité des Huiles	25
Activités biologiques des Huiles essentielles	26
10. Activité antimicrobienne.....	26
10.1. <i>Activité antibactérienne</i>	26
10.1.1. <i>Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne</i>	26
A. <i>Méthode de diffusion sur gélose</i>	27
B- <i>Méthode de diffusion en puits</i>	28
C- <i>Méthode de dilution</i>	28
D- <i>Méthode de micro-atmosphère</i>	28
10.2. <i>Activité antifongique</i>	29
10.3. <i>Mécanismes d'action antibactérienne</i>	30
10.4. <i>Activité antioxydante</i>	30
11. Méthodes d'identification des composés.....	31
11.1. <i>Chromatographie en phase gazeuse(CPG)</i>	31
11.2. <i>Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie</i>	31
de masse(CPG/SM)	

Chapitre III : Généralité sur le monde microbien

Introduction	34
Bactériologie médicale	34
Effet antimicrobien	34
4. Infection	35
5. Caractéristiques des souches bactériennes étudiées.....	35
5.1. Bactéries Gram négatif	35
5.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
5.1.2. <i>Salmonella arizonae</i>	36
5.1.3. <i>Escherichia coli</i>	36
5.2. Bactéries à Gram positif	36
5.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	37

6. Caractéristiques des souches fongiques étudiés	37
6.1. <i>Candida albicans</i>	37
6.2. <i>Aspergillus sp</i>	37
7. Activités biologiques des extraits des plantes	38

Partie II : partie expérimentale

Matériel et Méthodes

1. Objectifs de travail	41
2. Présentation de la zone d'étude	41
2.1. Le climat	42
2.1.1. La température	43
2.1.2. La pluviométrie	43
2.1.3. Les vents	44
2.1.4. Humidité relative	45
3. Matériel végétale	45
4. Matériel microbiologique.....	46
4.1. Les microorganismes testés	46
5. Extraction de l'huile essentielle du romarin	47
5.1. Traitement du matériel végétal	47
5.2. Extraction des l'huiles essentielles	48
5.2.1. Dispositif d'extraction	48
5.2.2. Mode opératoire	49
6. Les paramètres étudiés	51
6.1. Le volume d'huile essentielle.....	51
6.2. Le Rendement en huile essentielle	51
6.3. Caractéristique de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	51
6.3.1. Caractéristiques organoleptiques	51
6.3.2. L'identification chimique de l'huile essentielle : Analyse par	51
Chromatographie en phase Gazeuse Couplée par Spectrophotométrie de masse (CPG/MS).	

6.3.2.1. Les conditions opératoires optimales utilisées	52
6.4. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de romarin	52
6.4.1 Méthode de diffusion des disques	52
6.4.2. Préparation des suspensions microbiennes (l'inoculum)	53
6.4.3. Préparation de milieu de culture	54
6.4.4. Ensemencement	55
6.4.5. Préparation des disques	55
6.4.6. Incubation et lecture	56
6.5 Evaluation de l'activité antioxydante	58
6.5.1. Test de l'activité antioxydante	58
6.5.1.1. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	58
A – Principe	58
B- Mode opératoire	59
C- Préparation des dilutions de l'huile essentielle	59
6.5.2. Expression des résultats	60
7. Analyse statistique	61
résultats et discussion	
1. Rendement en huiles essentielles	63
2. Tests organoleptique de l'huile essentielle	63
3. Analyse chimique CPG/SM de l'huile essentielle de romarin	65
4. Activité antimicrobienne de l'HE de romarin « in vitro »	68
5. Activité antioxydante	75
5.1 Détermination d'IC50 et ARP	77
Conclusion et perspectives	82
Références bibliographiques	85
Annexes	101

Liste des tableaux

Tableau 1 : Variations de la composition chimique (composé majoritaire).....	07
de l'huile essentielle de romarin.	
Tableau 2 : température moyennes mensuelles des maxima et des minima.....	43
de 2009 à Blida exprimées en degrés Celsius (° C).	
Tableau 3 : précipitations mensuelles (P) à Blida en 2009, exprimées.....	44
en mm (I.N.R.H, 2009).	
Tableau 4 : Valeurs mensuelles de la vitesse des vents les plus forts.....	44
notées à Soumaâ en 2009.	
Tableau 5 : Moyenne mensuelle des minima et des maxima de.....	45
l'humidité de l'air à Soumaâ en 2009.	
Tableau 6 : Microorganismes testés.....	47
Tableau 7 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE de romarin.....	64
Tableau 8 : Composition chimique majoritaire de l'huile essentielle	66
de <i>Rosmarinus officinalis</i> de la région de Blida.	
Tableau 9 : Résultats synthétisés de la croissance des souches.....	69
Microbiennes.	
Tableau 10 : Résultat du test antioxydant exprimant la concentration.....	78
efficace 50% en mg/ml.	

Liste des figures

Figure 01 : <i>Rosmarinus officinalis</i>	05
Figure 02 : Aspects morphologiques du romarin.....	06
Figure 03 : Schéma du montage de l'hydrodistillation.....	15
Figure 04 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur.....	17
Figure 05 : montage d hydrodiffusion.....	17
Figure 06 : appareil de Soxhlet et appareil de Lickens-Nickerson.....	19
Figure 07 : photo et schéma du principe de la technique d'extraction.....	20
par micro-onde.	
Figure 08 : Les structures de quelques monoterpènes existent dans les.....	23
huiles essentielles.	
Figure 09 : Illustration de la méthode d'aromatogramme.....	27
Figure 10 : méthode de micro atmosphère.....	29
Figure 11 : Localisation de la région d'étude.....	42
Figure 12 : <i>Rosmarinus Officinalis</i> de la région de Blida.....	46
Figure 13 : feuilles de séchées de <i>R. Officinalis</i>	48
Figure 14 : Appareillage utilisé : type clevenger.....	49
Figure 15 : les étapes d'extraction de l'huile essentielle.....	50
Figure 16 : Huile essentiel de <i>Rosmarinus officinalis</i>	50
Figure 17 : l'aromatogramme.....	53
Figure 18 : préparation de l'inoculum.....	54
Figure 19 : préparation de milieu de culture.....	54
Figure 20 : diffusion de l'huile essentielle en milieu solide.....	56

Figure 21 : les étapes de la technique d'aromatogramme.....	57
Figure 22 : Réaction entre le radical DPPH* et l'antioxydant pour.....	59
former le DPPH stable.	
Figure 23 : préparation des dilutions et DPPH.....	60
Figure 24 : échantillon de l'huile essentielle du romarin de la région.....	64
de Blida.	
Figure 25 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	67
Figure 26 : Effet de l'huile essentielle sur <i>Pseudomonas</i>	70
Figure 17 : Effet de l'huile essentielle sur <i>staphylococcus</i>	70
Figure 28 : Effet de l'huile essentielle sur <i>Candida albicans</i>	71
Figure 29 : Effet de l'huile essentielle sur <i>aspergillus</i>	71
Figure 30 : Effet de l'huile essentielle sur <i>E.coli</i>	72
Figure 31 : Effet de l'huile essentiel sur <i>salmonella</i>	72
Figure 32 : Effet antimicrobien de l'HE de romarin sur les	73
Microorganismes testés.	
Figure 33 : Etude comparé par le test d'anova sur les microorganismes	74
Figure 34 : Pourcentage d'inhibition des huiles essentielles et.....	76
de l'acide ascorbique(Témoin).	
Figure 35 : Etude comparé des taux d'inhibitions par le test d'anova	77
Figure 36 : Concentrations de réduction de 50% de DPPH.....	78

Liste des abréviations

Abs_c	: Absorbance du contrôle.
Abs_e	: Absorbance de l'échantillon testé.
AFNOR	: Association Française de Normalisation
ATCC	: American Type Culture Collection
CCL4	: Tétrachlorure de carbone
CO₂	: Dioxyde de carbone
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
CPG/SM	: Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DPPH	: 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
ev	: electro volte.
GST	: glutathion-S-transférase
HE	: Huile (s) Essentielle (s)
HIV	: Virus de l'Immunodéficience Humaine
I.N.P.V	: Institut National de la Protection des Végétaux
I.N.R.H	: Institut national des ressources hydrauliques
IC50	: Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire en à 50% la concentration initiale u radical DPPH
INCC	: Institut national de Gendarmerie de criminologie
MeOH	: méthanol.
M.H	: Mueller Hinton
Mg/ ml	: Millilitre / milligramme
Nm	: Nanomètre

OMS : Organisation mondiale de la Santé

ONIPPAM : Office Nationale Interprofessionnelle des Plantes Aromatique et Médicinale.

Ppm : Partie par million

R (%) : Rendement en huile essentielle (%)

R.Officinalis : *rosmarinus officinalis*.

UFC/ ml : Unités de colonies formés / millilitre

INTRODUCTION

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'homme utilisait les plantes trouvées dans la nature, pour traiter et soigner des maladies (**SANAGO, 2006**). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2003), environ 65-80% de la population mondiale à recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en premiers soins en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (**MA et al., 1997**).

L'Algérie recèle d'un patrimoine végétal important par sa richesse et sa diversité dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes : on y trouve plus de 3000 espèces végétales. Parmi ces ressources naturelles les plantes aromatiques et médicinales qui occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différents domaines : industrie alimentaire, conserverie, pharmacie, et phytothérapie (**DURAFFOURD et al., 1997**).

En effet, les plantes possèdent des milliers de substances actives à l'intérieur de leurs organes (feuilles, fleurs, racines,...) et peuvent, selon des techniques chimiques (extraction, distillation,...), permettre l'isolation du principe actif tels que les composés phénoliques, les huiles essentielles dont ils possèdent des intérêts multiples et des propriétés très intéressantes mis en faveur de l'industrie agroalimentaire (additifs, colorants, arômes, agents de conservation) , pharmaceutique, et agriculture. L'usage des huiles essentielles remonte à fort longtemps, puisque l'homme préhistorique pratiquait l'extraction traditionnelle des principes odorants et médicinaux des plantes.

L'exploitation et la valorisation de ces ressources naturelles reste très limitée et très artisanale. Toutefois, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydantes et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connues dans la médecine.

Le romarin *Rosmarinus officinalis L.*, C'est une plante aromatique stimulante, à l'odeur forte et reconnaissante, appréciée pour ses propriétés aromatiques, antioxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, emménagogues et anti-tumorales. On l'utilise en médecine homéopathique traditionnelle dans plusieurs

Introduction

diagnostics : asthme, palpitation, vomissements, grippe, fièvre typhoïde, elle fait partie des plantes dépuratives pour son action sur le système digestif et urinaire.

Le romarin, comme toutes les plantes aromatiques et médicinales, contient des composés chimiques ayant des propriétés biologiques. L'utilisation de ces molécules à base de plantes peut présenter de nombreux avantages par rapport aux produits de synthèse actuels.

Le but de ce travail consiste à identifier la composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* de la région de Blida, et de mettre en évidence son pouvoir antimicrobien, ainsi que son pouvoir antioxydant. Pour cela, nous avons utilisé du matériel végétal et biologique constitué de bactérie (Gram+), (Gram -), et de champignon (moisissure), (levure).

Partie bibliographique

Chapitre I

Généralité sur le romarin

1. Le romarin *Rosmarinus officinalis* L

Le *Rosmarin* 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. C'est une plante antiseptique stimulante, d'odeur forte apprécié par ses propriétés biologiques.

(BOULLARD, 2010).

1.1 Caractéristique botanique

Les feuilles sont étroitement lancéolées linéaires, faibles et coriaces, les fleurs d'une bleue pale, maculées intérieurement de violet sont disposées en courtes grappes denses s'épanouissent presque tout au long de l'année (GONZALEZ-TRUJANO et al. 2007 et ATIK BEKKARA et al. 2007).



Figure 01 : Vue générale de *Rosmarinus officinalis*
(Photo original)

a. Systématique :

- Règne : Végétal
- Embranchement : Spermaphytes.
- Classe : Angiospermes.
- Sous classe : Gamopétale.
- Ordre : Lamiales.
- Famille : Labiacées.
- Genre : Rosmarinus.
- Espèce : *officinalis* L. (**QUEZEL et SANTA, 1963**).



Figure.02 : Aspects morphologiques du romarin (**QUEZEL et SANTA, 1963**).

b. Principaux Constituants :

Le composé majoritaire de l'huile essentielle du Romarin varie d'une région à l'autre et d'un pays à l'autre (tableau 01). On trouve le 1-8 cinéole, le camphre, le pinène, le linalool, le limonène.

Tableau 01 : Variations de la composition chimique (composé majoritaire) de l'huile essentielle de romarin.

Composé majoritaire	%	origine	référence
a-pinène camphre B-pinène	23.1 14.5 12.2	Algérie (tlemcen)	(ATIKBEKKARA et al.,2007)
a-pinène Linalool Pipéritone	14.9 14.9 23.7	IRAN (Teheran)	(GACHKAR et al ., 2007)
a-pinène 1,8-cinéole	10.2 61.4	TURQUIE(Izmir)	(YESILCELIKTAS et al.,2007)
a-pinène 1,8-cinéole Camphre	11.4 50.2 9.1	Maroc	(OURAINI et al.,2005)
a-pinène Limoéne Camphre	13.5 21.7 21.6	SERBIE (Vojvodina)	(BOZIN et al.,2007)

1.2. Habitat

Originaire des régions méditerranéennes, le *Romarin* pousse spontanément dans le Sud de l'Europe. On le cultive dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps. Il apprécie les climats chauds, modérément secs. **(HEINRICH et al. 2006)**.

1.3. Utilisation

Le romarin est souvent cultivé en agronomie pour son huile essentielle. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique.

L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, aussi bien pour l'assaisonnement des plats et la conservation des produits alimentaires **(ARNOLD et al. 1997)**.

2. Propriétés du romarin *Rosmarinus officinalis*

2.1. Activité antibactérienne

Les effets des extraits aqueux et méthanoliques de romarin, sur la croissance du *Streptococcus sobrinus* et sur l'activité extracellulaire de l'enzyme glucosyl transferase ont été étudiés.

Les résultats ont montré 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 **(TSAI et al., 2007)**.

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. L'extrait obtenu par le dioxyde de carbone (CO₂) supercritique du romarin, a présenté un large spectre antimicrobien. La croissance de 28 sur 29 germes a été empêchée par cet extrait d'acide carnosique **(WECKESSER et al. 2007)**.

2.2. Activité antifongique

La biosynthèse de l'aflatoxine a été inhibée totalement par l'huile essentielle du romarin à une concentration de 450 ppm. Selon les résultats indiqués, le potentiel de cette huile essentielle en tant que conservatif naturel contre l'*Aspergillus parasiticus* **(RASOOLI et al., 2008)**.

En utilisant la technique standard de diffusion sur gélose, a évalué l'activité biologique de 11 huiles essentielles y compris celle du *Rosmarin*, les résultats ont montré que de ces huiles ont une activité inhibitrice modérée sur les cinq levures (*Candida albicans*, *Rhodotorulaglutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowialy politica*) testées **(SACCHETTI et al., 2005)**.

2.3. Activité antivirale

L'évaluation de l'activité antivirale de l'extrait commercial du romarin a indiqué qu'il ya une inhibition de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) à la concentration très basses. Cependant, le carnosol a montré une activité (anti-HIV) à une concentration modérée qui n'était pas cytotoxique (**ARUOMA et al., 1996**).

2.4. Activité ovicide

L'huile essentielle du *Romarin* s'est avérée un agent ovicide contre trois espèces de moustique (*Anopheles stephensi*, *Aedesaegypti* et *Culex quinquefasciatus*) (**GILLIJ et al., 2007**), de même **GILLIJ et al.** ont trouvé que cette huile présente une activité répulsive contre les moustiques (*Aedesaegypti*) (**PRAJAPATI et al., 2005**).

2.5. 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 utilisé en tant qu'épices dont l'activité anti-oxydante la plus élevée (**WANG et al., 2008**).

Plusieurs auteurs ont étudié l'utilisation des extraits du *Romarin* comme antioxydant pour conserver les produits à base de viande (**NASSU et al, 2003**; **BALENTINE et al., 2006**; **FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2005**; **SEBROTYNEK et al., 2005**).

2.6. Effet anti-cancérogène

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**).

2.7. Effet anti-acétylcholinestérase

Des extraits aqueux et méthanoliques de 11 plantes utilisés dans la médecine traditionnelles chinoise pour l'amélioration de la mémoire ont été étudiées pour évaluer leurs activités inhibitrices 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%. **(ADSERSEN et al., 2006).**

2.8. Effet hypoglycémiant

Les observations après l'administration oral de différentes dose de l'extrait éthanolique du romarin à 3 groupes de lapins (lapins ayant une glycémie normal, lapins ayant une hyperglycémie provoquée par l'administration oral du glucose, lapins diabétiques d'alloxane ont clairement montré que cet extrait exerce une activité hypoglycémiant remarquable à une dose de 200 mg /kg **(BAKIRELet al ., 2008).**

2.9. Effet anti-hépatotoxique

De nombreuses études ont été réalisées pour étudier l'effet anti hépatotoxique du romarin, le travail 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'information, la nécrose, normalisé les taux de la bilirubine, la glycogène et l'activité du l'alanine aminotransférase) et enfin il a augmenté l'activité du glutathion-S-transférase (GST) **(MARIE et al., 2004).**

3. Composition biochimique du romarin

L'huile essentielle du romarin (1 à 2% dans la plante) contient : de l'a –pinène (7 à80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 35%), 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 canosolique, romanol, romadial, des acides phénolique, 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 J ,1997)** et de la résine **(BELOUED A ,1998).**

Chapitre II

Les huiles essentielles

1. Historique

Depuis longtemps, les hommes avaient cherché le moyen de séparer les éléments huileux des produits aromatiques. Ils réussirent en soumettant la matière à l'action de la chaleur. Les substances aromatiques étaient transformées en vapeur ; il suffisait de les recueillir et de les refroidir pour les obtenir sous forme liquide. Ce procédé qui se faisait à feu nu, prit le nom de distillation

L'extraction des huiles essentielles par distillation à la vapeur d'eau naît à l'époque de la révolution industrielle et permet le développement de produits alimentaires et de parfums. Au début du XXème siècle, des chercheurs (Chamberland, Cadéac, Martindale) démontrent par leurs expérimentations, le pouvoir antiseptique des huiles essentielles. Mais les véritables « pères » de l'aromathérapie sont Gattefossé puis Valnet et ses collaborateurs. R.M. Gattefossé, pionnier de la parfumerie moderne se brûlant les mains lors d'une explosion dans son laboratoire, a le réflexe génial de plonger ses mains dans un récipient rempli d'huile essentielle de lavande. Soulagé instantanément, sa plaie se guérit avec une rapidité déconcertante. Etonné par ce résultat, il décide d'étudier les huiles essentielles et leurs propriétés.

2. Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverse partie des végétaux. Elles sont concentrées, volatiles, et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur.

Actuellement, leurs utilisations en parfumerie et en alimentation est considérables c'est pour cette raison que l'organisme de normalisation AFNOR NF et 150 ont donné une définition plus précise des huiles essentielles ; ces dernières sont des produits obtenus à partir d'une hydro distillation. .L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques **(BELHADI, 2010)**.

3. Classification

Selon le pouvoir spécifique sur les germes microbiens et grâce à l'indice aromatique obtenu par des chromatogrammes, les huiles essentielles sont classées en groupes.

- Les huiles majeures
- Les huiles médiums
- Les huiles terrains (CHAKOU et BASSOU, 2007).

4. Répartition et localisation

On rencontre les huiles essentielles dans diverses familles botaniques elles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et forment dans le cytoplasme de cellules spécialisées (DEGRYSE et al., 2008).

4.1. Répartition

Les constituants qui composent les huiles essentielles sont répartis dans un nombre limité de familles, Exemple : *Myrtaceae* (Girofle), *Lauraceae* (laurier), *Rutaceae* (citron), *Lamiaceae* (Menthe), *Apiaceae* (Coriandre), *Zingiberaceae* (Gingembre).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes de la plante, par exemple dans les sommités fleuries (Menthe, Lavande) les feuilles (Eucalyptus, Laurier) les rhizomes (Gingembre) les fruits (agrumes, badiane, anis), les racines (Vétiver), bien que cela soit moins habituel dans des écorces (Cannelle) (BELLAKIIDARJ, 1997).

4.2. Localisation

Elles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante. Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines

cellules ou se rassemblent sous formes de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles (**GONZALEZ-TRUJANO et al., 2007**).

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence des structures histologique spécialisés, souvent localisée sur ou à proximité de la surface de la plante qui sont : cellules à huiles essentielles de *Lauraceae*, les poils sécréteurs des *laminaceaes*, poches sécrétrices des *Myrtaceaes*, des *Rutaceaes*, et les *Laminaceaes*, et les canaux sécréteurs qui existent dans des nombreuses familles. Les organes d'une même espèce peuvent renfermer des huiles essentielles de composition différente selon la localisation dans la plante (**DEGRYSE et al., 2008**).

5. Extraction des huiles essentielles

La plupart des huiles essentielles sont obtenues par distillation et entraînement par la vapeur d'eau (sauf les huiles essentielles des hespéridés : citron, orange, bergamote, etc.). Ce procédé est de loin le plus répandu, car il convient à la majorité des plantes. Comme les huiles essentielles sont insolubles dans l'eau mais soluble dans la vapeur, lorsqu'on envoie de la vapeur sur la plante, elle se charge au passage des huiles. Dans un appareil spécial, la vapeur d'eau ainsi lestée de ces essences est envoyée dans un compartiment pour y refroidir. Là, la vapeur redevient donc liquide et les huiles s'en désolidarisent (elles flottent à la surface). On les récupère alors par décantation. Le temps complet de distillation doit être respecté pour l'obtention de l'huile essentielle de bonne qualité qui dévoilera « toute son activité » (**DANIELE FESTY., 2008**). La faible quantité d'HE contenue dans les plantes explique le coût élevé des huiles essentielles, il est lié à la rareté et non au procédé d'extraction qui reste le même pour la plupart des plantes. Il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle.

Il existe différents procédés d'extraction (souvent chimique).

5.1. Distillation :

Selon **PIOCHON (2008)**, il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydro distillation, l'hydro diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

5.1.1. Technique d'hydrodistillation

Les feuilles des espèces végétales utilisées sont découpées en petits morceaux pour faciliter leur introduction dans un ballon en verre de 2 L, rempli d'eau jusqu'aux 2/3 de sa capacité. L'eau est ensuite chauffée dans le chauffe ballon jusqu'à l'ébullition, ce qui entraîne la formation d'une vapeur qui va entraîner les constituants volatiles (**Figure 03**). Ces vapeurs s'élèvent et passent dans le réfrigérant qui est constamment refroidi à une température comprise entre 15°C et 18°C (**TALEB-TOUDERT., 2015**).

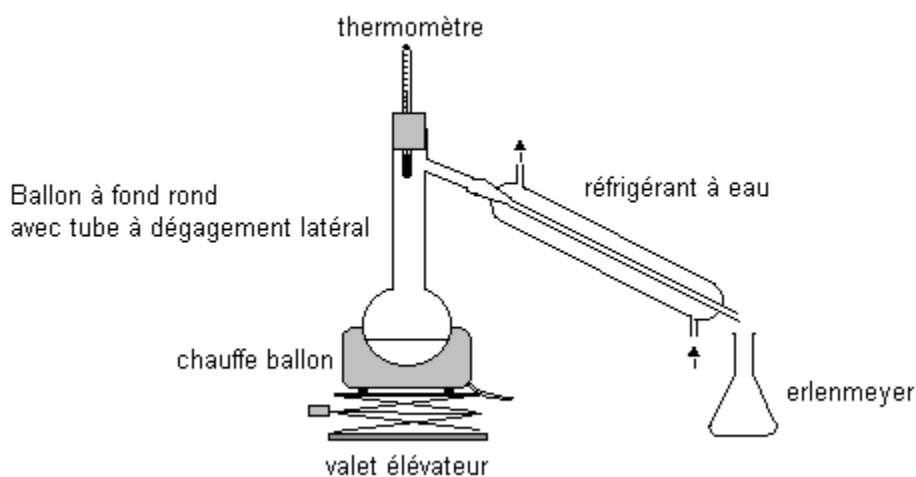


Figure 03 : Schéma du montage de l'hydrodistillation

Une température basse, favorise la formation de cristaux dans le réfrigérant, ce qui pourrait freiner l'éclatement des gouttelettes d'eau. Lorsque la température est trop élevée, le phénomène de condensation ne se réalise pas (**TALEB-TOUDERT., 2015**).

Au contact des parois du réfrigérant, les vapeurs chaudes se condensent et s'écoulent au goutte à goutte dans un récipient où elles forment le distillat. Ce dernier est un mélange de deux phases non miscibles (huiles essentielle + eau) qui seront séparées par extraction liquide—liquide (décantation), au moyen d'un solvant organique (de l'éther diéthylique dans notre cas). L'huile essentielle primaire récupérée est mélangée à l'éther diéthylique (phase organique). Pour éliminer toute trace d'eau, la phase organique est séchée sur une surface de sulfate de sodium anhydre. Après évaporation de l'éther, l'huile finale obtenue est conservée dans des flacons en verre opaque à une température de 4°C (TALEB-TOUDERT., 2015).

5.1.2. Entraînement à la vapeur d'eau :

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct de l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile.

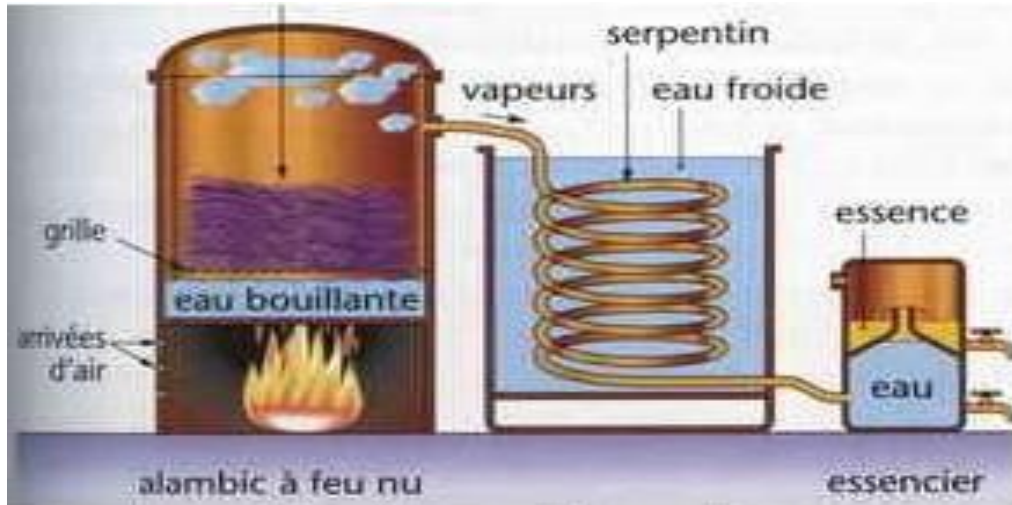


Figure 04 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur (LUCCHE SI, 2005).

5.1.3. Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur (Figure 05). Cette technique relativement récente et particulière. Elle exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale.

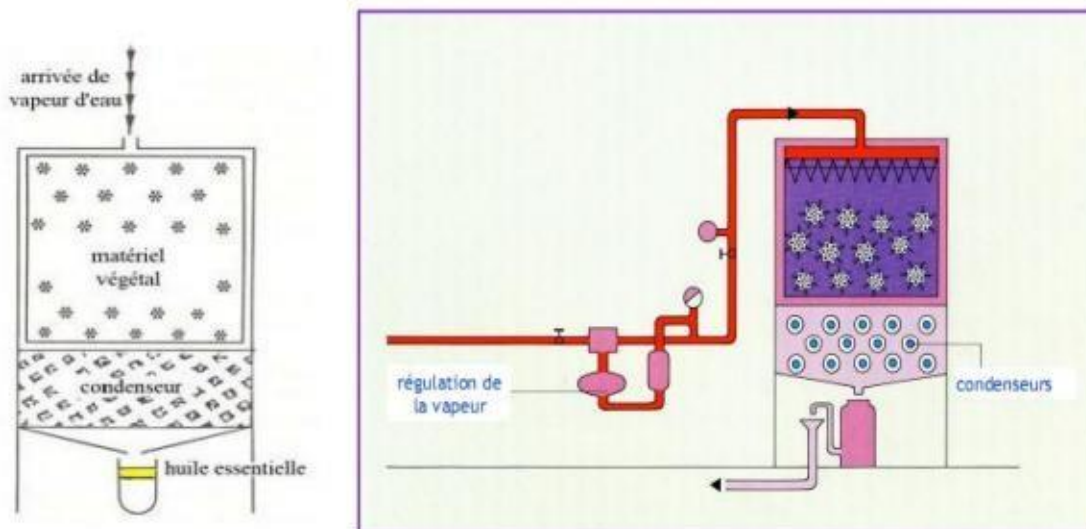


Figure 05: montage d'un hydrodiffusion

L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils, et de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur.

5.2. Extraction à froid

L'essence, altérable par entraînement à la vapeur d'eau, est extraite par différents modes d'extractions : dans l'industrie, les zestes sont dilacérés et le contenu des poches sécrétrices est récupéré par expression manuelle ou à l'aide de machines qui rompent les poches par expression et recueillent directement l'huile essentielle (**BRUNETON, 1999**) ; ou encore après scarifications mécaniques, un entraînement de l'huile essentielle par un courant d'eau. L'essence est séparée par décantation comme précédemment (**PARIS et HURABIELLE, 1981**).

5.3. Extraction par solvants volatils

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone .Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet ou un appareil de Lickens-Nickerson (**Figure 06**).

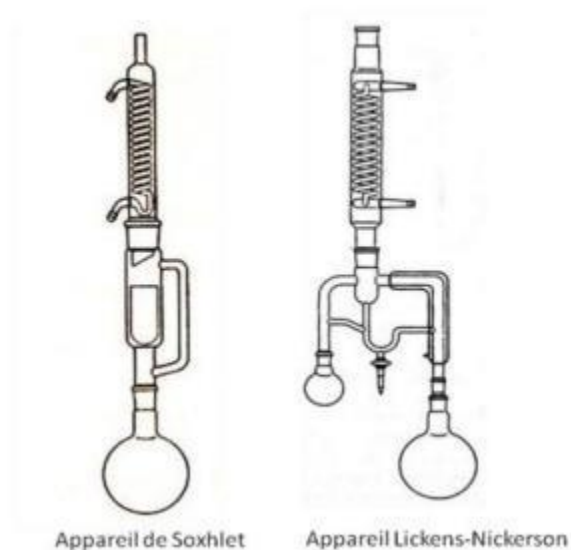


Figure 06 : appareil de Soxhlet et appareil de Lickens-Nickerson.

5.4.Extraction par micro-ondes

C'est un procédé utilisant les micro-ondes et les solvants transparents aux micro-ondes pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances (**PARE, 1997**). Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant (non chauffé). On filtre et on récupère ensuite l'extrait (figure 07). L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes (**FRANCE IDA, 1996**).

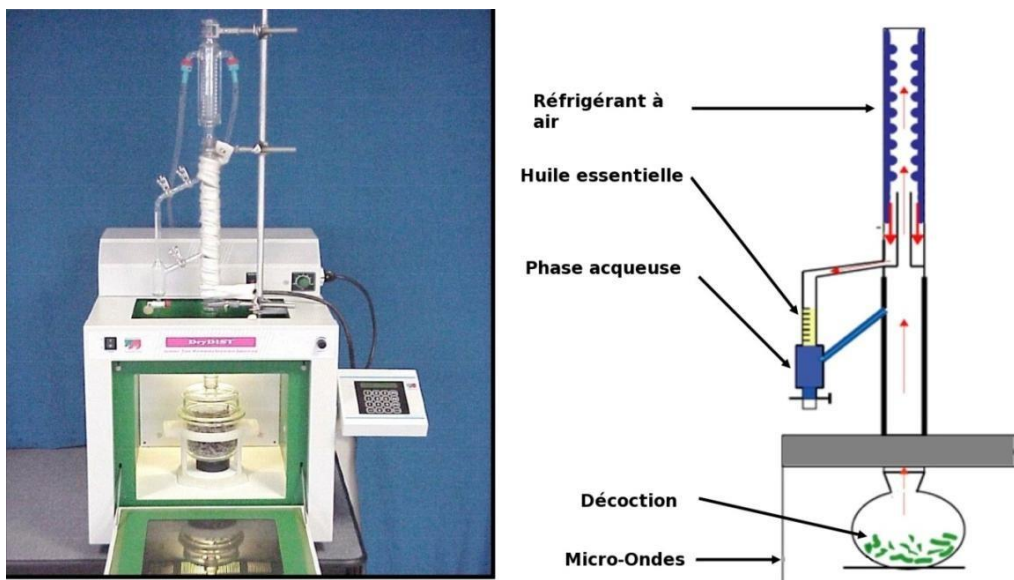


Figure 07: Schéma du principe de la technique d'extraction par micro-onde

5.5. Extraction par du CO₂ supercritique :

La technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone à l'état super-critique. Grâce à cette propriété, le dioxyde de carbone permet l'extraction dans le domaine liquide (supercritique) et la séparation dans le domaine gazeux. Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant.

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus, les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. A ces différents avantages s'ajoutent ceux de l'innocuité, d'inertie et d'ininflammabilité de CO₂ (LAGUNEZ RIVERA, 2006).

6. Caractéristiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances très odorantes, volatiles, souvent colorées et plus légères que l'eau (densité de l'ordre de 0,750 à 0,990). Elles se distinguent des huiles fixes et des principaux lipides en ce sens qu'elles se volatilisent sous l'action de l'air et de la chaleur et, si l'on tache un papier blanc, la marque ainsi imprimée se dissipe au bout de quelques instants (**FABRICE BARDEAU, 2009**).

6.1. Propriétés physicochimiques des huiles essentielles

- les huiles essentielles sont acres, inflammable, très odorantes, volatiles, plus ou moins fluide, souvent colorées et plus légères que l'eau
- leur point d'ébullition varie de 160°C à 240°C et leur densité de l'ordre de 0,759 à 1,096.
- Les huiles essentielles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organiques, mais insolubles dans l'eau à laquelle elles communiquent leurs odeurs.
- Elles sont dextrogyres ou lévogyres et rarement inactives sur la lumière polarisée.
- Un indice de réfraction : l'indice de réfraction (changement de direction de la lumière au passage d'un milieu à un autre) d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air à l'huile essentielle maintenue à une température constante. Cet indice peut être mesuré par un **réfractomètre**.
- L'indice de réfraction est utilisé pour l'identification et comme critère de pureté des huiles essentielles et de composés liquides divers. Chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. Cette pureté est définie dans des intervalles considérés comme acceptable (**HUSNU CAN BASER et GERHARD BUCHBAUER, 2010**)
- Un pouvoir rotatoire : le pouvoir rotatoire d'une huile essentielle est l'angle exprimé en milli-radians et /ou degrés d'angle dont tourne le plan de polarisation

d'une radiation lumineuse de longueur d'onde (589 nm), correspondant aux raies du sodium, lorsque celles-ci traversent une épaisseur de 100 mm d'HE dans des conditions déterminées de température. On peut mesurer le pouvoir rotatoire d'un corps avec un polarimètre **(NAOUELOUIS, 2015)**.

7. Composition des huiles essentielles

Communément appelées **essences**, les huiles essentielles sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides, voire résinoïdes **(FABRICE BARDEAU, 2009)**.

7.1. Composition biochimique des huiles essentielles

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phenylpropane **(TEISSEIRE., 1991)**.

7.1.1. Terpénoïdes :

Le terme terpène rappelle la toute première extraction de ce type de composé dans l'essence de térébenthine. Dans le cas des huiles essentielles, seuls les terpènes les plus volatils, c'est à dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas élevée sont observés. Ils répondent dans la plupart de cas à la formule générale $(C_5H_8)_n$. Suivant les valeurs de n , on a les hémiterpènes ($n = 1$), les monoterpènes ($n=2$), les sesquiterpènes ($n=3$), les triterpènes($n=6$), les tétraterpènes ($n=8$) et les polyterpènes. Les constituants des huiles essentielles sont très variés .On y trouve en plus de terpènes, des hydrocarbures, des esters, des lactones, des aldéhydes, des alcools, des acides, des cétones, des phénols, des oxydes et autres. **(TEISSEIRE., 1991)**.

a. Les alcools

Ce sont des produits de la série terpénique. Ils peuvent être acycliques (géraniol et linalol), monocycliques ou bicycliques.

b. Les aldéhyde

Les aldéhydes contenus dans des huiles essentielles dégagent en général un arôme puissant. Les aldéhydes sont le plus souvent acycliques, tels que le géraniol, le néral et le citronellal.

c. Les cétones

les quantités des cétones dans les huiles essentielles sont négligeables, tels que : le Carvone, le Tagénone, le Camphre et le Fenchone.

d. Les acides et les esters

Ce sont des composés existants chez le végétal, ils sont très répandus dans les huiles essentielles et jouent un rôle important dans les essences. Ce sont des dérivés oxygénés des terpènes qui ont la particularité de présenter un arôme fruitier.

