

**UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences de la nature et de la vie**

Département de biotechnologie

**THESE DE DOCTORAT**

En Sciences agronomiques

Option : Amélioration des productions végétales

Laboratoire des biotechnologies végétales

EFFET COMPARATIF DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES,  
BIOCHIMIQUES ET THERAPEUTIQUES DE ROMARIN *Rosmarinus*

*officinalis* L.

Par

**MOUAS Yamina**

Devant le jury composé de :

S.A. SNOUSSI	Professeur, U. Blida1	Président
M. LAHRECH	Professeur, U. Djelfa	Examineur
M. BELHAMRA	Professeur, U. Biskra	Examineur
A. BENAZIZA	MCA, U. Biskra	Examineur
F.Z. BENREBIHA	Professeur U., Blida1	Directrice de thèse
C. CHAOUIA	MCA U., Blida1	Co-directrice de thèse

Blida, 2018

## RESUME

Le romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) est une plante spontanée médicinale. Afin de remplacer les produits synthétiques par des molécules bioactives qui sont à base de plantes, il est intéressant de connaître ses vertus thérapeutiques.

Le travail consiste à étudier l'influence du facteur région et du facteur saison sur les paramètres physiologiques et biochimiques de romarin *Rosmarinus officinalis L.* Identifier la composition chimique de l'huile essentielle du romarin *Rosmarinus officinalis L.*, évaluer son activité anti-oxydante et mettre en évidence son pouvoir antimicrobien et biocide (bactéricide et insecticide).

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydro distillation. L'aromatogramme a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique, vis-à-vis les souches bactériennes testées. L'activité anti-oxydante a été évaluée in vitro par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH.

Les paramètres physiologiques et biochimiques nous ont permis de vérifier l'existence d'une corrélation entre la variation des conditions climatiques et la réponse des écotypes. L'écotype Djelfa a présenté les teneurs les plus élevées en chlorophylle, proline et sucres solubles avec respectivement : 1.23 µg/ gMF, 0.96 µg/gMF et 3.71 µg/gMF. Les résultats montrent aussi que les teneurs les plus élevées en chlorophylle, proline et en sucres solubles sont enregistrées chez le romarin récolté en printemps avec respectivement 0.77 µg/ gMF, 0.07 µg/ gMF et 3.31 µg/ gMF.

L'analyse des huiles par CG/MS montre que le composé majoritaire commun entre les trois régions Blida, Djelfa et M'sila est l'α-pinène avec 20.33 %, 19.25 % et 10.40% respectivement. Concernant l'effet saisonnier, les résultats ont montré que la nature des constituants est la même pour les trois saisons avec des teneurs variables selon les saisons.

Les tests antibactériens montrent que quatre souches bactériennes sur cinq testées sont sensibles à l'huile essentielle de romarin des écotypes Blida et Djelfa. Quant à l'extrait méthanolique, trois souches sur cinq ont montré une sensibilité. L'huile essentielle et l'extrait méthanolique du romarin des deux écotypes (Blida et Djelfa) ont montré une activité antibactérienne importante vis-à-vis les bactéries à Gram (+) comparées aux bactéries à Gram (-). L'huile essentielle du romarin de la région de Blida récolté durant les différentes saisons a montré un pouvoir biocide envers *Erwinia amylovora* et *Tuta absoluta*. Les résultats ont montré que cette activité biocide varie également selon les saisons et selon les doses des extraits.

**Mots clés :** *Rosmarinus officinalis L.*, huile essentielle, extrait méthanolique ; Ecotype, saisons, CG/MS, effet antimicrobien, effet antioxydant, effet biocide.

## ABSTRACT

### COMPARATIVE EFFECT OF THE PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND THERAPEUTIC PARAMETERS OF ROSEMARY *Rosmarinus officinalis* L.

The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is a medicinal plant; it is interesting to know its therapeutic virtues, in order to replace the synthetic products with bioactive molecules that are based on plants.

The work consists of studying the influence of regions and seasons on the physiological and biochemical parameters of rosemary *Rosmarinus officinalis* L. Identify the chemical composition of *Rosmarinus officinalis* L. Rosemary essential oil, assess its antioxidant activity and evidence of its antimicrobial potency against five microbial strains.

The extraction of the essential oil was carried out by hydro distillation. The aromatogram showed the antibacterial potency of the essential oil and the methanol extract, compared to the bacterial strains tested. The diffusion method on agar medium made it possible to determine the diameters of the zones of inhibition. The antioxidant activity was evaluated in vitro by the measurement of the trapping power of the DPPH radical

The physiological and biochemical parameters studied, namely: chlorophyll (a and b), proline, and soluble sugars; allowed us to verify the existence of a correlation between the variation of the climatic conditions and the ecotype response.

Analysis of the oils by CG / MS shows that the major majority compound between the three regions is alpha-pinene. Regarding the seasonal effect, the results showed that the nature of the constituents is the same for the three seasons, and the grades differ according to the season.

Antibacterial tests show that four out of five bacterial strains tested are sensitive to Rosemary essential oils from the Blida and Djelfa ecotypes. For methanol extract, three strains out of five showed sensitivity. The essential oil and the methanolic extract of the rosemary of the two ecotypes showed an important antibacterial activity with respect to the Gram + bacteria compared to the Gram - bacteria.

Key words: *Rosmarinus officinalis* L., essential oil, methanolic extract; Ecotype, season, CG / MS, antimicrobial effect, antioxidant effect, biocide effect.

## ملخص

تأثير مقارن للمتغيرات الفسيولوجية ، البيوكيميائية والعلاجية للإكليل الجبل

*Rosmarinus officinalis L.*

روزماري (إكليل الجبل) هو نبات طبي، فمن المثير للاهتمام معرفة خصائصه العلاجية، ليحل محل المنتجات الاصطناعية، الجزيئات الحيوية النشطة التي مصدرها الأعشاب.

عملنا يتمحور حول دراسة تأثير المناطق والمواسم على المعلمات الفسيولوجية والبيوكيميائية لإكليل الجبل، التعرف على التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية، تقييم النشاط المضاد للأكسدة و على فاعليتها المضادة للميكروبات ضد خمس سلالات ميكروبية.

تم استخراج الزيوت العطرية بواسطة التقطير المائي. أظهر الأروماتوغرام قوة مضادة للجراثيم للزيت العطري ومستخلص الميثانول، مقارنة مع السلالات البكتيرية المختبرة. وقد مكنت طريقة الانتشار على وسط أجار من تحديد أقطار مناطق تثبيطها. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر عن طريق قياس قوة محاصرة الأيونات الحرة.

المعلمات الفيزيولوجية والبيوكيميائية المدروسة، وهي: الكلوروفيل (أ و ب)، البرولين، والسكريات القابلة للذوبان. سمحت لنا بالتحقق من وجود ارتباط بين تغير الظروف المناخية واستجابة النمط الايكولوجي.

ويبين تحليل الزيوت بواسطة CG/MS أن المركب الغالب المشترك بين المناطق الثلاث هو l'Alpha-pinène . وفيما يتعلق بالأثر الموسمي، أظهرت النتائج أن طبيعة المكونات هي نفسها بالنسبة للمواسم الثلاثة، وتختلف الدرجات من موسم لآخر.

وتبين الاختبارات المضادة للجراثيم أن أربعة من أصل خمس سلالات بكتيرية مختبرة حساسة للزيوت العطرية من روزماري من النمطين البليدة والجلفة. وبالنسبة لمستخلص الميثانول، أظهرت ثلاث سلالات من أصل خمسة حساسية. أظهرت الزيوت الأساسية و مستخلص الميثانول نشاطا مضادا للبكتيريا كبير بالنسبة للبكتيريا Gram+ مقارنة مع البكتيريا Gram-.

**الكلمات المفتاحية:** روزمارينوس أوفسيناليس، الزيوت الأساسية، مستخلص الميثانول؛ نوع إيكولوجي، الموسم ، GC / MS ، تأثير مضاد للميكروبات ، تأثير مضاد للأكسدة. تأثير حيوي.

## REMERCIEMENT

Au terme de ce travail, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience afin d'achever ce travail.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à M<sup>me</sup> BENREBIHA F.Z. professeur au département des biotechnologies d'avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité et ses conseil.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance au co-directrice M<sup>me</sup> CHAOUIA C. maitre de conférences A au département des biotechnologies, pour son aide et son énorme soutien concernant la réalisation de ce projet.

J'adresse mes sincères remerciements à M<sup>r</sup> SNOUSSI S.A., professeur au département des biotechnologies d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens également mes vifs remerciements à Mr M. LAHRECH, professeur à l'université de Djelfa, M<sup>r</sup> M. BELHAMRA, professeur à l'université de Biskra et M<sup>r</sup> A. BENAZIZA maitre de conférences A , à l'université de Biskra , pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

À M<sup>me</sup> OUKARA FZ. et M<sup>r</sup> DEGAICHIA H. pour leur aide et leur disponibilité.

Ma gratitude va également à tout le corps administratif et enseignant du département des Biotechnologies.

Aux personnels du laboratoire de biotechnologie des productions végétales, de physiologie végétale et de phytopharmacie du département des biotechnologies.

Aux personnels du laboratoire d'hygiène de Blida et du groupe SAIDAL. .

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

## **RESUME**

## **REMERCIEMENTS**

## **TABLE DES MATIERES**

## **LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAU**

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>CHAPITRE I : DESCRIPTION DE LA PLANTE ETUDIEE</b> .....	4
1.2. Répartition géographique .....	4
1.3. Etude botanique de la plante .....	5
1.4. Exigences écologiques et pédologiques de la plante .....	6
1.5. Composition chimique .....	6
1.6. Utilisation de romarin .....	8
<b>CHAPITRE II : LES EXTRAITS DES PLANTES MEDICINALE</b> .....	10
2.1. Utilisation des plantes médicinales et aromatiques .....	10
2.2. Huiles essentielles des plantes médicinales et aromatiques .....	10
2.3. Métabolites secondaires des plantes médicinales .....	21
2.4. Extraits des plantes médicinales .....	21
2.5. Groupes des principes actifs .....	22
<b>CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES</b> .....	25
3.1. Matériel végétal .....	25
3.2. Étude de l'effet de la région .....	35
3.3. Étude de l'effet de la saison sur l'écotype Blida .....	45
3.4. Expression des résultats et analyses statistiques des données .....	54
<b>CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	55
4.1. Effet du facteur région sur les paramètres étudiés .....	55
4.2. Effet du facteur saison sur les paramètres étudiés .....	76
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	104
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	108
<b>ANNEXES</b> .....	127

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 : Aspect morphologique du <i>Rosmarinus officinalis</i> L .....	6
Figure 2.2 : Principe de la technique d'hydro distillation (Distillation simple) .....	14
Figure 3.3: Matériel végétal utilisé : <i>Rosmarinus officinalis</i> L .....	25
Figure 3.4 : Situation géographique des zones d'étude .....	26
Figure 3.5 : Carte géographique de la région de M'sila .....	26
Figure 3.6 : Carte géographique de la région de Djelfa .....	27
Figure 3.7 : Carte géographique de la région de Blida .....	28
Figure 3.8 : Diagramme Ombrothermique (2005/2015) de M'sila .....	29
Figure 3.9 : Diagramme Ombrothermique (2005/2015) de Djelfa .....	30
Figure 3.10 : Diagramme Ombrothermique (1985/2015) de Blida .....	31
Figure 3.11 : Etages bioclimatiques des régions d'étude (Climagramme d'Emberger).....	33
Figure 3.12 : Lot de feuilles séchées de <i>R. Officinalis</i> .....	35
Figure 3.13 : Appareillage utilisé : type Clevenger .....	36
Figure 3.14 : Principe de la méthode de l'aromatogramme .....	43
Figure 3.15: Réaction d'un donneur d'hydrogène avec le radical DPPH .....	46
Figure 3.16 : Préparation des dilutions des extraits testés du romarin (HE et EM) .....	48
Figure 3.17 : Principe de la méthode de diffusion sur disque .....	49
Figure 3.18 : Culture de tomate sous serre attaquée par <i>Tuta absoluta</i> .....	52
Figure 4.19 : Teneur en chlorophylle (a) selon les écotypes .....	55
Figure 4.20 : Teneur en chlorophylle (b) selon les écotypes .....	56
Figure 4.21 : Teneur en chlorophylle (a+b) selon les écotypes .....	57
Figure 4.22 : Teneur en proline selon les écotypes .....	58
Figure 4.23 : Teneur en sucres solubles selon les écotypes .....	59
Figure 4.24 : Rendement des huiles essentielles de <i>R. officinalis</i> L .....	63

Figure 4.25 : Echantillons d'HE extraite des trois écotypes .....	63
Figure 4.26 : Huile essentielle du romarin .....	65
Figure 4.27 : Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> .....	69
Figure 4.28 : Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis <i>Enterococcus faecalis</i> .....	71
Figure 4.29 : Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis <i>Bacillus cereus</i> .....	72
Figure 4.30 : Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis <i>Escherichia coli</i> .....	73
Figure 4.31 : Pouvoir antibactérien des deux extraits du romarin vis-à-vis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	74
Figure 4.32 : Teneur en chlorophylle (a) selon les saisons .....	76
Figure 4.33 : Teneur en chlorophylle (b) selon les saisons .....	77
Figure 4.34 : Teneur en chlorophylle (a+b) selon les saisons .....	78
Figure 4.35 : Teneur en proline selon les saisons .....	79
Figure 4.36 : teneur en sucres solubles selon les saisons .....	80
Figure 4.37 : Rendement en HE de <i>R. officinalis</i> L. de l'écotype Blida .....	83
Figure 4.38 : Principaux composés identifiés en automne (Ecotype Blida) .....	84
Figure 4.39 : Principaux composés identifiés en hiver (Ecotype Blida) .....	84
Figure 4.40 : Principaux composés identifiés au printemps .....	85
Figure 4.41 : Composition chimique de l'HE du romarin des trois saisons .....	86
Figure 4.42 : Pouvoir antibactérien de l'HE de l'écotype Blida vis-à-vis <i>Staphylococcus aureus</i> .....	88
Figure 4.43 : Pouvoir antibactérien de l'HE de l'écotype de Blida vis-à-vis <i>Escherichia coli</i> .....	89
Figure 4.44 : Passage de la couleur violette à la couleur jaune de l'extrait ....	91
Figure 4.45 : Courbe d'étalonnage (acide ascorbique) .....	92
Figure 4.46 : Taux d'inhibition du radical libre DPPH selon les concentrations de l'HE (saison automnale) .....	92
Figure 4.47 : Taux d'inhibition du radical libre DPPH selon les concentrations de l'HE (saison hivernale) .....	93



Figure 4.48 : Taux d'inhibition du radical libre DPPH selon les concentrations de l'HE (saison printanière) .....	93
Figure 4.49 : Taux d'inhibition des trois HE comparés à l'acide ascorbique .....	94
Figure 4.50 : Concentration inhibant 50 % de la réaction .....	95
Figure 4.51 : Taux d'inhibition des extraits méthanoliques .....	96
Figure 4.52 : Activité anti radicalaire des extraits méthanoliques de l'écotype Blida exprimée en IC <sub>50</sub> .....	97
Figure 4.53 : Effet bactéricide de l'HE du romarin de la région de Blida .....	99
Figure 4.54 : Effet insecticide de l'HE du romarin de la région de Blida .....	102

Tableau 1.1: Composition chimique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	7
Tableau 3.2: Etages bioclimatiques des régions d'étude .....	32
Tableau 3.3 : Généralités sur les souches bactériennes utilisées .....	42
Tableau 3.4 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition .....	44
Tableau 3.5 : Différentes dilutions d'extraits testés du romarin (écotype de Blida). ....	47
Tableau 3.6 : Présentation du parasite : <i>Erwinia amylovora</i> . ....	50
Tableau 3.7 : Différentes dilutions de l'HE du romarin .....	51
Tableau 3.8 : Présentation du ravageur : <i>Tuta absoluta</i> .....	53
Tableau 3.9 : Différentes dilutions de l'HE du romarin .....	54
Tableau 4.10 : Teneur en chlorophylle (a) : test de signification de Tukey .....	56
Tableau 4.11 : Teneur en chlorophylle (b) : test de signification de Tukey .....	57
Tableau 4.12 : Teneur en chlorophylle (a+b) : test de signification de Tukey.....	58
Tableau 4.13 : Teneur en proline : test de signification de Tukey .....	59
Tableau 4.14 : Teneur en sucres solubles : test de signification de Tukey .....	60
Tableau 4.15 : Rendement en huiles essentielles de <i>R. officinalis</i> .....	62
Tableau 4.16 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de romarin .....	64
Tableau 4.17 : Caractéristiques physico-chimiques de l'HE du romarin .....	67
Tableau 4.18 : Composition chimique des HE de <i>R. officinalis</i> .....	67
Tableau 4.19 : Teneur en chlorophylle (a) : test de signification de Tukey .....	77
Tableau 4.20 : Teneur en chlorophylle (b) : test de signification de Tukey.....	78
Tableau 4.21 : Teneur en chlorophylle (a+b) : test de signification de Tukey .....	79
Tableau 4.22 : Teneur en proline : test de signification de Tukey à .....	80
Tableau 4.23 : Teneur en sucres solubles : test de signification de Tukey .....	81
Tableau 4.24. : Rendement en huiles essentielles de <i>R. officinalis</i> .....	82
Tableau 4.25 : Diamètres d'inhibition de l'HE de l'écotype Blida vis-à-vis <i>S. aureus</i> .....	89

Tableau 4.26 : Diamètres d'inhibition de l'HE de l'écotype Blida vis-à-vis <i>E. coli</i> .....	90
Tableau 4.27 : Pouvoir anti-radicalaire de l'HE de <i>R. officinalis</i> .....	94
Tableau 4.28 : Valeurs des IC <sub>50</sub> et le pouvoir anti-radicalaire de l'EM du romarin .....	97

## LISTE DES ABREVIATIONS

Abs	: Absorbance
ANOVA	: Analyse de la variance à 1 seul facteur
ARP	: Puissance anti-radicalaire
C	: Concentration
Ch	: Chlorophylle
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
CG/MS	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse
d	: densité
DPPH	: 2,2- diphényl -1-picrylhydrazyle
Do	: Densité optique
EM	: Extrait méthanolique
EPH	: Etablissement public hospitalier
HE	: Huile essentielle
I <sub>A</sub>	: Indice d'acide
IC <sub>50</sub>	: Concentration initiale (50 %)
INGC	: Institut national de gendarmerie de criminologie
I <sub>R</sub>	: Indice de réfraction
M	: Masse
MANOVA	: Analyse de la variance
MeOH	: Méthanol
MF	: Matière fraîche
MH	: Muller Hinton
nm	: nanomètre
OMS	: Organisation mondiale de la santé

P	: Précipitation
Q <sub>2</sub>	: Quotient d'Emberger
SM	: Spectrométrie de masse
SM-IE	: Spectrométrie de masse – Impact électronique.
SPSS	: Statistical package for the social sciences.
T	: Température
UV	: Ultra-violet
V	: Volume



## INTRODUCTION

Les grandes civilisations (chinoise, égyptienne, babylonienne, grecque, et romaine) ont eu recours aux plantes médicinales pour leurs propriétés thérapeutiques, cosmétiques, chimiques, diététiques, pharmaceutiques, agro-alimentaires et industrielles. Actuellement, cette médication, par les plantes, connaît un regain d'intérêt notable (LAHSISSENE et *al.*, 2009).

LHUILIER (2007), signalent que les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) mentionnent que 80 % de la population mondiale sont dépendants des plantes médicinales. Importantes sur le plan médical et culturel, les plantes médicinales sont aussi un facteur économique majeur pour les pays en voie de développement.

Au moins 35 000 espèces végétales sont utilisées dans le monde à des fins médicales. Alors que les médicaments industriels les plus importants sont produits à partir de 90 espèces environ. Les plantes sont donc la source principale de substances actives. Selon des estimations de l'OMS, elles représentent environ 70 % des matériaux de base des produits pharmaceutiques modernes (KASPAREK et JANABI, 2001).

L'Algérie avec sa diversité de climats et de sols, sa situation géographique et ses reliefs, présente une diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques dont la plupart existent à l'état spontané (QUEZEL et MEDAIL, 1995). En Algérie la flore médicinale naturelle est relativement abondante et compte plus de 3000 espèces utilisées en médecine traditionnelle (ABED, 1997). Avec ses espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% sont endémiques, la flore reste peu exploitée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique (BOUZID et *al.*, 2017).

Dans le but de valoriser les espèces spontanées médicinales connues pour leurs tolérances à la sécheresse et à la salinité et dans le but d'élaborer de nouveaux produits bioactifs exploités par l'homme dans l'agro-alimentaire, l'industrie pharmaceutique et dans l'agriculture biologique comme bio-pesticide, nous nous sommes intéressés à une espèce très convoitée le romarin.

Le romarin *Rosmarinus officinalis* L. est une plante médicinale originaire du bassin méditerranéen qui pousse à l'état spontané. Il aime les terrains calcaires et s'accommode très bien des contrées arides et rocailleuses. On le reconnaît aisément, toute l'année. Les feuilles, les sommités fleuries et l'huile essentielle sont utilisées en phytothérapie.

Le romarin est une herbe stimulante, à odeur forte et reconnaissable, qui a une vertu antispasmodique et qui est prescrite, encore de nos jours, pour les bronchites. En médecine homéopathique traditionnelle, on l'utilise dans plusieurs diagnostics : asthme, palpitations, vomissements, grippe et fièvre.

Les huiles essentielles qui se composent de métabolites secondaires sont des mélanges volatils, naturels et complexes qui se trouvent dans différents organes de plantes aromatiques. Une recherche massive a été récemment consacrée aux huiles essentielles dûe à leurs caractéristiques multifonctionnelles, comme ayant des vertus antioxydantes , antibactériennes, antifongiques et antivirales (DAMYEH et NIAKOUSARI, 2016)

Les composants des huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives [DAMYEH et NIAKOUSARI (2016) ; BARAKAT et LAIB (2011)]

Les extraits des plantes médicinales (l'extrait méthanolique, l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux) riches en composés phénoliques ont également fait l'objet de nombreuses recherches. Ce sont des produits naturels dotés d'une grande diversité structurale et de propriétés pharmaceutiques intéressantes qui suscitent actuellement un grand intérêt en tant que substance à effet anti-radicalaire, antimicrobien et anti-inflammatoire (BRAVO, 1998).

Les activités des huiles essentielles décrites sur les insectes sont variées : larvicides, adulticides, répulsifs ou inhibiteurs de croissance. La plupart des huiles



essentielles agissent en perturbant la structure de la membrane cellulaire mais, pour certaines, des effets neurotoxiques ont pu être mis en évidence (REGNAULT-ROGER et *al.*, 2012). Par leur volatilité et leur petite taille, beaucoup des constituants des huiles essentielles interagissent avec les récepteurs d'odeur des insectes, déclenchant des comportements variés : fuite, attraction et oviposition (TRIPATHI et *al.*, 2009).

La majorité des travaux de recherche ont été orienté sur les huiles essentielles (HE) extraites de cette plante aromatique le romarin, alors que certaines d'entre eux ont étudié leurs extraits méthanoliques (EM).

Dans ce contexte s'inscrit notre travail de recherche où nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence du facteur région sur l'espèce étudiée : *Rosmarinus officinalis* L. Nous avons choisi trois localités pour faire la récolte, Boussaâda (M'sila), Ain Oussara (Djelfa) et Sidi El Kebir (Blida) appartenant à des étages bioclimatiques différents : aride, semi aride et humide.

L'étude a porté sur :

- Paramètres physiologiques et biochimiques,
- Composition chimique de l'huile essentielle,
- Activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique.

Une deuxième expérimentation a été réalisée, où nous nous sommes orientés vers une étude plus approfondie en récoltant le romarin dans la localité Sidi El Kebir (Blida) durant les trois saisons (automne, hiver et printemps) complétée par une étude d'une activité antioxydante et biocide.

# CHAPITRE I

## DESCRIPTION DE LA PLANTE ETUDIEE

### 1.1. Historique

Le romarin est connu depuis la plus lointaine antiquité où des rameaux de cette plante ont été trouvés dans les tombes égyptiennes des premières dynasties (BARDEAU, 2009).

Ce sont les arabes qui, les premiers, extrairont l'essence d'encensier, mais c'est Arnaud de Villeneuve qui, en 1330, trouva le moyen de la conserver en solution alcoolique. Puis Raymond Lulle continua les recherches et donna des indications précises sur la distillation du romarin. Il acquiert une grande célébrité et on le retrouve dans de multiples compositions préparées chez les apothicaires, du XVIe jusqu'au XVIIIe siècle (BARDEAU, 2009).

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

En outre son emploi, en pharmacie comme antiseptique, antispasmodique, cholagogue, digestif, diurétique, tonique, vulnéraire la fit connaître, durant le Moyen Âge et fût un véritable « succès individuel » puisque de courts traités de pharmacologie lui furent consacrés exclusivement (FERY-HUE, 2005). Aujourd'hui le romarin est un aromate culinaire et fournit une huile essentielle encore recherchée par l'industrie des parfums (GUY, 2005).

### 1.2. Répartition géographique

Selon GUINOCHET et *al.* (1973), le romarin se reparti tout au long de la mer méditerranéenne et le reste de l'Europe d'où son nom « rose de la mer ».

D'après PERROT et PARIS (1971), cette plante existerait aussi en Corse et au Portugal.

En France, elle pousserait abondamment dans les terrains calcaires du midi en particulier sur le littoral méditerranéen (aux faibles altitudes) d'où il remonte même jusqu'au massif central (Provence, Roussillon, Languedoc). Elle est

également cultivée dans de nombreux pays tel que l'Espagne, l'Italie, la Tunisie et le Maroc (GARNIER et *al.*, 1961).

En Algérie cette plante est bien apparente à différentes régions. Elle est retrouvée dans la steppe à Sid Djilali dans la région de Sid El Makhfi, ainsi on peut la voir dans le littoral à Béni Saf dans la zone de Sidi Safi. Nous pouvons la rencontrer à différentes altitudes suivant les étages bioclimatiques, elle est retrouvée à Tlemcen à lala Setti à 1025 mètres (ATIK-BEKKARA et *al.*, 2007).

### 1.3. Etude botanique de la plante

Le genre *Rosmarinus* regroupe deux espèces de plantes de la famille des Lamiacées originaires du bassin méditerranéen le *Rosmarinus eriocalyx* et le *Rosmarinus officinalis* L. (BESOMBES, 2008)

Ses caractères sont les suivants : (figure 1.1)

- arbuste toujours vert, de 60cm à 2m de haut et pouvant vivre jusqu'à 30ans,
- tige, à l'écorce grisâtre, écailleuse et fissurée, se divisant en rameaux opposés tortueux, nœuds distancés de 0,5 à 2mm,
- feuilles opposées, coriaces, sessiles, linéaires, entières, de 1.5 à 4.5cm de long, aux bords enroulés vers le bas; face supérieure vert sombre et glabre, face inférieure blanche, tomenteuse, parcourue par une nervure saillante, et portant des poils articulés ramifiés et poils glandulaires fortement serrés,
- inflorescence spiciforme, à fleurs subsessiles, qui s'épanouissent toute l'année,
- calice gamosépale, poudré-blanchâtre, tube en forme de cloche, à 3 lobes, le plus large est la lèvre supérieure et les deux autres forment la lèvre inférieure,
- corolle gamopétales, tubuleuses, à 2 lèvres (la supérieure à 2 lobes en forme de capuchon, l'inférieure à 3 lobes, avec le médian plus large, concave),
- 2 étamines, et des anthères allongées uniloculaires,
- le fruit est un tétrakène, de couleur brune,
- fleurs bleu pâle, lilas ou blanchâtres, maculées de petites taches violettes à l'intérieur.



Figure 1.1 : Aspect morphologique du *Rosmarinus officinalis* L

#### 1.4. Exigences écologiques et pédologiques de la plante

Le romarin est une plante thermophile mais le jeune plant peut craindre les gelées. Sur les rivages marins, on le rencontre jusqu'à 1500 m d'altitude. Si l'espèce se rencontre souvent en terre calcaire, on peut aussi le rencontrer sur sol acide quand la pinède est peu favorable à d'autres espèces (GUY, 2005). Les sols argilo-calcaires à pH 7-8 sont les plus favorables (PERON, 2006).

#### 1.5. Composition chimique

Cette espèce très polymorphe, présente plusieurs variétés. Mais, à cette différenciation morphologique très aléatoire, nombreux botanistes préfèrent s'appuyer sur la composition chimique de l'huile essentielle pour lister quatre chémotypes, suivant le composé dominant : romarin à cinéole, romarin à verbénone, romarin à camphre/ bornéol, et parfois, romarin à myrcène.

Les composés rencontrés dans *Rosmarinus officinalis* peuvent être classés dans le tableau 1.1

Tableau 1.1: Composition chimique de *Rosmarinus officinalis* L.

Huile essentielle	1,8-cinéole, Camphre, $\alpha$ -pinène, Autres monoterpènes (bornéol, limonène, camphène, $\alpha$ -terpinéol).
Diterpènes phénoliques tricycliques	Acide carnosolique, Carnosol, Rosmanol, Épirosmanol, Isorosmanol, Rosmaridiphénol, rosmari-quinone, Rosmadial...
Acides phénols	Acides caféique, Chlorogénique, Rosmarinique
Flavones méthylées	Genkwanine, Lutéoline, Diosmétine
Triterpènes et stéroïdes	Acide oléanolique, Dérivés d'acide ursolique, $\alpha$ - et $\beta$ -amyrines
Autres constituants	Polysaccharides acides, Traces de salicylates

[BRUNETON (1999) ; GAMET-PAYRASTRE et *al.*, (1999)]

## 1.6. Utilisation de romarin

### 1.6.1. Agriculture

Les hautes plaines steppiques connaissent aujourd'hui une forte dégradation qui se traduit par la réduction du potentiel biologique et la rupture des équilibres écologiques et socio-économiques. Afin de préserver et d'améliorer les sols de ces régions, la valorisation des espèces spontanées (fourragères et médicinales) connues pour leurs tolérances à la sécheresse et à la salinité telle que le romarin, s'avère indispensable.

Le romarin préfère les sols argilo-calcaires, de pH 7 à 8. Poussant naturellement dans la garrigue, le romarin peut valoriser des terrains pauvres, il se développe mieux en terrain profond, léger et perméable (QUEZEL et MEDAIL,1995)

### 1.6.2. Phytothérapie

La phytothérapie repose sur des remèdes naturels, elle est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite (ISERIN et *al.*,2001). Cependant, deux manières distinctes font l'objet de la phytothérapie par la plante de romarin qui :

#### 1.6.2.1. Voie externe

L'extrait alcoolique qui contient des sommités du romarin est utilisé pour le traitement des entorses, foulures, contusions et torticolis. La décoction aqueuse s'utilise en gargarismes (angines) et bains de bouche (aphtes), ou elle est ajoutée à des bains stimulants.

L'huile essentielle de romarin soulage les troubles rhumatismaux et de la circulation sanguine, soigne les blessures, soulage les maux de tête, améliore la concentration pour une bonne mémoire, combat les effets du stress et de la fatigue, traite l'inflammation des voies respiratoires et de la sphère ORL (DIAS et *al.*, 2000), alors que l'huile essentielle du romarin a une action sur la pousse des cheveux en stimulant l'irrigation du cuir chevelu par une simple application sur la tête (ISERIN et *al.*, 2001).

#### 1.6.2.2. Voie interne

Le romarin est un stimulant, antispasmodique, cholagogue. On l'indique pour ses qualités stimulantes dans les dyspepsies atoniques, les fermentations intestinales, les asthénies, le surmenage, les états adynamiques des fièvres typhoïdes ou muqueuses et de la grippe.

ISERIN et *al.* (2001), remarquent que les propriétés hypertensives du romarin, ont permis d'utiliser la plante en cas d'évanouissements liés à une insuffisance circulatoire et ils ajoutent que la plante pourrait être considérée comme un fortifiant qui accélère la convalescence à la suite de maladies chroniques ou de stress prolongés.

#### 1.6.3. Industrie alimentaire

Il est largement utilisé dans l'industrie alimentaire pour prévenir une éventuelle dégradation oxydative et microbienne des aliments. Le romarin est utilisé comme alternative aux additifs chimiques pour la préparation de la volaille, de l'agneau, du veau, des fruits de mer, des saucisses et salades ainsi que des soupes et chapelures. Il est également utilisé comme épice dans les croustilles et les chips (BOUSBIA, 2011).

#### 1.6.4. Industrie de parfumerie

La faculté des extraits de romarin a protégé la peau des lésions cutanées induites par les radicaux libres. Ils ont montré la validité réelle de la biotechnologie des antioxydants naturels dans la gestion de l'antivieillessement de la peau (BOUSBIA, 2011).

L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, parfums, désodorisants [ARNOLD (1997) ; CUVELIER et *al.*, (1996)].

## CHAPITRE II

### LES EXTRAITS DES PLANTES MEDICINALES

#### 2.1. Utilisation des plantes médicinales et aromatiques

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, c'est au cours du XVIIIème siècle, que les savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques contenus dans les plantes.

La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments. Aujourd'hui, les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes (ISERIN et *al.*, 2001).

La phytothérapie à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi « totum » plutôt que des extraits obtenus en laboratoire. Une plante entière est plus efficace que la somme de ses composants, les plantes contiennent des centaines voire des milliers de substances chimiques actives (ISERIN et *al.*, 2001).