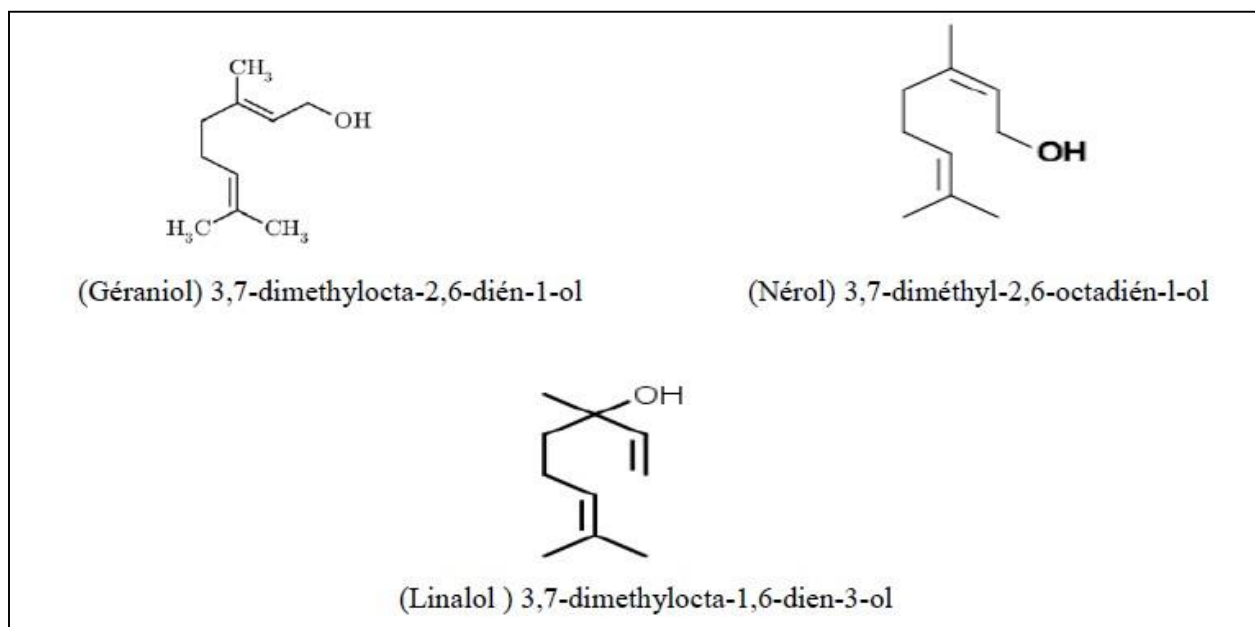


Figure 08: Les structures de quelques monoterpènes existents dans les huiles essentielles

7.1.2. Les composés aromatiques

Contrairement aux dérivés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles et sont en concentration moindre que les dérivés terpéniques. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol. Ces composés

aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle **(TEISSEIRE., 1991)**.

7.1.3. Les composés d'origines diverses

Compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydro distillation. Ces produits peuvent être azotés ou soufrés **(TEISSEIRE., 1991)**.

A- Les chémotypes

La connaissance des chémotypes d'une huile essentielle et leur comportement est fondamentale car elle permet d'envisager l'activité pharmacologique, de prévoir aussi la pharmacocinétique et la biodisponibilité. Pour une même espèce botanique, la composition chimique de l'huile essentielle n'est pas immuable. Les huiles essentielles sont élaborées par les plantes aromatiques au sein des cellules sécrétrices. Leur élaboration est totalement tributaire du rayonnement solaire en l'absence duquel le rendement en produits aromatiques et leur nature sont affectés. En sa présence, et tout particulièrement en fonction de la présence de tel ou tel rayonnement, les types de composants pourront varier considérablement au sein d'une même espèce **(AZALENKO ., 1995)**.

8. Utilisation des huiles essentielles :

Outre l'emploi strictement médical des huiles essentielles, celle-ci sont utilisées dans de nombreux domaines tels que la parfumerie, la cosmétologie, l'agro-alimentaire, et l'industrie chimique. Deux industries se partagent ce marché mondial florissant : il s'agit de l'industrie agro-alimentaire et la parfumerie. Les huiles essentielles interviennent dans la fabrication.

- Des produits alimentaires : jus de fruits, crème glacées, bonbons, ect,
- De tabac pour cigarette

- Des produits d'hygiène et de beauté
- Des parfums, la désinfection des locaux (elles sont antiseptiques).
- Des colles et vernis dans l'industrie chimique.

Les huiles essentielles sont utilisées également pour leurs différentes propriétés et effets thérapeutiques divers (**ANTON et al, 2006**), tels que les effets anti-infectieux, les effets antiparasitaires, anti-inflammatoires, anti-calmants et antispasmodiques.

Les huiles sont de même utilisées pour traiter des aphtes, gingivites et maux de gorge en faisant les gargarismes et les bains de bouche. Le massage aux huiles essentielles constitue un traitement curatif puissant, stimulant et relaxant. Les huiles essentielles sont incorporées dans les crèmes, les lotions, gels et shampooings. Les huiles possèdent également des propriétés insecticides et insectifuges (**OUSSALAh, 2007**).

Les huiles essentielles demeurent un réservoir potentiel de matières actives de soin naturels et une chance pour la médecine (**AZALENKO, 2005**).

9. Toxicité des Huiles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisées sans risque. Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome. Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant.

D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' α -thujone sont toxiques pour les tissus nerveux) (**GUBA, 2001**).

Reste à savoir que dans leur emploi externe, les risques de toxicité sont fortement réduits (**BERNADET, 2000**). Les huiles essentielles peuvent provoquer: agitation, tremblements généralisés, coma, hématurie, néphrite aiguë, ivresse, congestion cérébrale et pulmonaire, dépression du tonus sympathique, hallucination, spasmes musculaires etc. En ce qui concerne leur cancérogénicité, il faut noter la présence de constituants allylbenzène ou propénylphénols (comme le safrol, l'estragol) de certaines huiles qui sont capables d'induire l'apparition de cancers (chez les rongeurs).

Activités biologiques des Huiles essentielles

10. Activité antimicrobienne

De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (**DORANTES *et al.* 2000; DJENANE *et al.* 2002 et 2006 ; KUDA *et al.* 2004, BOUSBIA, 2004**).

Les constituants des Huiles essentielles sont actifs contre une large gamme de bactéries, levures et champignons.

10.1. Activité antibactérienne

Les Huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux *Labiatae* : origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à Huiles essentielles riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol.

Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne.

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

Le thymol et l'eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et, alimentaires.

Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries :

E. Coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Clostridium spp, Helicobacter pylori (**PAULI, 2001**).

10.1.1. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antibactérien des huiles essentielles a une grande influence sur les résultats. Le choix de la méthode est conditionné par l'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de les tester à de faibles concentrations.

A. Méthode de diffusion sur gélose

C'est une méthode ancienne mais toujours d'actualité. Elle permet l'estimation qualitative de l'effet de l'huile. Ce test est réalisé par dépôt de l'huile essentielle, à l'aide de disques de cellulose imprégnés d'une quantité connue de l'huile essentielle (aromatogramme) ou de puits creusés dans la gélose et remplis par l'huile essentielle. Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenues sur géloseensemencée. Cette méthode sert en général à la présélection de l'activité antimicrobienne des HE car:

* Le diamètre d'inhibition n'est pas une mesure directe de l'activité antimicrobienne des HE, les différents constituants ne diffusent pas tous de la même manière dans le milieu gélosé.

* Le diamètre d'inhibition varie en fonction de la densité de l'inoculum et de l'épaisseur du milieu de culture. Il est donc nécessaire de standardiser ces conditions pour pouvoir comparer les résultats (BELAICHE, 1979 ; HULIN *et al*, 1998).

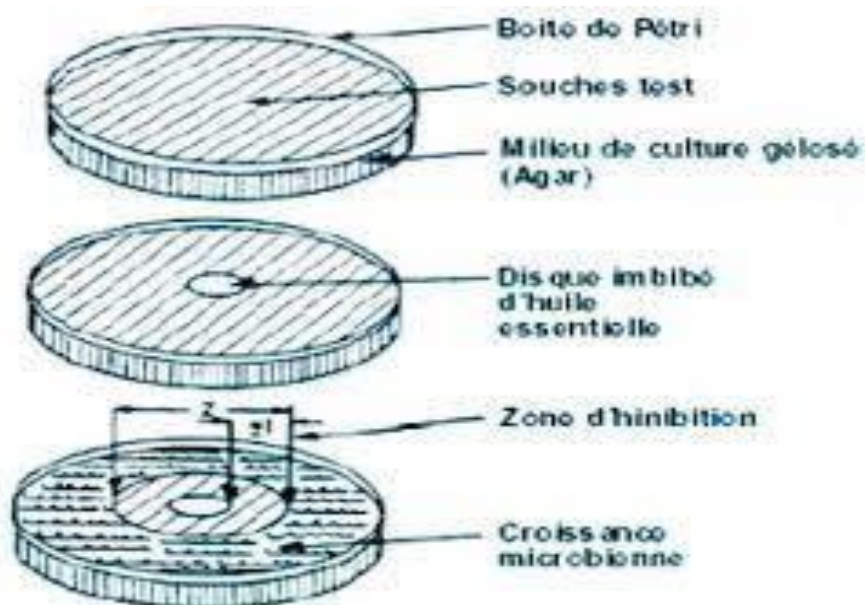


Figure 09 : Illustration de la méthode d'aromatogramme

B- Méthode de diffusion en puits

Méthode proposée par **SHROEDER** et **MESSING** en **1949**. Elle assure une diffusion radiale de l'H.E à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable.

La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'H.E de concentration connue.

L'huile essentielle diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (**EYMARD, 2003**).

C-Méthode de dilution

Les Huiles essentielles à tester peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant).

Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture.

La lecture peut-être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (**ROBERT-DEMUET, 1995**).

D-Méthode de micro-atmosphère

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boîtes de Pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'huile essentielle qui est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée après fixation de l'huile essentielle sur le disque (Figure 10). L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boîte, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés (**PIBIRI, 2005**).

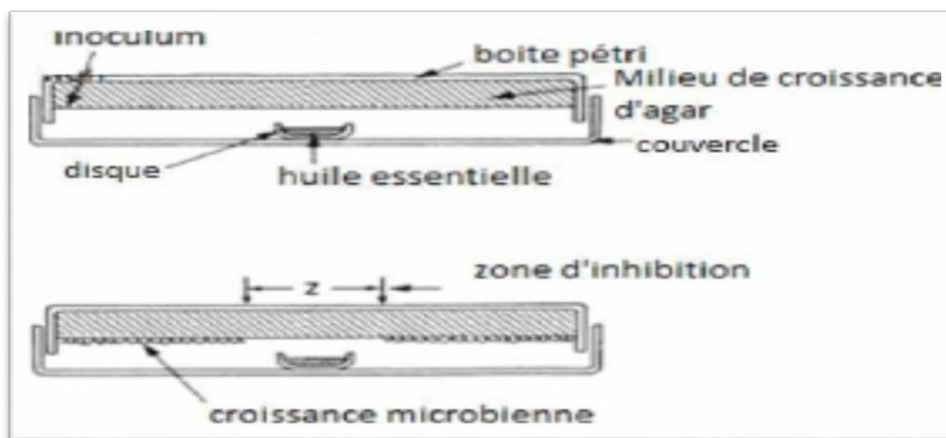


Figure 10 : méthode de micro atmosphère (PIBIRI, 2005).

10.2. Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des Huiles essentielles des plantes aromatiques, contre les moisissures allergisantes, a été mis en évidence par de nombreux auteurs (DE BILLERBECK *et al.* 2002; OUSSOU *et al.* 2004 ; OURAINI *et al.* 2005).

TEIXEIRADUARTE, 2005 a rapporté un effet antifongique contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans* (levure), *Cryptococcus neoformans* et *aspergillus fumigatus*.

Des travaux similaires ont été réalisés par MOHAMMEDI, (2006) sur l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* contre sept moisissures : *Rhizopus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Aspergillus*.

OMIDBEYGI *et al.* (2007) ont démontré que les Huiles essentielles de thym, de la sarriette et du clou de girofle présentent une activité antifongique « *in vitro* » contre *Aspergillus flavus*.

Les Huiles essentielles d'*Eucalyptus saligna* et d'*Eucalyptus camalduiensis* ont montré un effet fongistatique vis-à-vis de *Phaeoramularia angolensis* (JASET-DONGMO *et al.* 2008).

10.3. Mécanismes d'action antibactérienne

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaires (**CARSON et al, 2002**).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut introduire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ion (**CARSON et al, 2002**).

OUSSALAH et al. (2006), suggère que, l'action des Huiles essentielles sur la prolifération microbienne se fait à travers l'altération de la perméabilité membranaire des bactéries en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie.

Le mode d'action des Huiles essentielles dépend du type de microorganismes.

10.4. Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (**RICHARD, 1992**). Lorsque l'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux sortes selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation (**MULTON, 2002**). En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène... etc (**MADHAVI et al., 1996**).

11. Méthodes d'identification des composés

En effet l'analyse d'une huile est complexe, de par son très grand nombre de constituants chimiques volatils mais aussi, souvent, de par l'importance des composés à l'état de traces qui font le caractère spécifique de l'huile (**FRANCE-IDA, 1998**).

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique.

11.1. Chromatographie en phase gazeuse(CPG)

La CPG s'est montrée une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une HE, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative (**PARIS et GODON, 1979**). L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de produit analysé entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte (**SKOOG et al., 2003**).

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé (**TRANCHANT, 1995**).

11.2. Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (**CONSTANTIN, 1996**).

Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étages (**PRADEAU et COHEN, 1992**).

Ionisation : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de l'échantillon de départ
Accélération : Les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.

Séparation : Les ions seront distribués suivant leur rapport masse/charge ;

Détection : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées ;

Traitement du signal : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse/charge.

Chapitre III
Généralité sur le monde
microbien

1. Introduction

Le monde microbien est omniprésent dans l'environnement qui nous entoure (air-eau-aliments...), mais également à l'intérieur et à la surface de notre corps.

La plupart des micro-organismes hébergés par un être humain ne sont pas dangereux, bien au contraire, ils contribuent à maintenir son corps en bonne santé et forment son microbiote.

En revanche, certains micro-organismes peuvent provoquer des maladies : ils sont dits pathogènes.

Les micro-organismes aussi appelés microbes et protistes, forment un ensemble d'organismes vivants microscopiques, invisibles à l'œil nu. C'est leur seul point commun, car ils diffèrent et varient par leur morphologie, leur physiologie, leur mode de reproduction et leur écologie.

Cependant la première personne qui réellement observa et décrivit des microorganismes est un Hollandais, amateur de microscope. **(ESCOTT et al ,2006).**

2. Bactériologie médicale

La flore normale dans le domaine de la santé et de la pathologie provient surtout de travaux dont on ne peut tirer que des arguments indirects :études avec des animaux stériles, observation de patients sous antibiotique, etc. on pense que, du point de vue immunologique et microbiologique, la flore normale contribuerait à préservé notre santé, surtout en éloignant les germes qui pourraient nous infecter ,et peut – être aussi en entretenant un niveau de stimulation immunologique permanent dans l'organisme **(ESCOTT et al ,2006).**

3. 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 microorganismes résistant aux antibiotiques. Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est 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**). Le premier rapport des propriétés antimicrobiennes des épices est apparu en 1880 dont lequel les activités de la moutarde, clou de girofle et de la cannelle et leurs huiles ont été décrites (**PRASAD ET SEENAYYA, 2000**).

4. Infection

Les bactéries pathogènes sont transmises à l'hôte de diverses façons :

- 1- ingestion d'eau ou d'aliments contaminées (voies digestives).
- 2- inhalations d'aérosols ou des particules associés à des bactéries (voies respiratoires).
- 3- inoculation cutanées par contact direct ou indirecte (voies cutanées).
- 4- inoculation muqueuse directe par la salive ou la sécrétion sexuelle.
- 5- inoculation transcutanées par les insectes (*Yersinia pestis*, *Rickettsia*, *Borrelia* ...). par traumatismes ou manipulation iatrogènes (**ESCOTT et al., 2006**).

5. Caractéristiques des souches bactériennes étudiées :

5.1. Bactéries Gram négatif

Les bactéries Gram négatives ont adopté une solution différente pour protéger leur membrane cytoplasmique, elles fabriquent une structure particulière, la membrane externe, située à l'extérieur de la muréine la membrane externe est chimiquement distincte des autres membranes biologiques, ce qui leur 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 ou LPS, molécule complexe rencontrée uniquement chez les bactéries Gram - (**ESCOTT et al., 2006**).

- **5.1.1. *Pseudomonas aeruginosa* :**

Le genre *pseudomonas* est fait de bacilles à Gram négatif, très mobiles grâce à une flagelle polaire. aérobies stricts, se cultive facilement sur les milieux usuels.

Pseudomonas aeruginosa (ou bacille pyocyanique) se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ses 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. Considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales (**AVRIL, 2000**).

- **5.1.2. *Salmonella arizonae***

Les salmonelles sont des entérobactéries, bacilles à Gram négatif, intracellulaires facultatifs, de dimensions moyennes (0,8 µm de large sur 3,5 µm de long), généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche. Elles sont cependant immobiles. Comme les autres bactéries de la famille des Enterobacteriaceae, les salmonelles sont des aéro-anaérobies facultatives

Le réservoir naturel des salmonelles s'étend à tout le monde animal. Les vertébrés, en particulier les mammifères domestiques et les volailles, peuvent héberger ces bactéries au niveau de leur tube digestif. Certains sérotypes sont adaptés à une espèce hôte en particulier, notamment Gallinarum chez les volailles, mais la plupart n'ont pas d'hôte préférentiel et peuvent infecter aussi bien l'homme que l'animal.

- **5.1.3. *Escherichia coli* :**

Bacille aérobie et Gram négatif, 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 virulence particuliers (**NAUCIEL, 2000**). Cette population bactérienne ne représente qu'environ 1 % de celle des anaérobies (voir encadré sur la flore du tube digestif). (**NAUCILIEL C et VILDE J.L ,2005**). La recherche d'E. Coli dans l'eau d'alimentation (colimétrie) est fait pour apprécier sa potabilité. La présence d'E. Coli dans l'eau est le témoin d'une contamination fécale récente et la rend impropre à la consommation (**JEAN-PIERRE, 2006**).

5.2. Bactéries à Gram positif

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

- **5.2.1 *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 aureus est un germe aérobic - anaérobic facultatif **(AVRIL, 2000)**, doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales, possède une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de *staphylocoques*. La bactérie est très répandue 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. Il développe rapidement des résistances aux antibiotiques et les souches hospitalières ne sont souvent sensibles qu'aux glycopeptides **(NAUCIEL, 2000)**.

6. Caractéristiques de souches fongiques étudiées :

- **6.1. *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. *Candida albicans* est considéré chez l'Homme et les animaux à sang chaud comme un commensal des muqueuses, faisant partie intégrante de la flore microbienne. Au niveau des muqueuses digestives et vaginales, la levure se présente sous forme de blastospores, considérées comme la forme saprophyte qui vit en symbiose avec l'organisme hôte. En revanche, lorsque le délicat équilibre entre la forme commensale et les défenses immunitaires est rompu, cette étroite symbiose se transforme en parasitisme, résultant en une maladie infectieuse appelée candidose.

- **6.2. *Aspergillus sp*:**

L'aspergillus est une espèce de champignon, constitué de filaments, présent dans les moisissures. L'aspergillus se retrouve dans le sol, les céréales, les aliments et le compost en décomposition. Ils sont saprophytes de matières organiques en décomposition. Leurs spores sont présentes dans l'air et la poussière, et peuvent

être ingérés en consommant des fruits. Ce sont des contamineurs fréquents.

(MOULINIER, 2003)

7. Activités biologiques des extraits des plantes :

Parmi les ressources naturelles, les plantes médicinales et aromatiques jouent un rôle non négligeable dans l'économie. Les extraits de ces plantes ont toujours fait l'objet de plusieurs études vues leur rôle dans l'activité biologique

Une étude faite par **SIBIRINA (2010)** a montré que deux extraits naturels du Poivrier de Guinée (*Xylopiya aethiopyca*) ont été évalués in vitro et in vivo pour tester leurs efficacités fongicides sur le mycopathogène *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici*. Les résultats obtenus ont montré que la croissance radiale mycélienne et la reprise de la pastille mycélienne ont été totalement inhibées par la poudre naturelle brute extraite des fruits de *Xylopiya aethiopyca*.

Les biotests de toxicité des huiles essentielles des feuilles de *Cestrum parqui* L'herit a montré une mortalité totale des jeunes criquets pèlerin (*Schistocerca gregaria*) au stade L5 dans un délai de 2 à 4 jours **(BARBOUCHE, 2001)**.

Concernant l'activité antibactérienne des extraits des plantes, **MOROH et al., (2008)** ont évalué in vitro le pouvoir antibactérien de l'extrait acétatique de *Morinda morindoides* (Baker) Milne Redheat (Rubiaceae) sur huit souches d'*Escherichia coli* : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli* 2361, *Escherichia coli* O26 H6, *Escherichia coli* O142 K86 et *Escherichia coli* O126 B16. Toutes ces souches bactériennes testées se sont révélées sensibles à l'extrait étudié.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel et méthodes

1. Objectifs de travail :

L'objectif de ce travail est d'identifier la composition chimique de l'huile essentielle du romarin *Rosmarinus officinalis* L. spontanée, d'évaluer son activité antioxydante et mettre en évidence son pouvoir antimicrobien vis-à-vis quelques souches microbiennes.

2. Présentation de la zone d'étude

Le matériel végétal provient de la région de Blida. La région de Blida appartient à la partie occidentale de Mitidja. Elle est limitée au Nord par la capitale d'Alger, Boumerdes et Tipaza, au Sud par Médea, l'Atlas et la montagne de Chréa, les gorges de la Chiffa, à l'Ouest par Ain Defla et à l'Est par Bouira (figure 11). Elle s'étend sur une superficie de 1696 km². Elle est située à une altitude de 163 m. Les coordonnées géographiques de cette région sont 36° 43' N et 2° 49' E.

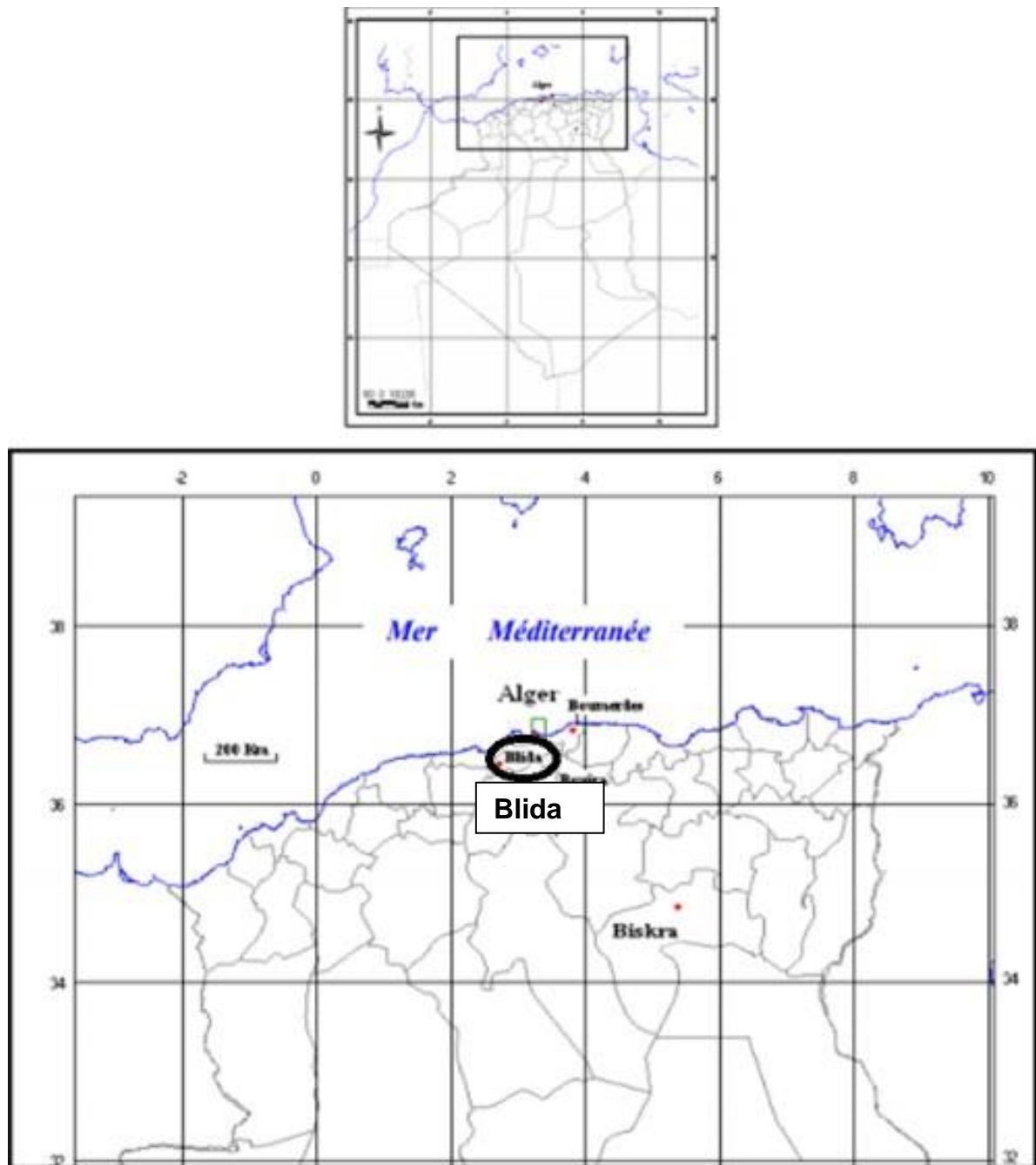


Figure 11 : Localisation de la région d'étude

I.N.P.V., 2010

2.1. Le climat

Les principaux facteurs atmosphériques ayant une influence sur la flore spontanée et la faune sont la température, la pluviométrie, la vitesse du vent, l'humidité relative

.Les relevés de ces facteurs sont enregistrés au niveau de la station de l'institut national des ressources hydrauliques (I.N.R.H) de Soumaâ à Blida.

2.2.1. La température

Le tableau 02 regroupe les températures moyennes mensuelles, leurs minima et maxima obtenus dans la station de l'Institut National des Ressources Hydrauliques de Soumaâ (Blida) en 2009.

Tableau 02 – Température moyennes mensuelles des maxima et des minima de 2009 à Blida exprimées en degrés Celsius (° C).

Mois		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Année													
2009	M	19	19,5	25,0	26,0	38,5	41,5	39,5	35,0	25,96	24,61	21,66	26,5
	m	3,0	2,5	6,0	9,0	13,5	19,5	23,0	22,5	22,1	17,90	13,86	6
	(M+m)/2	11	11	15,5	17,5	26	30,5	31,25	28,75	24,03	21,25	17,76	16,25

(M)= moyenne des températures maximales mensuelles.

(m)= moyenne des températures minimales mensuelles.

(M+m)/2= moyenne mensuelle des températures) (I.N.R.H., 2009).

D'après le tableau 02 pour l'année 2009, nous constatons que le mois le plus chaud est juin avec 41,5 °C, et le mois le plus froid est février avec 2,5 °C.

2.1.2. La pluviométrie

Les relevés de la pluviométrie de la région d'étude pour l'année 2009 sont notés dans le tableau 03.

Tableau 03 : précipitations mensuelles (P) à Blida en 2009, exprimées en mm. (I.N.R.H, 2009).

Mois	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Total
P (mm)	167,2	20,4	65,5	83,1	28,7	0,3	1,7	1,3	86,2	08,9	100,0	132	695,6

La pluviométrie mensuelle enregistrée dans la station météorologique de Blida pour l'année 2009, montre un maximum de 167.2 mm. Observé en janvier et un minimum de 0.3 mm noté en juin (tableau 03).le total des précipitations en 2009 est égale à 695,6 mm.

2.1.3. Les vents

Les vents exercent une grande influence sur les êtres vivants (**FAURIE et al., 1984**).La vitesse des vents mensuels les plus forts exprimée en m/s, enregistrée à Blida en 2009, est notée dans le tableau 04

Tableau 04 : - Valeurs mensuelles de la vitesse des vents les plus forts notées à Soumaâ en 2009.

Mois	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
V max (m/s)	8,3	8,2	7,9	7,8	7,8	8,1	7,6	7,8	8,6	8,8	9,1	8,2

(V max = vitesse des vents maximale, m/s= mètre /seconde). (I.N.R.H, 2009).

D'après le tableau 04 , les valeurs de la vitesse des vents les forts varient de 7,6 m/s (27,36 km/h) à 9,1 m/s (32,76 km/h).la plus grande valeur est notée en novembre avec 9,1m/s.

2.1.4. Humidité relative

Le tableau 05 présente les valeurs de l'humidité relative enregistrées pendant l'année 2009.

Tableau 05 : Moyenne mensuelle des minima et des maxima de l'humidité de l'air à Soumaâ en 2009 .

Mois		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Année													
2009	M (%)	84,7	81	86,8	86,5	80,7	71,6	73,1	83,6	87,8	84,2	76,6	79
	m (%)	46,3	33,3	37,6	34,5	24,5	16,4	17,9	31,3	41,0	28,1	26,6	28,1
	$\frac{M+m}{2}$	65,5	57,1	62,2	60,5	52,6	44,0	45,5	62,3	64,4	56,1	51,62	53,56

(**M%**=moyenne des humidités de l'air maxima mensuelles, **m**= moyenne des humidités de l'air minima mensuelles, **(M+m)/2**= moyenne mensuelle des humidités de l'air. (I.N.R.H., 2009).

Les relevés de l'humidité relative de l'air notés au niveau de la station de soumaâ pour l'année 2009 montrent un mois plus humide qui est janvier avec 65,5% (tableau 05) et le mois le moins humide est juin avec 44,0%.

3. Matériel végétal

Le matériel végétal a été récolté au niveau du département des Sciences Agronomiques de l'Université Saad DAHLEB (Blida) en saison printanière (16 avril), seule la partie aérienne (feuilles et jeunes tiges) qui a été collectée en début de matinée afin que le matériel végétal soit le plus frais possible.



Figure 12 : *Rosmarinus Officinalis* de la région de Blida

4. Matériel microbiologique

4.1. Les microorganismes testés :

Le support microbien utilisé est composé de six souches de références (04 souches bactériennes (01Gram+ et 03 Gram–)) une levure, et une moisissure. Fournies dans des milieux de conservation (GN) par le laboratoire d'hygiène de Blida (Tableau 06).

Tableau 06: Microorganismes testés

Microorganismes testés	Gram	Souches	Référence	Source
Bactéries	Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	L.B.H
	Gram-	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	L.B.H
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	L.B.H
		<i>Salmonella arizona</i>	ATCC 13314	L.B.H
Champignon	Levure	<i>Candidas albicans</i>	ATCC 10231	L.B.H
	Moisissure	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 10231	L.B.H

5. Extraction de l'huile essentielle de romarin

5.1. Traitement du matériel végétal

L'extraction des huiles essentielles s'est effectuée au niveau du laboratoire phytopharmacie de département biotechnologie, durant les mois « Fin d'Avril et Mai ».

Les échantillons, fraîchement récoltés, sont séchés à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant 15 jours. Une fois la plante séchée, nous avons séparé les feuilles des rameaux et elles sont conservées dans des sacs propres et aérés en papier pour servir ultérieurement à l'extraction de l'huile essentielle. (Figure 13)



Figure 13 : feuilles de séchées de *R. Officinalis*.

5.2. Extraction des l'huiles essentielles :

Parmi les différentes techniques d'exploitation des plantes aromatiques, nous avons opté pour l'extraction des huiles essentielles par hydro distillation.

5.2.1. Dispositif d'extraction

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clevenger, il est constitué d'un chauffe ballon qui permet la distribution homogène de la chaleur dans le ballon, un ballon en verre pyrex où l'on place les feuilles séchées et l'eau distillée, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement du ballon, un collecteur en verre pyrex également qui reçoit les extraits de la distillation (figure 14).



Figure 14 : Appareillage utilisé : type clevenger.

5.2.2. Mode opératoire :

Il consiste à immerger directement 100 g du matériel végétal à traiter dans un ballon (alambic) de 1 Litre, rempli d'environ 700 ml d'eau distillée, qui est ensuite porté à ébullition pendant 3h. Les vapeurs hétérogènes formées dans le serpentin sont condensées sur une surface froide qui est celle du réfrigérant, ainsi la séparation eau- essences s'effectue par une simple différence de densité. L'huile essentielle obtenue est gardée au réfrigérateur à 4 °C et à l'obscurité jusqu'à son utilisation.

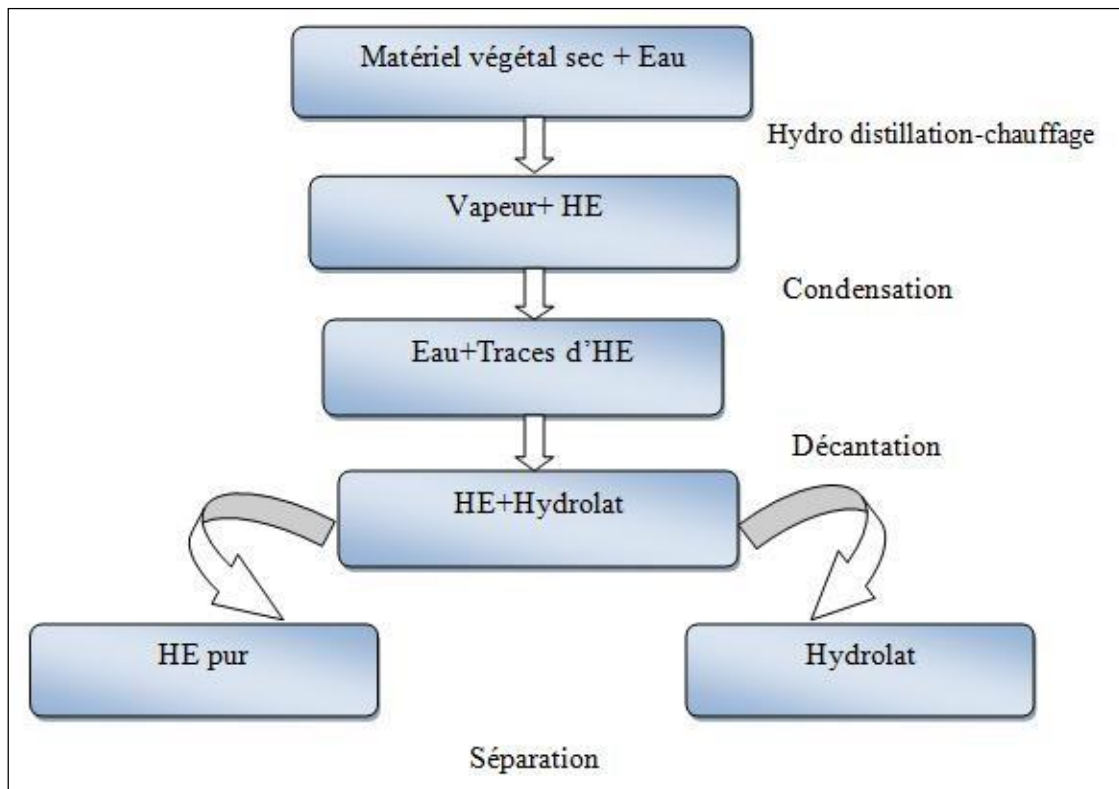


Figure 15 : les étapes d'extraction de l'huile essentielle

Huile essentielle de *Rosmarinus*

Hydrolat



Figure 16 : composés récoltés de *Rosmarinus officinalis*

6. Les paramètres étudiés

6.1. Le volume d'huile essentielle

Le volume de l'huile essentielle est déterminé grâce aux graduations millimétriques de l'éprouvette utilisée pour séparer la couche de l'huile essentielle de celle de l'hydrolat. Les volumes obtenus sont exprimés en ml.

6.2. Le Rendement en huile essentielle:

Le rendement est défini comme étant le rapport de la masse d'huile essentielle obtenue sur la masse de matière végétale.

$$R (\%) = (m \text{ H E} / m \text{ M V}) \times 100$$

m H E : Masse d'huile essentielle(g)

mMV: Masse de matière végétale(g)

R(%): Rendement en huile
essentielle

6.3. Caractéristique de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L.

La caractérisation d'une essence consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur et saveur).
- Identifier sa composition chimique.

6.3.1. Caractéristiques organoleptiques

Les tests pour les caractères organoleptiques (aspect, couleur et odeur) ont été effectués par un personnel qualifié du laboratoire.