#### 2.2. Huiles essentielles des plantes médicinales et aromatiques

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés lipophiles, volatiles et souvent liquides stockées dans des tissus végétaux spécialisés et extrait des plantes grâce à des procédés physiques (BRUNETON, 1993).

DEGRYSE et *al.*, (2008), précisent que ces substances ne contiennent aucun corps gras : contrairement à une huile végétale, une goutte déposée sur un papier s'évaporerait sans laisser de trace.

##### 2.2.1. Localisation

Les huiles essentielles sont sécrétées dans différentes parties, variant selon la plante aromatique. Elles peuvent être de minuscules cellules épidermiques dans les pétales de la rose ou des poils sécréteurs disposés à la périphérie des calices floraux, des feuilles et des tiges chez les labiées (thym, sauge) ou de grosses cellules disposées au sein même des tissus végétaux : tiges, écorces, racines,



feuilles et semences. Mais elles peuvent être aussi, et cela est beaucoup plus particulier, des cellules végétales en poches sécrétrices (SCIMECA et TETAU,2005)

### 2.2.2. Caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

Les HE communément appelées essences, sont des constituants de consistance huileuse, plus ou moins fluide, voir résinoïdes, très odorantes, volatiles, souvent colorées et plus légères que l'eau (densité de l'ordre de 0,750 à 0,990).

Elles se volatilisent sous l'action de l'air et de la chaleur et se dissipent au bout de quelques instants. Les HE sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organiques, mais sont insolubles dans l'eau.

### 2.2.3. Composition chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent à deux groupes les:

- Terpènes
- Composés aromatiques (BRUNETON, 1999).

#### 2.2.3.1. Terpènes

Ils ont pour formule générale  $(C_nH_{2n})_n$ , cyclique. Ils sont constitués du polymère de l'isoprène parmi lequel on distingue les monoterpènes et les sesquiterpènes.

D'après BELLAKHDAR (1997), les monoterpènes sont des composés plus volatiles, ils sont les principaux composés rencontrés dans les huiles essentielles. Ils sont composés essentiellement de  $\alpha$ -pinène, (3-pinène), o-terpinène, camphène,  $\alpha$ -phéllandrène, P-phéllandrène, limonène et myrcène.

Les sesquiterpènes sont des composés caractéristiques des arômes produits par les plantes et donnent à celles-ci leur goût amer. Ce sont des composés d'hydrocarbures notamment l'aromadendrène, allo-aromadendrène et  $\alpha$ -gurjunène (AZOUDJ, 1999).

### 2.2.3.2. Les composés aromatiques

Les composés aromatiques sont en concentration moindre que les dérivés terpéniques, ils procurent aux HE leur propriétés odorantes de type les «phénylpropanoïde » qui emprunte une voie biosynthétique dite de l'acide schikimique conduisant essentiellement à la synthèse de la « tyrosine » (NAZLIN, 2003)

### 2.2.4. Facteurs de variabilité de la composition chimique des huiles essentielles

Formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, que nous pouvons regrouper en deux catégories :

- Facteurs intrinsèques : liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, à l'interaction avec l'environnement (type de sol et/ou climat) et au degré de maturité du végétal concerné, au moment de la récolte et en fonction des stades phénologiques.
- Facteurs extrinsèques : directement liée à la méthode d'extraction.

### 2.2.5. Propriétés physiques

Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent un certain nombre de propriétés physiques communes.

Elles sont généralement sous forme liquides à température ambiante et leur grande volatilité les oppose aux "huiles fixes" (lipides). Lorsqu'elles viennent d'être préparées, leurs teintes est généralement comprise dans une gamme allant de l'incolore, à jaune pâle. Il existe toutefois quelques exceptions, comme l'huile essentielle de camomille romaine (*Anthemis nobilis*) qui possède une coloration bleu clair due à la présence du chamazulène.

Leur densité est le plus souvent inférieure à l'unité. Seules 3 huiles essentielles officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau: il s'agit des huiles essentielles de certaines plante notamment la cannelle et le girofle.

Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et ont une capacité de pouvoir rotatoire puisque constituées, pour l'essentiel, de molécules asymétriques. Elles sont peu solubles dans l'eau, dégagent cependant leurs

odeurs (eaux distillées aromatiques), sont très facilement altérables et sont sensibles à l'oxydation, mais ne rancissent pas.

Le caractère odorant des huiles essentielles est lié à la volatilité des molécules qui les composent ce qui permet de les obtenir par entraînement à la vapeur d'eau (WILLEM, 2002).

#### 2.2.6. Méthodes d'extractions des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général, le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, rameaux), de la nature des composés (par exemple, les flavonoïdes, les huiles essentielles, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées.

##### 2.2.6.1 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.

- Hydro-distillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et, de ce fait la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'H.E se sépare de l'hydrolysate par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysate (figure 2.2).

En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (LUCCHESI, 2005).

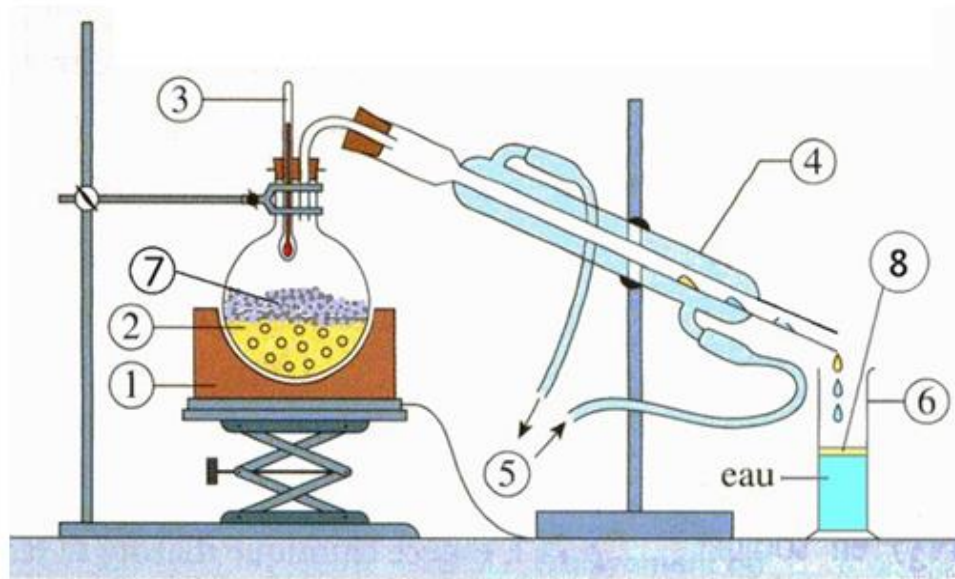


Figure 2.2 : Principe de la technique d'hydro distillation (Distillation simple)  
(LUCCHESI, 2005).

- |                   |                                  |
|-------------------|----------------------------------|
| 1- Chauffe ballon | 5- Entrée et sortie d'eau        |
| 2- Ballon         | 6- Erlenmeyer                    |
| 3- Thermomètre    | 7- Matière à extraire l'essence  |
| 4- Réfrigérant    | 8- La couche d'huile essentielle |

- Distillation par entrainement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, le matériel végétal n'est pas macéré directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant.

Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'H.E en minimisant les altérations hydrolytiques.

- Hydro diffusion

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas, et à pression réduite la vapeur d'eau au travers la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide et n'altère pas les composés volatils.

#### 2.2.6.2. L'extraction à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence.

Le produit ainsi obtenu est appelé essence, car il n'a subi aucune modification chimique (ROUX, 2008).

#### 2.2.6.3. Extraction assistée par micro-ondes

Cette nouvelle technique combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle.

Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques condensation, refroidissement et décantation.

Des études montrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant et un rendement d'extraction élevé (HEMWIMON et *al.*, 2007).

#### 2.2.6.4. Extraction par les solvants et les graisses

Il s'agit d'extrait de plantes obtenu au moyen de solvants non aqueux (hexane et éther de pétrole), mais aussi de graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par les corps gras).

Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également des composés non volatils tels que des cires, des pigments et des acides gras, un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés.

Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé « absolu », et sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle. L'extraction à l'aide de solvants organiques pose le problème de toxicité et de solvants résiduels (HERNANDEZ-OCHOA, 2005)

### 2.2.7. Utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont de plus en plus reconnues et utilisées pour leurs bienfaits sur le bien-être et la santé.

#### 2.5.7.1. Propriétés odorantes

Les huiles essentielles sont employées dans le secteur de la cosmétique, notamment pour la fabrication des parfums; dans les compositions parfumantes des détergents (BESOMBES, 2008).

#### 2.2.7.2. Pour leurs propriétés médicinales

L'utilisation historique des plantes en raison de leurs propriétés thérapeutiques, a avec les avancées techniques et scientifiques, mené à l'isolation de principes actifs. La phytothérapie est la médecine par les plantes, utilisées en partie ou en totalité, sous différentes formes (teintures mères, extraits fluides ou secs, poudres, infusions et décoction). L'aromathérapie n'utilise que les principes actifs d'une partie de la plante, où ils sont extrêmement concentrés (BESOMBES, 2008).

### 2.2.8. Toxicité des huiles essentielles

Les Huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisées sans risque. Certaines Huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en Cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de *citrus* contenant des furacoumarines).

D'autres HE ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' $\alpha$ -thujone sont toxiques pour les tissus nerveux) (GUBA, 2001).

### 2.2.9. Méthodes de caractérisation des huiles essentielles

La détermination de la composition chimique des HE est une étape importante malgré le développement des méthodes de séparation et d'identification. Elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques.

#### 2.2.9.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs ont contribué à rendre la CPG incontournable pour la caractérisation des huiles essentielles.

Cette technique permet de séparer un mélange gazeux complexe par succession continue d'équilibre entre phase mobile gazeuse et phase stationnaire (BESOMBES, 2008).

Le développement des phases stationnaires et de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés rencontrées dans la séparation et l'identification des composés dans les huiles essentielles.

Ainsi, la CPG bidimensionnelles (CPG/CPG), mettant en ligne deux colonnes capillaires, permet la séparation, l'identification et la quantification de composés minoritaires pouvant co-combiner avec les composés plus abondants. L'échantillon est injecté dans la première colonne, puis les composés sont transférés dans une deuxième colonne pour être séparés (PAOLINI, 2005).

#### 2.2.9.2. Spectrométrie de masse (SM)

Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des composés. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse; renfermant une source, un analyseur et un détecteur. La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites.

Dans le spectromètre de masse, les ions sont séparés selon leur ration « masse/charge », à l'aide d'un champ magnétique ou électrique (BESOMBES, 2008). Le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse est détecté et transformé en un signal utilisable.

#### 2.2.9.3. Couplage CPG/SM

Le couplage chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse est aujourd'hui une des techniques les plus utilisées de la chimie analytique. L'association des deux techniques fournit un instrument d'analyse

particulièrement plus performant. La principale difficulté rencontrée lors de ce couplage est due à la grande différence de pression.

En effet, la spectrométrie de masse requiert un niveau de pression très bas, alors que la chromatographie en phase gazeuse se déroule à un niveau de pression plus élevé. Ainsi le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM – IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des HE (CAVALLI, 2002)

#### 2.2.10. 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. (2006) ; KUDA et al.,(2004) ; BOUSBIA (2004)]. Les constituants des Huiles essentielles sont actifs contre une large gamme de bactéries, levures et champignons.

##### 2.2.10.1. Activité antibactérienne

Les Huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent à la famille des *Labiatae* (origan, thym, sauge, romarin et clou de girofle) qui sont des plantes aromatiques à huiles essentielles riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol.

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).

##### 2.2.10.2. Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des HE des plantes aromatiques, contre les moisissures allergisantes, a été mis en évidence par de nombreux auteurs [DE BILLERBECK et al.,(2002) ; KOKBA et al. (2004) ; 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 MOMAMMEDI (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 HE 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).

### 2.2.10.3. Mécanismes d'action antimicrobienne

Les mécanismes par lesquels les HE exercent leur activité antibactérienne sont mal connus. Du fait de la complexité de leur composition chimique. DORMAN et DEANS (2000), soulignent qu'il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des HE. Il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire.

BURT (2004), a annoncé que la caractéristique importante des HE est attribuée à l'hydrophobicité de certains de ces composants qui leur permet de traverser facilement la couche phospholipidique de la membrane cellulaire en altérant sa perméabilité et entraînant des pertes anormales d'ions, voire même des macromolécules.

### 2.2.11. Activité anti-oxydante

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

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

En jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'électrons, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules,

possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milliseconde) (KOECHLIN-RAMONATXO, 2006). De même que, tous les oxydants ne sont pas des radicaux libres (DIALLO, 2005).

#### 2.2.11.1. Rôles des radicaux libres

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

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

#### 2.2.11.3. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles

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

### 2.3. Métabolites secondaires des plantes médicinales

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit. Elle combat les prédateurs et les divers microorganismes pathogènes. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre notamment les métabolites secondaires (KANSOLE, 2009).

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes (BOUDJOUREF, 2011). Ils sont caractérisés généralement par de faible concentration dans les tissus végétaux (NEWMAN et CRAGG, 2012). Bio-synthétisés à partir de métabolites primaires et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème (PEEKING et *al.*, 1987).

### 2.4. Extraits des plantes médicinales

Selon la Pharmacopée européenne (2002), les extraits sont des préparations liquides (extraits fluides et teintures), de consistance semi-solide (extraits mous ou fermes) ou solide (extraits secs), obtenues à partir de drogues végétales généralement à l'état sec. Les extraits titrés sont ajustés au moyen d'une substance inerte ou en mélangeant des lots d'extraits, avec une tolérance acceptable à une teneur donnée en constituants ayant une activité thérapeutique connue.

Selon HOSTTMANN (1997), les extraits des plantes médicinales peuvent être utilisés sous plusieurs formes.

### 2.4.1. Extraits aqueux

**a.** Les tisanes : regroupent les infusions et les décoctions.

- L'infusion est utilisée pour les parties les plus fragiles de la plante : les pétales, les jeunes feuilles très fines. Elle consiste à verser de l'eau chaude ou bouillante sur les plantes sèches (NOGARET- EHRHART,2003).
- La décoction convient aux parties ligneuses de la plante comme les tiges, les racines et l'écorce. Il s'agit ici de plonger les parties de plante sèche à froid dans de l'eau et de porter le tout à ébullition (POTEL, 2002).

**b.** La macération s'opère à froid plutôt pour des plantes à gommages et à mucilages. Laisser tremper les plantes sèches ou fraîches dans l'eau le temps de macération peut aller jusqu'à 3 semaines. Grâce à ces techniques, les principes actifs hydrosolubles sont extraits, une filtration sera nécessaire avant la consommation (BERTRAND, 2010)

### 2.4.2. Extrait par solvant éthanoliques ou hydroalcooliques :

L'extraction est réalisé par un solvant approprié (généralement de l'éthanol, méthanol) à partir d'un ou plusieurs lots de drogues, qui peuvent avoir subi préalablement différents traitements comme l'inactivation des enzymes présents, un broyage ou encore un dégraissage (WICHTLET et ANTON, 2003).

## 2.5. Groupes des principes actifs

### 2.5.1. Huiles essentielles

Une huile essentielle est un liquide concentré en substances végétales, obtenu par extraction ou distillation de molécules volatiles de la plante d'origine.

On retrouve majoritairement de terpénoïdes et des molécules aromatiques, ils possèdent un caractère volatil offrant à la plante une odeur caractéristique et on les trouve dans les organes sécréteurs (ISERIN et *al.*, 2001). Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance d'une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (SANON et *al.*, 2002).

### 2.5.2. Polyphénols

Les polyphénols ou composés phénoliques sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux (LUGASI et *al.*, 2003).

Les fonctions principales attribuées à ces composés chez les végétaux sont la protection contre les pathogènes et les herbivores ainsi que la limitation des dommages dus aux radiations UV. Dans ce cas, ils agissent par effet d'écran et par effet antioxydant (LEBHAM, 2005).

### 2.5.3. Acides phénoliques

Les phénols ou les acides phénoliques sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être estérifiées, étherifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides (WICHTL et ANTON, 2009).

Les phénols possèdent des activités anti-inflammatoires, antiseptiques et analgésiques (médicament d'aspirine dérivée de l'acide salicylique) (ISERIN et *al.*, 2001).

### 2.5.4. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, ils peuvent être considérés parmi les agents responsables des couleurs de plante à côté des chlorophylles et des caroténoïdes (WICHTL et ANTON, 2009). Ils se sont révélés être des substances antimicrobiennes actives *in vitro* contre un large spectre de microorganismes. Cette activité serait due à leur capacité à former un complexe avec les protéines extracellulaires solubles et à la paroi bactérienne (COWAN, 1999). Ils sont aussi connus pour leur activité anti-oxydante (BRENETON, 1999).

#### 2.5.5. Tanins

Le terme tanin provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux. On distingue les tanins condensés ou non hydrolysables et ceux qui sont hydrolysables (HOPKINS, 2003).

Les plantes riches en tanins sont utilisées pour soigner l'eczéma et les brûlures. Elles facilitent ainsi le transit intestinal et ont donc un effet anti diarrhéique ; ils sont vasoconstricteurs et limitent la perte en fluides. Certains aussi sont des antioxydants (ISERIN et *al.*,2001) .

#### 2.5.6. Alcaloïdes

Ce sont des substances organiques azotées d'origine végétale, de caractère alcalin et de structure complexe, on les trouve dans plusieurs familles des plantes. Elles sont pour la plupart solubles dans l'eau et à l'alcool et ont un goût amer et certaines sont fortement toxiques (WICHTL et ANTON, 2009).

#### 2.5.7. Coumarines :

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les coumarines sont connues par leurs activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives. Elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées (GONZALEZ et ESTEVEZ-BRAUN, 1997).

#### 2.5.8. Quinones :

Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou orangeS et possédant deux fonctions cétones. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons et les bactéries. Les organismes animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K, qui est impliquée dans la coagulation du sang. Les quinones sont utilisées dans les colorants, dans les médicaments et dans les fongicides, ils possèdent un potentiel antimicrobien élevé (KANSOLE, 2009).

## CHAPITRE III

### MATERIEL ET METHODES

#### 3.1. Matériel végétal

Le matériel végétal ayant fait l'objet de notre étude est composé des rameaux de sommités de romarin : *Rosmarinus officinalis* L. spontané, récolté dans trois régions différentes : M'sila, Djelfa, et Blida durant les campagnes 2012/2013, 2013/2014, 2014/2015, 2015/2016 (figure 3.3).



Figure 3.3: Matériel végétal utilisé : *Rosmarinus officinalis* L

#### 3.1.1 Présentation des régions d'étude

Les régions arides, semi-arides et humides subissent d'une part les pressions dues à l'action de l'homme et d'autre part celle du climat. Ces milieux sont des écosystèmes complexes et très productifs, ils forment des réservoirs précieux de diversité biologique.

Afin d'étudier l'influence du facteur région sur les paramètres étudiés, nous avons choisi trois zones d'étude appartenant à différents étages bioclimatiques (figure 3.4).

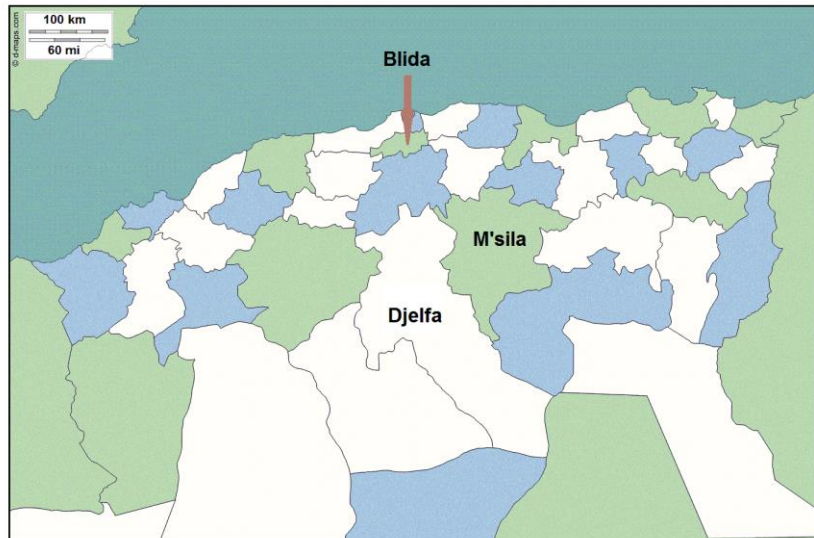


Figure 3.4 : Situation géographique des zones d'étude.

### 3.1.1.1. Région de M'sila

La wilaya agro-pastorale se situe entre le Tell et le Sahara. Elle a une superficie de 18175 km<sup>2</sup> et constitue avec Batna la grande plaine du Hodna (figure3.5).

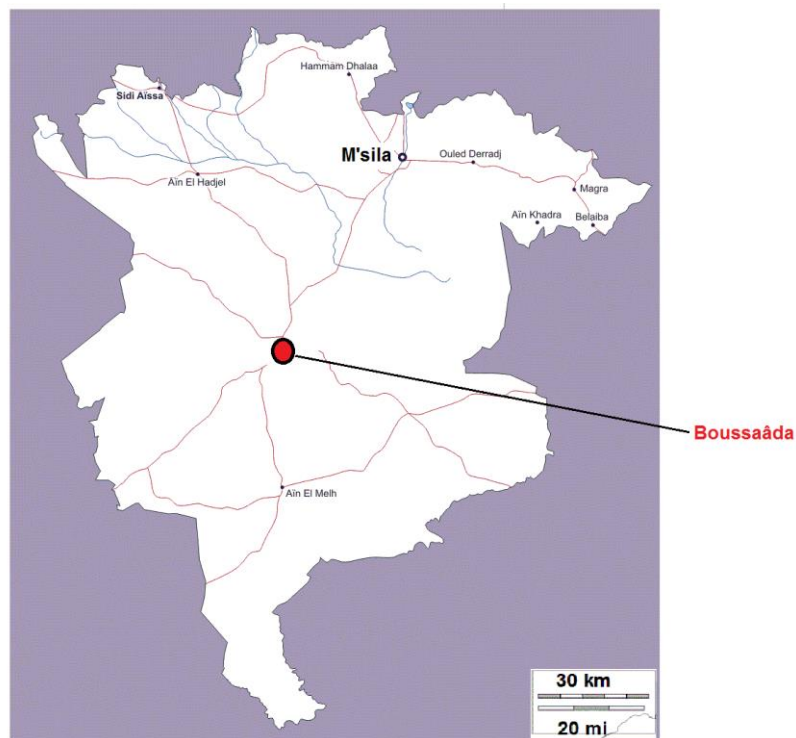


Figure 3.5 : Carte géographique de la région de M'sila



Sa morphologie et sa position géographique lui confèrent un aspect écologique unifié, représenté par la prédominance de la steppe qui couvre 1.200.000 ha (soit 63 % de la superficie totale) de la wilaya (SENNI, 2015).

### 3.1.1.2. Région de Djelfa

La wilaya de Djelfa fait partie de la région des hauts plateaux, elle se situe dans la partie centrale de l'Algérie, comprise entre 2° et 5° de longitude Est et entre 33 ° et 35° de latitude Nord (Figure 3.6).

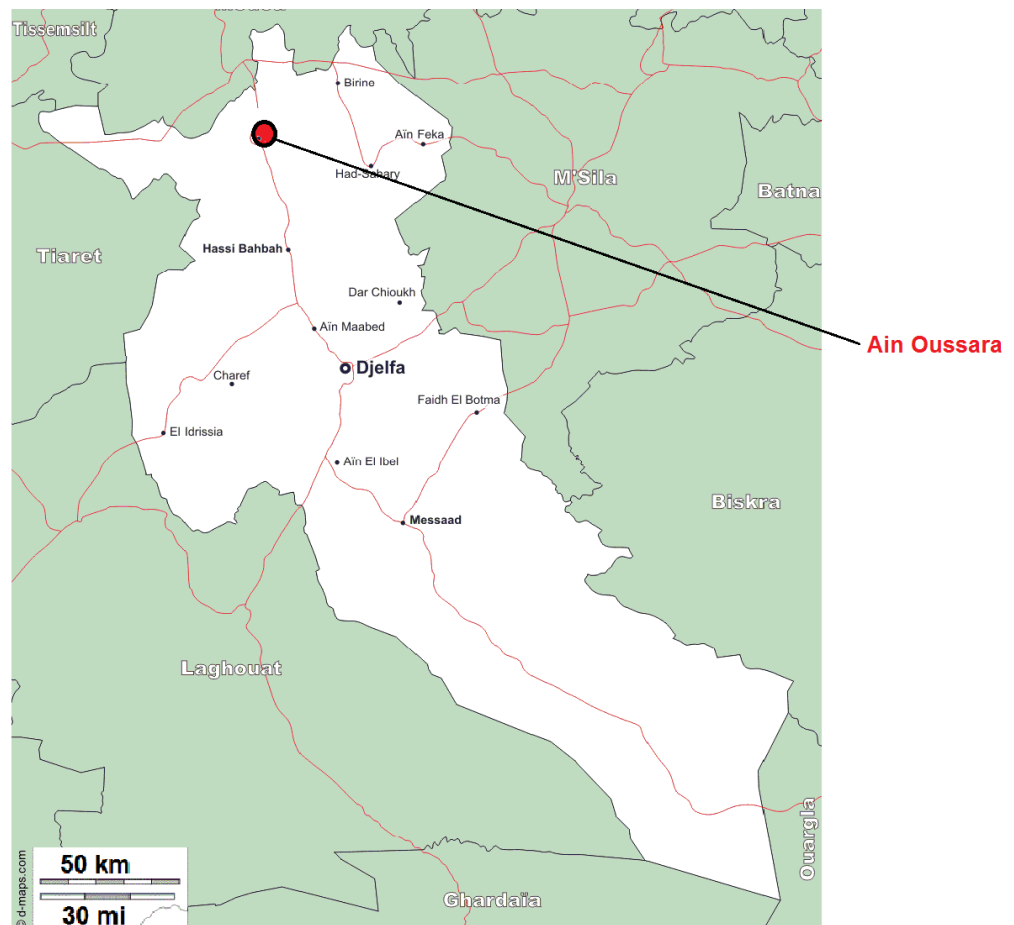


Figure 3.6 : Carte géographique de la région de Djelfa

Elle s'étend sur une superficie totale de 32.280,41 Km<sup>2</sup> elle est caractérisée par le point culminant qui se situe à l'Est de la wilaya avec une altitude de 1613 m et le point le plus bas, à l'extrême sud, avec une altitude de 150 m (SENNI, 2015).

### 3.1.1.3. Région de Blida

La wilaya de Blida se situe au nord de l'Algérie. Elle comporte principalement une importante plaine : la Mitidja, zone agricole riche ; et d'une chaîne de montagnes au Sud : l'Atlas Blidien, qui constitue une partie de centrale de l'atlas Tellien (figure 3.7)



Figure 3.7 : Carte géographique de la région de Blida

La pluviométrie est généralement plus importante dans l'Atlas que dans la plaine. Les précipitations atteignent leur apogée en décembre, janvier et février.

### 3.1.2. Climat et bioclimat des zones d'études

Le climat est un facteur essentiel de l'évolution des espèces, il intervient dans leur apparition et succession ainsi que dans la répartition des grandes formations végétales à travers le monde. L'analyse du contexte climatique est la première étape à toute étude écologique, c'est un facteur déterminant qui se place en amont de toute étude relative au fonctionnement des écosystèmes. Il joue un rôle prépondérant dans la distribution spatiale des espèces animales et végétales (DREUX, 1980).

Les zones d'étude jouissent d'un climat du type méditerranéen. Les synthèses climatiques les plus utilisées dans ce type de climat sont le diagramme ombrothermique de BAGNAULS et GAUSSEN (1957), et le climagramme d'EMBERGER (1955).

Selon BAGNOULS et GAUSSEN (1957), la sécheresse s'établit lorsque pour un mois donné les précipitations mensuelles exprimées en mm sont inférieures ou égales au double de la température moyenne mensuelle exprimée en degré Celsius (°C) :  $P \leq 2T$ .

Gausсен (1968), estime que si la période délimitée par les deux courbes est en été, le climat est de type méditerranéen.

### 3.1.2.1. Région de M'sila

L'examen du diagramme ombrothermique de la décennie 2005/2015 de la région de M'sila révèle l'existence d'une période sèche qui s'étale durant toute l'année (figure 3.8).

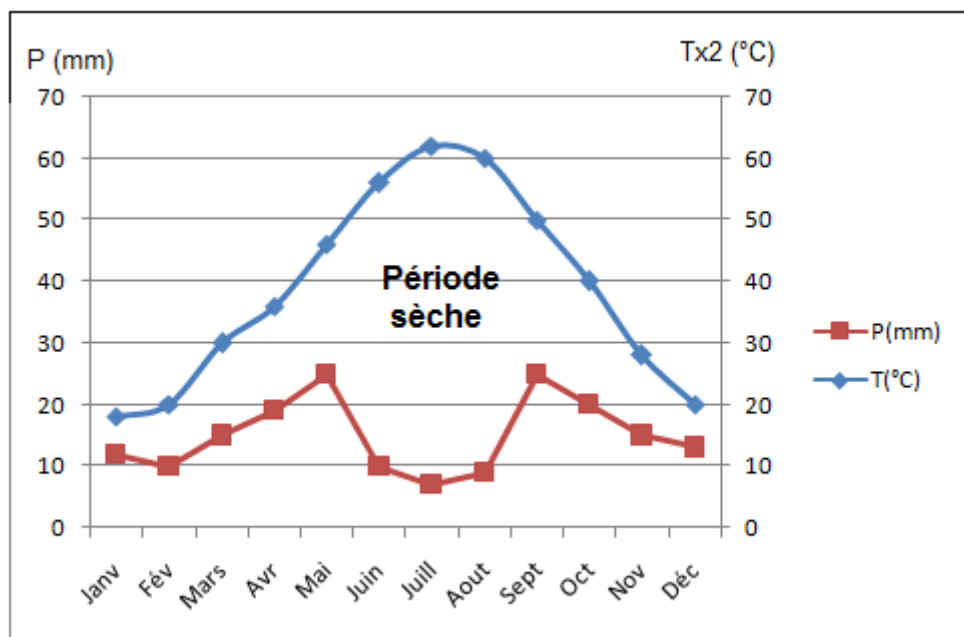


Figure 3.8 : Diagramme Ombrothermique (2005/2015) de M'sila

Dans la région de M'sila, les précipitations varient de 25 à 7 mm, entre le plus humide et le plus sec des mois. Entre la température la plus basse et la plus élevée de l'année, la différence est de 22°C. Juillet et Aout sont les mois les plus chauds de l'année. Le mois le plus froid de l'année est celui de Janvier avec une température moyenne de 9°C.

### 3.1.2.2. Région de Djelfa

L'analyse du diagramme ombrothermique de la décennie 2005/2015 de la région de Djelfa permet de visualiser une période sèche qui s'étend de la deuxième quinzaine de mois de Mai jusqu'à la première quinzaine du mois d'Octobre (figure 3.9).

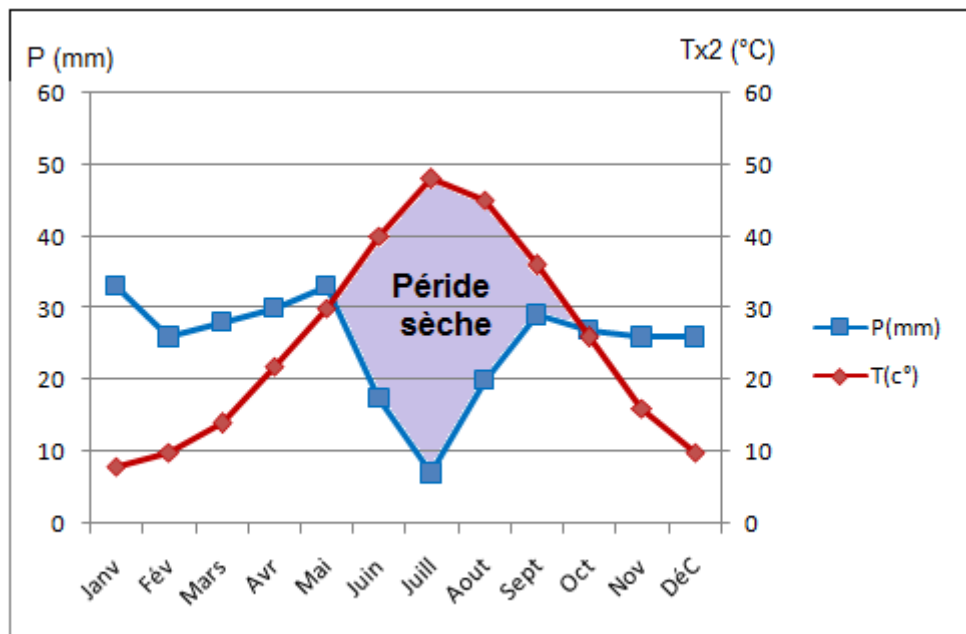


Figure 3.9 : Diagramme Ombrothermique (2005/2015) de Djelfa

Les précipitations varient de 33 à 7 mm, entre le plus humide et le plus sec des mois. Entre la température la plus basse et la plus élevée de l'année, la différence est de 20°C. Juillet et Aout sont les mois les plus chauds de l'année. Le mois le plus froid de l'année est celui de Janvier avec une température moyenne de 4°C.