6.3.2. L'identification chimique de l'huile essentielle : Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse Couplée par Spectrophotométrie de Masse (CPG/MS)

L'analyse des huiles essentielles récupérées a été réalisé à l'Institut national de Gendarmerie de criminologie (INCC) de Bouchaoui (Alger) par chromatographie en

phase gazeuse couplé au détecteur à un spectrophotomètre de masse GC/MS modèle Trace GC Ultra DSIII équipé d'est une HP5-MS 30m ; 0.25mm ID ; 0.25mm d'épaisseur de phase stationnaire.

Les conditions opératoires optimales utilisées

- Température de l'injecteur 250°
- La programmation de température du four du CG est de 50° pendant 1min 03°C/min jusqu'à 280° C, 1mn de maintien
- Le gaz vecteur utilisé est He avec un débit de 1.0 ml/min débit constant.

- Spectromètre de masse :

Ligne de transfert à 280°C

Source d'ions à 200° C

Retard sur l'acquisition 4.0 min

Energie d'ionisation 70 eV

Full scan de 35 à 450 amu

Après obtention des pourcentages les composés des HE sont identifiés par une recherche dans bibliothèques spectrales: NIST, PFLEGER, NBS, WILEY.

6.4. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de romarin

L'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a été effectuée au niveau du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida.

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle 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. (**BENDJELALI et al. 1986**)

6.4.1 Méthode de diffusion des disques :

Nous avons appliqué la technique par contact direct de l'aromatogramme pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Ce test a été effectué suivant la méthode de **CONNER et BEUCHAT (1984a,b)**, **ADAM et al. (1998)** et

CHAO et al. (2000) et en respectant les recommandations établies par le BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy). Ce test est effectué par dépôt d'un disque stérile de cellulose de 6 mm de diamètre (Whatman N°1) imprégné d'une quantité d'HE sur un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une culture microbienne. Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (Figure 17)

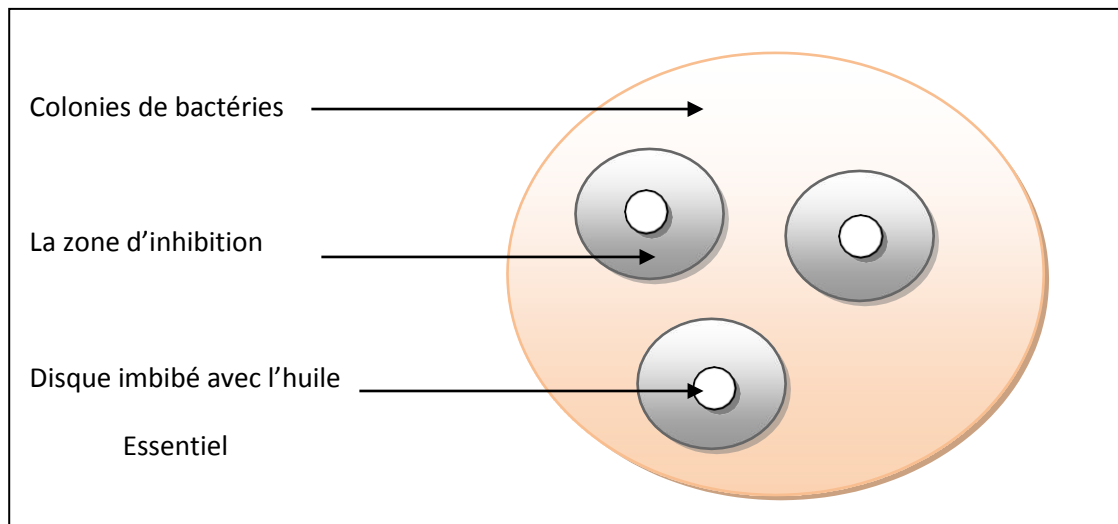


Figure 17: l'aromatogramme

6.4.2. Préparation des suspensions microbiennes (l'inoculum)

A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement, racler par une anse de platine, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger l'anse dans 5 ml d'eau physiologique stérile, bien homogénéiser la suspension bactérienne. L'ensemencement doit se faire en quelques min après la préparation de l'inoculum (**DJELLOUL DAOUADJI, 2010**).

L'inoculum microbien est ajusté à 0,5Mc (10^6 UFC/ml pour les bactéries et 1,5Mc 10^5 UFC/ml pour les champignons, en utilisant un Mc Farland densitomètre.

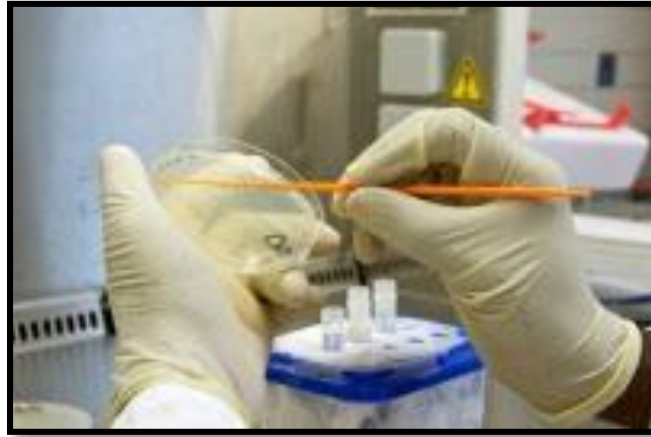


Figure 18: préparation de l'inoculum

6.4.3. Préparation de milieu de culture:

Les milieux de cultures utilisés, Mueller Hinton (M.H) pour les bactéries et le Sabauraud (S) pour les champignons, sont stérilisés à l'autoclave pendant 15 min à 121°C. Couler aseptiquement les milieux de culture dans les boîtes de Pétri à 4 mm de hauteur (figure 19) et laisser refroidir et solidifier. **(HARRAR, 2012).**



Figure 19: préparation de milieu de culture (photo originale)

6.4.4. Ensemencement :

L'ensemencement se fait dans un milieu stérile en présence de bec benzen. Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, 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, sèche, de haut en bas. Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétrie de 60° 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.

6.4.5. Préparation des disques :

Pour mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de romarin, nous avons utilisé des disques de 6 mm de diamètre, préparés avec du papier Whatman n°1. Les disques doivent posséder un contour régulier pour donner une zone d'inhibition que l'on peut mesurer facilement. Ces disques sont stérilisés dans un autoclave pendant 20 minutes à 120°C.

Les disques sont disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée au bec benzen. À l'aide d'une micropipette on imbibe chaque disque par 20 µl.

Pour chaque souche microbienne les essais ont été répétés 3 fois, soit 18 essais au totale.



Figure 20: diffusion de l'huile essentielle en milieu solide.

6.4.6. Incubation et lecture

Les boîtes sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20 min, ensuite dans une étuve à 37 °C /24 h pour les bactéries et à 24°C pour les cultures fongique pendant 5 jours

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d' après la sensibilité des souches vis-à-vis des huiles essentiels (**PONCE et al 2003**).

- (-) souche résistante ($D < 8$ mm)
- (+) souche sensible ($9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$)
- (+ +) souche très sensible ($15\text{mm} \leq D \leq 19$ mm)
- (+ + +) extrêmement sensible ($D > 20$ mm)

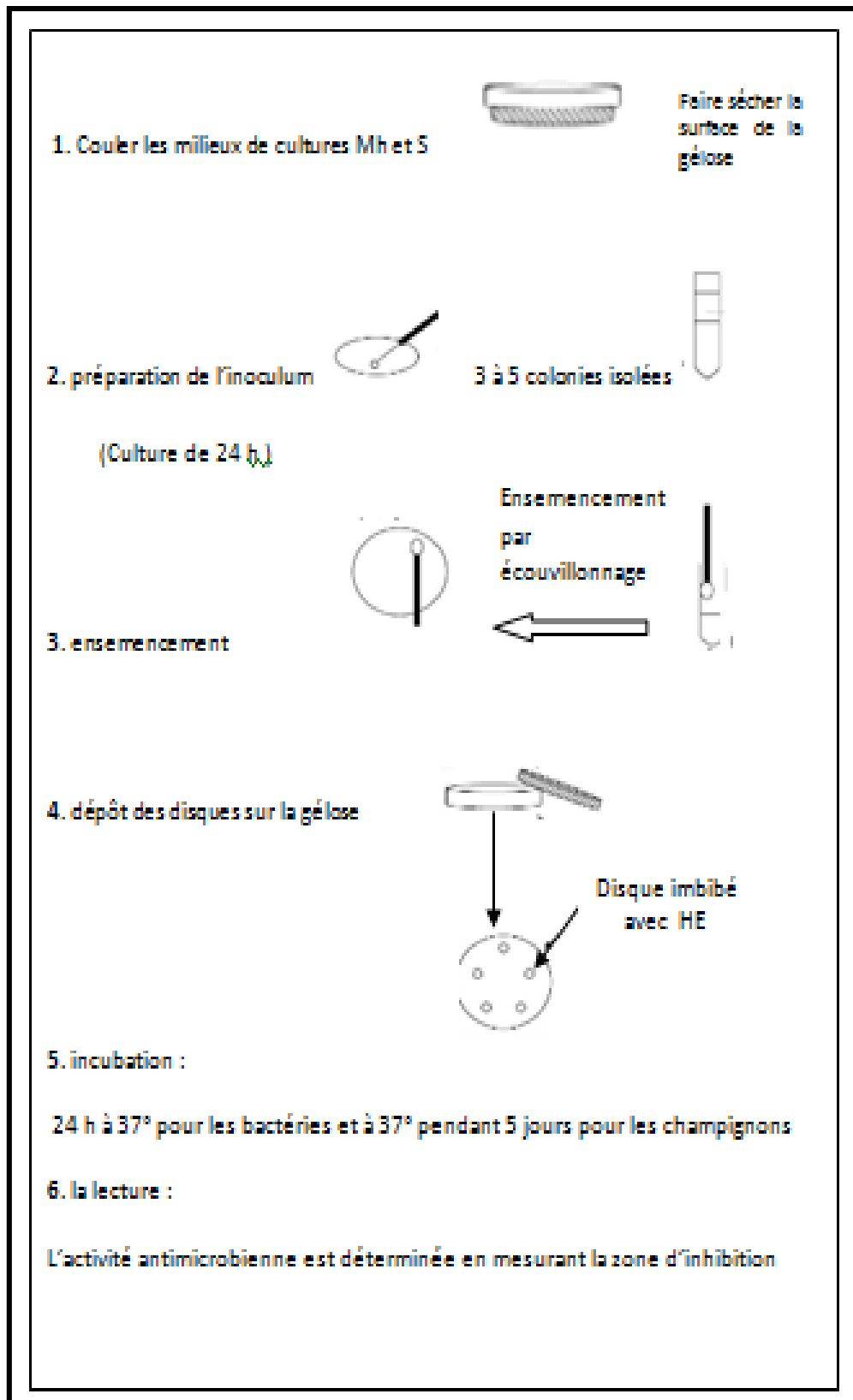


Figure 21: les étapes de la technique d'aromatogramme

6.5. Evaluation de l'activité antioxydante

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Cette étude était destinée à un contrôle préalable au balayage de l'activité radicalaire de huile isolé à partir de romarin et évaluer leur efficacité par rapport à l'antioxydant synthétique l'acide ascorbique (Vitamine C). Ce test a été accompli au niveau de laboratoire du groupe Sidal de Médéa.

6.5.1. Test de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour mesurer les activités antioxydantes des extraits volatils des plantes aromatique. L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle du Romarin a été évaluée par la capacité de balayage du radical libre DPPH. Cette méthode décrite pour la première fois par **BRAND WILLIAMS et al. (1995)**, modifiée par la suite par, **MASUDA et al. (1999)** et **MOLYNEUX (2004)** consiste à suivre la réduction du radical libre DPPH (2,2- diphenyl -1- picrylhydrazyl) par un antioxydant à l'aide de spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence de l'huile essentielle.

6.5.1.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

A - Principe :

A température ambiante, le radical DPPH présente, en solution alcoolique, une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance donneuse de protons (figure 22).

Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm (**MOON et SHIBAMOTO, 2009**).

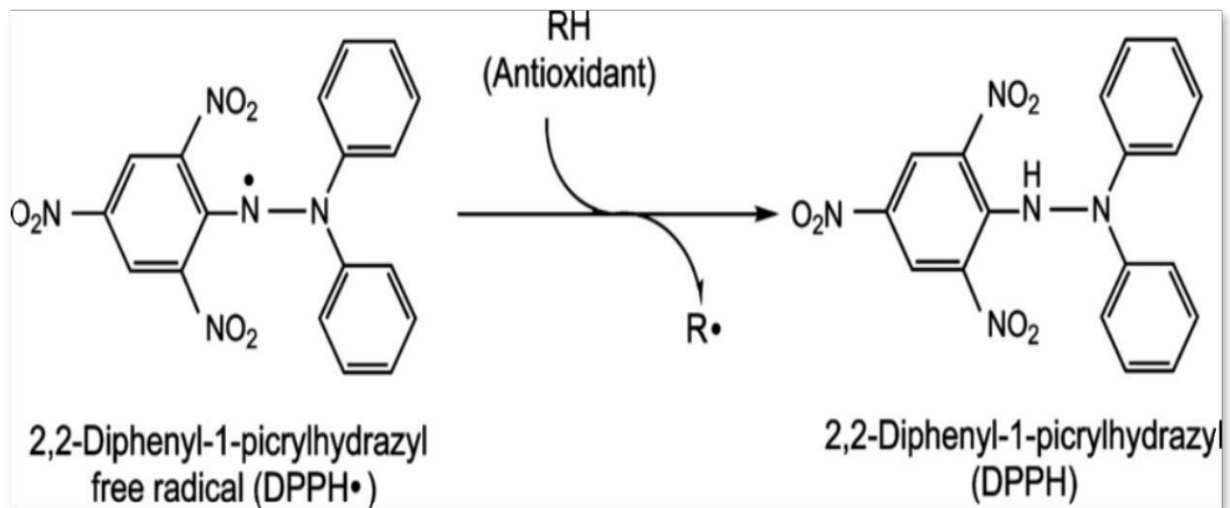


Figure 22 : Réaction entre le radical DPPH* et l'antioxydant pour former le DPPH stable (Moon et Shibamoto, 2009).

B- Mode opératoire :

Le teste antioxydant à été réalisé avec la méthode au DPPH

C- Préparation des dilutions de l'huile essentielle :

L'expérience a été effectuée sur 6 concentrations différentes d'échantillon de l'ordre décroissant, dilués dans le méthanol (0.1, 0.08., 0.06., 0.04., 0.02., 0.01)

Cinquante microlitres de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations de (0.0125 à 5mg /ml) ou de standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH .En parallèle, un contrôle 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 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I %) (**ATHAMINA ., al 2010**).

Pour chaque dilution les essais ont été répétés 2 fois, soit 12 essais au totale.



Figure 23 : préparation des dilutions et DPPH (photo originale)

6.5.2. Expression des résultats :

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left[\frac{\text{Abs c} - \text{Abs e}}{\text{Abs c}} \right] \times 100$$

Abs c : Absorbance du contrôle

Abs e : Absorbance de l'échantillon testé

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

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC₅₀ qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (**SAMARTH et al. 2008**).

Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance antiradicalaire (**BRAND WILLIAMS et al., 1995**).

$$\text{ARP} = 1 / \text{IC50}$$

ARP : Puissance anti radicalaire

IC50 : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.

7. Analyse statistique :

Les paramètres que nous avons étudiés nous conduisent à l'utilisation de l'analyse statistique de variance en utilisant le logiciel XLSTAT .Les différences sont considérés statistiquement significatives au seuil de 0.05.

Résultats et discussion

1. Rendement en huiles essentielles

Les rendements moyens en huiles essentielles extraite par hydrodistillation, a été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis*.

$$R_{HE} (\%) = (M_H / M_{mv}) \times 100$$

$$R_{HE} = 0,31 \%$$

Le rendement en l'HE obtenu par l'hydrodistillation est de l'ordre de **0.31%**. Les rendements obtenus concordent avec ceux cités par **EL GUIDOUR, (2003)**, qui mentionne des taux variant entre 0.1 et 0.4%. Cependant **GUY, (2005)**, indique des taux supérieurs 0.5 et 0.6%. Les valeurs de l'Office Nationale Interprofessionnelle des Plantes Aromatique et Médicinale (**ONIPPAM**) sont supérieures à nos résultats, elles sont de l'ordre de 1.5 et 2%.

Ces variations de teneurs peuvent être dues à plusieurs facteurs cités dans la bibliographie notamment le degré de développement des feuilles de *R. officinalis*, l'interaction avec l'environnement (type de climat, sol), le moment de la récolte et la méthode d'extraction (**BESOMBES, 2008**).

2. Tests organoleptique de l'huile essentielle

L'huile essentielle obtenue est un liquide limpide jaune pâle avec une odeur aromatique forte et fraîche plus ou moins camphrés, de goût amer (figure 24). Ces caractéristiques sont comparables à ceux d'**AFNOR (2000)**.

Les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielles du romarin obtenu, sont résumées dans le tableau.

Tableau 07: Caractéristiques organoleptiques de l'HE de romarin.

Espèce	Caractéristiques organoleptiques		
	Aspect	Couleur	Odeur
Romarin	Liquide mobile limpide	Jaune pâle	Odeur caractéristique fraiche plus ou moins camphrée
Normes AFNOR	Liquide, mobile limpide	Incolore à jaune pâle	Odeur caractéristique cinéolée plus ou moins camphrée selon l'origine

**Figure 24 :** échantillon de l'huile essentielle du romarin de la région de Blida.

3. Analyse chimique CPG/SM de l'huile essentielle de romarin

L'identification de la composition chimique de l'huile essentielle de romarin a été réalisée par CPG/SM.

Les pics du chromatogramme de l'huile essentielle de feuille du *Rosmarinus officinalis* sont comparés à ceux des composés de références présents dans une bibliothèque de spectre avec une banque de données informatisées. L'appareil CPG/SM nous a donné les différents chromatogrammes de masse et les indices de rétention des substances comparables qui peuvent constituer cet extrait (figure 25).

L'analyse chromatographique CPG/SM nous a permis d'identifier Vingt cinq composés dans l'huile essentielle de *R. officinalis*. Les principaux composants (>5%) et leurs pourcentages ont été déterminés ainsi que le temps de rétention dans l'huile essentielle de *R. officinalis* sont : le camphène (8.64%), α -Pinène (20,43%), Eucalyptol (9,08%), Camphre (19,13%), Barneol (11,37) et Verbenone (12,13). **tableau(08)**.

L'huile essentielle testée contient également des quantités considérables de divers constituants mineurs.

Tableau 08 : Composition chimique majoritaire de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* de la région de Blida.

Nom	TR	Surface	%
α-Pinene	7,44	1022704319	20,432%
Camphene	7,93	432709599	8,645%
Eucalyptol	11,09	454800979	9,086%
Camphre (Lcanfor)	15,96	957838001	19,136%
Barneol	16,93	569407163	11,376%
Verbenone (2-Pinen-4-one)	18,88	607436039	12,135%

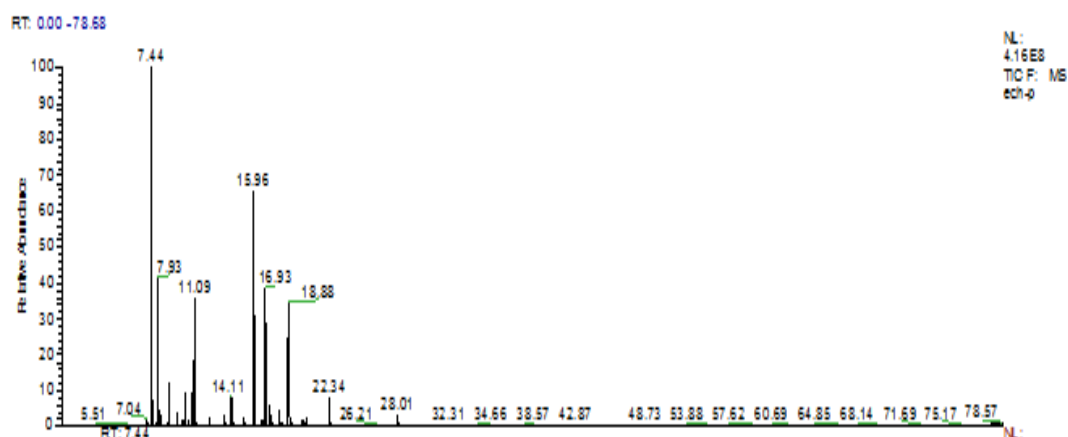


Figure 25: Chromatogramme de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Il existe de nombreuses études dans la littérature sur la composition chimique de l'huile essentielle de *R. officinalis* (**CELIKTAS et al, 2007 ; BOUSBIA et al, 2008**). Plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence de multiples composés bioactifs dans l'huile essentielle de *R. officinalis* dans différentes régions d'Algérie (**BENHABILES et AÏT AMMAR, 2001 ; LOGRADA et al., 2014**). Le chromatogramme de l'huile essentielle de *R. officinalis* a montré des spectres avec pourcentage élevé en Verbenone, Camphre, Borneol, Eucalyptol et dans le groupe des monoterpènes.

D'après les résultats obtenus, la nôtre s'avère être du type Camphre/ Verbenone car ces deux molécules sont majoritaires dans l'HE. Nos résultats sont en accord avec les études de **MILADI et al., (2011)** et **KUKERJA et al.,(2007)**. Ils ont également identifié le camphre comme un composant principal dans l'huile essentielle de *R. officinalis*. Alors que, **AYADI et al., (2011)** a identifié le verbénone comme un composant principal dans l'huile essentielle de *R. officinalis*.

Les variations rencontrées dans la composition chimique du point de vue qualitatif et quantitatif de notre échantillon comparés à certains travaux antérieurs peuvent être dues à certains facteurs écologiques, à la partie de la plante utilisée, à l'âge de la plante et la période du cycle végétatif ou même à des facteurs génétiques (**HUSSAIN, 2009 ; ANWAR et al., 2009**).

4. Activité antimicrobienne de l'HE de romarin « in vitro »

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, la technique utilisée est celle de l'aromatogramme.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *R.officinalis* est évaluée sur six germes pathogènes hospitaliers de référence (quatre souches bactériennes et deux souches fongiques) par la méthode de diffusion de disque. Le DMSO utilisé comme témoin négatif est sans effet sur la croissance des bactéries. Le pouvoir antimicrobien de cette huile volatile est obtenu par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm à l'aide d'une règle. A noter que les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

Le tableau 09 illustre les variations des diamètres des zones d'inhibition des souches microbiennes apparues en présence de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

Tableau 09 : Résultats synthétisés de la croissance des souches microbiennes.

	Souches	Diamètres (mm)		Degré de la sensibilité
		Témoin négatif (-)	Moyenne	
Bactéries	<i>Staphylococcus</i> Gram +	-	8±1	Résistante (-)
	<i>E. coli</i> Gram-	-	16±2	Très sensible (++)
	<i>P. aeruginosa</i> Gram-	-	6±1	Résistante (-)
	<i>Salmonella</i> Gram-	-	9.33±0.57	Sensible (+)
Fongiques	<i>Candida albicans</i>	-	10±3	Sensible (+)
	<i>Aspergillus niger</i>	-	12,33±2,51	Sensible (+)

Non sensible (-), Sensible (+), Très sensible (+ +), Extrêmement sensible (+++)

(PONCE et al 2003)

Notes : (-) pas d'inhibition, DMSO: témoin



Figure 26 : Effet de l'huile essentielle sur *Pseudomonas*

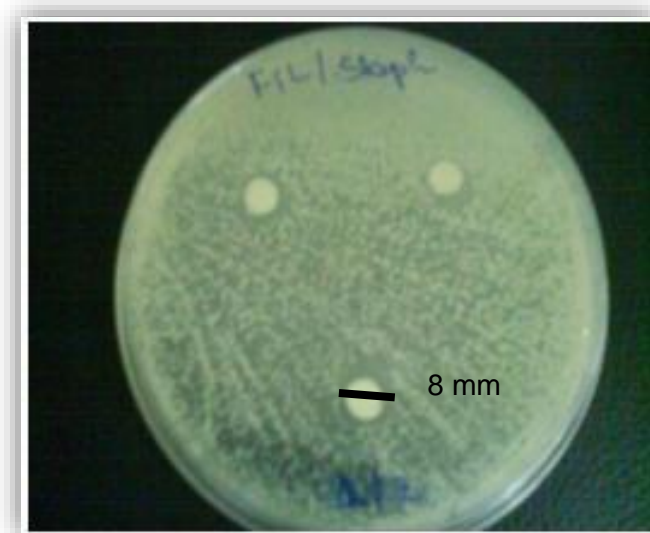


Figure 27: Effet de l'huile essentielle sur *staphylococcus*

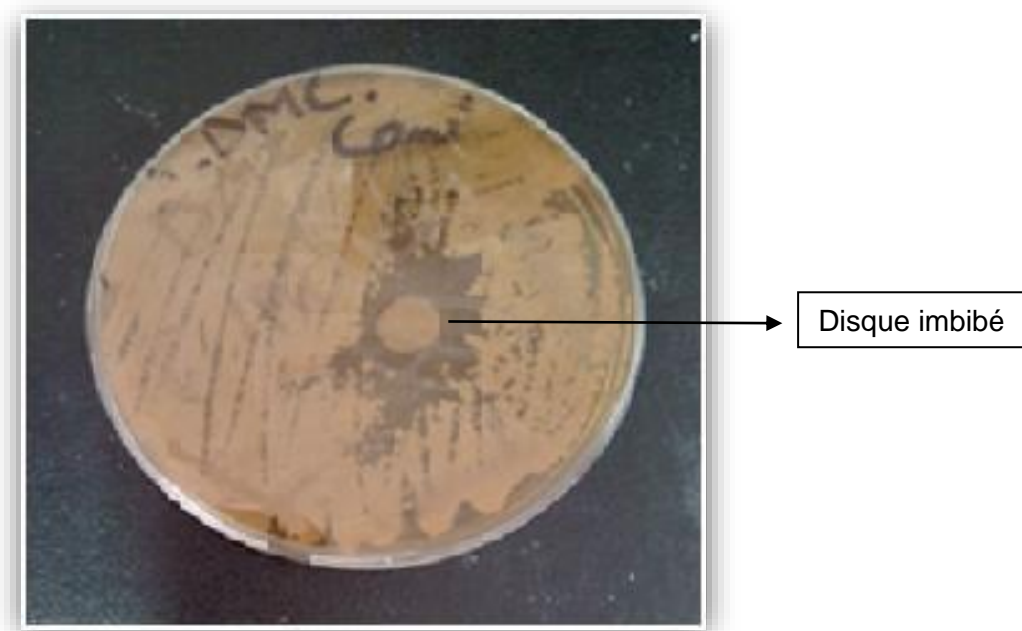


Figure 28: Effet de l'huile essentielle sur *Candida albicans*



Figure 29 : effet de l'huile essentielle sur *aspergillus*

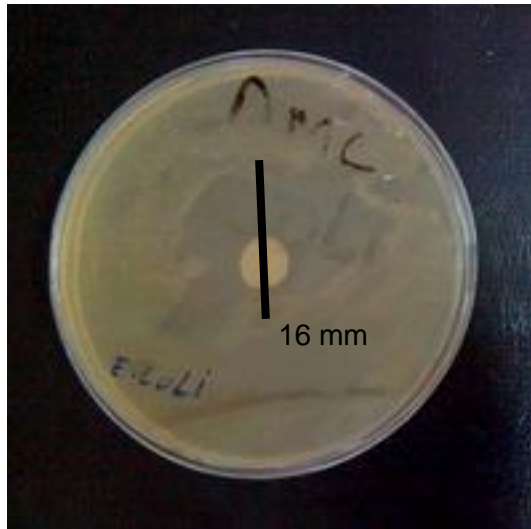


Figure 30: effet de l'huile essentielle sur
E. coli

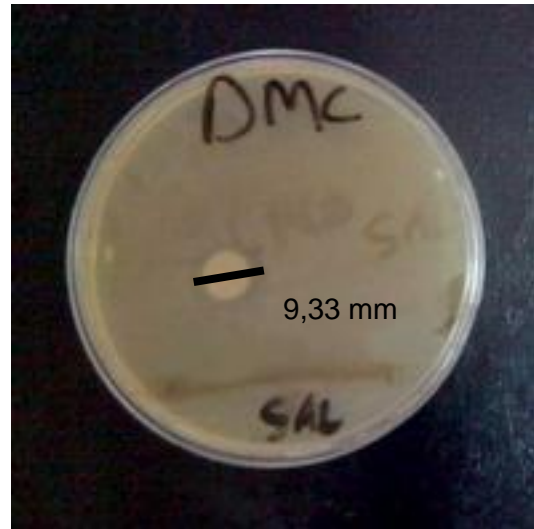


Figure 31: effet de l'huile essentiel sur
salmonella

L'activité antimicrobienne des HE a fait l'objet d'un grand nombre de publication à l'échelle internationale (**OURAÏNI et al., 2005 ; GIORDANI et al., 2006 ; KALOUSTIAN et al., 2002 ; AMARTI, 2009 ; BSSAIBIS et al., 2009**). Dont plusieurs ont spécifiquement noté la forte activité antibactérienne.

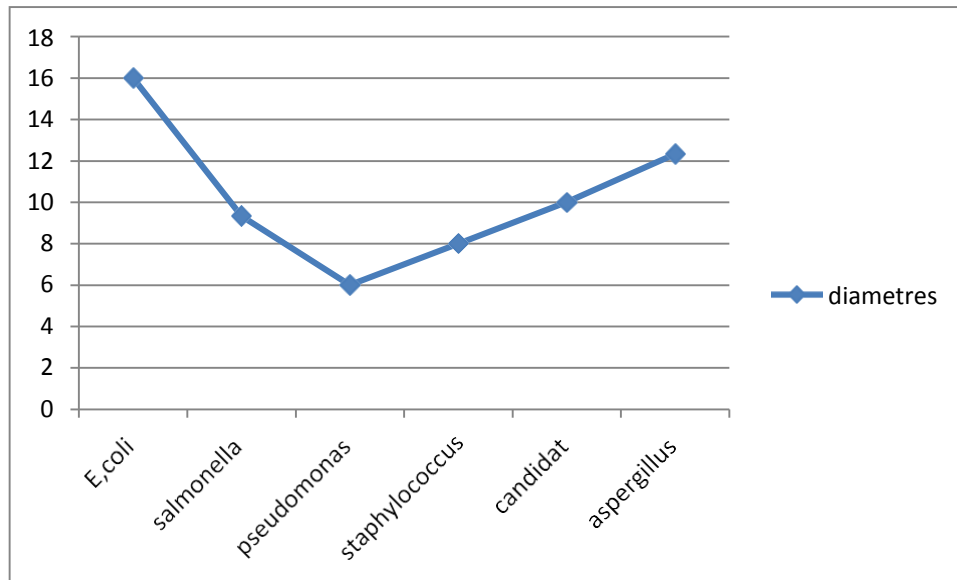


Figure 32: Effet antimicrobien de l'HE de romarin sur les microorganismes testés.

L'activité antibactérienne montre que, *E. coli* possède un potentiel de sensibilité très élevé par sa zone d'inhibition de 16 mm. Cependant aucune zone d'inhibition, n'a été observée pour *P. aeruginosa*, dont elle possède un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne de l'huile essentielle testée.

L'huile de *Rosmarinus officinalis* présente un effet inhibiteur sur les deux souches bactériennes avec des zones d'inhibition de 8 mm et 9.33 mm respectivement, pour *staphylococcus aureus* et *salmonella arizona*.

De plus on remarque que l'H.E est pourvue d'un effet inhibiteur efficace sur les moisissures et levures de *R. officinalis candida* et *aspergillus* avec des zones d'inhibition de 10 mm, 12.33 mm respectivement. (Figure 32).

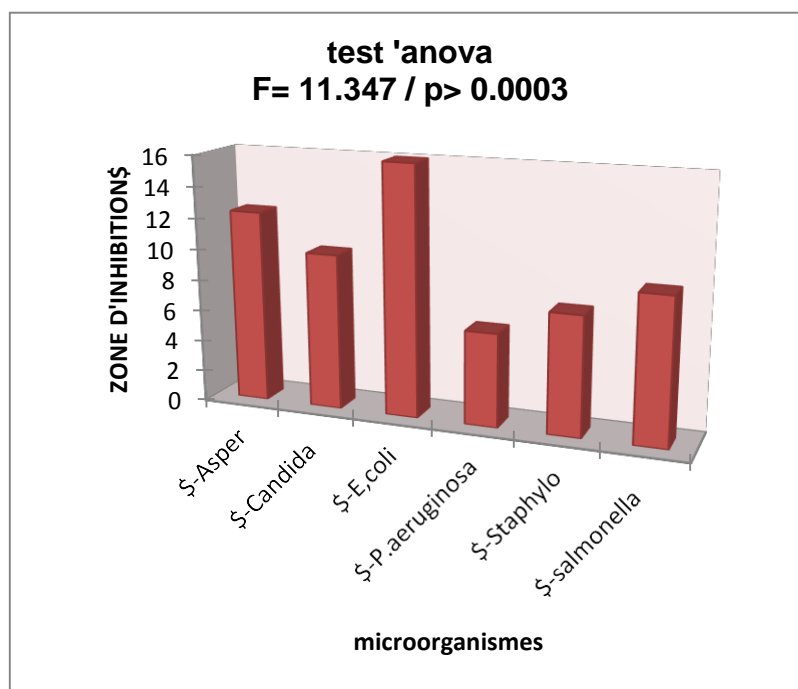


Figure 33: Effet comparé par le test d'anova
sur les microorganismes

D'après les résultats obtenus (figure 33) par le modèle XLSTAT, L'analyse statistique de la variance a révélé une différence significative entre les diamètres des zones d'inhibition ($F=11,347/ p>0,0003\%$).

Nos résultats montrent quelques similitudes avec les autres travaux. L'étude de l'effet antimicrobien du *Rosmarinus officinalis L* de la région de Djelfa, a montré que *E.coli* a une certaine sensibilité de (18mm) vis-à-vis L'huile essentielle (**ARBOUCHE et al., 2015**). Celui d'El Kala, s'est montré efficace contre *E-coli*, et inefficace contre, *pseudomonas* (**OUIBRAHIM, 2015**).

L'activité antibactérienne de L'huile essentielle de *R. officinalis* a exercé une activité inhibitrice importante vis-à-vis des bactéries Gram - (*E.coli* et *Salmonella*).

Certaines études révèlent aucune activité antimicrobienne sélective vis-à-vis les bactéries Gram (+) ou Gram (-) (**GUESMI & BOUDABOUS, 2006**).

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles de plusieurs plantes aromatiques et médicinales ont été attribuées à leur profil chimique et surtout aux alcools terpéniques (**KURIT et al., 1982, KARAMAN et al., 2001 , BAYDAT et al., 2004 , PIBIRI, 2005 ,SATRANI et al ., 2006**). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (**KALEMBA et Kunicka, 2003**). Selon **DORMANS en 2000**, le principal facteur modifiant l'activité antimicrobienne d'HE est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans cette HE.

La plupart des composés chimiques des H.E. sont dotés de propriétés antimicrobiennes, cité par **BOUAOUN ET SES COLLABORATEURS (2007)**, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols, les alcools et les aldéhydes.

L'α pinène, limonène sont des hydrocarbures aliphatique monoterpènes, qui ont une activité antibactérienne modérée sur la pluparts des bactéries telles que *E.coli* et *S. aureus*, ils ne sont pas actifs sur *P.aeruginosa*. (**DORMAN et al., 2000**).

5. Activité antioxydante

Le DPPH est un radical libre nous permettant de déterminer le potentiel de piégeage de nos huiles essentielles grâce à sa sensibilité à détecter les composants actifs à des basses concentrations (**YI et al, 2008**) C'est un radical synthétique de couleur violette qui vire vers le jaune quand il est capté par les extraits testés. L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité anti-radicalaire de l'extrait, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cet extrait. L'activité anti-radicalaire a été estimée par spectrophotométrie en suivant la réduction du DPPH à 517nm (**Maisuthiaskul, 2007**). L'activité antioxydante de l'H.E de *R.officinalis* L. a été comparée à celui de l'acide ascorbique.

La figure 34 illustre l'efficacité des huiles essentielles et du BHT à piéger par le radical DPPH, traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations.