### 3.1.2.3. Région de Blida

L'examen du diagramme ombrothermique de la décennie 2005/2015 de la région de Blida révèle l'existence de deux périodes (sèche et humide). La période sèche s'étale du mois de mai jusqu'à la 1<sup>ère</sup> quinzaine du mois de Septembre.(figure 3.10)

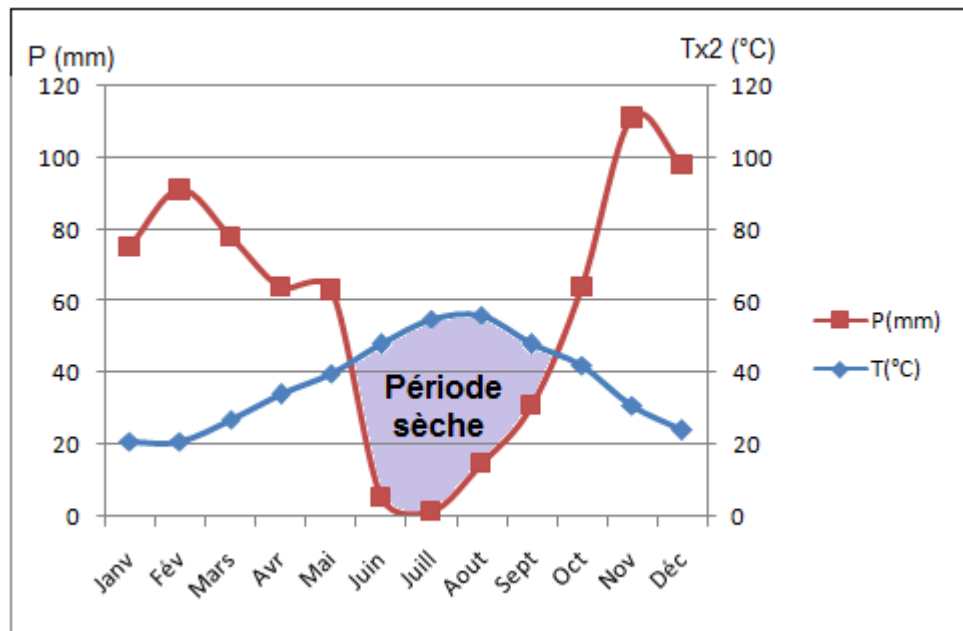


Figure 3.10 : Diagramme Ombrothermique (1985/2015) de Blida

Les précipitations varient de 111 à 1.5 mm, entre le plus humide et le plus sec des mois. Entre la température la plus basse et la plus élevée de l'année, la différence est de 17.5°C. Juillet et Aout sont les mois les plus chauds de l'année. Le mois le plus froid de l'année est celui de Janvier avec une température moyenne de 10°C.

### 3.1.2.4. Climagramme d'Emberger des trois régions

Emberger a élaboré un quotient climatique ( $Q_2$ ), celui-ci comporte les éléments du climat qui sont prépondérants pour la végétation (températures et précipitations).

$$Q_2 = 3.43 * \frac{P}{M - m}$$

- $Q_2$  : quotient pluviométrique
- P : pluviosité moyenne annuelle en mm
- M : moyenne des maximas
- m : moyenne des minimas

EMBERGER (1955), a considéré que le quotient était insuffisant pour faire ressortir l'action des températures, il a donc combiné le  $Q_2$  et la moyenne des températures minimales du mois le plus froid (m) sur un climagramme.

Le tableau 3.2 résume les résultats des trois régions et les paramètres permettant de déterminer l'étage bioclimatique des zones d'étude.

Tableau 3.2: Etages bioclimatiques des régions d'étude.

Régions	M (°C)	m (°C)	P(mm)	$Q_2$	Bioclimat
Msila	39.35	3.76	175.4	16.90	Aride tempéré
Djelfa	32.91	0.62	333.99	35.47	Semi-aride frais
Blida	34.65	4.64	704,08	80.47	Subhumide tempéré

Le Climagramme d'Emberger a permis de déterminer l'étage bioclimatique des 3 régions d'étude (M'sila, Djelfa et Blida) (figure 3.11).

Le climagramme précise que :

- La région de M'sila appartient à l'étage aride à hiver tempéré. Il est caractérisé par la sécheresse, d'où on enregistre un nombre de mois secs important dû à une faible pluviosité. Ce climat se caractérise par une action forte de vent et une forte évaporation.

- La région de Djelfa appartient à l'étage semi-aride à hiver frais. C'est un étage typique de l'Afrique du Nord, caractérisé par une légère augmentation de précipitation et une diminution de température qui induit une diminution d'évaporation.

- La région de Blida appartient à l'étage bioclimatique subhumide à hiver tempéré appelé aussi climat méditerranéen moyen. Il est généralement localisé au nord du pays et se caractérise d'une pluviosité plus ou moins élevée.

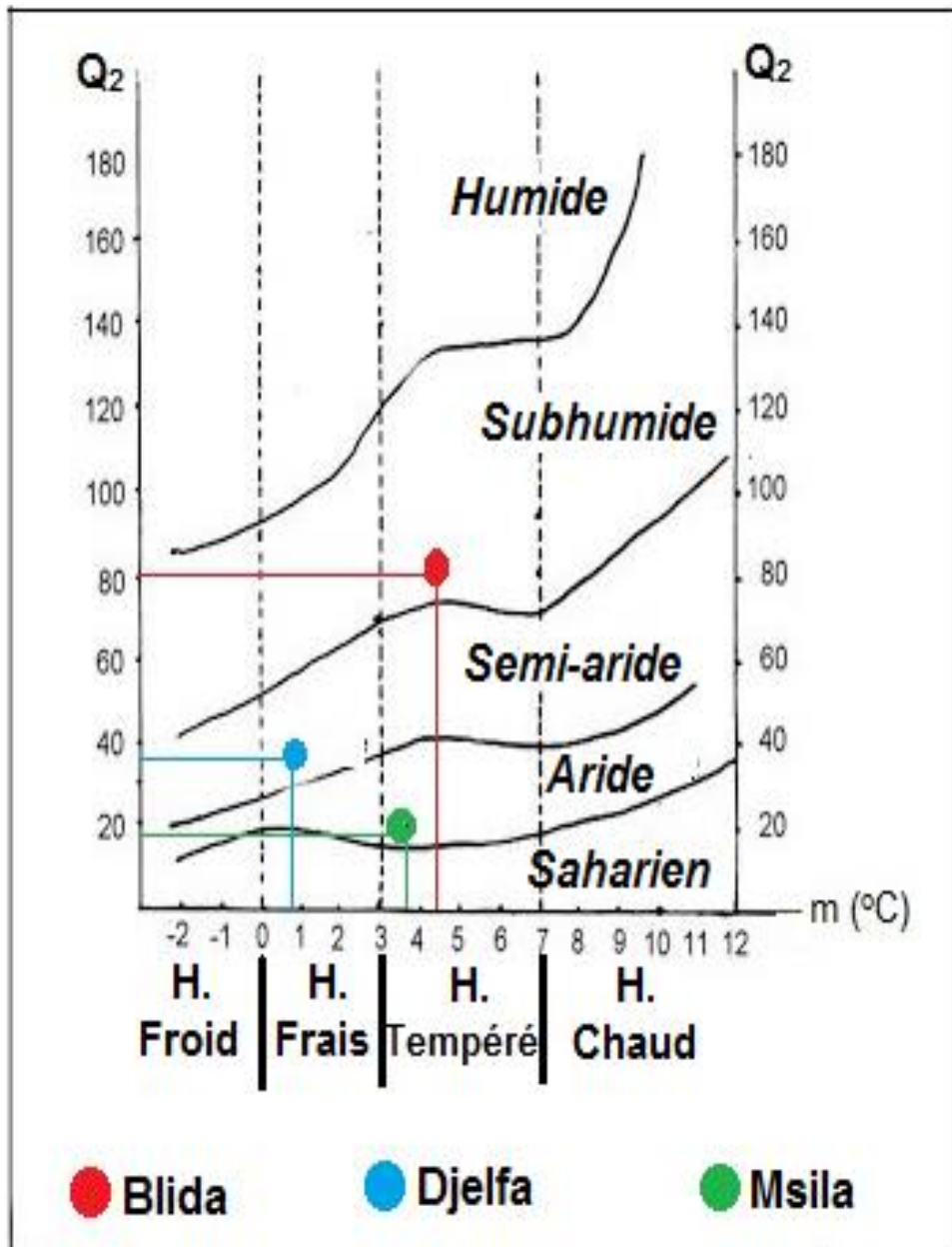


Figure 3.11 : Etages bioclimatiques des régions d'étude (Climagramme d'Emberger).

### 3.1.2. Echantillonnage

La méthode d'échantillonnage adoptée dans notre travail est un échantillonnage aléatoire. Il consiste à récolter le matériel végétal sur des individus prélevés au hasard. Les arbustes retenus pour la récolte doivent être homogènes et présentant un bon état végétatif et se situent en dehors des bordures de routes.

La plante a été identifiée au niveau du laboratoire de botanique du département de biotechnologie de l'Université de Blida1 en comparaison avec celle décrite par Quezel et Santa (1962).

Pour garantir l'intégrité des échantillons, il faut :

- éviter de cueillir les échantillons par temps humide,
- garder les échantillons dans un endroit sec et frais,
- éviter toute source de contamination et veiller à ce que les échantillons soient séchés,
- les échantillons ne doivent jamais être séchés au four, car les températures élevées peuvent influencer sur les résultats de l'analyse.

### 3.1.3. Préparation du matériel végétal

Une partie de la matière végétale cueillie, a été utilisée pour l'analyse à l'état frais (dosage des paramètres physiologiques et biochimiques). Une autre partie a été séchée à l'air libre, à l'ombre jusqu'à la dessiccation complète (7 jours) (AYADI et *al.*, 2011). Nous avons séparé les feuilles des rameaux et nous les avons conservé dans des sacs en papier kraft afin de les utiliser pour l'extraction de l'huile essentielle et pour la préparation de l'extrait méthanolique (figure 3.12).





Figure 3.12 : Lot de feuilles séchées de *R. Officinalis*.

### 3.2. Étude de l'effet de la région

Nous avons étudié l'influence du facteur région sur les différents paramètres retenus. Le matériel végétal du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) provient de trois régions appartenant à des climats différents humide, semi-aride et aride qui sont :

- Blida (localité Sidi El Kebir)
- Djelfa (localité Ain Ossara)
- M'sila (localité Boussaâda)

Le travail porte sur l'étude des différents paramètres physiologiques et biochimiques du *R. officinalis* L. et l'évaluation de l'activité antimicrobienne de son huile essentielle et extrait méthanolique.

#### 3.2.1. Extraction de l'huile essentielle de *R. officinalis* L.

Nous avons opté pour l'extraction des huiles essentielles la technique de l'hydro-distillation, c'est la méthode la plus utilisée car elle est simple d'application et l'eau utilisée comme solvant capte les produits les plus subtiles et les plus fragiles élaborés par le végétal. Ce procédé n'altère pas la qualité et la composition chimique de l'HE, il est intéressant car les températures et la pression pendant la manipulation sont maîtrisées (PONCE et *al.*, 2003).

### 3.2.1.1. 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, un ballon en verre pyrex où l'on place le mélange des feuilles séchées et l'eau distillée, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement du ballon et un collecteur en verre pyrex qui reçoit les extraits de la distillation (figure 3.13).



Figure 3.13 : Appareillage utilisé : type Clevenger.

### 3.2.1.2. Principe

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 3 heures. Les vapeurs hétérogènes formées dans le serpentin sont condensées sur une surface froide qui est celle du réfrigérant, ainsi la séparation eau- essence s'effectue par une simple différence de densité.

L'huile récupérée est déshydratée par le sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) et elle est conservée à  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 3.2.2. Préparation de l'extrait méthanolique

Les feuilles sèches de romarin ont été broyées et conservées dans des flacons en verre, hermétiquement fermés, à basse température.

Une prise de 10g de la poudre végétale a été mise à macérer dans 100 ml de méthanol sous agitation pendant 24 heures à une température  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

L'extrait obtenu a été filtré et évaporé à sec sous pression réduite à  $50 \pm 5^\circ\text{C}$  au rotavapor. Le résidu sec est repris par 3 ml du méthanol et conservé à une température de  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  jusqu'à son utilisation (FALLEH et *al.*, 2008).

### 3.2.3. Etude des paramètres physiologiques et biochimiques

Le matériel végétal (romarin) ayant fait l'objet de cette étude est récolté durant le printemps de la campagne 2013/2014.

L'activité physiologique et biochimique d'une plante soumise à un stress (salin ou hydrique) se caractérise par une diminution de l'activité photosynthétique et une accumulation des sucres et de la proline (osmorégulateurs), pour cela nous avons réalisé certains dosages.

#### 3.2.3.1. Dosage de la chlorophylle

Le dosage de la chlorophylle est réalisé selon la méthode de FRANCIS (1970), qui consiste en une macération de 100 mg de feuilles dans 10 ml d'un mélange de l'acétone à 80% et de l'éthanol à 40% (75% et 25% de volume). Les feuilles sont fragmentées et mises dans des tubes à essai fermés et couverts par du papier aluminium (pour éviter l'oxydation de la chlorophylle par la lumière). Les tubes sont mis au repos pendant 48 heures.

On procède ensuite à la lecture des densités optiques des solutions à l'aide d'un spectrophotomètre, à deux longueurs d'ondes : 645 nm pour la chlorophylle(a) et 663 nm pour la chlorophylle (b).

La détermination des teneurs en chlorophylles se réalise selon les formules suivantes :

$$\text{Chl(a)}(\text{mg/g MF}) = 12,6 \times \text{Do } 663 - 2,59 \times \text{Do } 645 \times V / (1000 \times W)$$

$$\text{Chl(b)}(\text{mg/gMF}) = 22,9 \times \text{Do } 645 - 4,68 \times \text{Do } 663 \times V / (1000 \times W)$$

V: Volume de la solution extraite

W : Poids de la matière fraîche de l'échantillon.

### 3.2.3.2. Dosage des sucres solubles

Nous avons procédé au dosage des sucres solubles dans les feuilles du romarin selon la méthode de DUBOIS et *al.*, (1956).

Elle consiste à prendre 100 mg de matière végétale fraîche dans des tubes à essai auxquels on ajoute 2 ml d'éthanol à 80 %, et on laisse les tubes fermés au repos pendant 48 heures. Faire évaporer l'alcool en mettant les tubes à essai dans un bain-Marie à 70°C. Après refroidissement, on ajoute 20 ml d'eau distillée dans chaque tube à essai. Prendre 1ml de la solution et ajouter 1 ml de phénol à 5% et bien agiter. Ajouter 5 ml d'acide sulfurique concentré dans chaque tube à essai puis les passer au vortex. Laisser au repos pendant 10 minutes puis les passer au bain Marie pendant 15 minutes à  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Procéder à la lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 490nm,

La détermination de la teneur des sucres solubles est réalisée selon la formule :

$$\text{Sucres solubles}(\mu\text{g/gMF}) = \text{Do } 490 \times 1,657$$

### 3.2.3.3. Dosage de la proline

La proline est dosée selon la technique utilisée par TROLL et LINDSELEY simplifiée et mise au point par DREISER et GORING, et modifiée par MONNEVEUX et *al.*, (1986). Le principe est la quantification de la réaction proline ninhydrine par mesure en spectrophotomètre, la proline se couple avec la ninhydrine en formant un complexe coloré, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de proline dans l'échantillon.

La méthode consiste à mettre 100 mg de matière végétale fraîche dans des tubes à essai et on ajoute 2 ml de méthanol à 40%. Les tubes couverts (pour éviter la volatilisation de l'alcool) sont portés à l'ébullition au bain Marie à  $85 \pm 5^\circ\text{C}$  pendant 60 minutes. Après refroidissement, 1ml de la solution est prélevé de

chaque tube et mis dans de nouveaux tubes auxquels nous ajoutons : 1ml d'acide acétique, 25 mg de ninhydrine et 1ml d'un mélange contenant :

- 120ml d'eau distillée
- 300ml d'acide acétique
- 80 ml d'acide ortho phosphorique

On porte les tubes à essai à ébullition dans bain Marie pendant 30 minutes. Après refroidissement des solutions on ajoute 5ml de toluène dans chaque tube, après agitation au vortex .Deux phases se séparent après refroidissement et après déshydratation de la phase supérieure par l'ajout de 5 mg de sulfate de sodium. Après 48 heures, la densité optique (DO) est mesurée à 528 nm en utilisant le spectrophotomètre. La détermination de la teneur en proline est réalisée selon la formule :

$$\text{Proline}(\mu\text{g/g MF}) = \text{Do } 528 \times 0,62$$

#### 3.2.4. Détermination du rendement en huiles essentielles

Le matériel végétal (*R. officinalis* L.) ayant fait l'objet de cette partie est récolté durant le printemps de la campagne 2014/2015.

Selon les normes d'AFNOR (2000), le rendement en HE ( $R_{HE}$ ) est défini comme le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction ( $M_H$ ) et la masse de la matière végétale utilisée ( $M_{mv}$ ). Le rendement est exprimé en pourcentage et donné par l'expression suivante :

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

$M_{HE}$  : Masse d'HE en gramme.

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

$R_{HE}$  : Rendement en HE

#### 3.2.5. Caractéristiques de l'huile essentielle de *R. officinalis*

L'étude des caractéristiques de l'HE du romarin a porté sur les caractéristiques organoleptiques et les caractéristiques physicochimiques.

### 3.2.5.1. Caractéristiques organoleptiques

L'évaluation des caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles consiste à préciser l'aspect, l'odeur, la couleur et la saveur du produit.

### 3.2.5.2. Caractéristiques physico-chimiques

#### 3.2.5.2.1. Calcul de la densité

La densité d'une huile essentielle est définie comme étant le rapport de la masse de l'huile essentielle sur le volume:

$$d = M_{HE} / V_{HE}$$

d : densité

M<sub>HE</sub> : Masse de l'Huile Essentielle (g)

V<sub>HE</sub> : Volume de l'Huile Essentielle (ml)

#### 3.2.5.2.2. Détermination de l'indice de réfraction (I<sub>R</sub>)

L'indice de réfraction (I<sub>R</sub>) d'une substance est le rapport de la vitesse de la lumière (à une longueur d'onde définie) dans le vide à sa vitesse dans la substance. La mesure de l'indice de réfraction d'une huile, se fait à l'aide du réfractomètre à une température constante (AUDIGIE et *al.*, 1983)(Annexe A).

#### 3.2.5.2.3. Détermination de l'indice d'acide

L'indice d'acide (I<sub>A</sub>) d'un corps gras est la masse d'hydroxyde de potassium exprimée en milligramme nécessaire pour neutraliser l'acidité libre (acides gras libres), contenue dans un gramme de corps gras (COUTOULY et *al.*, 2006) (Annexe A), il est donné par la formule suivante:

$$I_A = 5.61 v/m$$

v : Volume (ml) de solution d'hydroxyde de potassium utilisé.

m : Masse en gramme de la prise d'essai

#### 3.2.5.2.4. Détermination de l'indice d'ester

L'indice d'ester d'un corps gras est la quantité de potasse exprimée en milligramme nécessaire pour saponifier des acides gras combinés présents dans 1g de corps gras (GAVRILOVIC et *al.*, 1996) (Annexe A).

L'indice d'ester est calculé par la formule suivante:

$$I_E = [5.61 (V_0 - V) / m] - I_A$$

$V_0$  : Volume (ml) de la solution d'acide chlorhydrique dans le test blanc.  
 $V$  : Volume (ml) de la solution d'acide chlorhydrique utilisée.  
 $m$  : Masse en gramme de la prise d'essai.  
 $I_A$  : Indice d'acide.

### 3.2.6. Identification chimique de l'huile essentielle

Actuellement, la chromatographie en phase gazeuse couplée au spectrophotomètre de masse (CG-SM) se présente comme la technique de base dans le domaine d'analyse et d'étude de la composition chimique complexe des huiles essentielles.

L'analyse de l'huile essentielle du romarin a été réalisée à l'Institut National de Gendarmerie de criminologie (INGC) de Bouchaoui (Alger). Elle a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse couplé au détecteur à un spectrophotomètre de masse de type : Trace GC Ultra DSQII (Annexe B).

### 3.2.7. Etude de l'activité antimicrobienne du romarin

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de *Rosmarinus officinalis* L. récolté durant la campagne 2014/2015, cinq souches bactériennes ont été utilisées. Les souches testées sont largement rencontrées dans diverses pathologies chez l'homme (Tableau 3.3).

Ces souches bactériennes ont été fournies par le laboratoire de microbiologie et mycologie de l'EPH de Hadjout, après avoir été purifiées et identifiées.

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique de romarin, nous avons utilisé la méthode d'aromatogramme, c'est une méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé. Elle est communément appelée aromatoigramme. Le principe de la méthode est inspiré à partir du titrage des antibiotiques (BENDJELALI et al., 1986) (figure 3.14).

Tableau 3.3 : Généralités sur les souches bactériennes utilisées.

Souches bactériennes testées	Caractères bactériologiques	Habitats	Pouvoir pathogène
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram (+)	- Les fosses nasales - La gorge - Le tube digestif	- Infection hospitalière. - Responsable des abcès, des plaies, des septicémies, de pneumonie et de l'intoxication alimentaire
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram (+)	-Le tube digestif	- Infection mortelle chez l'homme. - Inflammations chroniques de l'intestin. - Infection de la vessie et de la prostate.
<i>Bacillus cereus</i>	Gram (+)	-Les sols et eaux	- Un contaminant des aliments d'origine végétale (riz, épices) - Un contaminant des drogues et de médicaments. -Toxi-infection alimentaire
<i>Escherichia coli</i>	Gram (-)	- Le tube digestif	- Infections urinaires - Septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastro-entérites. - Douleurs abdominales et des diarrhées sanglantes.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram (-)	- Eau et sols humides - Surface des végétaux.	- Infections nosocomiales (personnes fragilisées ou immunodéprimées) - Infections urinaires, oculaires et pulmonaires.

[DELLARAS (2007), JOLI et REYNAUD (2002), HART et SHEARS (1997)]



### 3.2.7.1. Principe de l'aromatogramme

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme ciblé. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition, la souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (figure 3.14)..

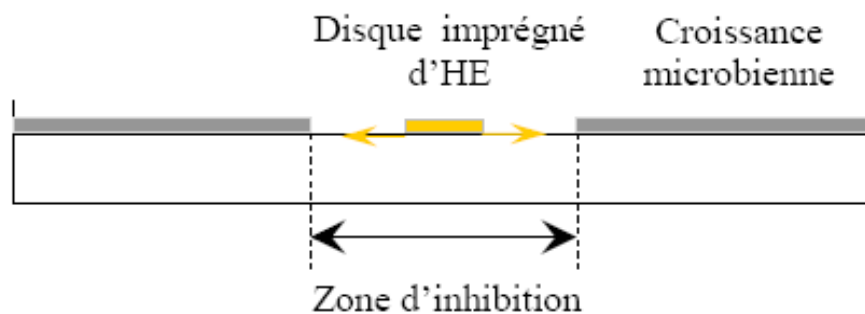


Figure 3.14 : Principe de la méthode de l'aromatogramme

### 3.2.7.2. Préparation des suspensions microbiennes (l'inoculum)

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

### 3.2.7.3. Préparation de milieu de culture

Le milieu de culture utilisé, Mueller Hinton (M.H), est stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes à  $121 \pm 5^\circ\text{C}$ . Les milieux de culture sont coulés aseptiquement dans les boîtes de Pétri à 4 mm de hauteur et on laisse refroidir et solidifier (HARRAR, 2012) (Annexe B).

### 3.2.7.4. Ensemencement

Il 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.

#### 3.2.7.5. Préparation des disques

Pour mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de l'HE du 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  $120 \pm 5^\circ\text{C}$ . Ils sont ensuite disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen. À l'aide d'une micropipette on imbibe chaque disque par 20  $\mu\text{l}$  (Annexe B).

#### 3.4.7.6. Incubation et lecture

Les boîtes de Pétri sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20 minutes, ensuite mises dans une étuve à 37 °C pendant 24 heures.

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 en mm.

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des huiles essentielles (PONCE et *al.*, 2003) (tableau 3.4).

Tableau 3.4 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition.

Sensibilité	Zone d'inhibition
Non sensible ou résistante (-)	diamètre < 8mm
Sensible (+)	diamètre compris entre 9 à 14 mm
Très sensible (++)	diamètre compris entre 15 à 19 mm
Extrêmement sensible (+++)	diamètre > 20 mm

(PONCE et *al.*, 2003)

Le diamètre des zones d'inhibition (ZI), nous permet d'estimer la résistance ou la sensibilité des différentes souches bactériennes testées.

### 3.3. Étude de l'effet de la saison sur l'écotype de Blida

Ayant enregistré un rendement élevé en huiles essentielles dans la localité de Sidi El Kebir ( Blida) comparé aux deux autres régions (M'sila et Djelfa), nous avons jugé utile de suivre l'évolution de cette HE durant toute les campagnes 2014/2015 et 2015/2016.

Cette étude nous permettra de suivre la répartition, la quantité et d'analyser la qualité de cette HE durant les trois saisons (automne, hiver et printemps) complétée par une étude d'une activité antioxydante et biocide.

#### 3.3.1. Etude de l'activité anti-oxydante du romarin (HE et EM)

Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible (HALLIWELL et GUTTERIDGE, 2007).

Il existe une grande diversité de méthodes physico-chimiques pour évaluer l'activité anti-oxydante des extraits naturels.

##### 3.3.1.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité anti-oxydante des extraits de *R. Officinalis* a été évaluée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH), au sein de laboratoire du groupe Saidal. L'activité anti-oxydante des différents extraits est mesurée par la méthode décrite par BRAND-WILLIAM et *al.*, (1995). Pour chaque extrait, un volume de 2ml de la solution de DPPH (0.2mM) est mélangé avec 1 ml d'extrait ou des antioxydants standards (acide ascorbique). Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm.

- Principe du test de piégeage

Le composé chimique 2,2- diphényl -1-picrylhydrazyle (DPPH) possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Suite à cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et restent dans leur forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue violette bien caractéristique de la solution de DPPH. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par

spectrophotométrie à 515-518 nm (POPOVICI et *al.*, 2009). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphényl- 1- picryl hydrazyle ) de couleur violette se réduit en 2,2 diphényl -1- picryl hydrazine de couleur jaune (MAATAOUI et *al.*, 2006) (figure 3.15).

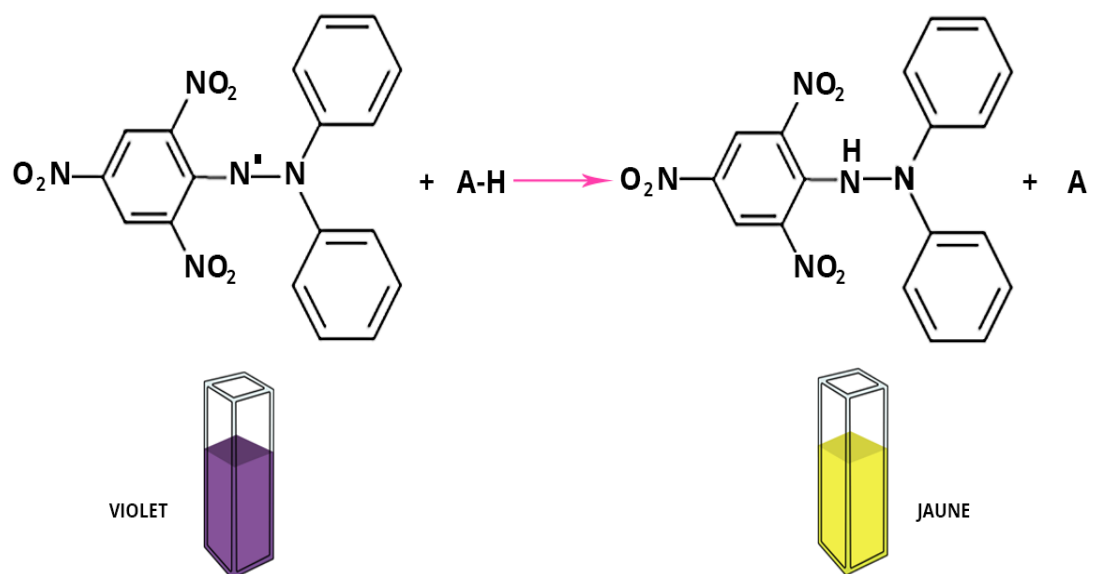


Figure 3.15: Réaction d'un donneur d'hydrogène avec le radical DPPH (MAATAOUI et *al.*, 2006).

- Principe

Afin de mettre en évidence l'activité anti-oxydante des extraits testés (HE / EM) nous avons opté pour le mode opératoire suivant :

- Préparation de la solution DPPH

Nous avons pris 4 mg de DPPH (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>), dans 100 ml de méthanol (MeOH) absolu pour avoir la concentration de 0.04 mg/ml. La solution obtenue a été mise à l'obscurité dans un agitateur pendant 20 minutes.

- Préparation des solutions mères

Nous avons préparé pour chaque extrait de romarin une solution de 5 mg/ml, à partir de 20 mg d'extrait, de 4 ml de MeOH absolu et une autre solution de concentration de 4 mg/ml, à partir de 20 mg d'extrait et 5ml de MeOH.

- Préparation des dilutions des extraits

L'expérience a été effectuée sur 8 concentrations différentes d'échantillon de l'ordre décroissant, dilués dans le méthanol (Tableau 3.5), (figure 3.16) .

Tableau 3.5 : Différentes dilutions d'extraits testés du romarin (écotype de Blida).

Concentration initiale du romarin (HE et EM)	Volume de MeOH (ml)	Concentration finale mg/ml
5mg d'extrait	1	5
4mg d'extrait	1	4
1ml de la solution 4mg/ml	1	2
1ml de la solution 5 mg/ml	4	1
1ml de la solution 5 mg/ml	9	0.5
1ml de la solution 0,5 mg/ml	1	0.25
1ml de la solution 1mg/ml	9	0.1
1ml de la solution 0,25 mg/ml	1	0.125

Mettre 1ml de chaque dilution de ces extraits dans un tube à essai, ajouter 2ml de solution méthanolique de DPPH, puis laisser incuber 30 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante. Une lecture de l'absorbance à 517 nm en comparaison avec un témoin (blanc) qui contient du méthanol pur (Annexe B).

Répéter les mêmes opérations, en remplaçant l'extrait de *R. officinalis* par l'acide ascorbique (vitamine C) (contrôle positif).

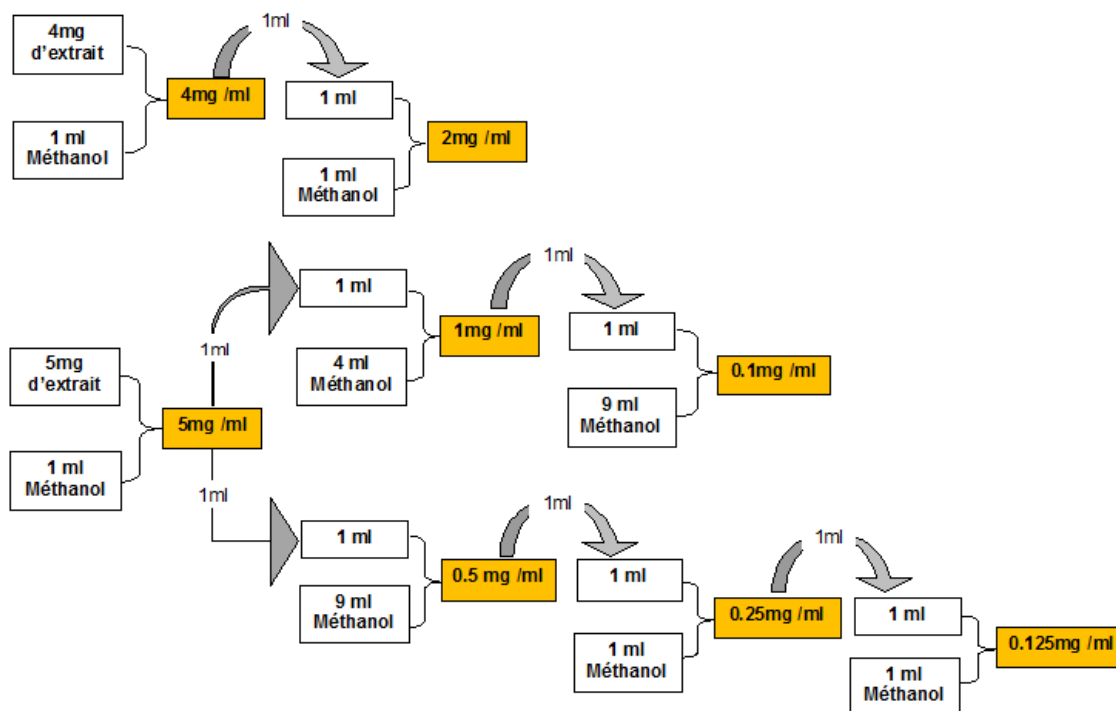


Figure 3.16 : Préparation des dilutions des extraits testés du romarin (HE et EM).

### 3.3.1.2. Expression des résultats

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

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Abs_C - Abs_E) / Abs_C] \times 100$$

$Abs_C$  : Absorbance du contrôle

$Abs_E$  : Absorbance de l'échantillon testé

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur  $IC_{50}$  qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50 % de l'activité du DPPH (SMARTH et al., 2008)

Les résultats peuvent aussi être exprimés en puissance anti-radicalaire (ARP) (BRAND-WILLIAM et al., 1995).

$$ARP = 1 / IC_{50}$$

ARP : Puissance anti radicalaire

$IC_{50}$  : Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50 % la concentration initiale du radical DPPH.

### 3.3.2. Etude de l'activité bactéricide

Pour évaluer le pouvoir bactéricide de *R. officinalis* L., une souche bactérienne a été utilisée, *Erwinia amylovora* (tableau 3.6). Pour cela nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé (aromatogramme) (Annexe B).

La préparation du bio-pesticide à été réalisée après l'extraction de l'huile essentielle de *R. officinalis* L.

#### 3.3.2.1. Milieu de culture utilisé

Le milieu de culture utilisé lors de notre travail est le milieu Levane semi sélectif d'*Erwinia amylovora* (KING et al., 1954) (Annexe A).

#### 3.3.2.2. Ensemencement et repiquage

On a pris 100 µl de la suspension d'*E.amylovora* puis on étale par le rateau sur une boîte de Pétri stérile contenant le milieu Levane (figure3.17)

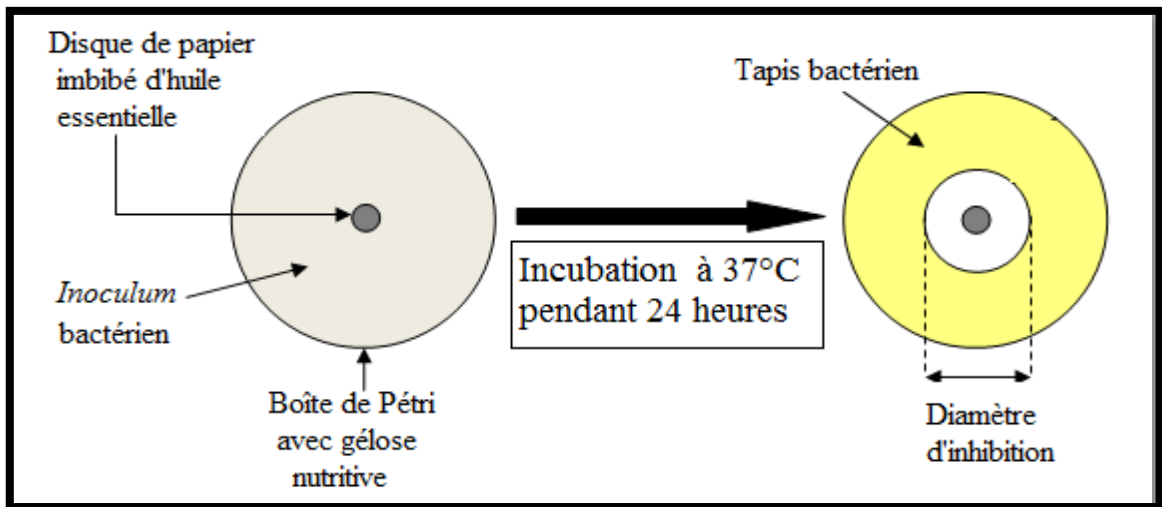


Figure 3.17 : Principe de la méthode de diffusion sur disque.

Tableau 3.6 : Présentation du parasite : *Erwinia amylovora*.

Nom commun	Nom scientifique	Systematique	Statut	Plantes hôtes	Symptômes et dégâts
Feu bactérien	<i>Erwinia amylovora</i>	Bactérie gram (-)	Organisme réglementé de quarantaine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plus de 140 espèces végétales appartenant à 39 genres de la famille des rosacées.</li> <li>Le poirier, le pommier et le cognassier sont les plantes hôtes les plus sensibles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dépérissement et mort des inflorescences</li> <li>Flétrissement et mort des pousses et rameaux</li> <li>Brûlure des feuilles, du tronc et des fruits.</li> <li>Exsudats bactérien sur pédoncules, feuilles, fleurs et fruits.</li> </ul>



### 3.3.2.3. Dilution de l'huile essentielle

L'huile essentielle de *R. Officinalis* L., n'est pas miscible à l'eau, elle flotte au-dessus du bouillon de culture et le contact avec les bactéries n'est pas bon. Pour remédier à cela, nous avons utilisé un émulsifiant : le Tween (80) à 30% [BEN HAMIDA et *al.*, (2001) ; AYADI et *al.*, (2005)]. A partir de la solution initiale (HE pure) nous avons préparé nos dilutions C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub>. (Tableau 3.7).

Tableau 3.7 : Différentes dilutions de l'HE du romarin

	C <sub>0</sub> Témoin	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
HE (%)	0	100	75	50	25
Tween (80) à 30 %	100	0	25	50	75

### 3.3.2.4. Dépôt de disques

Les disques stériles de 6 mm de diamètre sont imprégnés d'huile essentielle puis déposés à l'aide d'une pince stérile à raison de 3 disques par boîte de Pétri. Le témoin correspond aux disques imprégnés par le Tween 80 à 30%.

Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées avec de la parafilm et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 minutes ensuite mises à l'étuve à température de 27 à 28 ± 2°C pendant 24 à 48 heures.

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque (PONCE, 2003).

### 3.3.3. Etude de l'activité insecticide

Afin d'évaluer le pouvoir insecticide nous avons testé l'HE extraite de la plante *R. officinalis* L. sur un insecte, *Tuta absoluta* (la mineuse de la tomate) (figure 3.18)

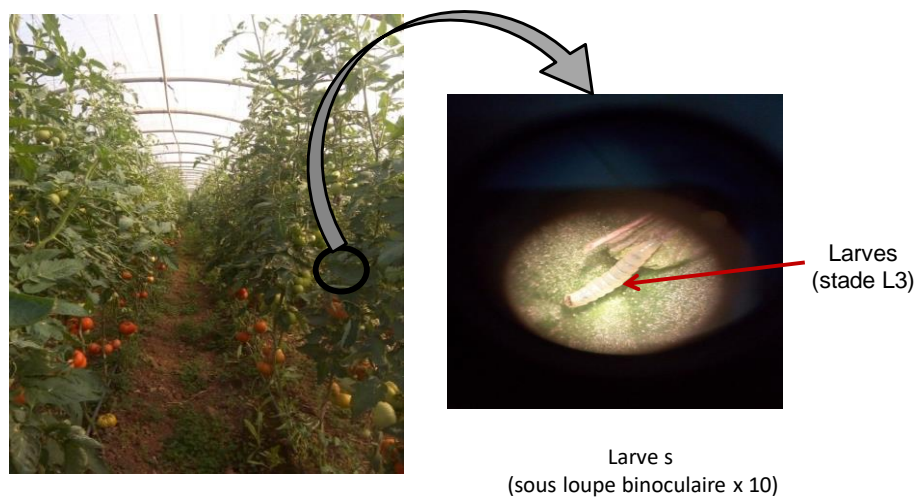


Figure 3.18 : Culture de tomate sous serre attaquée par *Tuta absoluta*.

La larve est le stade nuisible de l'insecte. Les premières attaques s'observent sur les parties apicales de la plante où nous pouvons enregistré jusqu'à 4 stades larvaires. Cette larve s'attaque également aux jeunes plants repiqués et même aux semis en pépinière (tableau 3.8).

#### 3.3.3.2. Prélèvements des échantillons

Les feuilles infectées de la tomate ont été récoltées et mises dans des sacs en plastiques après les avoir séparé par du papier absorbant. Les larves âgées du troisième et quatrième stade (L3 et L4) ont été séparées des feuilles et mises dans des boites à Pétri stériles, chaque boite contient 10 larves.

L'application du traitement se fait au laboratoire in vitro juste après le prélèvement.

Tableau 3.8 : Présentation du ravageur : *Tuta absoluta*

Nom commun	Nom scientifique	Origine	Plantes hôtes	Symptômes et dégâts
La mineuse de la tomate	<i>Tuta absoluta</i>	Amérique du sud, première déclaration en 1964 en Argentine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La tomate,</li> <li>• La pomme de terre,</li> <li>• L'aubergine,</li> <li>• Les piments,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La larve est le stade nuisible de l'insecte.</li> <li>• Les premières attaques s'observent sur les parties apicales de la plante.</li> <li>• Il s'attaque aux jeunes plants repiqués et même aux semis en pépinière.</li> <li>• Attaques : galeries blanchâtres renfermant chacune une chenille.</li> <li>• Les chenilles s'attaquent aux fruits verts comme aux fruits mûrs.</li> <li>• Les fruits sont alors invendables et impropres à la consommation.</li> <li>• Perte pouvant aller jusqu'à 80-100%</li> </ul>

### 3.3.3.3. Préparation et application du bio-pesticide à base de l'HE de romarin

La préparation des différentes doses du bio-pesticide à été réalisée après l'extraction de l'huile essentielle de *R. officinalis* L., provenant de la localité Sidi El Kebir (Blida) et mélangé au Tween (80) à 30%. Les dilutions ont été préparées aléatoirement comme suit : C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> et C<sub>6</sub> (tableau 3.9).

Tableau 3.9 : Différentes dilutions de l'HE du romarin

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
	Témoin						
HE (%)	0	100	75	50	25	10	1
Tween (80) à 30 %	100	0	25	50	75	90	99

Les traitements ont été appliqués par une micropipette 50 µl en contact direct avec les larves.

### 3.3.3.4. Taux de mortalité de la mineuse

Le taux de mortalité des larves a été calculé selon la formule d'Abbott qui consiste à calculer le pourcentage de larves immobiles (mortes) en fonction du nombre total de larves (ABBOTT, 1925).

$$\% \text{ de mortalité} = (\text{nombre de larves immobiles} / \text{nombre total de larves}) \times 100.$$

### 3.4. Expression des résultats et analyses statistiques des données

Les données relatives à chaque essai ont fait l'objet de l'analyse de variance à un seul facteur de classification (ANOVA) et l'analyse de variance multivariée (MANOVA) à l'aide d'un logiciel SPSS© (version 20), puis un classement des moyennes a été effectué à l'aide de test de Tukey à ( $\alpha=0,05$ ).

La corrélation de Pearson a été étudiée entre les extraits testés du romarin et les différents paramètres étudiés.

## CHAPITRE IV

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 4.1. Effet du facteur région sur les paramètres étudiés

Cette partie de résultats consiste à mettre en lumière l'effet du facteur région sur les paramètres physiologiques et biochimiques, la composition chimique et l'activité antimicrobienne du romarin.

##### 4.1.1. Effet du facteur région sur les paramètres physiologiques et biochimiques

Les résultats obtenus montrent que la teneur en chlorophylles, en proline et en sucres solubles varie selon les régions.

##### 4.1.1.1. Effet du facteur région sur la teneur en chlorophylles

- Chlorophylle (a)

Nous constatons que l'écotype Djelfa présente une teneur en chlorophylle(a) 0,84  $\mu\text{g/gMF}$  comparée à celle enregistrée chez les écotypes de Blida et de M'sila avec respectivement 0.59  $\mu\text{g/ gMF}$  et 0.51 $\mu\text{g/ gMF}$  (Figure 4.19)

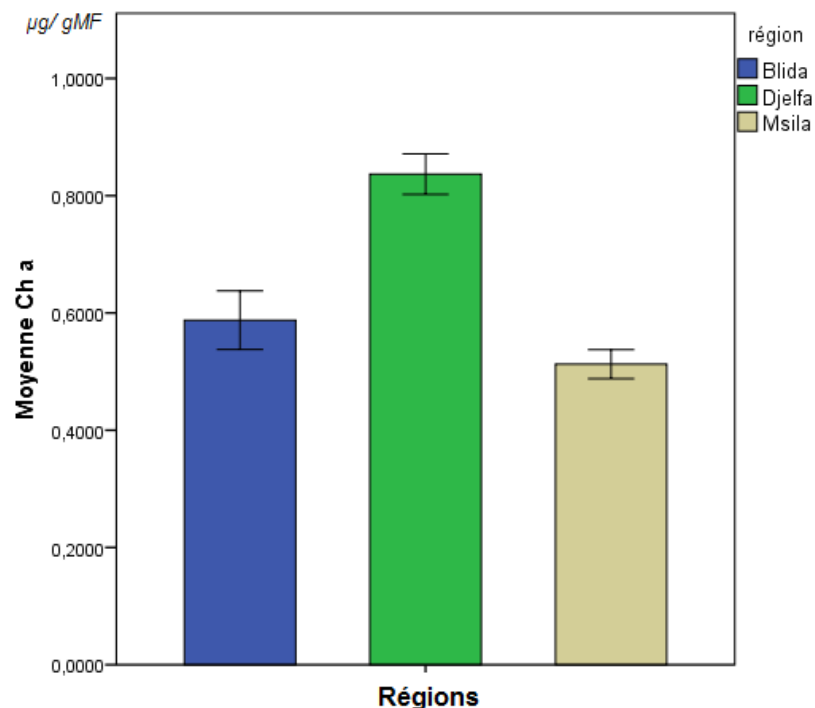


Figure 4.19 : Teneur en chlorophylle (a) selon les écotypes

L'analyse de la variance (ANOVA) à un seul critère de classification montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P= 0.00 < 0.05$ ) (Annexe C).

Le test de Tukey (tableau 4.10) a classé les moyennes en deux sous-groupes homogènes.

Tableau 4.10 : Teneur en chlorophylle (a) : test de signification de Tukey à ( $\alpha=5\%$ ).

	M'sila	Djelfa	Blida
<b>Chlorophylle (a)</b>	0,51	0,84	0,51
<b>Groupes homogènes</b>	a	b	a

- Chlorophylle (b)

Les résultats montrent que l'écotype Djelfa présente une teneur en chlorophylle (b) plus élevée avec  $0.39 \mu\text{g/ gMF}$ , suivi par les deux écotypes Blida et M'sila avec respectivement  $0.18 \mu\text{g/ gMF}$  et  $0.09 \mu\text{g/ gMF}$  (figure 4.20).

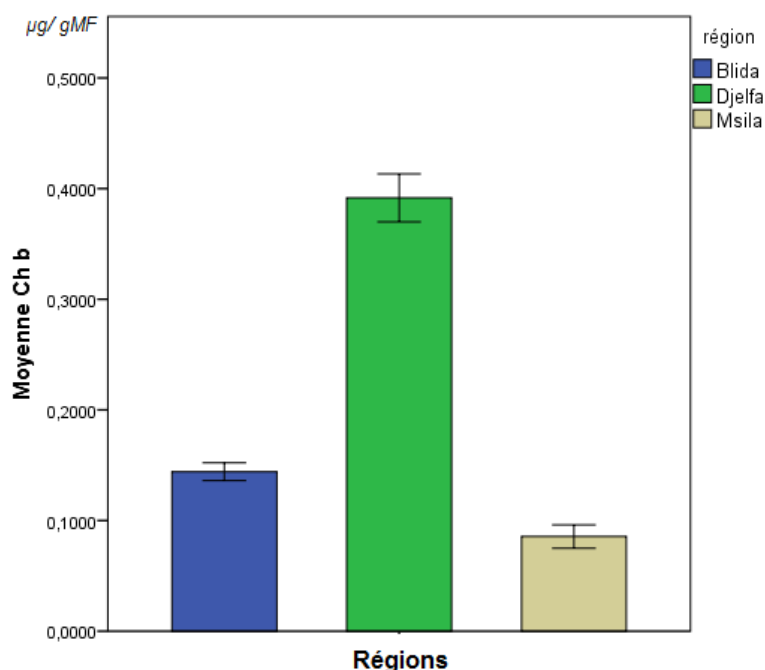


Figure 4.20 : Teneur en chlorophylle (b) selon les écotypes.

L'analyse de la variance à un seul critère de classification ANOVA montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P= 0.00 < 0.05$ ) (Annexe C).

Le test de Tukey (tableau 4.11) a classé les moyennes en deux sous-groupes homogènes.

Tableau 4.11 : Teneur en chlorophylle (b) : test de signification de Tukey à ( $\alpha=5\%$ ).

	M'sila	Djelfa	Blida
<b>Chlorophylle (b)</b>	0,09	0,39	0,18
<b>Groupes homogènes</b>	a	b	a

- Chlorophylle (a+b)

Les résultats présentés dans la figure 4.21 montrent que l'écotype Djelfa présente la teneur en chlorophylle (a+b) la plus élevée avec 1.23  $\mu\text{g/ gMF}$  (figure4.21)

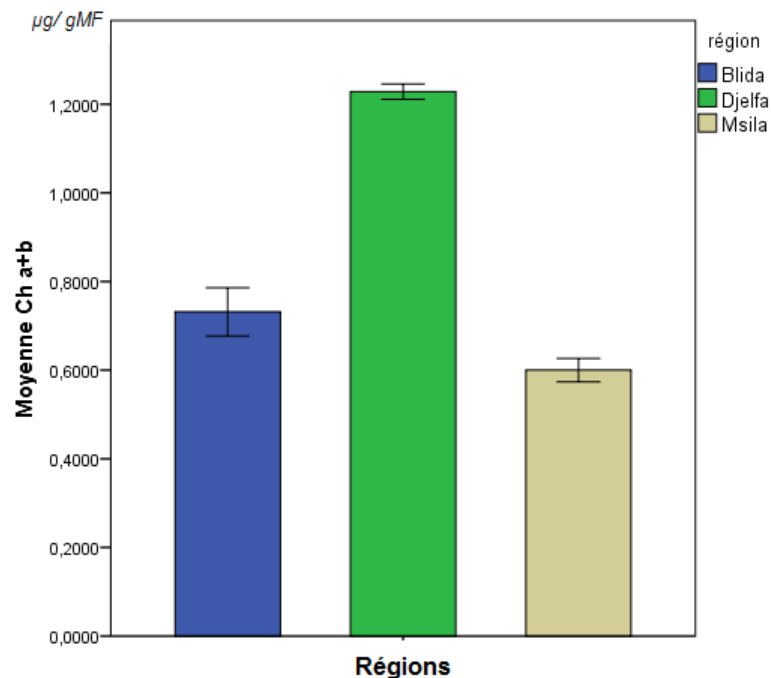


Figure 4.21 : Teneur en chlorophylle (a+b) selon les écotypes.

L'analyse de la variance à un seul critère de classification ANOVA montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P= 0.00 < 0.05$ ) (Annexe C).

Le test de Tukey (tableau 4.12) a classé les moyennes en trois sous-groupes homogènes.

Tableau 4.12 : Teneur en chlorophylle (a+b) : test de signification de Tukey ( $\alpha=5\%$ )

	M'sila	Djelfa	Blida
<b>Chlorophylle (a+b)</b>	0,60	1,23	0,77
<b>Groupes homogènes</b>	a	c	b

#### 4.1.1.2. Effet du facteur région sur la teneur en proline

Nous avons enregistré une quantité plus élevée en proline pour l'écotype Djelfa avec  $0.96 \mu\text{g/ gMF}$ , comparée aux deux autres écotypes de Blida et M'sila avec respectivement  $0.07 \mu\text{g/ gMF}$  et  $0.16 \mu\text{g/ gMF}$  (figure 4.22).

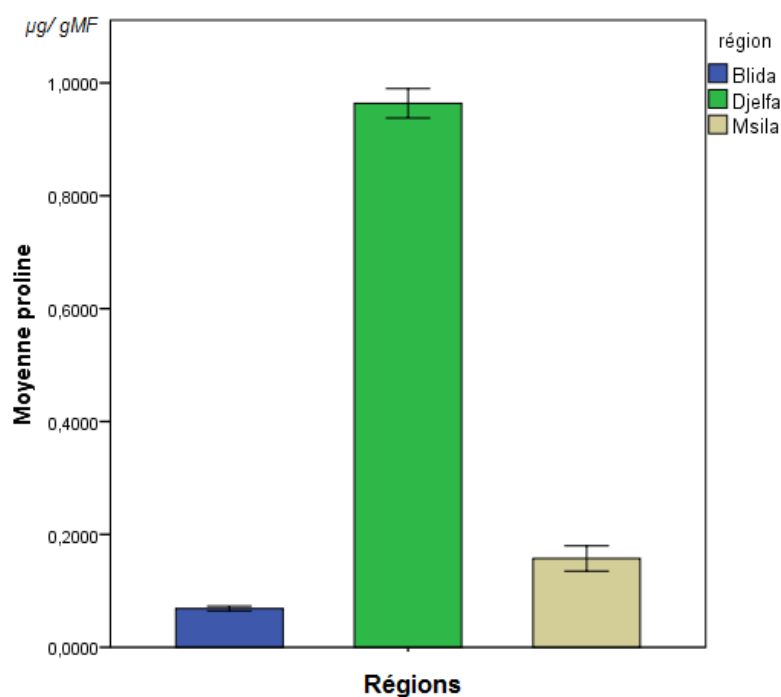


Figure 4.22 : Teneur en proline selon les écotypes



L'analyse de la variance à un seul critère de classification ANOVA montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P= 0.00 < 0.05$ ) (Annexe C).

Le test de Tukey (tableau 4.13) a classé les moyennes en deux sous-groupes homogènes (tableau 4.13).

Tableau 4.13 : Teneur en proline : test de signification de Tukey à ( $\alpha=5\%$ ).

	M'sila	Djelfa	Blida
<b>Proline</b>	0,16	0,96	0,07
<b>Groupes homogènes</b>	a	b	a

#### 4.1.1.3. Teneur en sucres solubles

Les résultats obtenus montrent que la teneur la plus élevée en sucres solubles est enregistrée chez l'écotype Djelfa avec  $3.71 \mu\text{g/ gMF}$ , suivi par l'écotype M'sila avec  $3.67 \mu\text{g/ gMF}$ . La teneur la plus faible a été enregistrée chez l'écotype Blida avec  $3.31 \mu\text{g/ gMF}$  (Figure 4.23).

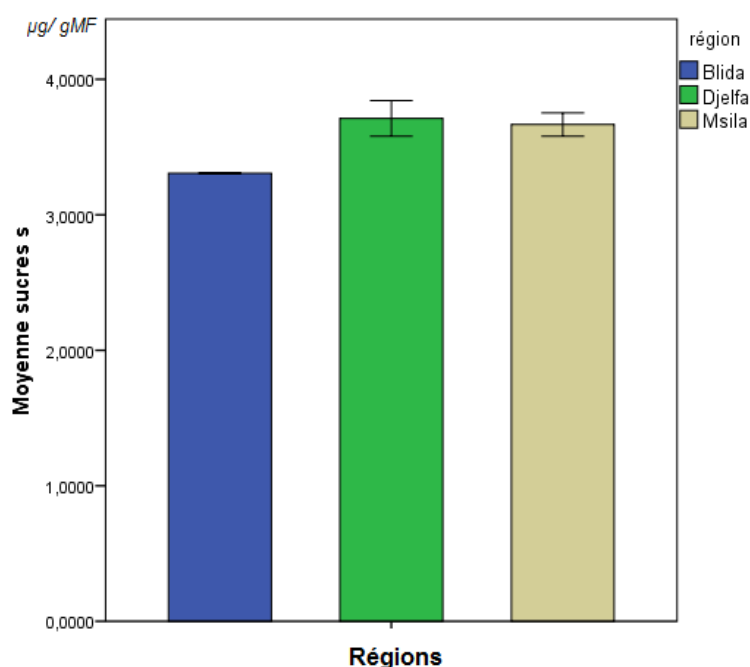


Figure 4.23 : Teneur en sucres solubles selon les écotypes

L'analyse de la variance à un seul critère de classification ANOVA montre qu'il existe une différence non significative ( $P= 0.12 > 0.05$ ) (Annexe C).

Le test de Tukey (tableau 4.14) a classé les moyennes en un seul sous-groupe homogène.

Tableau 4.14 : Teneur en sucres solubles : test de signification de Tukey à ( $\alpha=5\%$ ).

	<b>M'sila</b>	<b>Djelfa</b>	<b>Blida</b>
<b>Sucres solubles</b>	3,67	3,71	3,31
<b>Groupes homogènes</b>	a	a	a

#### 4.1.1.4. Interaction inter-paramètres

L'examen de la corrélation de *Pearson* entre les différents paramètres (physiologiques et biochimiques) révèle une corrélation non significative ( $P > 0.05$ ) entre la teneur en chlorophylles, la teneur en proline et la teneur en sucres solubles au sein des écotypes étudiés (Annexe C).

### **Discussion**

L'examen des résultats montre que l'écotype Djelfa a présenté les teneurs les plus élevées en chlorophylles, proline et sucres solubles. Nous avons enregistré de faibles teneurs en pigments chlorophylliens chez les deux autres écotypes de Blida et de M'sila.

La diminution de la quantité de chlorophylle est liée à la diminution de la quantité relative en eau qui est due essentiellement, à la réduction des échanges du  $CO_2$ , limitée par une fermeture des stomates. Ce phénomène engendre par conséquence la résistance de la feuille à la diffusion du  $CO_2$  (FRIEDMAN, 2001).

D'après HIKOSAKA et *al*, (2006) les feuilles peuvent être influencées par beaucoup de facteurs notamment l'âge, la position, ainsi que par les facteurs environnementaux tels que la lumière, la température et l'humidité.

La réduction des taux des pigments chlorophylliens de l'échantillons provenant de M'sila peut être expliquée par un abaissement de contenu en protéines thylacoïdal associé aux chlorophylles (a) et (b) (LOGGINI *et al.*, 1999). Cet abaissement est du soit à une faible synthèse de ces protéines, soit à une activation de leur dégradation. La région de M'sila a montré une période sèche s'étalant durant toute l'année, ainsi, MILLER (1993) a démontré que les températures élevées peuvent provoquer la dénaturation de protéines, l'inactivation des enzymes et la réduction de l'activité photosynthétique du chloroplaste.

Les sucres ont un rôle dans l'ajustement osmotique et ils participent également à la préservation de l'intégrité membranaire dans les organes desséchés ainsi qu'une protection des protéines (MARTIN *et al.*, 1987).

En effet, les plantes du romarin des deux écotypes Djelfa et Msila peuvent se retrouver face à un stress hydrique et salin car elles poussent spontanément sur des aires sèches où on enregistre des températures très élevées et de très faibles précipitations. L'analyse climatique de la région de M'sila a montré l'existence d'une période sèche qui s'étale durant toute l'année.

Le comportement biochimique des plantes du romarin montre une variation de l'accumulation de la proline en fonction de la région. En effet, cette accumulation permet aux plantes de supporter le manque d'eau et maintiennent leur turgescence relative foliaire le moins perturbée que possible et leur intégrité cellulaire préservée (BENSALEM, 1992).

La proline quant à elle à de fortes concentrations agit comme un soluté pour l'ajustement osmotique et aussi pour servir de réservoir de composés azotés et de carbone pour une utilisation ultérieure dans la croissance. Sous l'effet de stress, la proline protège le métabolisme cellulaire de la plante et elle le restitue après le stress (STEWART *et LEE*, 1974).

Les travaux de CLIFFORD *et al.*, (1998), ont déduit que l'accumulation de proline est la cause d'une forte concentration en sucres solubles.

Les paramètres étudiés nous ont permis de vérifier que les teneurs en proline et en sucres solubles accumulés permettent d'ajuster l'osmolarité interne (osmo-régulateurs). Ce phénomène permet d'éviter une déshydratation rapide des tissus végétaux qui entraîne par la suite la mort des plantes. En effet, la plante accumule les sucres, proline et protéines pour surmonter un effet de stress (hydrique ou salin).

Le dosage des paramètres physiologiques et biochimiques du romarin a révélé l'existence d'une corrélation entre la variation des conditions climatiques, les stades phénologiques et la réponse des écotypes.

L'examen de corrélation réalisée entre les paramètres physiologiques et biochimiques révèle des résultats importants. Une corrélation négative et significative est observée entre la teneur en chlorophylle (a) d'une part, la teneur en chlorophylle (b) et la teneur en chlorophylle (a+b). En revanche, une corrélation non significative a été enregistrée entre la teneur en chlorophylle, la teneur en proline et la teneur en sucres solubles.

#### 4.1.2. Rendement en HE du romarin des trois régions étudiées

Les résultats du rendement en HE du romarin des trois régions M'sila, Djelfa et Blida sont mentionnés dans le tableau 4.15

Tableau 4.15 : Rendement en huiles essentielles de *R. officinalis*

Espèce	Rendement (%)		
	Blida	Djelfa	M'sila
<i>Rosmarinus officinalis</i>	0.76	0.58	0.073
Norme AFNOR	0.5 à 2		

Le rendement en huile essentielles le plus élevé a été enregistré au niveau de l'écotype Blida (localité de Sidi El Kebir) avec 0.76% suivi par celui de Djelfa avec 0.58% comparé à l'écotype M'sila où la teneur est très faible (0.073%) (figures 4.24 et 4.25).

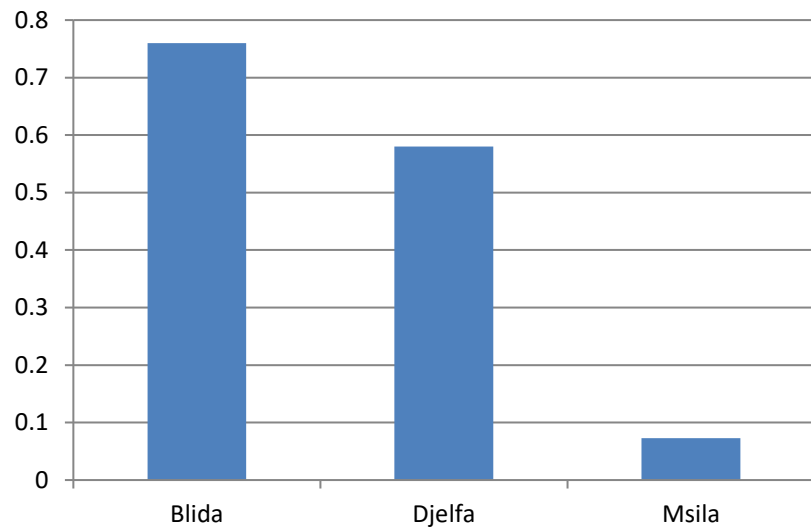


Figure 4.24 : Rendement des huiles essentielles de *R. officinalis* L.

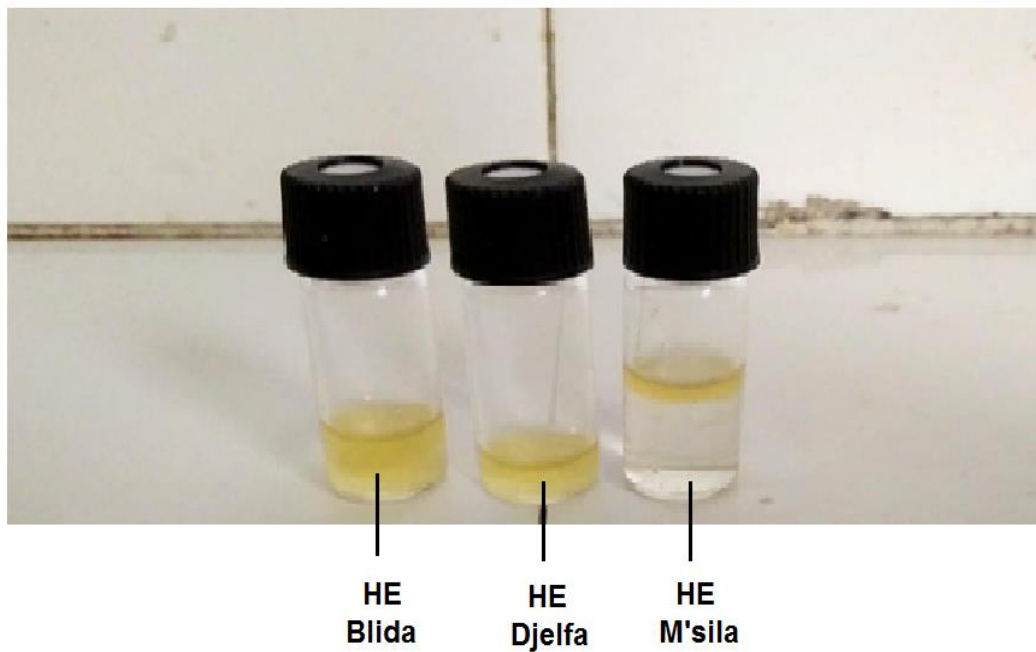


Figure 4.25 : Echantillons d'HE extraite des trois écotypes

#### 4.1.3. Caractéristiques de l'huile essentielle de *R. officinalis*

L'étude des caractéristiques de l'HE du romarin a porté sur les caractéristiques organoleptiques et les caractéristiques physicochimiques.

##### 4.1.3.1. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle du romarin obtenue sont mentionnées dans le tableau 4.16.

Tableau 4.16 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de romarin

Ecotype	Aspect	couleur	Odeur et saveur
Blida (localité de Sidi El Kebir)	Liquide	Jaune clair	Odeur caractéristique de l'espèce plus au moins camphrée saveur amère
Djelfa (localité de Ain Oussara)	Liquide	Jaune clair	Odeur caractéristique de l'espèce plus au moins camphrée saveur amère
Msila (localité de Boussaâda)	Liquide	Jaune clair	Odeur caractéristique de l'espèce plus au moins camphrée Saveur amère
Norme d'AFNOR	Liquide	jaune clair	Odeur caractéristique fraîche, plus ou moins camphrée selon l'origine

Les HE extraites des trois écotypes (M'sila, Djelfa et Blida) possèdent les mêmes caractéristiques organoleptiques et sont comparables aux normes d'AFNOR. L'HE est jaune clair et dégage un parfum frais et légèrement camphré (figure 4.26).