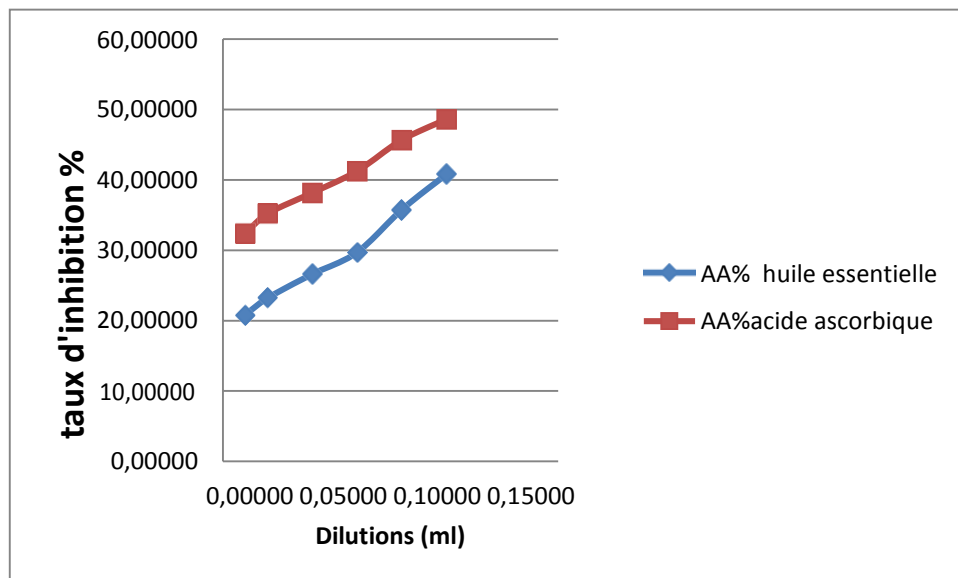


Figure 34 : Pourcentage d'inhibition des huiles essentielles et de l'acide ascorbique(témoin)

On observe que la plus faible activité radicalaire ($20.800 \pm 0.145\%$) a été obtenus par l'huile essentielle à une concentration 0.01mg/ml, tandis que la plus faible exposé par l'acide ascorbique est de (32.4 ± 0.442). Par ailleurs la plus forte activité anti-oxydante (40.800 ± 0.142) a été exercé par l'HE à une concentration de 0.1 mg/ml, cependant la plus forte activité détecté par l'acide ascorbique est de (48.6 ± 0.353). Le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour l'acide ascorbique ou pour l'huile essentielle de romarin. On observe que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'huile essentielle est relativement inférieur à celui de la vitamine c'est pour toutes les concentrations utilisées.

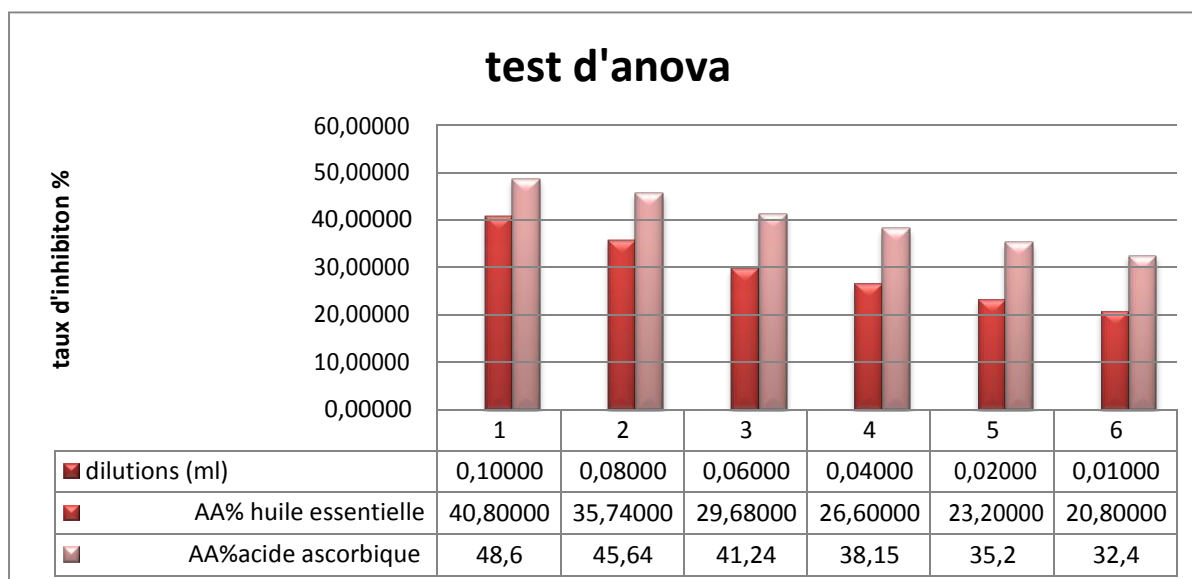


Figure 35 : Etude comparé des taux d'inhibitions par le test d'anova

D'après analyse statistique de la variance, le teste d'annova exprimé dans la figure (35) confirme nos résultats dont la différence est significative $F= 302,550 / p < 0.0001$. L'acide ascorbique a présenté une activité plus élevé que celle de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Détermination d'IC50 et ARP :

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

IC50 est inversement proportionnel à la capacité anti-oxydante d'un composé, parce qu'il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. (**ABDULMAJED et al., 2005; AHMAD et al., 2012; RANGA et al., 2009**) Plus la valeur d'IC50 est petite, plus l'activité anti-oxydante d'un composé est grande.

Les valeurs de IC50 des deux testes étudiées (tableau 10) ont été estimées en utilisant la courbe de régression linéaire : (tableau 09) (figure 36)

$$y = ax + b \quad \text{Où} \quad y = 50\% \text{ (pourcentage de réduction de DPPH)}$$

x : IC50 (la concentration en extrait et de l'acide ascorbique)

- Le calcul du pouvoir antiradicalaire :

(APR) qui est inversement proportionnel à l'IC₅₀ (tableau 10).

$$(APR=1/IC_{50})$$

Tableau 10 : Résultat du test antioxydant exprimant la concentration efficace 50% en mg/ml

Teste étudiés	IC ₅₀	ARP
H.E de <i>R.officinalis</i>	0,146	6,849
Acide ascorbique	0.107	9,345

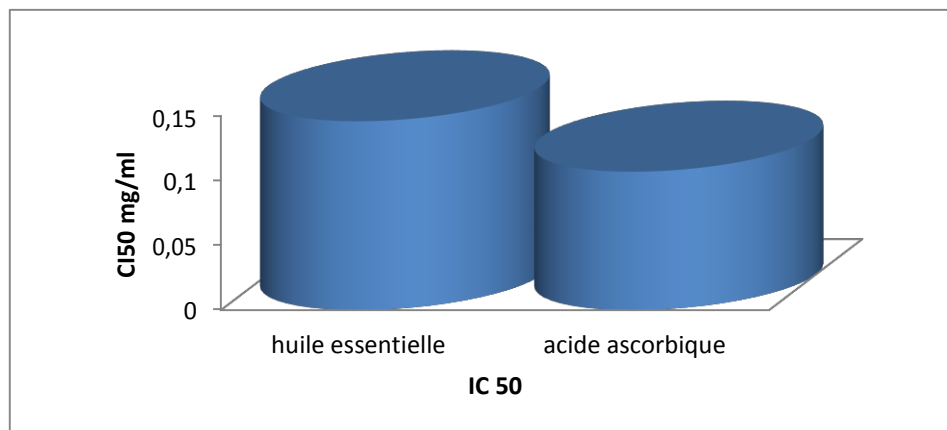


Figure 36: Concentrations de réduction de 50% de DPPH.

L'huile essentielle rend le radical libre stable (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) au diphenyl-picrylhydrazine jaune-coloré avec un IC₅₀ de 0,146 mg/ml montrant une

activité très importante .D'après ces résultats on prouve que l'acide ascorbique reste l'antioxydant le plus efficace avec un IC50 de 0.10 0.107 mg /ml.

D'après nos résultats, l'HE de *Rosmarinus officinalis* s'est avéré être un bon inhibiteur d'oxydation. Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres travaux. À titre d'exemple, ceux de **Gachkar et al, (2007)** dont l'aptitude du romarin à réduire l'oxydation est meilleure que son potentiel antiradicalaire.

Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) peut produire des antioxydants similaires aux antioxydants synthétique (BHA, BHT, BTHQ).(Ibanez, 1999). Selon de nombreuses études précédentes, l'extrait de romarin contient principalement des composés aromatiques comme le bornéol, le camphène, le camphre et le cinéol, des flavonoïdes comme l'apigénine et l'diosmine, des tanins, de l'acide rosmarinique, des diterpènes et de la rosmaricine.

La présence de 1, 8 - cinéole (Eucalyptol) en tant que substance naturelle principale de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* donne beaucoup d'effets (**SANTOS, 2000 ; GHANNADI et al., 2002**).Ce monoterpène a présenté des effets pharmacologiques divers, comme relaxant des muscles lisses, anti-inflammatoire, antioxydant et hypotenseur (**SANTOS et al., 2004**)

L'HE contient des monoterpènes à des taux assez élevés. Dans une étude antérieure, les huiles avec une prédominance monoterpénique ont montré une activité assez modeste (**GACHKAR et al., 2007**). En contradiction avec les travaux de **TEPE et al, (2004)**, où ils ont démontré une grande activité antioxydante des huiles essentielles contenant des monoterpènes et / ou des sesquiterpènes oxygénés. Ainsi une corrélation existe entre l'activité antioxydante des essences et la teneur de monoterpènes oxygénés (**MILADI et al., 2013**)

Nos résultats s'accordent avec celui cité par **SVOBODA et HAMPSEN, 1999**, le camphre qui est un composé majoritaire de notre huile essentielle avec une concentration de 11.25% possède une forte activité antioxydante, ainsi que notre camphre qui est un composé majoritaire avec une concentration de 19.136 %.

Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HE qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés

minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (**Lu et Foo, 2001 ; SING et al., 2006**).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Le Romarin est une plante médicinale aromatique très recherchée par l'aromathérapie, les industries pharmaceutiques, et plusieurs domaines, dont elles restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Cette étude se voulait une contribution à la connaissance phytochimique par CG/SM et à évaluer l'activité biologique des huiles essentielles de *R. officinalis*.

L'extraction des huiles essentielles de la partie aérienne de *R. officinalis* par hydrodistillation en utilisant un dispositif d'extraction type Clevenger, a donné un rendement de 0.31 %. Cette valeur est identique avec celles obtenus dans d'autres études concernant la même espèce.

L'analyse de l'huile de romarin a permis d'isoler et d'identifier 25 composés représentant 97,82% de l'huile essentielle avec des constituants majoritaires : le camphène (8.64%), α -Pinène (20,43%), Eucalyptol (9,08%), Camphre (19,13%), Barneol (11,37) et Verbenone (12,13).

En comparant les résultats de l'analyse chimique de l'huile essentielle avec les résultats obtenus de plusieurs espèces appartenant aux mêmes genres étudiés, on a constaté beaucoup de ressemblances et quelques différences qui peuvent être attribuées aussi bien aux facteurs extrinsèques qu'aux facteurs intrinsèques.

La caractérisation d'une huile essentielle est une opération indispensable lorsqu'on souhaite la contrôler, la commercialiser, ou mettre en évidence son éventuelle spécificité.

La sensibilité des bactéries y compris champignons vis-à-vis de l'huile de romarin est déterminée selon la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme), en mesurant le diamètre de l'halo d'inhibition. nous avons réalisé un test antimicrobienne vis-à-vis quatre souches bactériennes et deux souches fongiques pathogènes, les résultats microbiologiques ont montré que l'huile essentielle de *R. officinalis* a une action importante sur les champignons et les espèces bactériennes testées, dont *Escherichia coli* (gram -) s'est révélée la plus sensible avec un diamètre d'inhibition de (18 mm).et s'es montrée inactive sur *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 8mm. Par ailleurs une forte activité est noté sur les

Conclusion et perspectives

souches fongiques avec une zone inhibitrice vis-à-vis *Candida albicans* et *Aspergillus* sp de 10 mm et 12 mm respectivement.

En ce qui concerne l'évaluation de la propriété antioxydante, elle est une tâche intéressante et utile, en particulier pour trouver de nouvelles sources d'agents antioxydant naturels. Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer l'activité antioxydante d'huile de romarin à Blida. La coloration de solution DPPH méthanolique par l'huile de romarin confirme que c'est un bon inhibiteur d'oxydation. Cette huile peut être considérée comme un agent antioxydant naturel capable d'empêcher l'oxydation et l'altération de certains aliments.

D'autre part, les valeurs d'IC50 pour l'acide ascorbique, et le romarin sont à l'ordre de 0.107 mg/ml et de 0,146 mg/ml respectivement. La comparaison des résultats montre que l'acide ascorbique a présenté une activité plus élevée que celle de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Les résultats obtenus semblent très intéressants et doivent être poursuivis par d'autres études, notamment la caractérisation des huiles de romarin, optimisation des paramètres de traitement, détermination de son mécanisme d'action sur l'activité bactérienne, antivirale, Anti-inflammatoire, anti oxydante et autres, donc peuvent servir comme base de lutte biologique .

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A -

- **ABDULMAJED K., MCGUIGAN C. AND HEARD C. M.** Topical delivery of retinyl ascorbate: 4. Comparative anti-oxidant activity towards DPPH. *Free Radic. Res.* 2005; 39: 491-498.
- **ADAM K., SIVROPOULOU A., KOKKINI S., LANARAS T. et ARSENAKIS M., 1998** : Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 46, N°6, pp : 1739-1745.
- **ADSERSEN et al (2006)**. Memory dysfunction for 104:418-422. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol*
- **Anonyme, (2000). HUILES ESSENTIELLES. ECHANTILLONNAGE et METHODES D'ANALYSE** Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2).
- **AHMAD N., FAZAL H., ABBASI B. H., ANWAR S. and BASIR A.** DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum* L.). *Toxicol. Ind. Health.* 2012.
- **AMARTI, F. (2009)**. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 14(1), 141-148
- **ANTON J.C., WENIGER B., ANTON R., 2006.** Huiles essentielles in actifs et additifs en cosmétologie. 3^{ème} édition, Lavoisier, Tec et Doc, Paris. p189-229.
- **ANWAR F., ALI M., HUSSAIN AI. and SHAHID M., 2009.** Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour and Fragrance Journal.* 24: 170-176.
- **ARBOUCHE R., et AMAR SETTI H., 2015.** Etude de la composition chimique et évaluation de l'effet antimicrobien du *Rosmarinus officinalis* de deux régions des hauts plateaux Algériens (Msila Djelfa). Mémoire magistère. 78 p.
- **ARNOLD N., VALENTINI G., BELLOMARIA B., LAOUER H., 1997.** Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. From Algeria and *R. officinalis* L. from other countries. *J.essent.Oil Res.* 9: 167-175.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **ARUOMA, O. I., SPENCER, J. P. E., ROSSI, R., AESCHBACH, R., KHAN, A., MAHMOOD, N., MUNOZ, A., MURCIA, A., BUTLER, J., HALLIWELL, B. (1996).** An Evaluation of the Antioxidant and Antiviral Action of Extracts of Rosemary and Provençal Herbs. *Food and Chemical Toxicology*. 34: 449-456.
- **ATHAMINA S., CHALGHEM I., KASSAH-LAOUAR A LAROUI S., KHEBRI S., 2010.** Activity antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science journal*. Vol 11(1) :72 p
- **ATIK BEKKARA F., BOUSMAHA L., TALEB BENDIAB S.A., BOTI J.B., CASANOVA J., 2007.** Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé*. 7: 6-11.
- **AVRIL, J.L., DABERNAT, H., DENIS, F., MONTEIL, H. (2000)** Bactériologie clinique. 3ème édition Ellipses (Ed) Paris, 602 p
- **AYADI S., JERRIBI C., ABDERRABBA M., 2011.** Extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* recueillie dans trois régions différentes de la Tunisie. *J. Soc. Alger. Chim*, 21(1), 25-33.
- **AZALENKO K.** Contribution à la détermination des chemotypes d'une plante à huile essentielle du Togo : *Lippiamutiflora*. Mémoire d'ingénieur de travaux, ESTBA, Univ. Lomé. 1995
- **AZALENKO, (2005)** .contribution à la determinations des chemotypes d'une plante à l'huile essentielle du Tago *Lippiamutiflora*. Mémoire d'ingénieur de travaux, ESTBA, UNiv.Lomé.
- **BAKIREL T, BAKIREL U, KELES OU, ULGEN SG, YARDIBI H (2008).** In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary Khalil et al.1035 (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan - diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol.*, 116: 64-73.

- B -

- **BALENTINE et al (2006)** .The pre-and post-grinding application of rosemary and itseffects on lipid oxidation and during storage of ground beef. *Meat Sciance*.73, p.413-421.
- **BANEZ E.AРАНZAZU O.,1999.** Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Different Preprocessed Rosemary Plants, *JAgric. Food Chem*, No. 47, 1999, p. 1400- 1404.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **BARBOUCHE, N., B. HAJEM, G. LOGNAY and M. AMMAR, 2001.** Contribution for studying the biological activity of the leaves extracts of *Cestrum parquii* L. Herit. On desert locust *Schistocera gregaria*. Biotechnol. Agron. Societe Environn., 5: 85-90.
- **BAYDAT H., SAGDIC O., OZKAN G., KARADOGANT., 2004** – Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymus and Satureja species with commercial importance in Turkey. Food Contro 15, 169-72.
- **BELAICHE P. (1979)** - Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
- **BELAKHDAR, J (1997)** .La pharmacopée marocaine traditionnelle. Idis PRESS(Ed). Paris, p. 764.
- **BELHADI, 2010** : Mémoire Master Académique, Université KASDI MERBAH – OUARGLA - Lutte biologique par l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.
- **BELOUED, A(1998)**. Plantes médicinales d'Algerie.2eme Edition. Office des publications.
- **BENDJELALI B., TANTAOUI E.A., ESMALI-ALAOUI M. (1986)**.Méthodes d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plantes Médicinales et Phytothérapie **20**, 155-167.).
- **BENHABILES NEH. and AÏT AMMAR H., 2001**.Comparative study of Algeria's *Rosmarinus Eriocalys* and *Rosmarinus officinalis*. Perfumer & Flavorist. 26: 40 – 48.
- **BERGOGNE-BEREZIN E. & BROGNARD J. M. (1999)**. Bases biologiques de l'antibiothérapie. Ed. Masson, pp 27. Biologie & santé .7 :6-11.
- **BERNADET M. (2000)**. Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles, Editions Dangles.
- **BESOMBES C., 2008**. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse Doctorat. Université de La Rochelle.p :41-45.
- **BILLERBECK, G.(2007)**. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. Springer .Phytothérapie ,5: 249–253.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **BOUAOUN D., HILAN C., GARABETH F., SFEIR R., 2007-** Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula Boiss.* Phytothérapie 5, 129-134.
- **BOULLARD (2010).** BOUDJEMAA NourElyakin et BEN GUEGUA Hadjer, L'effet antibactérien de *NigellaSativa*. Université KasdiMerbah Ouargla.
- **BOUSBIA N. (2004).** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antibactériennes. Thèse de Magistère. Option *Scienses Alimentaires*, INA. Algérie.
- **BOUSBIA N., VIAN M.A., FERHAT M.A., PETITCOLAS E., MEKLATI B.Y., CHEMAT F., 2008.** Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.* 14, 355-362.
- **BOZIN B., MIMICA-DUKIC N., BOGAVAC M., SUVAJDZIC LJ., SIMIN N., SAMOJLIK I., COULADIS M., 2008.** Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Bekker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* scheele essential oils. *Molecules.* 13(9):2058–2068.
- **BOUZOUITA, N et al. (2008).** Composition chimique et activités antioxydants, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10, 119-125.
- **BRAND-WILLIAMS W, CUEVELIER ME, BERSET C., 1995.** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology.* Vol. (28):25-30.
- **BRUNETON J. (1999)** - Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- **BSSAIBIS F., GMIRA N. et MEZIANE M., (2009).** Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* W. Greuter . *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 3, N° 1. PP 44-45.