ANGIONI et *al.*, (2006) rapportent que la couleur de l'HE dépend essentiellement de sa composition. Ils signalent par ailleurs que, L'HE riche en composés monoterpéniques, avec prédominance de l' $\alpha$ -pinène, présente une coloration jaune.



Figure 4.26 : Huile essentielle du romarin

#### 4.1.3.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les résultats des constantes physico-chimiques de l'huile essentielle de romarin sont présentés dans le tableau 4.17.

Tableau 4.17 : Caractéristiques physico-chimiques de l'HE du romarin

Paramètres physico-chimiques	Ecotype			Normes d'AFNOR Maximum/ minimum
	M'sila	Djelfa	Blida	
Densité	0.935	0.928	0.957	min :0.907 Max :0.920
Indice de réfraction	1.453	1.478	1.476	min :1.464 Max :1.470
Indice d'acide	2.35	1.34	2.03	Max=1.0
Indice d'ester	23.8	12.07	19.5	min : 2

La norme AFNOR, (2005) prévoit un indice de réfraction (IR), compris entre 1,450 et 1,513 pour les HE de haute qualité, et considère que celles dont l'IR dépasse le seuil de 1,513 sont de qualité moindre.

En faisant référence à ces normes, on peut considérer que les HE du romarin des trois régions M'sila, Djelfa et Blida sont de bonne qualité où on a enregistré un IR de 1.453, 1.478 et 1.476 respectivement.

La norme AFNOR,(2005) et la pharmacopée européenne, (2002) valident la conformité des HE ayant un indice d'acide inférieur à 2.

L'HE de l'écotype Djelfa a présenté un indice d'acide inférieure au seuil maximal défini par la pharmacopée européenne (2002).

L'HE de l'écotype M'sila et Blida ont présenté un indice d'acide légèrement supérieur au seuil maximal défini par la pharmacopée européenne (2002).

L'indice d'acide est un paramètre qui permet de garantir les bonnes pratiques de conservation des HE, qui s'oxydent très facilement et ce qui engendre une altération de leurs composants et favorise la formation des acides.

L'indice d'ester ( $I_E$ ) donne des informations sur le degré de dégradation de l'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation (Pharmacopée européenne, 2002).

Plus l'indice d'ester est élevé, mieux est la qualité d'une HE (AFNOR, 2005). Donc les HE extraites du romarin provenant des trois régions (Blida, Djelfa et M'sila) sont de bonne qualité où nous avons enregistré un  $I_E$  élevé.

#### 4.1.4. Effet du facteur région sur la composition chimique de l'HE de *R. officinalis*

Les résultats de l'analyse par CG/MS provenant des trois régions, sont illustrés dans les tableaux et traduits en chromatogrammes (Annexe C). La composition chimique majoritaire est décrite dans le tableau 4.18.



Tableau 4.18 : Composition chimique des HE de *R .officinalis*

Composés	Blida		Djelfa		M'sila	
	%	Temps de rétention (mn)	%	Temps de rétention (mn)	%	Temps de rétention (mn)
Eucalyptol	9.043	11.09	-	-	12.171	6.92
Camphre	-	-	38.008	8.95	22.054	8.93
Bornéol	11.321	16.93	-	-	10.617	9.33
Verbinone	-	-	-	-	6.714	9.87
$\alpha$ –Pinène	20.334	7.44	19.250	4.97	10.405	4.96
Camphène	8.603	7.93	19.036	5.30	-	-

Après analyse du tableau de la composition chimique majoritaire, on remarque que sur tous les composants, seulement deux ( $\alpha$ -pinène et camphre) sont communs aux deux régions étudiées (Blida et Djelfa). En terme quantitatif la région de M'sila contient plus de composants majoritaires que les deux autres régions (Blida et Djelfa) (eucalyptol, camphre, bornéol et  $\alpha$  –pinène).

La composition chimique majoritaire de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* des trois régions (Blida, Djelfa et Msila) montre quelques différences par rapport à certains travaux :

Dans la région de Bibans (Bordj-Bou-Argeridj), le composé majoritaire est le 1,8-cinéole (52.4%), suivi du camphre (12.6%) (BOUTEKEDJIRET, 1998) alors qu'un autre échantillon montre une grande variabilité quantitative en fonction de l'état de la plante (1,8-cinéole = 41.7-16.0%, camphre = 26.0- 9.3%,  $\alpha$ -pinène = 16.9-2.5%) (BOUTEKEDJIRET, 1999).

Un échantillon provenant de Bordj-Bou-Argeridj ne contient que 7,5% de cinéole à côté du camphre (12,1%), du bornéol (10,1%), de l' $\alpha$ - terpinéol (9,5%) et surtout du  $\beta$ -caryophyllène (13,9%) (BENHABILES, 2001).

Les résultats des travaux cités montrent que le facteur région influe sur la composition chimique majoritaire de l'huile essentielle du *R. officinalis* L.

En effet, ces HE ont été extraites des plantes récoltées dans des régions différentes, où chacune présente ses propres caractéristiques pluviométriques et édaphiques. Dans notre étude, l'analyse climatique montre l'existence d'un hiver plus doux à Blida et M'sila comparativement à un hiver plus rigoureux à Djelfa ceci peut expliquer la différence dans la composition majoritaire des composants du *Rosmarinus officinalis* issue des trois régions (Blida, Djelfa et M'sila)

L'implication de facteurs héréditaires dans ce processus n'est pas à exclure, sachant que la composition des HE est généralement influencée par des facteurs génétiques.

#### 4.1.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE et de l'EM selon les régions

Cette partie consiste à évaluer l'activité antimicrobienne de l'HE et de l'EM de romarin sur les cinq souches de bactéries testées, en fonction de deux régions Blida et Djelfa.

Cette étude n'a pas pu être réalisée sur les plantes provenant de la région de M'sila et qui ont présenté un faible rendement en HE. L'évaluation de cette activité nécessite des répétitions pour avoir un résultat fiable.

##### 4.1.5.1. Activité antibactérienne des extraits du romarin vis-à-vis *S. aureus*.

Nous remarquons que l'huile essentielle de romarin a un pouvoir antimicrobien plus élevé que celui de l'extrait méthanolique sur *S. aureus*. (Figure 4.27).

- Les huiles essentielles

Les HE des deux écotypes Blida et Djelfa ont inhibé la croissance de *Staphylococcus aureus* avec respectivement  $24 \pm 0.29$  et  $17 \pm 0.29$  mm. Elle a présenté des zones d'inhibitions supérieures à 20 mm, témoignant sa très forte sensibilité vis-à-vis l'HE de Blida.

L'analyse de la variance à double critère de classification MANOVA montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P= 0.00 < 0.05$ ) (Annexe).

- Les extraits méthanoliques

*Staphylococcus aureus* a montré une sensibilité envers l'extrait méthanolique du romarin des deux écotypes Blida et Djelfa, avec respectivement  $16 \pm 0.29$  et  $13 \pm 0.29$  mm.

Cependant l'EM s'est avéré moyennement actif sur *Staphylococcus aureus*.

L'analyse de la variance à double critère de classification MANOVA montre qu'il existe une différence significative ( $P= 0.02 < 0.05$ ) (Annexe C).

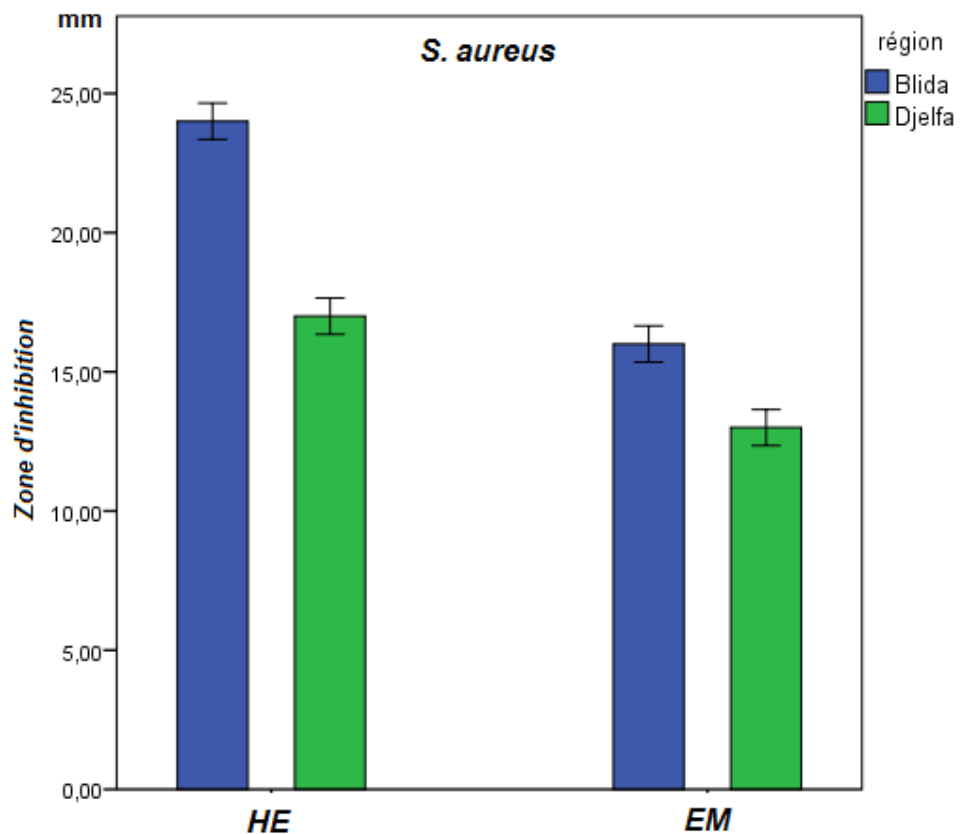


Figure 4.27 : Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis *Staphylococcus aureus*.

#### 4.1.5.2. Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis *E. faecalis*

Nous remarquons que l'huile essentielle de romarin a un pouvoir antimicrobien vis-à-vis *S. aureus* plus élevé que celui de l'extrait méthanolique (figure 4.28).

- Les huiles essentielles

Les résultats indiquent que l'huile essentielle de l'écotype Blida présente une activité antimicrobienne importante contre *Enterococcus faecalis* par rapport à celui de Djelfa, avec respectivement  $23 \pm 0.88$  et  $14 \pm 0.88$  mm.

Le test réalisé avec l'HE de l'écotype Blida a révélé une très forte sensibilité d'*E. faecalis*, où nous avons noté une zone d'inhibition supérieure à 20 mm.

L'analyse de la variance à double critère de classification MANOVA montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P=0.00 < 0.05$ ) (Annexe C).

- Les extraits méthanoliques

L'EM des deux écotypes Blida et Djelfa a inhibé la croissance d'*E. faecalis* à des diamètres de  $16 \pm 0.88$  mm et  $14 \pm 0.88$  mm respectivement.

La souche *Enterococcus faecalis* a montré une nette sensibilité à l'égard de l'EM des deux écotypes avec des zones d'inhibition très proches (entre 14 et 19 mm). L'EM s'est avéré moyennement actif vis-à-vis la souche testée.

L'analyse de la variance MANOVA montre qu'il existe une différence non significative ( $P=0.21 > 0.05$ ) (Annexe C).

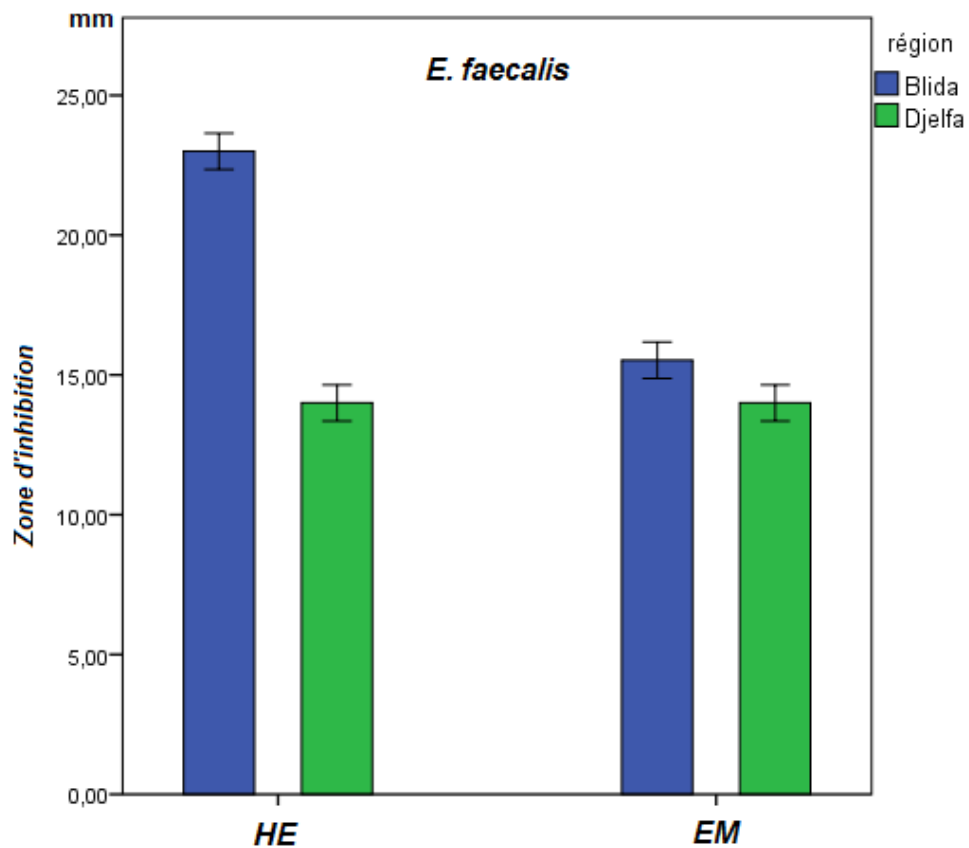


Figure 4.28 : Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis *Enterococcus faecalis*

#### 4.1.5.3. Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis *B. cereus*.

- Les huiles essentielles

Les HE des deux écotypes ont inhibé la croissance bactérienne de *Bacillus cereus* avec un diamètre similaire de  $12 \pm 0.38$  mm (Figure 4.29).

Le test réalisé avec l'HE des deux écotypes a révélé une sensibilité modérée de *B. cereus*.

L'analyse de la variance MANOVA montre qu'il existe une différence non significative ( $P=1.00 > 0.05$ ) (Annexe C).

- Les extraits méthanoliques

*Bacillus cereus* a montré une sensibilité envers l'extrait méthanolique des deux écotypes Blida et Djelfa, avec respectivement  $17 \pm 0.38$  mm et  $14 \pm 0.38$  mm.

L'EM des deux écotypes a montré un pouvoir antimicrobien moyennement actif sur *B. cereus* et plus élevé que celui de l'huile essentielle.

L'analyse de la variance MANOVA montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P=0.00 < 0.05$ ) (Annexe C).

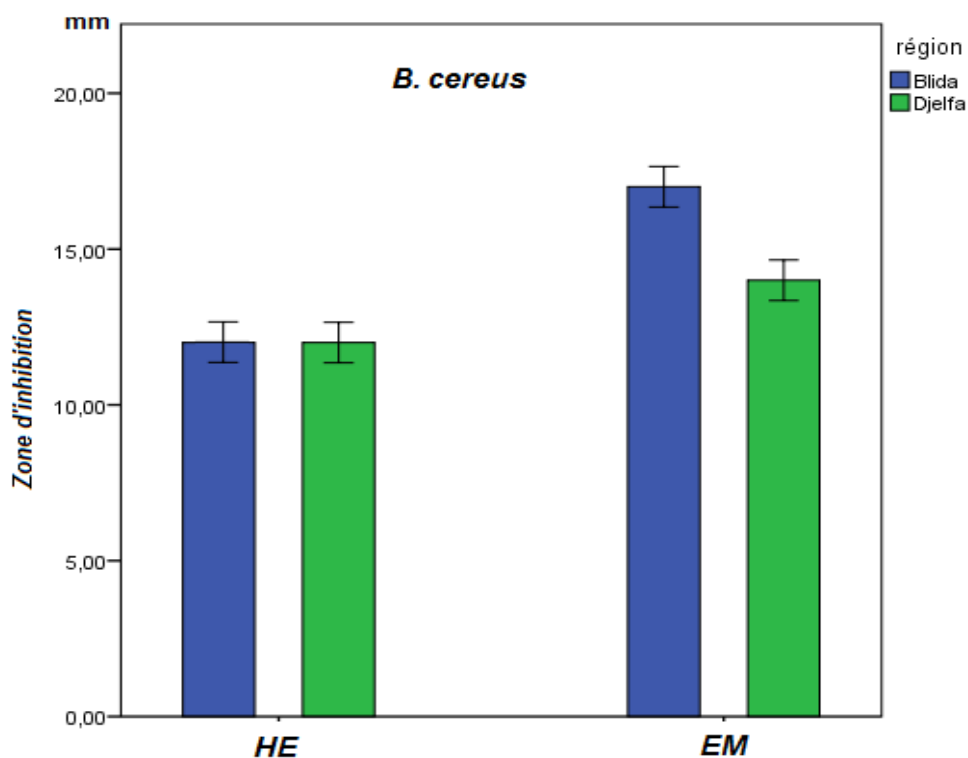


Figure 4.29 : Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis *Bacillus cereus*.

#### 4.1.5.4. Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis *E. coli*.

- Les huiles essentielles

Les résultats indiquent que les HE des deux écotypes Blida et Djelfa présentent une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli* avec respectivement  $9 \pm 0.29$  et  $10 \pm 0.29$  mm.

Le test réalisé avec l'HE des deux écotypes a révélé une résistance modérée d'*Escherichia coli*.

L'analyse de la variance à double critère de classification MANOVA montre qu'il existe une différence non significative ( $P=0.76 > 0.05$ ) (Annexe C).

- Les extraits méthanoliques

L'EM des deux écotypes Blida et Djelfa n'a montré aucun pouvoir antimicrobien vis-à-vis *Escherichia coli* où on a enregistré un faible diamètre de  $7 \pm 0.29$  mm ( $< 8$  mm) (figure 4.30).

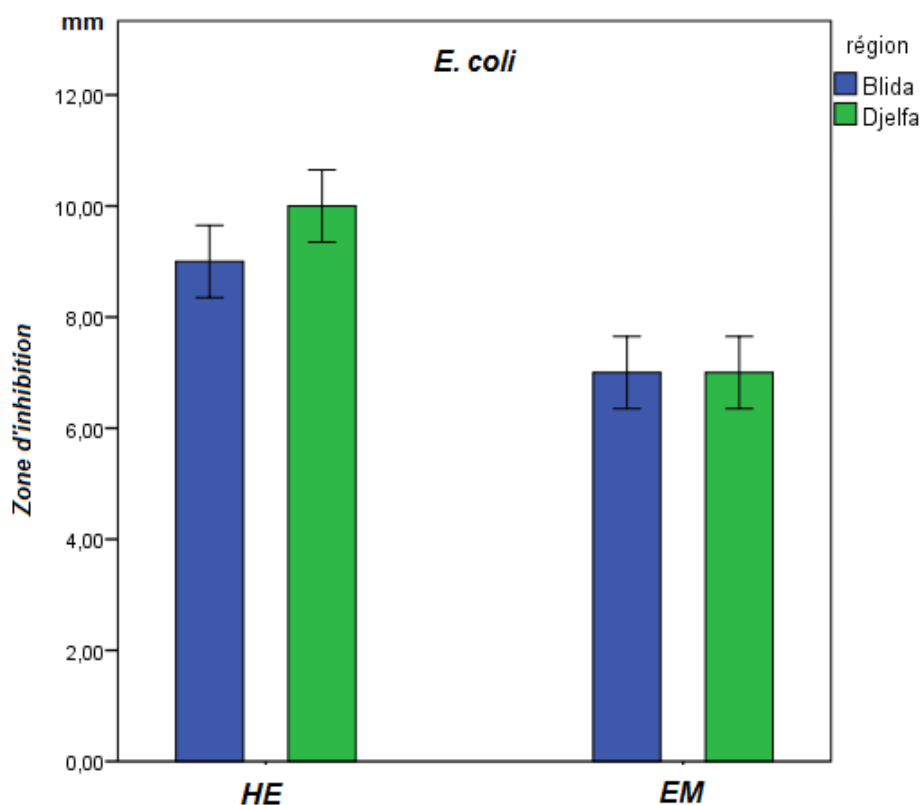


Figure 4.30 : Pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis *Escherichia coli*

#### 4.1.5.5. Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits vis-à-vis *P.aeruginosa*.

Les résultats enregistrés ne montrent aucune zone d'inhibition autour des disques imprégnés de l'HE et de l'EM des deux écotypes Blida et Djelfa (figure 4.31).

Cependant les extraits testés (HE et EM) se sont avérés non actifs sur la souche *Pseudomona aeruginosa*,

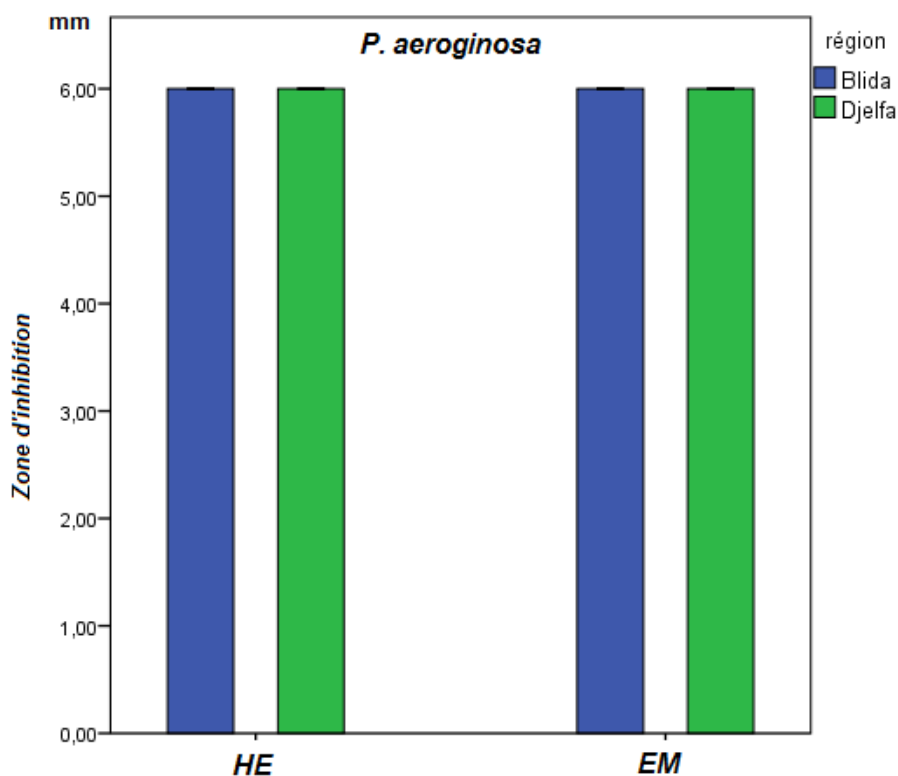


Figure 4.31 : Pouvoir antibactérien des deux extraits du romarin vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*

## Discussion

Les résultats indiquent que l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. des deux régions Blida et Djelfa possède une activité antimicrobienne envers les bactéries testées, exception observé pour la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*.

A partir de ces résultats nous pouvons déduire que l'HE de *R. officinalis* L. extraite des plantes prélevées de la localité de Sidi El Kebir (Blida) présente une activité antimicrobienne plus élevée que celle extraite des plantes d'Ain Oussara (Djelfa). L'huile essentielle de l'écotype Blida contient des composants majoritaires des alcools terpéniques (borneol, eucalyptol). Ces derniers sont absents dans l'HE de l'écotype Djelfa, alors que plusieurs travaux ont signalé que les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles de plusieurs autres plantes aromatiques et médicinales ont été attribuées à leur profil chimique majoritaire et surtout aux alcools terpéniques [KURITA *et al.*, (1982) ; BOUCHIKHI (1994) ; TANTAOUI-ELARKI *et al.*, (1994) ; FAID *et al.*, (1996) ; CHAND *et al.*, (2001) ; KARAMAN *et al.*, (2001) ; BAYDAT *et al.*, (2004) ; PIBIRI (2005) ; SATRANI *et al.*, (2006)].



Ceci n'exclut pas du spectre d'action antibactérienne tous les autres composants ne figurant pas dans la composition majeure de l'huile, car la plus part des composés chimiques des huiles essentielles sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes (BOUAOUN et *al.*, 2007).

Les extraits méthanoliques du romarin des deux écotypes (Blida et Djelfa) ont inhibé la croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus cereus*. *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* se sont montrés très résistants et nous n'avons enregistré aucune zone d'inhibition.

Les résultats montrent que le pouvoir antimicrobien est en relation avec la nature du produit testé (HE ou EM), de l'écotype et de la souche testée. Lorsqu'on compare les degrés de sensibilité des souches *S. aureus*, *E. faecalis* et *B. cereus* à Gram (+) avec les autres à Gram (-) notamment *E. coli* et *P. aeruginosa*, on trouve que nos résultats sont comparables à ceux confirmant que les bactéries à Gram (+) sont plus sensibles à l'huile essentielle que les bactéries à Gram (-) (POOLE, 2001).

L'étude du pouvoir antimicrobien des HE et des EM de *R. officinalis* L. a permis de visualiser une action inhibitrice plus intéressante de l'huile essentielle par rapport à l'extrait méthanolique. Selon DAVIDSON (1993), les HE possèdent un pouvoir antimicrobien plus important dû à leur accumulation dans les membranes, entraînant ainsi un appauvrissement d'énergie. Elles affectent les fonctions de diverses structures moléculaires membranaires telles que les systèmes de transport, les enzymes, les canaux ioniques et les récepteurs (SAAD et *al.*, 2013). Certains auteurs ont rapporté que les HE peuvent provoquer la coagulation du cytoplasme (GUSTAFSON et *al.*, 1998). L'effet synergique des composés chimiques contenus dans l'HE, sont les principaux responsables de cette activité antimicrobienne (ULTEE et *al.*, 2000).

L'huile essentielle et l'extrait méthanolique de romarin ont montré une activité importante sur les bactéries à Gram (+) que les bactéries à Gram (-), ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes (BURT, 2004).

La grande résistance des bactéries Gram (-) à l'huile essentielle est liée à la structure de leur membrane externe qui est plus riche en lipo-plysaccharides, le rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer, (CRISTIANI et *al.*, 2007).

#### 4.2. Effet du facteur saison sur les paramètres étudiés

Cette étude a concerné uniquement l'écotype de Blida (localité de Sidi El Kebir) où nous avons suivi l'évolution de l'HE durant trois saisons (automne, hiver et printemps) après avoir fait un dosage des paramètres physiologiques et biochimiques.

##### 4.2.1. Effet du facteur saison sur les paramètres physiologiques et biochimiques

Les résultats obtenus durant la campagne 2013/2014 montrent que la teneur en chlorophylles, en proline et en sucres solubles du romarin, récolté dans la localité de Sidi El Kebir, varie selon la saison.

##### 4.2.1.1. Effet du facteur saison sur la teneur en chlorophylles

- Chlorophylle (a)

D'après les résultats nous constatons que le romarin récolté au printemps présente une teneur en chlorophylle (a) de 0.59  $\mu\text{g/ gMF}$ , plus élevée que les deux autres saisons automne et hiver avec respectivement 0.32  $\mu\text{g/ gMF}$  et 0.0.48  $\mu\text{g/ gMF}$  (Figure 4.32).

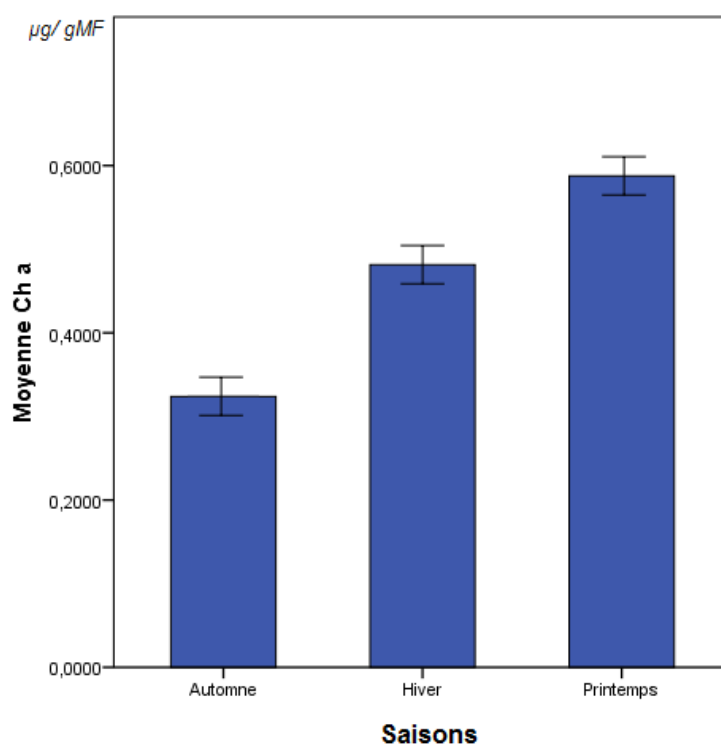


Figure 4.32 : Teneur en chlorophylle (a) selon les saisons

L'analyse de la variance à un seul critère de classification ANOVA montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P= 0.00 < 0.05$ ) (Annexe C).

Le test de Tukey (tableau 4.19) a classé les moyennes en trois sous-groupes homogènes.

Tableau 4.19 : Teneur en chlorophylle (a) : test de signification de Tukey à ( $\alpha=5\%$ ).

	Automne	Hiver	Printemps
<b>Chlorophylle (a)</b>	0,32	0,48	0,59
<b>Groupes homogènes</b>	a	b	c

- Chlorophylle (b)

Les résultats montrent que le romarin récolté en hiver présente une teneur en chlorophylle (a) plus élevée avec  $0.21 \mu\text{g/ gMF}$ , suivi par ceux récoltés au printemps et en automne avec respectivement  $0.18 \mu\text{g/ gMF}$  et  $0.10 \mu\text{g/ gMF}$ . (figure 4.33).

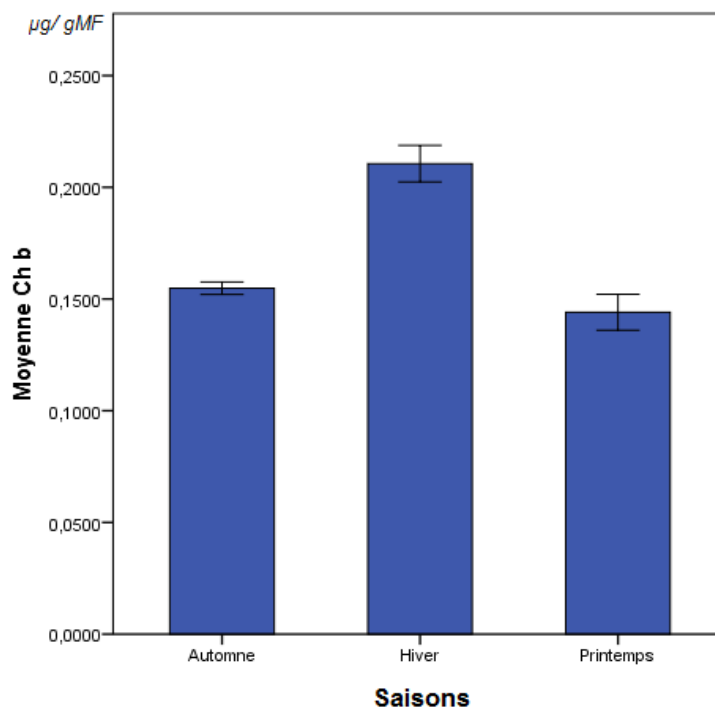


Figure 4.33 : Teneur en chlorophylle (b) selon les saisons.

L'analyse de la variance à un seul critère de classification ANOVA montre qu'il existe une différence non significative ( $P= 0.44 < 0.05$ ) (Annexe C).

Le test de Tukey (tableau 4.20) a classé les moyennes en un seul sous-groupe homogène.

Tableau 4.20 : Teneur en chlorophylle (b) : test de signification de Tukey ( $\alpha=5\%$ ).

	Automne	Hiver	Printemps
<b>Chlorophylle (b)</b>	0,15	0,21	0,18
<b>Groupes homogènes</b>	a	a	a

- Chlorophylle (a+b)

Nous constatons d'après les résultats obtenus que le romarin récolté au printemps présente une teneur en chlorophylle (a+b) la plus élevée avec  $0.77 \mu\text{g/ gMF}$  suivi par les deux autres saisons hiver et automne, avec respectivement  $0.69 \mu\text{g/gMF}$  et  $0.48 \mu\text{g/ gMF}$  (figure 4.34).

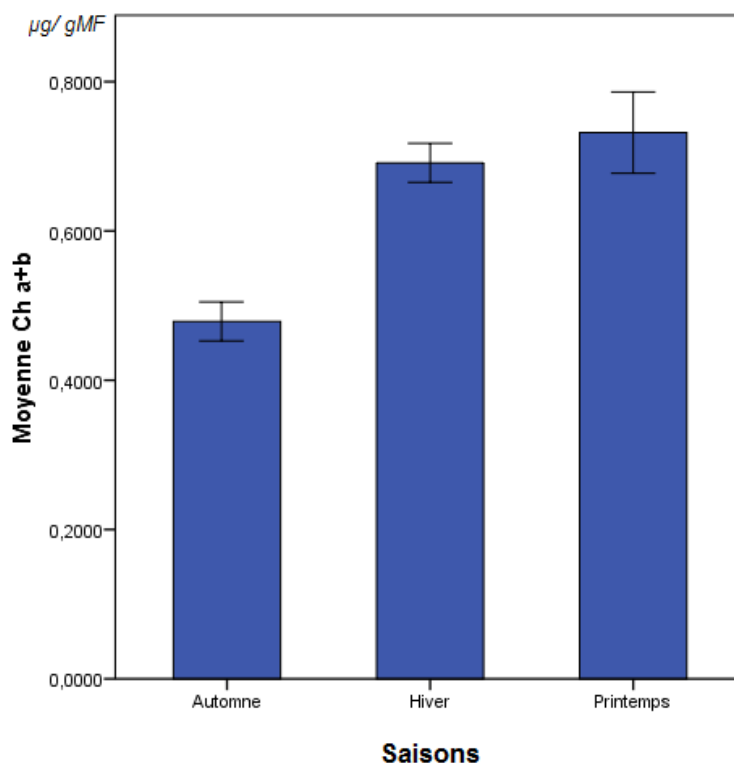


Figure 4.34 : Teneur en chlorophylle (a+b) selon les saisons

L'analyse de la variance à un seul critère de classification ANOVA montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P= 0.00 < 0.05$ ) (Annexe C).

Le test de Tukey (tableau 4.21) a classé les moyennes en deux sous-groupes homogènes.

Tableau 4.21 : Teneur en chlorophylle (a+b) : test de signification de Tukey à ( $\alpha=5\%$ ).

	Automne	Hiver	Printemps
<b>Chlorophylle (a+b)</b>	0,48	0,69	0,77
<b>Groupes homogènes</b>	a	b	b

#### 4.2.1.2. Effet du facteur saison sur la teneur en proline

Nous avons enregistré une quantité plus élevée en proline pour la saison du printemps avec  $0.07 \mu\text{g/ gMF}$ , comparée aux deux autres saisons automne et hiver avec une valeur similaire de  $0.03 \mu\text{g/ gMF}$  (figure 4.35).

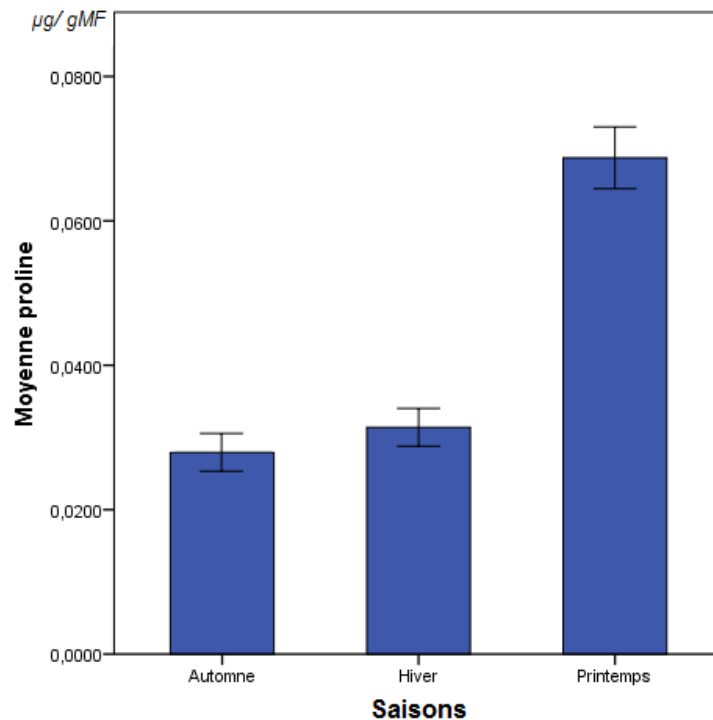


Figure 4.35 : Teneur en proline selon les saisons

L'analyse de la variance à un seul critère de classification ANOVA montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P= 0.00 < 0.05$ ) (Annexe C).

Le test de Tukey (tableau 4.22) a classé les moyennes en deux sous-groupes homogènes.

Tableau 4.22 : Teneur en proline : test de signification de Tukey à ( $\alpha=5\%$ ).

	<b>Automne</b>	<b>Hiver</b>	<b>Printemps</b>
<b>Proline</b>	0,03	0,03	0,07
<b>Groupes homogènes</b>	a	a	b

#### 4.2.1.3. Effet du facteur saison sur la teneur en sucres solubles

Les résultats obtenus montrent que la teneur la plus élevée en sucres solubles est enregistrée chez le romarin récolté au printemps avec  $3.31 \mu\text{g/ gMF}$ , suivi par celui récolté en hiver avec  $1.78 \mu\text{g/ gMF}$ . La teneur la plus faible est constatée chez le romarin récolté en automne enregistrant ainsi  $0.95 \mu\text{g/ gMF}$  (figure 4.36)

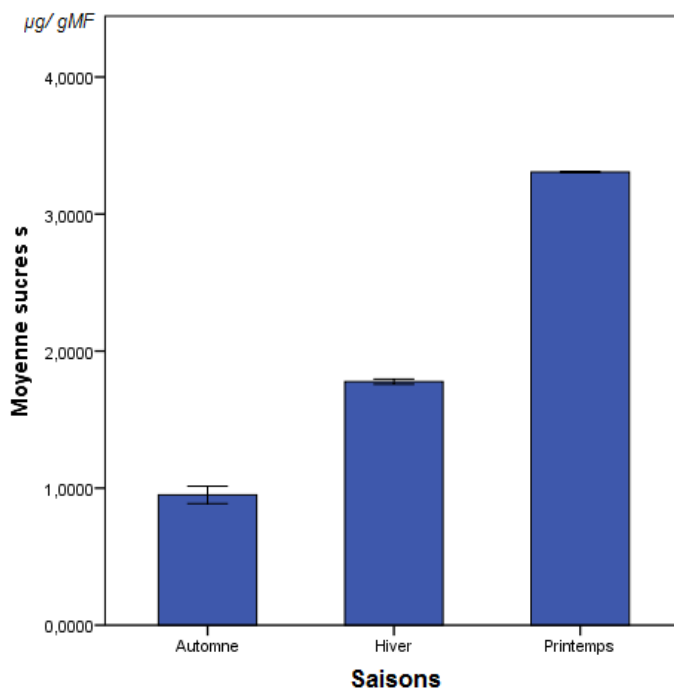


Figure 4.36 : teneur en sucres solubles selon les saisons

L'analyse de la variance à un seul critère de classification ANOVA montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P= 0.00 < 0.05$ ) (Annexe C).

Le test de Tukey (tableau 4.23) a classé les moyennes en trois sous-groupes homogènes.

Tableau 4.23 : Teneur en sucres solubles : test de signification de Tukey ( $\alpha=5\%$ ).

	<b>Automne</b>	<b>Hiver</b>	<b>Printemps</b>
<b>Sucres solubles</b>	0,95	1,78	3,31
<b>Groupes homogènes</b>	a	b	c

#### 4.2.1.4. Interaction inter-paramètres

L'examen de la corrélation de *Pearson* entre les différents paramètres (physiologiques et biochimiques) (Annexe C) nous a permis de souligner les points suivants :

- Une corrélation très forte, statistiquement significative ( $P<0.05$ ) inversement proportionnelle entre la teneur en chlorophylle (a) et la teneur en chlorophylle (b) ( $r=-0.999$ ).
- Une corrélation très forte, statistiquement significative ( $P< 0.05$ ) inversement proportionnelle entre la teneur en chlorophylle (a) et la teneur en chlorophylle (a+b) ( $r=-0.998$ ).
- Une corrélation non significative ( $P> 0.05$ ) entre la teneur en chlorophylle, la teneur en proline et la teneur en sucres solubles.

## **Discussion**

L'examen des résultats des paramètres physiologiques et biochimiques durant les périodes saisonnières montre que la teneur en chlorophylle du romarin durant la saison printanière est légèrement supérieure à celles des autres saisons.

Une baisse importante de la teneur en pigments photosynthétiques a été enregistrée durant la saison automnale. Parmi les causes possibles expliquant

cette réduction, la destruction des membranes thylakoïdiennes cellulaires ; une perte de la compartimentation cellulaire peut en effet inhiber le déroulement des grandes fonctions métaboliques (CORNIC et GHASHGHAIE, 1991).

Les teneurs en proline et en sucres solubles du romarin durant la saison printanière est nettement supérieure à celles des autres saisons (hiver et automne).

L'augmentation de la teneur en sucres solubles dans les feuilles du romarin est peut être le résultat d'une dégradation accrue de l'amidon en cours de cette saison (SMITH et *al.*, 1979).

L'accumulation de la proline est une des stratégies adaptatives déclenchées par la plante face aux contraintes de l'environnement (BELKHODJA, 2000). Elle s'accumule durant : le stress hydrique (HUBAC et *al.*, 1980), le stress salin (STEWART, 1980), ainsi sous l'effet des basses et hautes températures [CHU et *al.*, (1978) ; PALEG et *al.*, (1981)].

L'accumulation de la proline durant la saison printanière pourrait être attribuée au développement de la plante pendant cette saison et de ces besoins en composés azotés (LAPLANTE, 2003).

#### 4.2.2. Rendement en huiles essentielles du romarin de l'écotype Blida

Les rendements en huile essentielle du romarin récolté dans la région de Blida (localité de Sidi El Kebir) durant les trois saisons sont représentés dans le tableau 4.24 (figure 4.37).

Tableau 4.24. : Rendement en huiles essentielles de *R. officinalis*

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



Les résultats obtenus montrent que les rendements en HE des deux saisons, l'automne et l'hiver avec respectivement 0.17 % et 0.28 %, sont très faibles par rapport aux normes d'AFNOR (0.5-2%). Nous enregistrons pour la saison printanière, un rendement de 0.76 % plus important et comparable aux normes d'AFNOR .

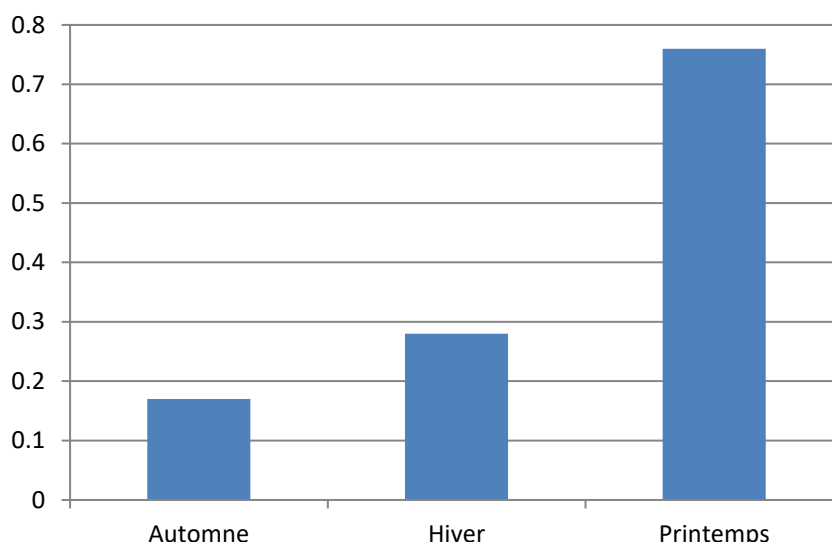


Figure 4.37 : Rendement en HE de *R. officinalis* L. de l'écotype Blida

#### 4.2.3. Effet du facteur saison sur la composition chimique de l'HE de *R. officinalis*

Cette partie consiste à étudier l'effet saisonnier sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L., de la région de Blida, récolté durant les saisons automne, hiver et printemps.

##### 4.2.3.1. Composition chimique de l'HE de la saison automnale

L'analyse chimique montre que le composé majoritaire chez le romarin récolté en automne est l'alcanfor (25.838%) suivi par borneol (18.905%), eucalyptol (17.721%) et 2-pinene-4-one (12.839%) (figure 4.38).

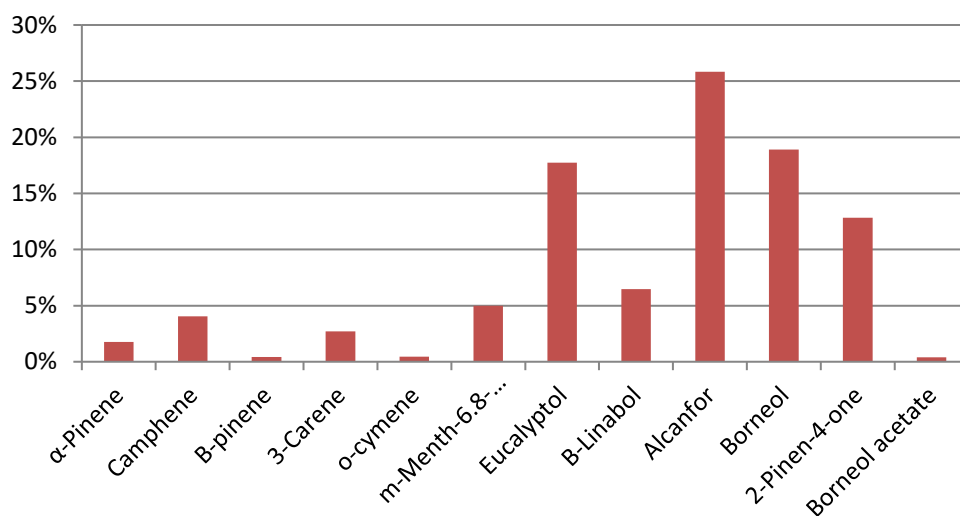


Figure 4. 38 : Principaux composés identifiés en automne (Ecotype Blida)

#### 4.2.3.2. Composition chimique de l'HE de la saison hivernale

Les résultats de l'analyse chimique, obtenus par CG/MS, ont montré que le composé majoritaire chez le romarin récolté en hiver est l'α-Pinene (20.172%), suivi par borneol (17.340%), alcanfor (15.783%) et eucalyptol (11.386%) (figure4.39)

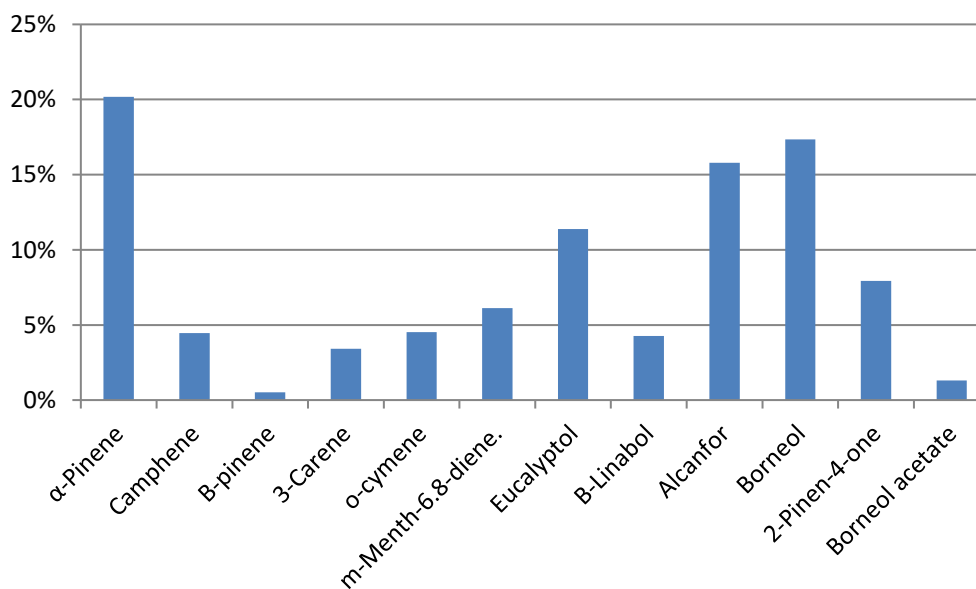


Figure 4.39 : Principaux composés identifiés en hiver (Ecotype Blida)

#### 4.2.3.3. La composition chimique de l'HE de la saison printanière

Pour le romarin récolté au printemps, le composé majoritaire est l' $\alpha$ -Pinene (20.334%) suivi par alcanfor (19.044%), 2-Pinen-4-one (12.077%) et borneol (11.321%) (figure 4.40).

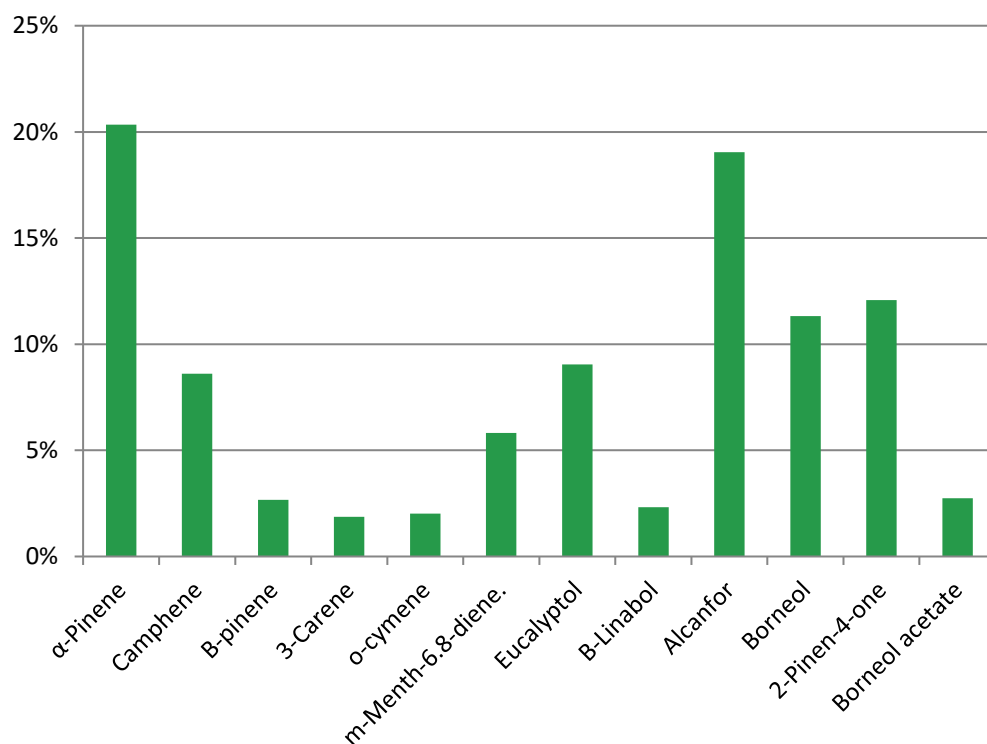


Figure 4.40 : Principaux composés identifiés au printemps

La figure 4.41 regroupe la composition chimique de l'HE effectuée par CG/MS durant les saisons retenues.

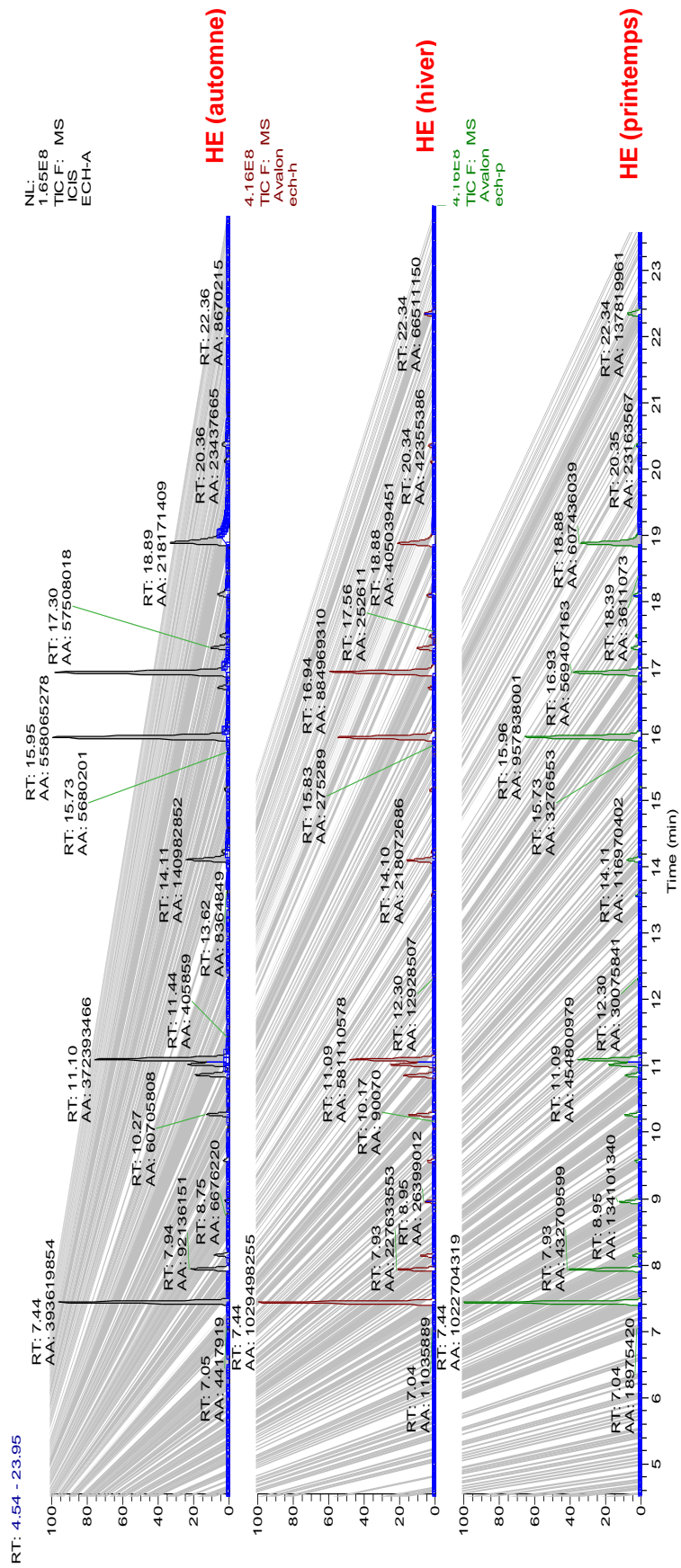


Figure 4.41 : Composition chimique de l'HE du romarin des trois saisons

L'analyse chimique montre que le seul composé stable durant les 3 trois prélèvements saisonniers (automne, hiver et printemps) est le m-Menth-6,8-diène avec respectivement 5 %, 6.11 % et 5.81%.

Nous enregistrons d'après les résultats obtenus que pour les trois HE analysées, l'alcanfor et le borneol sont des composants majoritaires qu'on retrouve durant les trois saisons.

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

Nous constatons que les variations enregistrées dans la composition chimique des HE extraites des plantes durant les différentes saisons de la région de Blida sont quantitatives et non qualitatives car la nature des constituants reste la même, c'est la teneur en composants qui diffèrent selon les périodes de récolte.

La détermination des composés chimiques des HE (majoritaires ou minoritaires), est importante pour les tests à effectuer. En effet, les composés existants nous permettrons de justifier l'efficacité antimicrobienne de nos produits obtenus et de comparer leur pouvoir thérapeutique en fonction de leur composition chimique.

#### 4.2.4. Activité antimicrobienne de l'HE en fonction des saisons

Ayant enregistré une forte activité antimicrobienne vis-à-vis quatre souches sur cinq testées, nous avons jugé utile d'approfondir notre étude sur l'HE du romarin de la localité Sidi El Kebir (Blida) durant les trois saisons : automne, hiver et printemps.

L'activité antimicrobienne de l'HE de *R. officinalis* des trois saisons a été évaluée sur deux bactéries : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

#### 4.2.4.1. Pouvoir antibactérien de l'HE vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

Les HE du romarin de Blida des trois saisons (automne, hiver et printemps) ont inhibé la croissance de *S. aureus* avec respectivement  $16 \pm 1.41$  mm,  $22 \pm 1.41$  mm et  $28 \pm 1.41$  mm.

L'HE extraite au printemps a montré un pouvoir antimicrobien actif ( $>20$ mm) sur *S. aureus* et il est plus important que le pouvoir antimicrobien des HE extraites en automne et en hiver (figure 4.42).

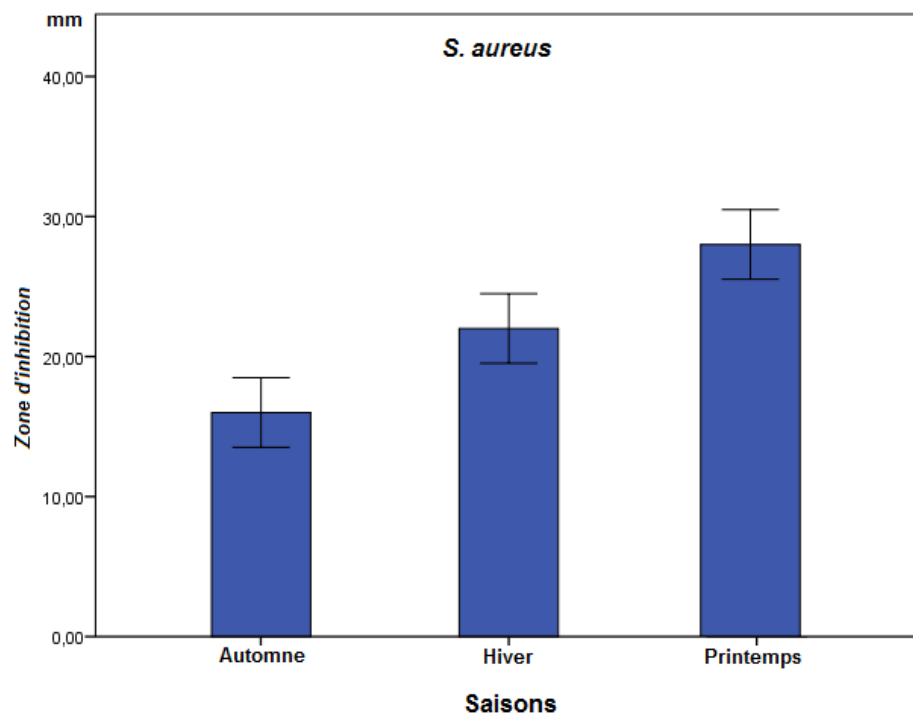


Figure 4.42 : Pouvoir antibactérien de l'HE de l'écotype Blida vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

L'analyse de la variance ANOVA montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P= 0.00 < 0.05$ ) (Annexe C).

Le test de Tukey (tableau 4.25) a classé les moyennes en trois sous-groupes homogènes.

Tableau 4.25 : Diamètres d'inhibition de l'HE de l'écotype Blida vis-à-vis *S. aureus* ( $\alpha=5\%$ ).

	Printemps	Hiver	Automne
<b>Ø d'inhibition (mm)</b>	28.00	22.00	16.00
<b>Groupes homogènes</b>	a	b	c

#### 4.2.4.2. Pouvoir antibactérien de l'HE vis-à-vis *Escherichia coli*

Les résultats montrent que l'huile essentielle du romarin récolté durant les trois saisons (automne, hiver et printemps) présentent une activité antimicrobienne envers *E.coli* avec respectivement  $14.33\pm 1.15$  mm,  $12.67\pm 1.15$  mm et  $12.00\pm 1.15$  mm (figure 4.43)

La souche *Escherichia coli* a montré une sensibilité à l'égard de l'HE des avec des zones d'inhibition très proches. L'HE de l'écotype de Blida extraite en automne s'est avéré la plus active vis-à-vis la souche testée.

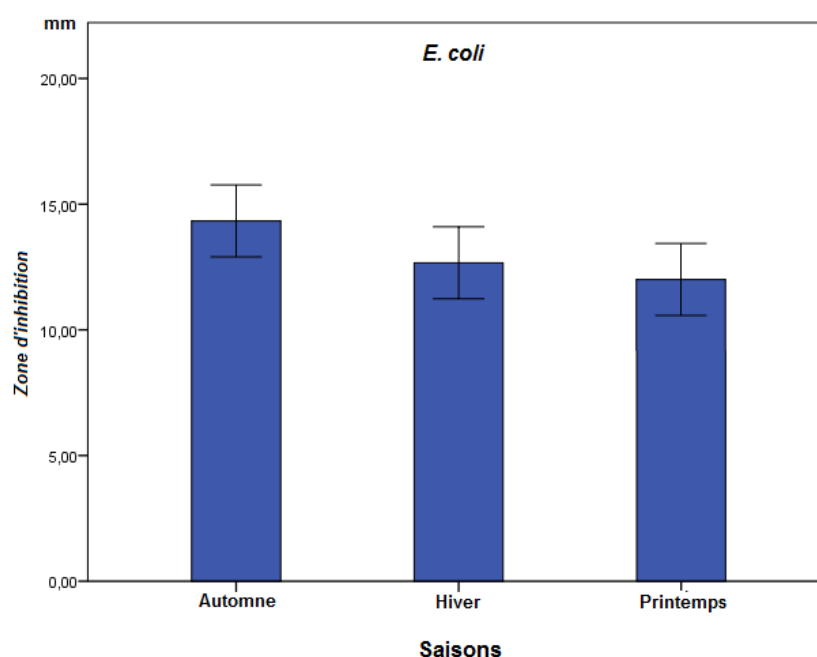


Figure 4.43 : Pouvoir antibactérien de l'HE de l'écotype de Blida vis-à-vis *Escherichia coli*

L'analyse de la variance à un seul critère de classification ANOVA montre qu'il existe une différence non significative ( $P= 0.55 > 0.05$ ) (Annexe C).

Le test de Tukey (tableau 4.26) a classé les moyennes en un seul sous-groupe homogène.

Tableau 4.26 : Diamètres d'inhibition de l'HE de l'écotype Blida vis-à-vis *E. coli* ( $\alpha=5\%$ ).

	Printemps	Hiver	Automne
<b>Ø d'inhibition (mm)</b>	12.00	12.67	14.33
<b>Groupes homogènes</b>	a	a	a

## Discussion

*Staphylococcus aureus* (gram +) est la bactérie la plus sensible aux huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* issues des trois saisons (automne, hiver et printemps) contrairement à *E. coli* (gram -) qui a montré une faible résistance envers les huiles testées.

L'HE extraite des plantes prélevées de la localité de Sidi El Kebir (Blida) au moment de la saison printannière présente une activité antimicrobienne plus élevée que celle extraite des plantes récoltées en automne et en hiver vis-à-vis les souches testées.

Ces résultats sont comparables à ceux de KALEMBA et KUNICKA, (2003) qui signalent que la sensibilité d'un microorganisme à l'huile essentielle dépend des propriétés de l'huile et du microorganisme.

Cette sensibilité peut varier selon le germe testé car une huile essentielle peut être bactéricide vis-à-vis de certaines souches, bactériostatique et n'avoir aucun effet sur d'autres (HERMAL, 1993).



La susceptibilité des bactéries est en effet dépendante du gram (DORMAN et DEANS, 2000), ou dépendante des huiles essentielles utilisées (DEANS et RITCHIE, 1987).

Le mécanisme d'action des huiles essentielles est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries. Elle exerce son pouvoir antimicrobien par son interférence avec la bicouche lipidique de la bactérie grâce à sa propriété hydrophobe, ce qui entraîne l'augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires; l'acidification à l'intérieur de la bactérie, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure; la destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (CAILLET et LACROIX, 2007).

#### 4.2.5. Effet de facteur saison sur l'activité anti-oxydante de l'éco-type Blida

La capacité anti-oxydante de HE et de l'EM de *R. officinalis* L. de la région de Blida est mesurée en termes de capacité de piégeage des radicaux en suivant la réduction de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH qui s'accompagne par un passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) (figure 4.44).

L'intensité de cette couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu fournisseur de protons (MAISUTHIASAKUI et *al.*, 2007).

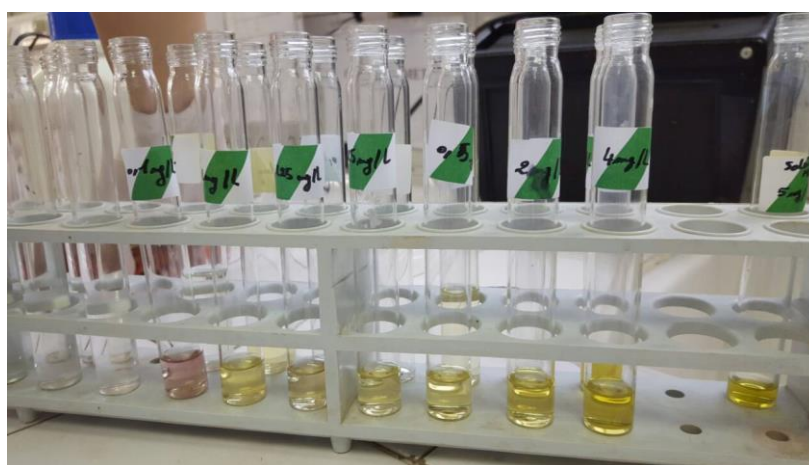


Figure 4.44 : Passage de la couleur violette à la couleur jaune de l'extrait

Afin de mettre en évidence l'activité anti-oxydante des extraits de *R. Officinalis* L. de la région de Blida, récolté durant les phases phénologiques, une courbe d'étalonnage, réalisée par l'acide ascorbique a été tracée (figure 4.45)

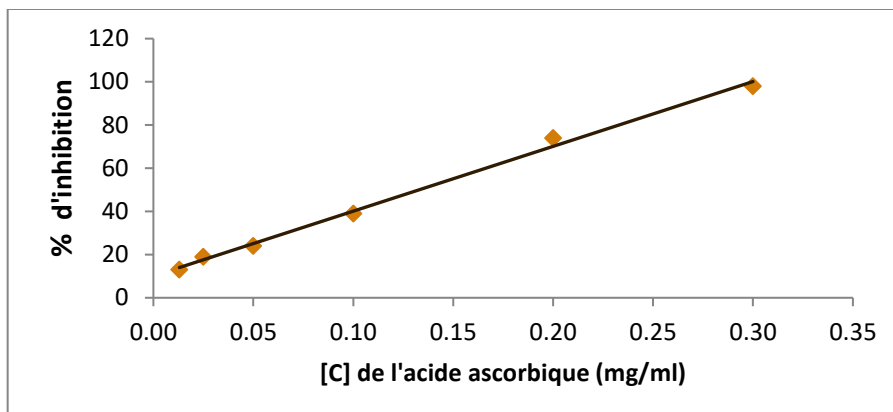


Figure 4.45 : Courbe d'étalonnage (acide ascorbique)

Une réduction de l'absorbance du DPPH en solution est observée avec l'augmentation de la dose des extraits à analyser (HE et EM) et l'antioxydant standard.