- C -

- **CARSON C.F., MEE B.J., RILEY T.V., 2002.** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. agents Chemother.*, vol46,p1914-1920.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **CELIK TAS O.Y., KOCABAS E.E.H., BEDIR E., SUKAN F.V., OZEK T., BASER K.H.C., 2007.**Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 100, 553-559.
- **CHACOU M. et BASSOU K., 2007.**Efficacité antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha Spicata* Lisdue de la région de Ouargla sur quelques germes pathogenes: *E.coli*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*.Mémoire de DES microbiologie. Université de Kasdi Merbah Ouargla, P. 14-27.
- **CHAO S.C., YOUNG D.G. et OBERG G. J., 2000:** Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *J. Essent. Oil Res.*, Vol. 12 (Sep/Oct 2000), pp: 639-649.
- **CONNER D.E .et BEUCHAT L.R., 1984, b:** Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.*, Vol. 49, pp: 429 – 434.
- **CONSTANTIN E., 1996.** Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec & Doc, Paris.p : 1-14.

- D -

- **DANIELE FESTY, Ma Bible des huiles essentielles, Page 20, Édition Leduc.S, 2008.**
- **DE BILLERBECK V.G., ROQUES C., VANIERE P. & MARQUIER P. (2002).** Activitéantibactérienne et antifongique de produits à base d'huile essentielle. *Hygiène* (Revue officielle de la société française d'hygiène hospitalière), **10**, 248-251.
- **DEGRYSE A., DELPLALA I. et VOINIER M.2008.**Risque et bénéfices possibles Huiles essentielles. École des hautes études en santé publique, P. 2-44.
- **DJELLOUL DAOUADJI S., 2010-** Detection de Biofilm a Staphylocoques sur Catheters Veineux. Thèse de Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie. 77 p.
- **DJENANE D., MEDDAHI A. & RONCALES P. (2006).** Les systèmes antioxydant etantimicrobien pour la conservation de la viande. *Sciences des Aliments*, **26**, 37-73.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **DORANTES L., COLMENRO R., HERNANDEZ H., MOTA L., JARAMILLO M.E., FERNANDEZ E. & SOLANO C. (2000).** Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal Food Microbiology*, **57**, 125-128
- **DORMANS H.J., DEANS S.G., 2000-** Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *J .Of Appliedmicrobiology* 88(2), 308-316.
- **DREUX P., 1980.** Précis d'écologie. Ed. Presse Univ. France , 'Le biologiste', Paris, 231 p.
- **DURAFFOURD C., LAPRAZ J-C., CHEMLI R. ; 1997.** La plante médicinale de la tradition à la science. 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris,

- E -

- **EL-GUEDOUIR, 2003.** Extraction des huiles essentielles du romarin et du thym et comportement insecticide de ces deux huiles sur *Rhyzoperta dominica*, Thème de mémoire Ingénieur, ANP. 120p.
- **ESCOTT, HARLEIN, KIEIN (2006).** Microbiologie 2 e édition française, de boek, P : 2.
- **EYMARDE S. (2003).** Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conversation et de la transformation de chinchard (*Trachurus trachurus*), choix des procédés.

- F -

- **FABRICE BARDEAU,** les huiles essentielles : découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale, édition Lanore, 2009, p 33.
- **FAURIE C., FERRA C., ET MEDORI P., 1980** -ECOLOGIE .ED Baillière J-B., Paris.168p.
- **FERNANDEZ-LOPEZ et al (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat science*.p.69:371-380
- **FRANCE-IDA J. (1996)** - Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. *Info-essence*. 3 : 5-6.
- **FRANCE-IDA J. (1998)** – Comment s'assurer de la pureté d'une huile essentielle? *Info – essences*. 7 : 1-2.

- G -

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **GACHKAR L, YADEGARI D, REZAEI MB, TAGHIZADEH M, ASTANEH SA, RASOOLI I (2007).** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. *Food Chemistry* 102:898-904.
- **GHANNADI A. (2002):** Composition of the essential oil of *R. officinalis* L. seeds from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 14: 35–36.
- **GILL DJ, TEO H, SUN J, PERISIC O, VEPRINTSEV DB, EMR SD, WILLIAMS RL (2007).** Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants
- **GIORDANI R. KALOUSTIAN J, 2006.** Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques *J Phytothérapie* (2006) Numéro 3, 121-124
- **GONZALEZ-TRUJANO M. E., PEÑA E. I., MARTINEZ A. L., MORENO J., GUEVARA-FEFER P., DECIGA-CAMPOS M., and LOPEZ-MUÑOZ F. J. (2007):** Evaluation of antinociceptive effect of *Rosmarin officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J theopharmacol.* 111:476-482.
- **GUBA R. (2001).** Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential. *International Journal of Aromatherapy.*
- **GUESMI, A., BOUDABOUS, A. 2006.** Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie. *Revue des Régions Arides*, numéro spécial, p. 224-230.
- **GUY-GILLY, 2005** - Les plantes aromatiques et huiles essentielles à grasse. S.l. : Harmattan. pp. 85-93.

- H -

- **HARRAR A.E.N., 2012-** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Thèse de Magister Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie. 73 p.
- **HENRICH, et al (2006).** Ethno botany and Flavonoids-potent and versatile.
- **HULIN V., MATHOT A.G., MAFART P. et DUFOSSE L. (1998)** - Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, 18: 563-582.
- **HUSNU CAN BASER ET GERHARD BUCHBAUER, *Handbook of essential oils*: science, technology and applications, CRC Press, 2010, p 121.**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Hussain Al., 2009.** Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae. Thèse de Doctorat. Pakistan. 257p.

- I -

- **IBANEZ E.AРАНZAZU O.,** Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Different Preprocessed Rosemary Plants, JAgric. Food Chem, No. 47, 1999, p. 1400- 1404.

- J -

- **JASET-DONGMO P.M., TATSADJIEU N.L., TCHINDA SONWA E., KUATE J.,AMVAM ZOLLO P.H. & MENUT C. (2008).** Antiradical potentiel and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Eucalyptus saligna* and *E. camaldulensis* against *Phaeoramularia angolensis*. *African Journal of Biotechnology*, **7**, 4045-4050.
- **JEAN-PIERRE DEDET (2006).** la microbiologie de ses origines aux maladies émergents. ISBN978-26106-B, P 213 -245

- K -

- **KALEMBA D., KUNICKA A.2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem* 10, 813-829.
- **KALOUSTIAN J, PORTUGAL H, PAULI AM et PASTOR J (2002)** Chemical, Chromatographic and Thermal Analysis of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *J Appl Polym Sci* 83: 747–756
- **KARAMAN S., DIGRAK M., RAVID U. & IICIM A., 2001.** Antibacterial and antifungal activity of the essential oil of thymus revolutus Celak from Turkey. *J. Ethnopharmacol* 76,183-186.
- **KUDA T., IWAI A. & YANO T. (2004).** Effect of red pepper *Capsicum annum* var. conides and garlic *Allium sativum* on plasma lipid levels and cecal microflora in mice fed beef tallow. *Food Chemistry Toxicology*, **42**, 1695-1700.
- **KUKERJA A. K., UR RAHMAN L., SHISHIR SINGH K., ANAND S., ANJU Y. and KHANUJA S. P. S., 2007.** Qualitative analysis of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. cultivated in Uttaranchal Hills, India. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, Vol. 16 (1) : 55–57
- **KURITA N., KOIKE S., 1982.** Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. *Agric.Biol.Chem* 46, 159-165.

- I -

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **LAGUNEZ-RIVERA L. (2006)** - Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
 - **LAOUER H., ZERROUG M. M., SAHLI F., CHAKER A. N. VALENTINI G., FERRETTI G., GRANDE M. & ANAYA J. (2003)**. Composition and Antimicrobial activity of *Ammoides pusilla* (Brot.) Breistr. Essential oil. Journal of Essential oil Research,
 - **LOGRADA T., RAMDANI M., CHALARD P., FIGUEREDO G., 2014**. Characteristics of essential oils of *Rosmarinus officinalis* from eastern Algeria. Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine. 2: 794-807.
 - **Lu F & Foo L.Y., 2001**. Antioxidant activity of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). Food Chemistry.75, p:197-202.
 - **LUCCHESI M.E. (2005)**. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline: Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.
- M -
- **MA W. G., TAN R. X., FUZZATI N., LI Q. S., WOLFENDER J. L., HOSTETTMANN K., 1997**. Natural occurring and synthetic polyne glycosides. Phytochemistry, 45(2): 411- 415.
 - **MADHAVI D. L., DESHPANDE S. S. & SALUNKHE D. K., 1996**. Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York. P: 65.
 - **MARIE ELISABETH ILUCCHESI, FARID CHEMAT, and JACQUELINE**
 - **MASUDA T., YONEMORI S., OYAMA Y., TAKEDA Y., TANAKA T. AND ANDOH, T. (1999)** - Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 1749–1754.
 - **MILADI H., BEN SLAMA R., MILI D, ZOUARI S., BAKHROUF A., AMMAR E., 2011**. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. Natural Science journal. Vol.5, No.6, 729-739 doi:10.4236/ns.2013.56090.
- **MILADI H., BEN SLAMA R., MILI D., ZOUAR S., BZKHRUF A., AND AMMAR E.** Chemical Composition and Cytotoxic and Antioxidant Activities of *Satureja montana* L. Essential Oil and Its Antibacterial Potential against *Salmonella* Spp. Strains. Journal of Chemistry. Volume 2013 (2013), Article ID 275698, 9 pages.
 - **MOHAMMEDI Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de magister. Option: Produits naturels, activité biologique et synthèse. Faculté des Sciences. Université ABB. Tlemcen. Algérie.
 - **MOLYNEUX P (2004)** – The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J.Sci.Technol.Vol.26 N°2: 211-219.
 - **MOON J. K. & SHIBAMOTO T. (2009).** Antioxidant Assays for Plant and Food Components. Journal of Agricultural Food Chemistry, 57: 1655–1666.
 - **MOROH JLA, BAHI C, DJE K, LOUKOU YG, GUEDE-GUINA F, (2008).** Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli*. Bull de la SR des Scien de Liège, 77 : 44 – 6
 - **MULTON, J.L, 2002.** Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. Lavoisier Technique & Documentation ,Paris Apria. Volume 1, 576p.
 - **MUTIN G., 1977 :** *La Mitidja : décolonisation et espace géographique*. Thèse de doctorat en géographie.volume 14.numéro 1 pp.107-112.

- N -

- **NAOUELOUIS,** étude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil, thèse soutenue pour obtenir le grade de docteur en sciences, université d'oran, 2015, p 6.
- **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.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **NAUCIEL C et VILDEJ.L (2005)** .Bactériologie médicale.2 éme Ed .Masson . Paris .ISBN : 2-294-018583.257p.

- **NAUCIEL, C. (2000)** Bactériologie médicale. Masson (Ed).Paris, 276p.

- O -

- **OMIDBEYGI M., BARZEGAR M., HAMIDI Z. & NAGHDIBADI H. (2007).**

Antifungal activity of tyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus xavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, **18**, 1518-1523.

- **OUIBRAHIM, 2015** Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'Est Algérien.memoire doctorat.59-60 p.

- **OURAINI D., AGOUMIL A., ISMAILI-ALAOUI M., ALAOUI K., CHERRAH Y., AMRANI M. & BELLABAS M.A. (2005).** Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermaphytes. *Phytothérapie*, **4**, 147-157.

- **OUSSALAH M., CAILLET S., SAUCIER L. & LACROIX M. (2006).**

Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogen* *Journal of Food Protection*, **69 (5)**, 1046-1055

- **OUSSALAh, (2007).** Inhibitory effects of selected plant essential oils on *Pseudomonas putida* growth, a bacterial spoilage meat.Meat science., vol 73, p236-244.

- **OUSSOU K.R., COFFI K., NATHALIE G., SERIYOLOU, GERARD K., MIREILLE D., YAO T.N., GILLES F. & JEAN-CLAUDE C.H. (2004).** Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus de Chimie*,**7**, 1081-1086.

- P -

- **PARE J. (1997)** - Procédé assisté par micro-ondes. Info-essences, Bulletin sur les huiles essentielles, 4 :p.4.

- **PARIS M. et HURABIELLE M. (1981)** – Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson p.339

- **PARIS R. & GODON M., 1979.** Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **PAULI A. (2001)**. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapy*, **11**, 126-133.
- **PIBIRI M.C., 2005**. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Suisse. P161.
- **PIOCHON M. (2008)**. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémisynthèse. Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada.
- **PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C., & ROURA S.I., (2003)**. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*36, pp.679-684.
- **PRADEAU D. & COHEN Y., 1992**. L'analyse pratique du médicament, Ed.médicales internationales. P :418-428.
- **PRAJAPATI et al (2005)** .Insecticide, repellent.
- **PRASAD, M.M., SEENAYYA, G. (2000)** Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt. *Food Research International*. 33: 793-798.

- Q -

- **QUEZEL, P. AND SANTA, S. (1962, 1963)** Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. 2 Tomes, Editions CNRS, Paris, 1170.

- R -

- **RAMADE F., 1984**. Eléments d'écologie. Ecologie fondamentale.Ed.Mc Graw-Hill.Paris, 397 pp.
- **RANGA R. R., TIWARI A. K., PRABHAKAR R. P., SURESH B. K., ALI A. Z., MADHUSUDANA K. and MADHUSUDANA R. J.** New furanoflavonoids, intestinal alpha-glucosidase inhibitory and free-radical (DPPH) scavenging, activity from antihyperglycemic root extract of *Derris indica* (Lam.). *Bioorg. Med. Chem.* 2009; 17: 5170-5175.
- **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.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **RICHARD F., 1992.** Manuel des corps gras, Paris, Ed: Lavoisier, Tec.&Doc., p :1228-1242.
 - **RICHARD H.** - Epices et aromates. Ed. dec et doc Lavoisier, collection science et techniques alimentaires, Paris, 339 p, 1992 .
 - **ROBERT-DEMUET S. (1995).** Méthodes de dilutions. In Antibiotiques et antibiogrammes, 131-137. Montréal-Canada.
Romarins officinalis.L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen.Biologie& santé .7 :6-11
*Romarins officinalis*L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen.
- S -
- **SACCHETTI, et SES COLLABORATEURS(2005).**Growing in Argentina.Bioresource
 - **Sagdic, O., Kuscu, A., Özcan, M., Özcelik, S. (2002)** Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of Escherichia coli O157:H7. Food Microbiology. 19: 473-480.
 - **SAMARTH R.M., PANWAR M., SONI A., KUMAR M., KUMAR A.; 2008** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radio protective plant extract Food Chemistry, 106, 868-873.
 - **SANAGO R., 2006.** Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali): 53.
 - **SANTOS FA, RAO VS (2000)** Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. Phytotherapy Research 14:240-244
 - **SANTOS FA, SILVA RM, CAMPOS AR et al (2004)** 1,8-Cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. Food & Chemical Toxicology 42:579-584
 - **SATRANI B., FARAH A. & TALBI M.,2006** .Effet de la distillation sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de Myrte (*Myrtus communis* L.) du maroc. Acta Bot.Gallica 153(2), 235-242

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **SEBROTYNEK et al (2005)** .Comparison of natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat science* .69:289-296
 - **SIBIRINA, S., 2010**. Effet inhibiteur in vitro et in vivo de l'extrait de poudre et de l'huile essentielle de *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich. (Annonaceae) sur *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici* (Forl), champignon parasite des cultures de tomate. *European Journal of Scientific Research*. 39 (2), 279-288.
 - **SING R., MARIMUTHU P., DE HELUANI C.S & CATALAN CESER A.N., 2006**. Antioxidant and biocidal Activities of *Carum nigrum* (seed) Essential oil, Oleoresin, and Their Selected Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .54, p:174-181.
 - **SKOOG D.A., HOLLER F.J. & NIEMAN T.A., 2003**. Principes d'analyse instrumentale. 1ère édition, Ed. De Boeck Université, p: 945.
 - **SMADJA (2004)**. *Flavour And Fragrance Journal* *FlavourFragr. J.*; 19: 134-138
 - **SVOBODA K.P. & HAMPSON J.B., 1999**. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr ,Scotland, UK., KA6 5HW.*
- T -
- **TALEB-TOUDERT KARIMA., 2011**. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (NORD Algérien). Evaluation de leurs effets sur la bruche du niébé *callosobruchus maculatus* (Coleoptera : *Bruchidae*). P 12. Thèse de Doctorat.
 - **TEISSEIRE P.J.** Chimie des substances odorantes. Tec et Doc., Lavoisier, Paris, France. 1991.
 - **TEIXEIRA-DUARTE M.C., MARA FIGUEIRA G. & SARTORATTO A. (2005)**. Anticandida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **97**, 305-311.
 - **TEPE B, DONMEZ E, UNLU M, CANDAN F, DAFERERA D, VARDAR-UNLU G (2004)**. Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex. Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chem.* 84: 519–525. Thèse de Doctorat en

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Génie des procédés (Ecole Doctorale en Génie des Procédés: Spécialité Biochimie. Nante. France

- **TRANCHANT J., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. Masson. Paris.
- **TSAI, I.C., AMACK, J.D., GAO, Z.H., BAND, V., YOST, H.J., and VIRSHUP, D.M. 2007.** In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of streptococcus sodrinus .Food chem. (in press).

- W -

- **WANG, W., WU, N., ZU, Y.G. AND 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 CM. 2007.** Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. Phytomedicine. (In press).

Annexes

Annexe 01 : Analyse de la variance du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle sur les micro-organismes.

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	5	189,111	37,822	11,347	0,000
Erreur	12	40,000	3,333		
Total corrigé	17	229,111			

Annexe 02 : Analyse de la variance de l'activité antioxydante de l'huile essentielle

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	6	1638,016	273,003	302,550	< 0,0001
Erreur	17	15,340	0,902		
Total corrigé	23	1653,356			

Annexe 03 : appareil utilisé pour CG/MS



Annexes 04 : Appareil utilisé pour l'activité antioxydante (spectrophotomètre).