#### 4.2.5.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante de l'HE de l'écotype Blida

D'une manière générale, tous les extraits testés ont provoqué une diminution plus ou moins importante de l'absorbance à 516 nm selon leurs concentrations (figures 4.46, 4.47 et 4.48).

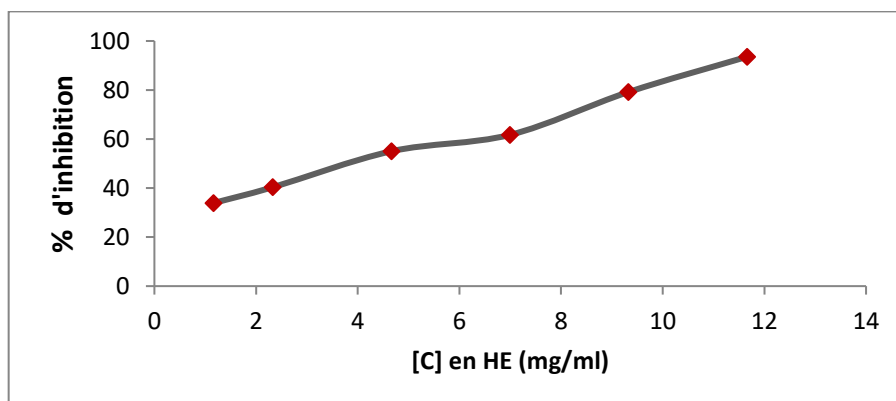


Figure 4.46 : Taux d'inhibition du radical libre DPPH selon les concentrations de l'HE (saison automnale)

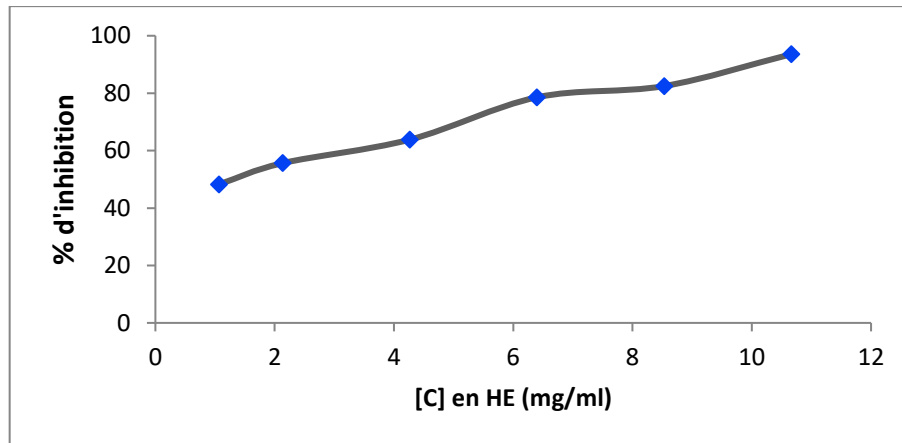


Figure 4.47 : Taux d'inhibition du radical libre DPPH selon les concentrations de l'HE (saison hivernale)

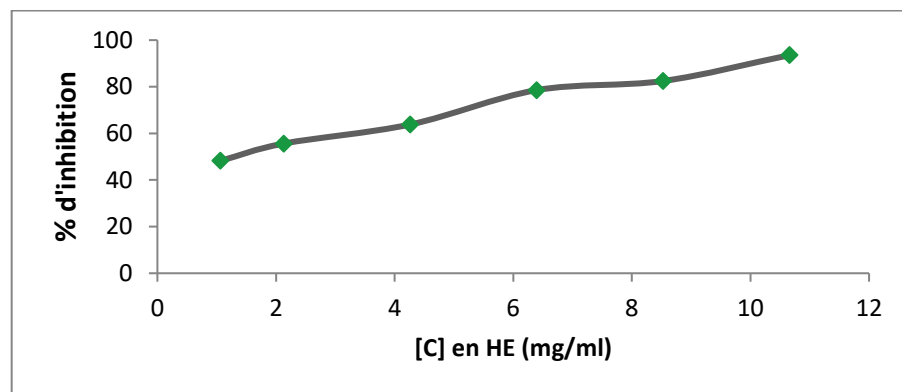


Figure 4.48 : Taux d'inhibition du radical libre DPPH selon les concentrations de l'HE (saison printanière)

Il apparait clairement que l'augmentation de la concentration en l'huile essentielle entraine l'augmentation de l'activité anti-oxydante par le piégeage du radical DPPH. L'HE de l'écotype Blida présente un pourcentage d'inhibition supérieur à 90% à des concentrations de l'ordre de 9.76 mg/ml pour le romarin récolté en hiver, 10.52 mg/ml pour celui récolté en printemps et 11.3 mg/ml pour le romarin récolté en automne.

On remarque que quelque soit la concentration des échantillons testés, l'activité anti-oxydante de l'acide ascorbique (vitamine C) est nettement supérieure à celle de l'huile essentielle (figure 4.49).

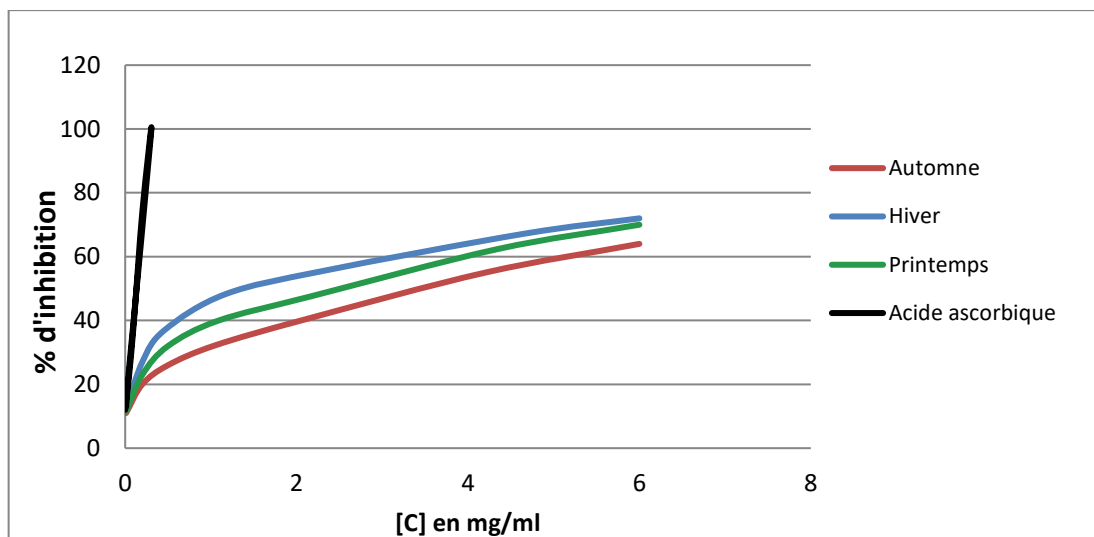


Figure 4.49 : Taux d'inhibition des trois HE comparés à l'acide ascorbique.

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

- Calcul d' $IC_{50}$

La capacité anti-oxydante des huiles essentielles testées est déterminée à partir des  $IC_{50}$ , paramètres couramment utilisés pour mesurer ce paramètre. Il s'agit de la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH dans une période de temps définie. Une valeur faible d' $IC_{50}$  correspond à une activité anti-oxydante plus élevée de l'extrait (PRAKASH et *al.*, 2007).

- Calcul du pouvoir anti-radicalaire (ARP)

Il est inversement proportionnel à l' $IC_{50}$ . ( $ARP=1/IC_{50}$ )

Tableau 4.27 : Pouvoir anti-radicalaire de l'HE de *R. officinalis* (valeurs des  $IC_{50}$ )

	Saisons	$IC_{50}$ (mg/ml)	ARP
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Automne	4.114	0.243
	Hiver	1.096	0.912
	Printemps	2.528	0.395
Acide ascorbique		0.134	7.462

Les valeurs de  $IC_{50}$  pour les trois extraits testés et l'acide ascorbique sont représentées dans la figure 4.50.

L'antioxydant standard (l'acide ascorbique) utilisé à des fins comparatives a montré une activité anti-radicalaire très puissante avec  $IC_{50}$  de l'ordre de 0,134mg/ml.

Les résultats présentés dans la figure 5.28 montrent un  $IC_{50}$  égal à 1.09mg/ml pour la saison d'hiver, 2.52 mg/ml pour la saison de printemps et enfin 4.11 mg/ml pour la saison d'automne

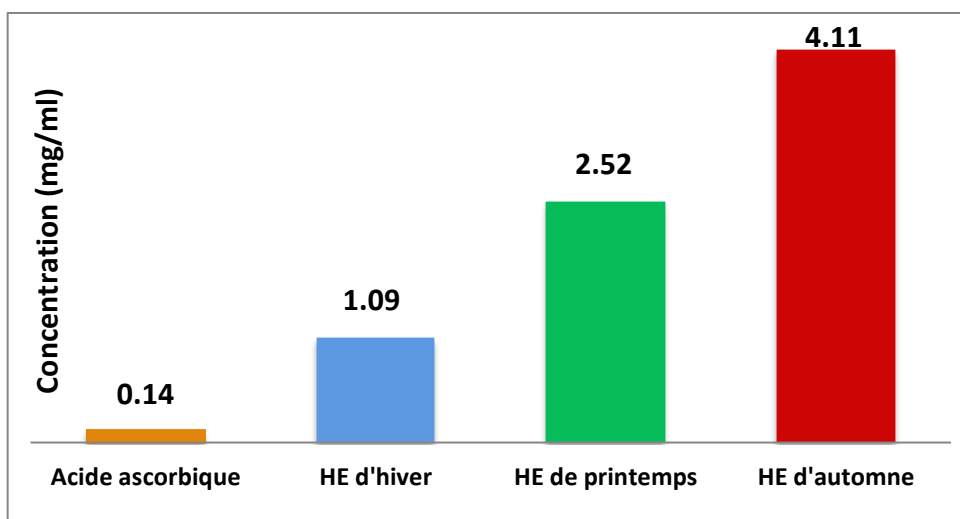


Figure 4.50 : Concentration inhibant 50 % de la réaction.

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

VILLANO et *al.*, (2007) soulignent que cette activité est liée à la présence des composés phénoliques dans l'huile essentielle.

Les études sur la composition chimique des huiles essentielles des plantes aromatiques en relation avec le screening de leurs activités biologiques sont abondantes. Il est établi dans de nombreux travaux que l'activité d'une huile essentielle est en rapport avec les composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre les constituants (VILLANO et *al.*, 2007).

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

#### 4.2.5.2. Evaluation de l'activité anti-oxydante de l'EM de l'écotype Blida

Les résultats obtenus et exprimés en tant que taux d'inhibition, révèlent que les extraits méthanoliques testés sont des anti-radicalaires (figure 4.51).

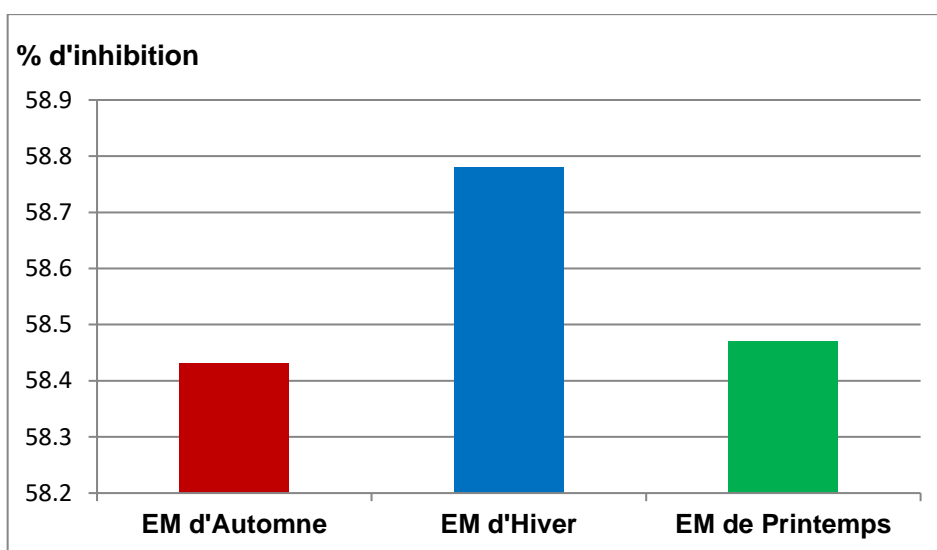


Figure 4.51 : Taux d'inhibition des extraits méthanoliques

L'extrait méthanolique de romarin récolté en hiver présente un taux d'inhibition le plus élevé (58,78%), comparé à celui récolté en automne qui présente un taux plus faible (58,43%).

- Calcul d'IC<sub>50</sub> et ARP

Les paramètres de calcul de l'activité anti-oxydante (IC<sub>50</sub> / ARP) sont résumés dans le tableau 4.28.

Tableau 4.28 : Valeurs des IC<sub>50</sub> et le pouvoir anti-radicalaire de l'EM du romarin

	Saisons	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	ARP
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Automne	0.483	2.07
	Hiver	0.343	2.915
	Printemps	0.484	2.066
Acide ascorbique		0.041	24.038

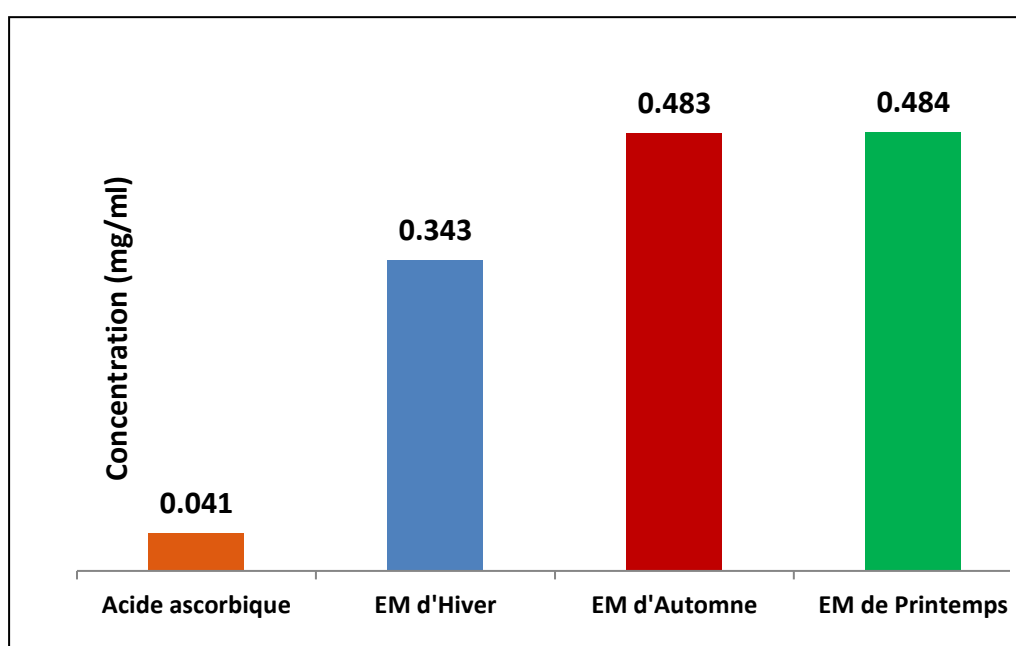


Figure 4.52 : Activité anti radicalaire des extraits méthanoliques de l'écotype Blida exprimée en IC<sub>50</sub>

On remarque que l'activité anti-radicalaire des extraits méthanoliques du romarin reste inférieure en comparaison au contrôle positif, (témoin : acide ascorbique (figure 4.52)).

Les résultats de l'activité anti-radicalaire des extraits du romarin sont en accord avec ceux obtenus par ALMELA et *al.*, (2006). Ces derniers ont constaté que les extraits méthanoliques du romarin ont montré une activité anti-radicalaire, est légèrement faible comparé au témoin (acide ascorbique).

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits des plantes étudiées. Le même constat a été fait par BOUNATIROU et *al.*, (2007); AAZZA et *al.*, (2011) et PRIYA et *al.*, (2012) qui ont signalé que l'augmentation de la concentration des extraits entraîne l'augmentation de l'activité anti-oxydante par le piégeage du radical DPPH.

La diminution de l'absorbance du radical DPPH provoqué par des antioxydants est due à la réaction entre les molécules anti-oxydantes et du radical, qui a comme conséquence le balayage du radical par donation d'hydrogène. Ceci est observée par une décoloration de pourpre au jaune [DUH et *al.*, (1999) ; CHANG et *al.*, (2002) ; GÜLÇİN et *al.*, (2003) ; EBRAHIMZADEH et *al.*, (2015) ]. Le virage vers cette coloration et son intensité dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire (ROLLAND, 2004), celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats comme il est employé pour le criblage des molécules dotées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux [YI, (2008) et NABAVI et *al.*, (2010) ].

Les résultats du test de DPPH sont en accord avec ceux décrits dans la littérature. En effet, le romarin est une plante qui appartient à la famille des Lamiaceae, qui inclut un grand nombre de plantes qui sont bien connues pour leurs propriétés antioxydantes et que la plupart de leurs composants antioxydants ont été identifiés [KIVILOMPOLO, et HYOTYLAINEN (2007) ; TEPE et *al.*, (2006)]. Le romarin fait partie des plantes ayant un pouvoir antioxydant naturel et le plus élevé (PENG et *al.*, 2005), ce dernier est due principalement aux composés phénoliques liés à sa teneur en produits tels que l' $\alpha$ -pinène et 1,8 cinéole et le camphre appartenant à trois groupes : les diterpènes phénoliques, les acides phénoliques et les flavonoïdes (ALMELA et *al.*, 2006).

Selon MONFARED et *al.*, (2011) la différence d'efficacité dépend essentiellement du site de prélèvement et de son étage bioclimatique ainsi que la période de récolte.



#### 4.2.6. Evaluation de l'activité bactéricide de l'HE de l'écotype Blida

Le pouvoir bactéricide de l'huile essentielle de *R. officinalis* L., provenant de la localité Sidi El Kebir (Blida), a été évalué sur une souche bactérienne *Erwinia amylovora*.

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de Blida récolté durant les saisons (automne, l'hiver et le printemps).

Nous constatons que l'augmentation des diamètres d'inhibition est proportionnelle avec l'augmentation des doses. Plus la dose est importante, plus le diamètre est important (figure 4.53).

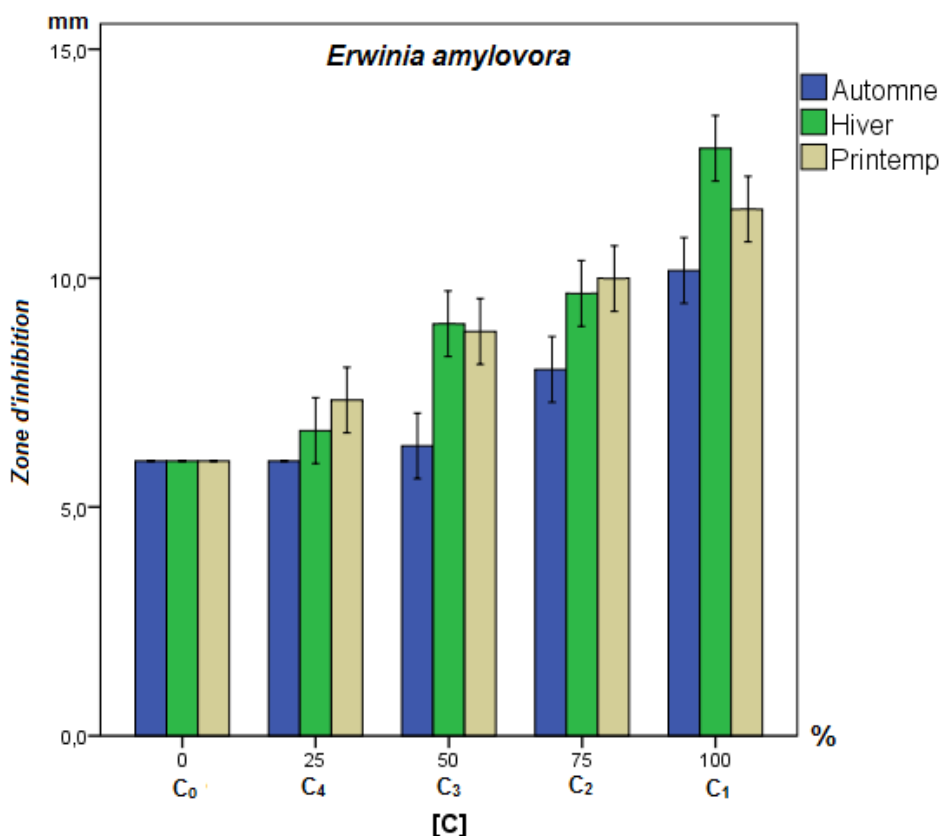


Figure 4.53 : Effet bactéricide de l'HE du romarin de la région de Blida

Les résultats montrent que les zones d'inhibition les plus élevées sont obtenues à la concentration C<sub>1</sub>/ (100%), avec une importante activité enregistrée pour l'échantillon prélevé en période hivernale avec un diamètre d'inhibition de 12.83 mm. La concentration C<sub>2</sub> a montré une activité inhibitrice aussi importante

que C<sub>1</sub> avec 10.00 mm de diamètre suivi par l'échantillon prélevé en hiver avec 9.52mm. L'activité inhibitrice a diminué pour la dose C<sub>3</sub> où l'échantillon prélevé de l'hiver a manifesté la plus importante zone d'inhibition avec 9.00 mm suivi par celui de printemps avec 8.83mm. Enfin la dose C<sub>4</sub> a présenté l'activité inhibitrice la plus faible pour les échantillons prélevés durant les trois saisons (printemps, hiver et automne) avec respectivement : 7.33mm, 6.66mm et 6 mm.

- Concentration C<sub>1</sub>

L'analyse de la variance à double critère de classification MANOVA montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P=0.00<0.05$ ) (Annexe C).

- Concentration C<sub>2</sub>

L'analyse de la variance à double critère de classification MANOVA montre qu'il existe :

- Une différence hautement significative ( $P=0.00<0.05$ ) entre l'automne et les deux autres saisons (hiver et printemps) (Annexe C)..
- Une différence non significative ( $P=0.25>0.05$ ) entre l'hiver et le printemps (Annexe C).

- Concentration C<sub>3</sub>

L'analyse de la variance à double critère de classification MANOVA montre qu'il existe :

- Une différence hautement significative ( $P=0.00<0.05$ ) entre l'automne et les deux autres saisons (hiver et printemps) (Annexe C).
- Une différence non significative ( $P=0.56>0.05$ ) entre l'hiver et le printemps (Annexe C).

- Concentration C<sub>4</sub>

L'analyse de la variance à double critère de classification MANOVA montre qu'il existe une différence significative ( $P= 0.03 <0.05$ ) (Annexe C).

Les résultats concordent avec ceux obtenus par LOPEZ et *al.*, (2005) qui ont testé l'huile du romarin provenant de plusieurs régions de l'Est Algérien : Kherrata (Bedjaia), Boutaleb (Sétif), Bibans (Bourdj Bou-Arridj), Agmeroual et N'gaous (Batna), et Boussaâda (M'sila), où les diamètres des zones d'inhibition n'ont pas dépassé les 20 mm.

Les travaux de plusieurs chercheurs montrent que les bactéries à Gram(-) sont plus résistantes que les Gram(+), ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes [INOUYE et *al.*,(2001), LOPEZ et *al.*, (2005), BOZIN et *al.*, (2006)].,

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence de multiples composés bioactifs dans l'huile essentielle de *R. officinalis* qui influent sur l'activité antimicrobienne [SANTOYO et *al.*, (2006), MILADI et *al.*, (2013)].

Selon DORMANS, (2000), le principal facteur modifiant l'activité antimicrobienne d'HE est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans cette HE.

Selon BOUAOUN et ses collaborateurs (2007), La plupart des composés chimiques des H.E. sont dotés de propriétés antimicrobiennes mais ce sont les composés volatils majeurs notamment les phénols, les alcools et les aldéhydes qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes.

Selon DELAQUIS, (2002), l'activité antimicrobienne de certaines HE pourrait aussi être attribuée à la présence des composés mineurs présents à de faibles taux et qui sont non négligeables tel que carvacrol, myrthénal et géraniol.

Ainsi, les effets antimicrobiens des HE ont été expliqués principalement par la présence des terpènes, les hydroxyles des groupements phénoliques capables de se lier aux sites actifs des enzymes cibles par des liaisons d'hydrogène. Les alcools terpéniques sont connus par leur fort pouvoir antibactérien, dû à leur solubilité dans l'eau, ce qui leur confère une haute habilité à pénétrer les parois des cellules bactériennes (AMMAM, 2014).

#### 4.2.7. Evaluation de l'activité insecticide de l'HE

L'activité insecticide de l'HE du romarin provenant de la localité Sidi El Kebir (Blida) vis-à-vis la mineuse de la tomate, a été évaluée par la détermination du taux de mortalité des larves de *Tuta absoluta* (figure 4.54 )

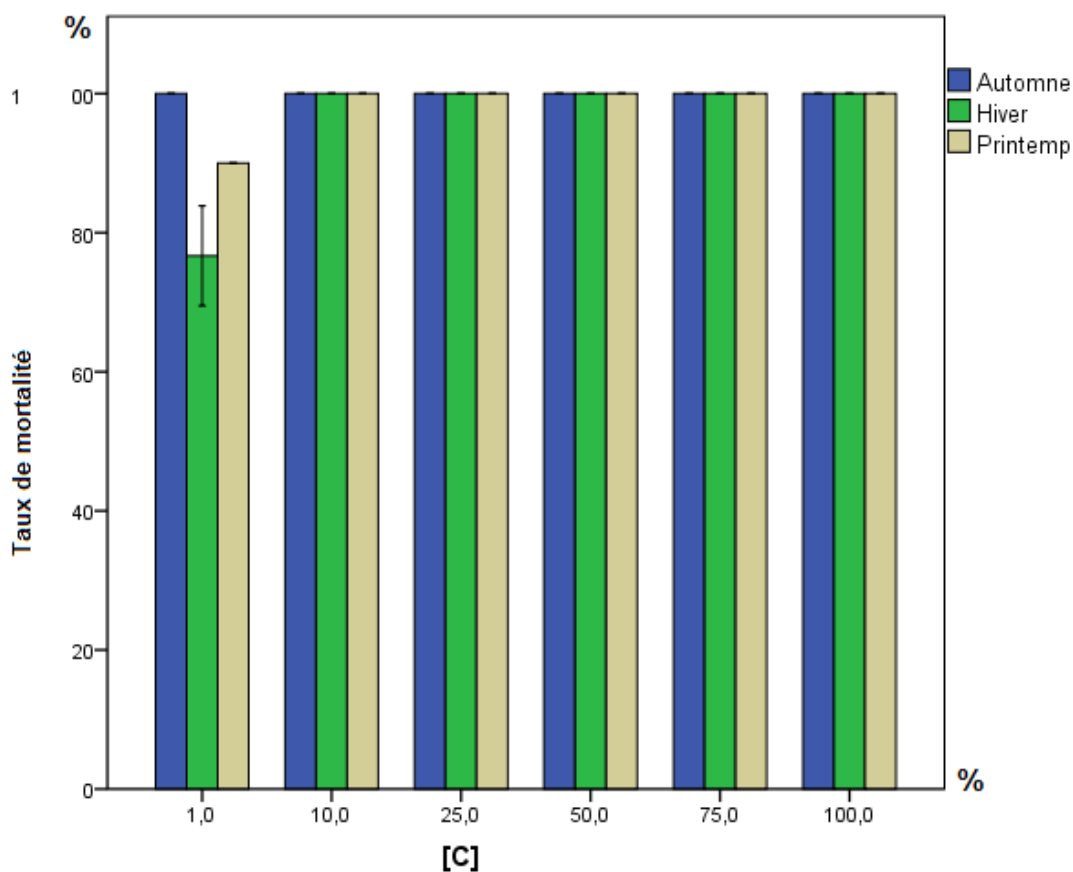


Figure 4.54 : Effet insecticide de l'HE du romarin de la région de Blida

Les résultats montrent que les concentrations C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> et C<sub>5</sub> des trois huiles étudiées ont présenté un taux de mortalité maximal (100%).

L'analyse de la variance MANOVA montre qu'il existe une différence non significative ( $P=1.00 > 0.05$ ) (Annexe C).

La concentration C<sub>6</sub> a montré une activité biocide pour les différentes huiles étudiées, la plus importante a été marquée par l'HE extraite des plantes récoltées en automne (mortalité de la totalité des larves), et la plus faible a été présentée par l'HE extraite des plantes récoltées en hiver avec 75% de mortalité des larves.

L'analyse de la variance MANOVA montre qu'il existe une différence hautement significative ( $P=0.00<0.05$ ) (Annexe C).

Un taux de mortalité élevé par les huiles du romarin de la région de Blida récolté durant les saisons, vis-à-vis les larves de *Tuta absoluta*. Il ressort de ces résultats que l'utilisation des huiles essentielles de *R. officinalis* dans la lutte contre la mineuse de la tomate s'avère efficace et présente un effet biocide important qui varie selon les doses appliqués.

Cette efficacité des huiles essentielles semble être due à l'application du liquide dont la cible la plus exposée est la cuticule des ravageurs, sur laquelle le produit en s'étalant et s'oxydant au contact de l'air finit par former une pellicule qui peut obturer en même temps les orifices respiratoires, perturber, voir même inhiber les échanges respiratoires, comme elle peut occasionner la destruction structurale et biochimique de la cuticule par la déshydratation de la larve. REGNAULT et *al.*, (2002), précisent en montrant que toutes les huiles essentielles ont des propriétés insecticides de différentes actions, aussi bien une toxicité par contact qui provient de la formation d'un film imperméable isolant l'insecte de l'air et provoquant son asphyxie ou une toxicité par inhalation dûe à la richesse de la plante en composés volatils.

Plusieurs études sont en cours pour évaluer l'intérêt des huiles essentielles dans la protection des cultures. On peut citer par exemple celles menées par l'ITAB (Institut Technique de l'Agriculture Biologique) qui, en 2012, a travaillé sur l'inscription de certaines plantes en tant que substances de base.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Un grand nombre des plantes aromatiques et médicinales contiennent des composés chimiques ayant des propriétés antimicrobiennes et anti-oxydantes. L'utilisation de ces molécules à base de plantes aromatiques et médicinales peut présenter de nombreux avantages par rapport aux produits de synthèse actuels. Le facteur environnemental, les conditions climatiques et géographiques qui changent d'une région à une autre ainsi que la période de la cueillette (saison), présentent un effet direct sur les paramètres que nous avons étudié.

Le dosage des paramètres physiologiques et biochimiques des trois écotypes (Blida, Djelfa et M'sila) a révélé l'existence d'une corrélation entre la variation des conditions climatiques (la région) et la réponse des écotypes. L'écotype Djelfa a présenté les teneurs les plus élevées en chlorophylle, proline et sucres solubles avec respectivement : 1.23 µg/ gMF, 0.96 µg/gMF et 3.71 µg/gMF.

L'analyse climatique montre l'existence d'un hiver plus doux à Blida et M'sila comparativement à un hiver plus rigoureux à Djelfa ce qui explique les teneurs élevées en chlorophylles, proline et sucres solubles enregistrées par ce dernier.

Au cours de cette étude, nous avons signalé une différence dans la composition et le rendement en huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* issue des trois régions (Blida, Djelfa et M'sila). Cette différence est probablement due à plusieurs facteurs, tels que la variation des conditions climatiques et édaphiques, les conditions de conservation des échantillons ainsi que la méthode d'extraction.

L'analyse de ces huiles par CG/MS montre que le composé majoritaire commun entre les trois régions : Blida, Djelfa et M'sila, est l' $\alpha$ -pinène avec : 20.33 %, 19.25 % et 10.40% respectivement.

Les résultats montrent que le facteur région influe sur la composition chimique et la composition majoritaire de l'HE du romarin.

La méthode d'aromatogramme a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin vis-à-vis les souches bactériennes testées.

Nous avons constaté que les l'HE du romarin possède une activité antimicrobienne plus importante que l'EM de la même plante, vis-à-vis les souches testées exception *Pseudomonas aeruginosa* qui a montré une résistance envers les deux extraits (HE et EM).

L'HE extraite du romarin de Blida a présenté un pouvoir antimicrobien plus important que celle extraite du romarin de Djelfa. Ce pouvoir est puissant sur : *S. aureus* et *E. faecalis* avec un diamètre d'inhibition : 24 mm et 16 mm respectivement, alors qu'il est moyen sur *B. cereus* (12 mm) et presque nul sur *E. coli* (9 mm).

L'HE et l'EM issus des deux écotypes Blida et Djelfa ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis les bactéries à gram (+) que les bactéries à gram (-).

Le dosage des paramètres physiologiques et biochimiques du romarin de Blida récolté durant les trois saisons (automne, hiver et printemps) a montré l'existence d'une corrélation entre la saison et la réponse de la plante.

Les résultats montrent que les teneurs les plus élevées en chlorophylle, proline et en sucres solubles sont enregistrées chez le romarin récolté en printemps avec respectivement 0.77 µg/ gMF, 0.07 µg/ gMF et 3.31 µg/ gMF.

En effet, les taux d'accumulation des osmolytes durant les différentes saisons peuvent nous indiquer la capacité d'adaptation de la plante étudiée (romarin) aux changements saisonniers.

Le rendement en HE extraite du romarin récolté à Blida durant la saison printanière est supérieur (0.76 %) à ceux enregistrés durant les deux autres saisons : automne (0.17 %) et hiver (0.28 %).

L'analyse chimique montre que la composition chimique des HE extraites des plantes durant les différentes saisons sont quantitatives et non qualitatives car la nature des constituants reste la même, c'est la teneur en composants qui diffèrent selon les périodes de récolte.

Nous constatons d'après les résultats que la détermination de la période de récolte est primordiale en terme de rendement et de qualité de l'HE.

L'HE extraite des plantes récoltées à Blida durant le printemps présente une activité antimicrobienne plus élevée que celle extraite des plantes récoltées en automne et en hiver vis-à-vis les souches testées.

Les résultats ont montré que la sensibilité des micro-organismes est dépendante du germe testé et du gram (positif ou négatif) comme elle peut varier selon les HE extraites de différentes récoltes.

Le résultat du test de DPPH montrent que quelque soit la concentration des échantillons testés (HE et EM) l'activité anti-oxydante de l'acide ascorbique est nettement supérieure à celle des extraits testés. D'une manière générale, les extraits testés ont présenté un taux d'inhibition du radical libre DPPH plus ou moins important.

L'activité anti-oxydante des HE est plus importante que celle des EM extraites du romarin récolté durant les trois saisons (automne, hiver et printemps).

L'utilisation des huiles essentielles de *R. officinalis* dans la lutte contre *Erwinia amylovora* (feu bactérien) s'avère efficace et présente un effet biocide important qui varie selon les doses appliquées et selon les saisons.

Les résultats montrent que les zones d'inhibition les plus élevées sont obtenues à la concentration C<sub>1</sub> (100%), avec une importante activité enregistrée pour l'échantillon prélevé en période hivernale avec un diamètre d'inhibition de 12.83 mm.

La mise en évidence de l'activité insecticide des huiles essentielles de *R. officinalis* dans la lutte contre *Tuta absoluta* (la mineuse de la tomate) a montré



que les concentrations C<sub>1</sub> (100%), C<sub>2</sub> (75%), C<sub>3</sub> (50%), C<sub>4</sub> (25%) et C<sub>5</sub> (10%) des trois huiles étudiées ont présenté un taux de mortalité maximal (100%).

A l'issu de ce travail de recherche, et en vue d'approfondir les résultats obtenus, il est souhaitable d'étudier d'autres provenances en utilisant des techniques plus performantes en vue de mettre en lumière d'autre effets thérapeutiques et biocides du romarin.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AAZZA, S., LYOUSSI, B., & MIGUEL, M.G., «Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds». *Molecules*, 16, (2011), 7672–7690.
2. ABBOTT, WS., «A method of computing the effectiveness of an insecticide » *J. Econ.Entomol* (18), (1925), 265-267.
3. ABED, L., « La plante médicinale de la tradition à la science » Ed. Michel Grancher, France (1997), pp120-140.
4. AFNOR (Association Française de Normalisation) « Huiles essentielles, Echantillonnage et méthode d'analyse » Ed. PARA Graphic, Tome1, (2000), 471 p
5. AFNOR (Association Française de Normalisation) « Monographie relative aux huiles essentielles» Ed. PARA Graphic, Tome 2 – Vol. 1 , (2000), 323p.
6. AFNOR (Association Française de Normalisation) « Monographie relative aux huiles essentielles» Ed. PARA Graphic, Tome 2 – Vol. 2, (2000) ,663 p.
7. AFNOR (Association Française de Normalisation), « Huile essentielle d'ylang-ylang *Cananga odorata* (Lamarck) ». J.D. Hooker et Thomson. Paris. (2005).
8. ALMELA, L., SANCHEZ-MUNOZ, B., FERNANDEZ-LOPEZ, J A., ROCA, M.J, RABE, V., «Liquid chromatographic- mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material». *J Chromatography A*. 1120, (2006), 221- 229.
9. ANGIONI, A., BARRA, A., TUBEROSO, C., «Chemical composition of volatiles in Sardinian myrtle (*Myrtus communis*) alcoholic extracts and essential oils». *J. Agricultural and Food Chemistry*. 54: ( 2006), 1420-1426.
10. ANWAR F., ALI M., HUSSAIN AI. AND SHAHID M., «Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan». *Flavour and Fragrance Journal*, 24: (2009), 170-176.

11. AQUARON, M., « Relation entre les hommes et les plantes médicinales : des pratiques empiriques aux pratiques scientifiques », Conférence du 18/08/2005. Les Causeries en Montagne, Sabenca de la Valéia, Barcelonnette. Site Internet :  
<http://www.hominides.com/html/references/homme-plantes-medicinales.php>
12. ARDESTANI, A., YAZDANPARAST, R., «Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts». *Food Chem.*( 2007);104:21–29.
13. ARNOLD N., VALENTINI G., BELLOMARIA B., LAOUER H., «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: (1997), 167-175.
14. ATIK-BEKKARA, F., BOUSMAHA L., TALEB BENDIAB S.A., BOTI J.B., CASANOVA J. « Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen » *Biologie & Santé* vol. 7, n° 1 (2007). 11p.
15. AUDIGIE CL., DUPONT G. et ZONSZAIN F., « Principe des méthodes d'analyse biochimique », Tome1. Ed. Doin (1982), 144p.
16. AUDIGIE CL., DUPONT G. et ZONSZAIN F., « Principe des méthodes d'analyse biochimique », Tome2. Ed. Doin (1992), 173p.
17. AYADI, S., JERRIBI, C., ABDERRABBA, M., «Extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* cueillie dans trois régions différentes de la Tunisie». *Journal de la Société Algérienne de Chimie* 21(1), (2011), 25-33.
18. AZOUDJ, S., « Valorisation des huiles essentielles de quelques espèces d'*Origanum* et *thymus* spontanées en Algérie ». P.F.E département d'agronomie Blida, (1999), 61p.
19. BAGNAULS, F. et GAUSSEN, H., « Les climats biologiques et leur classification » *Ann. Congr. Fr.*, , 55 : (1957), 193-220.
20. BARAKAT, M., LAIB, I., «Composition chimique et activité anti-oxydante de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* ». *Génie Industriel*, 6., (2011), 46-54.

21. BARDEAU, F., « la médecine par les fleurs ». Ed. Robert Laffont. Paris. (1978), 440p.
22. BAUDOUX, D., ZHIRI, A., «Huiles essentielles chemotypées et leurs synergies». Inspir, , Noisy-Le-Grand,(2009), 88p.
23. BAYDAT, H., SAGDIC, O., OZKAN, G., KARADOĞAN, T., «Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymus and Satureja species with commercial importance in Turkey». Food Contro 15, (2004), 169-72.
24. BELKHODJA, M., «Proline response of faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress». Egypt .J.of Agric.Res., 78 (1), (2000), 185-195.
25. BELLAKHDAR, J., «La pharmacopée marocaine traditionnelle : médecine arabe et savoir populaire ». Ed. Al Biruniya, Rabat, (1997), pp.337-340.
26. BENDJELALI, B., TANTAQUI, E.A., ESMALI-ALAOUI, M., «Méthodes d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé». Plantes Médicinales et Phytothérapie 20, (1986), 155-167.
27. BENHABILES, N.E.H., AÏT-AMAR H., «Comparative study of Algeria's *Rosmarinus eriocalys* and *R officinalis*». Perfumer & Flavorist., 26 (5), (2001), 40-48.
28. BEN HAMIDA, N., ABDELKAFI, M.M., BEN AISSA, R., et CHAABOUNI, M., « extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis cueillie* dans trois régions différentes de la tunisie » Essential Oil Research (13), (2001) ; 295-297.
29. BENHABILES, N.E.H., AÏT-AMAR, H., « Comparative study of Algeria's *Rosmarinus eriocalys* and *R officinalis*.» Perfumer & Flavorist. 2001, 26 (5), 40-48.
30. BENSALEM, M., « Etude comparative de l'adaptation à la sécheresse du blé, de l'orge et du triticales », Ed. INRA, Paris, (1992), colloque n° 64, pp 276-297.
31. BERTRAND, B., «Les secrets de l'Ortie». 7<sup>ème</sup> édition. Editions de Terran (Collection Le Compagnon Végétal; N : 01) : (2010), 128.
32. BESOMBES, C., « Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques », Thèse doctorat université de la rochelle, (2008), 130p.

33. BOUAOUN, D., HILAN, C., GARABETH, F., SFEIR, R., «Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula Boiss*». *Phytothérapie* 5, (2007), 129-134.
34. BOUCHONNET, S. & LIBONG, D., «Le couplage chromatographique en phase gazeuse-spectrométrie de masse». Département de Chimie, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels. Ecole Polytechnique, PALAISEAU Cedex, (2002).
35. BOUDJOUREF, M., «Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris L.* ». Thèse de Magister en Biochimie. Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie., (2011), 99 p.
36. BOUNATIROU, S., SMITI, S., MIGUEL, M.G., FALEIRO, L., REJEB, M.N., NEFFATI, M., COSTA, M. M., FIGUEIREDO, A.C., BARROSO, J.G., & PEDRO, L.G., «Chemical composition, antioxydant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus Hoff.* Et Link». *Food chemistry*, (2007), 105: 146-155.
37. BOURGOU, S., KSOURI, R., SKANDRANF, I., CHEKIR-GHEDIRA L., MARZOUK B., «Antioxidant and antimutagenic activities of the essential oil and methanol extract from Tunisian *Nigella sativa L.*(Ranunculaceae) » .*Ital. J. Food Sie.*, 20(2): (2008),191-201.
38. BOUSBIA, N. « Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires ». Thèse. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger.(2011). 128p.
39. BOUTEKEDJIRET, C., BENTAHAR, F., BELABBES, R., BESSIÈRE, J.M., «The essential oils from *Rosmarinus officinalis L.* in Algeria, *J.Essent. Oil Res.* (1998), 10, 680-682.
40. BOUTEKEDJIRET, C., BELABBES, R., BENTAHAR, F., BESSIÈRE, J.M., «Study of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil and composition as a function of the plant life cycle», *J. Essent. Oil Res.* (1999), 11, 238-240.
41. BOUZID, A., CHADLI, R., BOUZID, K., «Etude ethnologique de la plante médicinale *Arbutus unedo L.* dans la région de Sidi Bel Abbès en Algérie occidentale » *Phytothérapie*, V.15 (2017), 373-378.

42. BOZIN, B., MIMICA-DUKIC, N., SIMIN, N., ANACKOV, G., «Characterization of the volatile composition of essential oil of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils». *J. Agric. Food Chem.* 54: (2006), 1822-1828.
43. BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, ME., BERSET, C., «Use of free radical method to evaluate antioxidant activity». *Lebensm Wiss Technology*. V. (28), (1995), 25-30.
44. BRAVO, L., « Polyphenols : Chemistry, Dietary sources, Métabolism and Nutritional significance » *Nutrition Reviews* 56, (1998), 317-333.
45. BRUNETON, J., « Pharmacognosie, Plantes médicinales » 2<sup>ème</sup> éd. Paris, (1993), 464p
46. BRUNETON, J., « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales ». 2<sup>ème</sup> Ed Dunod Paris, (1999), 274 p.
47. BURT, S., A., «Des huiles essentielles, leurs propriétés antibactériennes et applications dans les aliments-Un examen». *Journal International de Microbiologie des Aliments*, 94, (2004), 223-253.
48. BOUCHIKHI, T., «Activité antimicrobienne de quelques huiles essentielles». Thèse de doctorat d'État : Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand (France) (1994).
49. CAILLET, S., & LACROIX, M., «Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire». Inrs-Institut Armand-Frappier, Resala, (2007), 8p.
50. CAVALLI, J-F., «Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de Doctorat de l'Université Pascal Paoli, de Corse, (2002), 260p.
51. CHANG, S.T., CHEN, P.F., CHANG, S.C., Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloem*. *J. Ethnopharmacol* 77, (2001), 123-127.
52. CHANG, L.W., YEN, W.J., HUANG, S.C., DUH, P.D., «Antioxidant activity of sesame coat». *Food Chemistry* 78,( 2002), 347–354.
53. CHU, T.M., JUSAITIS, M., ASPINALL, D., PALEG, L.G., «Accumulation of free proline at low temperatures». *Physiol Plant*, 43, (1978), 254-260.

54. CLIFFORD, S.C., ARNDT, S.K., CORLETT, J.E., JOSHI, S., SANKHLA, N., POPP, M., JONES, H.G., «The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.)». *J Exp Bot.* (1998), 967–977.
55. CORNIC, G., GHASHGHAIE, J., «Effect of temperature on net CO<sub>2</sub> assimilation and photosystem II quantum yield of electron transfer of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves during drought stress». *Planta* 185, (1991), 255-260.
56. COUTOULY, G., KLEIN, E., BARBIERI, E., et KRIAT M., «Travaux dirigés de biochimie, biologie moléculaire et bioinformatique, Biosciences et techniques». Ed. Doin. (2006), 346 p.
57. COWAN, M.M., «Plant products as antimicrobial Agents». *Clin .Microbiol.Rev.* (1999), 12 p
58. CRISTIANI M., D'ARRIGO M., MANDALARI G., CASTELLI F., SARPIETROM.G. & MICIELI D, «Interaction of four monoterpenes contained in essential oils», *J. Agric .Food Chem.* 55 (15), ( 2007), 6300–6308.
59. CUVELIER M.E., RICHARD H. et BERSET C., «Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary » *J. Am. Of Chem. Soc.* Vol. 73, (1996 ), pp. 645-665.
60. DAMYEH, M., NIAKOUSARI, M., «Impact of ohmic-assisted hydrodistillation on kinetics data, physicochemical and biological properties of *Prangosferulacea* Lindle. essential oil: Comparison with conventional hydrodistillation». *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, (2016), 387-396.
61. DAVIDSON, P., «Antimicrobials in foods», Ed. Marcel Dekker-New York, (1993), 647p.
62. DEANS S.G. & RITCHIE G., «Antibacterial properties of plant essential oils». *International Journal of Food Microbiology*, 5 (2): (1987), 165-180.
63. DE BILLERBECK, V.G., ROQUES, C., VANIERE, P. & MARQUIER, P., «Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huile essentielle». *Hygiène* (Revue officielle de la société française d'hygiène hospitalière), 10, (2002), 248-251.

64. DEGRYSE, A.C., DELPLA, I., ET VOINIER, M.A., « Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles ». Atelier santé environnement, École des hautes études en santé publique, (2008), 94 p.
65. DELAQUIS, «Microbial dynamics and interactions in the spermosphere». *Ann. Rev. Phytopathol.*, 42, (2002), 271-309.
66. DELHAYE, R., LE HOUEROU, H.N. et SARSON, M., « L'amélioration des pâturages et de l'élevage dans le Hodna (Algérie) ». *Rapp. Techn. No. 2*, FAO, Rome (1974), 115 p.
67. DELLARAS, C., «Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire». *Technique et Documentation*. Lavoisier, Paris, (2007), 654p.
68. DIALLO, A., «Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *syzygium guineense* WILLD(MYRTACEAE)». Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako : (2005), 13-14.
69. DIAS, P.C., FOGLIO, M.A., POSSENTI, A., DE CARVALHO, J.E. « Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L." *Enthnopharmacol*, 69, (2000), 57-62.
70. DJELLOUL DAOUADJI, S., « Detection de Biofilm à Staphylocoques sur Catheters Veineux». Thèse de Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie, (2010), 77 p.
71. DJENANE, D., MEDDAHI, A. & RONCALES, P., «Les systèmes antioxydant et antimicrobien pour la conservation de la viande». *Sciences des Aliments*, 26, (2006), 37-73.
72. DORANTES, L., COLMENRO, R., HERNANDEZ, H., MOTA, L., JARAMILLO, M.E., FERNANDEZ, E. & SOLANO, C., «Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts». *International Journal Food Microbiology*, 57, (2000), 125-128.
73. DORMAN, H.J. & DEANS, S.G., «Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils». *Journal of Applied Microbiology*, 88 (2), (2000), 308-316.
74. DREUX, P., « Précis d'écologie » Ed. Presses Univ. France, Paris (1980), 232p.



75. DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., RBERS, P.A. & SMITH, E., « Colorimetric method for determination of sugar and related substances », *Allal. Chem.*, 28, (1956), 350-356.
76. DUH, P.D., TU, Y.Y., YEN, G.C., «Antioxidant activity of water extract of HarugJyur (*Chrysanthemum morifolium Ramat*)» *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 32, (1999), 269–277.
77. EBRAHIMZADEH, M. A., GHAREKHANI, M., GHORBANI, M. & DARGANY, P., «Effect of Extract of Aerial Parts of *Urtica dioica* (Urticaceae) on the Stability of Soybean Oil». *Trop. J. Pharm. Res.*,14 (1) (2015), 125-131
78. EL GHAROUS, M., KARROU, M. ET EL MOURID M., « Acquis et perspectives de la recherche agronomique dans les zones arides et semi-arides du Maroc Esthétique », Ed. Elsevier Masson, (2009), 500p.
79. EMBERGER. L., «Remarques critiques sur les étages de la végétation dans les montagnes Marocaines ». *Bull. Soc. Bot. Suisse* (1955) 46, 614-631.
80. FAID M., CHARAL M. MOSADDAK M., «Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth». *J. Essent. Oil Res* 8, (1996), 657-664.
81. FALLEH, H., KSOURI, R., CHAIEB, K., KARRAY-BOURAOUI, N., TRABELSI, N., BOULAABA, M., ABDELLY, C., « Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities». *Comptes Rendus de Biologie* 331, (2008), 372-379.
82. FAVIER, A., «Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique». *l'actualité chimique - novembre-décembre*, (2003), 108-115.
83. FERNANDEZ, X., CHEMAT, F., «La chimie des huiles essentielles : Tradition et innovation». *Vuibret*, (2012), 274p, France.
84. FERY-HUE, F., « Le romarin », un traité manuscrit anonyme à travers l'Europe médiévale. *Besançon : s.n.*, (juin 2005). P. 1, Colloque
85. FRANCIS, M., « Cooper enzymes in isolated plantes », *plant physiol*, 24, (1970), pp 1-15.
86. FRIEDMAN, J., «Folding of newly translated in-vitro : the role of molecular chaperons ». *Annu. Rev. Biochem*, 70 : (2001), 603-47.

87. GAGNON C., «Le patriarche des optimiseurs : le romarin». (2005), 1-2.
88. GAMET-PAYRASTRE, L., MANENTI, S., GRATACAP, M-P., TULLIEZ, J., CHAP, H., PAYRASTRE, B., «Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase». *Gen Pharmacol*, 32: (1999), 279–286
89. GARNIER G., BEZANGERBEAUQUESNE L., DEBRAUX G., «Ressources médicinales de la flore française». Ed. Vigot Frères .Tome II., (1961), Paris.
90. GAVRILOVIC, M., MAGINOT, M.J. et WALLACH, J., «Manipulations d'analyse biochimique Biosciences et techniques». Ed. 3 Doin. (1996), 453 p.
91. GONZALEZ, A. G ; ESTEVEZ-BRAUN, A., « Coumarins », *Nat. Prod. Reprod*, 14 : (1997), p 465- 475.
92. GUBA, R., «Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential». *International Journal of Aromatherapy*, 11, (2001), 76-83.
93. GUERIN-FAUBLEE, V., & CARRET, G., «L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites». Journées Nationales GTV- INRA, (1999), 5-12.
94. GUINOCHET, M., « Phytosociologie ». Masson éd. Paris (1973), 227 p.
95. GÜLÇİN, I., UĞUZ, M.T., OKTAY, M., BEYDEMİR, S., KÜFREVIÖĞLU, Ö.İ., «Antioxidant and antimicrobial activities of *Teucrium polium* L.». *Journal of Food Technology* 1, (2003) , 9–17.
96. GUSTAFSON, JE, LIEW, YC, CHEW, S, MARKHAM, JL, BELL, HC, WYLLIE, SG, WARMINGTON, JR., «Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*.Lett». *Appl. Microbiol.* 26: (1998), 194-198.
97. GUY, G., « Les plantes aromatiques et huiles essentielles à grasse». S.I. : Harmattan, (2005), pp. 85-93.
98. HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C., «Free radicals in biology and medicine». Oxford university press (fifth edition), (2007), 29p.
99. HARRAR A.E.N., «Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L.». Thèse de Magister Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie. (2012), 73 p.
100. HART, T., et SHEARS, P., «Atlas de poche de microbiologie». *Medicine-sciences*. Lavoisier, (1997), 314p.

101. HEINRICH, M., KUFER, J., LEONTI, M., PARDO-DE-SANTAYANA, M., «Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences». *J Ethnopharmacol.* 107, (2006), 157-160.
102. HEMWIMON, S., PAVASANT, P., & SHOTIPRUX, A., «Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*». *Separation and Purification Technology*, 54, (2007), 44-50.
103. HERMAL C., «Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles». Thèse, Faculté de pharmacie, Université Montpellier I. (1993), 87 p.
104. HERNANDEZ-OCHOA, L.R., « Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné " Solvant/ Actif " D'origine végétale », Thèse de Doctorat, Institut National Polytechniques de Toulouse. France (2005), 124p.
105. HIKOSAKA, K., ISHIKAWA K., BORJIGIDAI, A., MULLER, O. & ONODA, Y. «Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. *J. Exp. Bot.* (2006), pp : 291-302
106. HOPKINS, W. G., « Physiologie végétale ». 2<sup>ème</sup> édition américaine, de Boeck et Lancier S A, Paris: (2003), 514.
107. HOSTETTMANN, K., «Tout savoir sur le pouvoir des plantes sources de médicaments». Lausanne, édition Favre S A, vol. 01, (1997), 239 p.
108. HUANG, H.S., CHANG, L. H., JONG, T. T., NIEN, Y. F. & CHANG, C. M. J., «Supercritical carbon dioxide extraction of turmeric oil from *Curcuma longa* Linn., and purification of turmerones». *Separation and Purification Technology.* 47, (1995), 119-125.
109. HUBAC, C., VIEIRA, DA SILVA, J., «Indicateurs métaboliques de contraintes mésologiques». *Physiol. Vég.* 18, (1980), 45-53.
110. HUSSAIN AI., «Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae». Thèse de Doctorat. Pakistan. (2008), 257p.
111. INOUIE S., TAKAZAWA T. AND YAMAGUCHI H., «Antimicrobial activity of the essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact» . *Journal of Antibacterial Chemotherapy.* 47: (2001) , 565-573.

112. ISERIN, P., MASSON M., RESTELLINI, JP., YBERT, E., DE LAAGE DE MEUX A., MOULARD F., ZHA Z., DE LA ROQUE R., DE LA ROQUE O., VICAN P, « Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins », Larousse, (2001), 10-12.
113. JASET-DONGMO P.M., TATSADJIEU N.L., TCHINDA SONWA E., KUATE J., AMVAM ZOLLO, P.H., & MENUT, C., «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, (2008), 4045-4050.
114. JOLI, B., et REYNAUD, A., «Entérobactéries : Systématique et méthode de diagnostic». Technique et Documentation. Lavoisier, Paris, (2002), 392 p.
115. KALEMBA, D., et KUNICKA, A., «Antibacterial and antifungal properties of essential oils». *Current Medicinal Chemistry* 10, (2003), 813-829.
116. KARAMAN, S., DIGRAK, M., RAVID, U. & IICIM, A., «Antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Thymus revolutus* Celak from Turkey». *J. Ethnopharmacol* 76, (2001), 183-186.
117. KASPAREK M. et AL-JANABI S., « Plantes médicinales. La diversité biologique au service de la santé ». 5-6 (Germany Technical Coopération GTZ) (2008).
118. KING, E.O., WARD, M.K. & RANEY, D.E., “ Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein”. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* (44) (1954), 301-307.
119. KIVILOMPOLO, M., HYOTYLAINEN, T., «Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of *Lamiaceae* herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids». *J. Chromatography A*. 1145, (2007), 155-164.
120. KOKA, K., SANDA, K., RAYNAUD, C., NENONENE, Y.A., MILLET, J. & CHAUMONT J.P. «Activities antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. Vis-à-vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie». *Annales de Médecine Vétérinaire*, 148, (2004), 202-206.
121. KOECHLIN-RAMONATXO, C., «Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans

- les maladies respiratoires». *Nutrition clinique et métabolisme*, 20, (2006),165–177.
122. KUDA, T., IWAI, A., & YANO, T., « 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, (2004), 1695-1700.
123. KURITA N., KOIKE S., «Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components». *Agric. Biol. Chem* 46, (1982),159-165.
124. LAHSISSENE H., KAHOUADJI A., TIJANE M. & HSEINI S. « Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër –Maroc occidental » *Lejeunia, Revue de Botanique - N° 186*, (2009), 27p.
125. LAOULAR, M., « Evaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. Cas des espèces négligées et sous utilisées ».( 2003), p. 25. Projet ALG/97/G31 PNUD.
126. LHUILLIER, A., « contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* HOOK., *AGAURIA polyphylla* baker (*Ericaceae*), *Tambourissa Trichophylla* BAKER (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* BAKER (*Myrsinaceae*)» .Thèse doctorat. L'Institut National Polytechnique de Toulouse, (2007), 200p.
127. LOGGINI, B., SCARTAZZA, A., BRUGNOLI, E. et FLAVIA NAVARI-IZZO, «Antioxidative Defense System, Pigment Composition, and Photosynthetic Efficiency in Two Wheat Cultivars Subjected to Drought». *Plant Physiology*, Vol., 119, (1999), 1091–1099.
128. LOGRADA, T., RAMDANI, M., CHALARD, P., «Caractéristique of essential oils of *Rosmarinus officinalis* from eastern Algeria», *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, 2, (2014), 794-807.
129. LOPEZ, P., SANCHEZ, C., BATLLE, R., NERIN, C., «Solid and vapor phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected food borne bacterial and fungal strains». *J. Agric. Food Chem.* 53, (2005), 6939- 6946.
130. LUCCHESI, M.E., «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, (2005), 143p.
- 131.LUGASI, A., HOVARI, J., SAGI, K. V. and BIRO, L., «The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases». *Acta Biologica Szegedensis*.1-4: (2003), 119-125.
- 132.MAATAOUI, BS., HMYENE, A., HILALI, S., «Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*)». *Lebanese Science Journal*. (1), (2006), 3-8.
- 133.MAFFEI, M., & SACCO S., «Perfumer and flavorist», *Flavour and Fragrance Journal*.13, (1997), 60-61.
- 134.MAISUTHISAKUL, P., PASUK, S., RITTHIRUANGDEJ, P., «Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J Food Composition and Analysis*, (2008), 21: 229-240.
- 135.MALECKY, M., «Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins». *Thèse de Doctorat de l'institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro. Paris,Tech.)*, (2007). 207p.
- 136.MARKOWICZ BASTOS, D. H., SALDANHA, L. A., CATHARINO, R. R., SAWAYA, A.C.H. F., CUNHA, I B. S., CARVALHO, P. O. EBERLIN, M. N., «Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts». *Molecules*. 12, (2007), 423-432.
- 137.MARTIN, P., GAGNARD, J., ET GAYTIER, P., « Plant analysis as guide the nutrient requirement of temperate and tropical corps », Ed. Lavoisier, Paris, (1987), 122p.
- 138.MEJLHOLM, O., & DALGAARD, P., «Antimicrobial effect of essential oils on seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products». *Letters in Applied Microbiology*, 34, (2002), 27-31.
- 139.MILADI H., BEN SLAMA R., MILI D., ZOUARI S., BAKHROUF A., AMMAR E., «Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science*. 5(6): (2013), 729-739.

140. MILLER, N., «Expression d'une thermotolérance au niveau de la fonction du photosystème II». Mémoire présenté à l'université du Québec pour la maîtrise en biophysique, (1993), 159p.
141. MOHAMMEDI Z. «Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant de quelques plantes de la région de Tlemcen». Thèse de magister. Option. Université ABB. Tlemcen. Algérie, (2006). 105p.
142. MONFARED, M., KAMKAR, A., KHALIGH, S. G., JAVAN, A. J., ASADI, F. & BASTI, A. A., « Antioxidative effects of *Iranian urticadioica* L. extracts on the oxidation of sunflower oil». *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (18), (2011), 4438-4445.
143. MONNEVEUX, P., ET NEMMAR, M., « Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* desf.) : étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. . *Agronomie*. 6, (1986), 583-590.
144. NABAVI, S.F., EBRAHIMZADEH, M.A., NABAVI, S.M. & ESLAMI, B., «Antioxidant activity of flower, stem and leaf extracts of *Ferula gummosa* Boiss». *Grasas y Aceites*, 61(3), (2010), 244- 250.
145. NAZLI N, B., « Etude des huiles essentielles de quelques plantes Algériennes caractéristiques chimiques et valorisation agronomique ». Thèse Magistère en sciences agronomiques INA, (2003), 128 p.
146. NEWMAN D.J., CRAGG G.M., «Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010». *J. Nat. Prod.* Vol. (75): (2012), 311-335.
147. NOGARET-EHRHART AS., «La phytothérapie Se soigner par les plantes». Edition Eyrolles, (2003), 19-36
148. OMIDBEYGI, M., BARZEGAR, M., HAMIDI, Z., & NAGHDIBADI, H., «Antifungal activity of tyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus xavus* in liquid medium and tomato paste», *Food Control*, 18, (2007), 1518-1523.
149. OURAINI, D., AGOUMIL, A., ISMAILI-ALAOUI, M., ALAOUI, K., CHERRAH, Y., AMRANI, M. & BELLABAS, M.A., «Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermaphytes», *Phytothérapie*, 4 , (2005), 147-157.

150. OUSSALAH, M., CAILLET, S., SAUCIER, L., & LACROIX, M., «Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* *Journal of Food Protection*, 69 (5), (2006), 1046-1055
151. OUSSOU K.R., COFFI K., NATHALIE G., SERIYOLOU, GERARD K., MIREILLE D., YAO T.N., GILLES F. & JEAN-CLAUDE C.H. «Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire». *Comptes Rendus de Chimie*, 7, (2004), 1081-1086.
152. PALEG, L.G., DOUGLAS, T.J., VAN DALI, A., KEECH, D.B., «Proline, betaine and other organic solutes protect enzymes against heat inactivation. *Aust. J. Plant Physiol*, 8, (1981), 107-114.
153. PAOLINI, J., «Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et deux *Asteraceae* Endémiques de Corse: *Eupatorium cannabinum subsp. Corsicum* et *Doronicum Corsicum*». Thèse de Doctorat de l'Université de Corse. France, (2005), 333 p.
154. PAULI, A., «Antimicrobial properties of essential oil constituents». *International Journal of Aromatherapy*, 11, (2001), 126-133.
155. PEEKING A., PICAND B., HACENE K., LOKIEC F., GUERIN P., «Oligomères procyanidoliques (Endotélon) et système lymphatique. Artères et Veines». Publications médicales AGCF. Vol. (6): (1987), 512-513
156. PERON J.Y., « Références productions légumières », 2. S.I. : Lavoisier, (2006), 560-563.
157. PENG, Y., YUAN, J., LIU, F., YE, J., «Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection». *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39, (2005), 431-437.
158. PERROT, E., « les plantes médicinales ». Ed. René. Paris (1971), 245p.
159. Pharmacopée européenne. 4<sup>ème</sup> édition. Conseil de l'Europe. Strasbourg, 2002. 2060p.
160. PIBIRI, M.C., « Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle ». Thèse de Doctorat. Polytechniques Fédérale de Lausanne, (2006), p.161 .



161. PIOCHON, M., « Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada (2008), 200p.
162. PONCE, A.G., FRITZ, R., DEL VALLE, C. & ROURA, S.I., «Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard». *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 36, (2003), 679-684.
163. POOLE, K., «Multidrug resistance in Gram-negative bacteria». *Current Opinion in Microbiology* 4, (2001), 500-508.
164. POPOVICI, C., SAYKOVA, I., TYLKOWSKI, B. «Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par réactivité avec le radical libre DPPH». *Revue de Génie Industriel*. (4), (2009), 8p.
165. POTEL, A -MA ., «Les plantes médicinales au Sénégal (commune de Nguékokh, zone de la Petite Côte) ». Extraits du rapport du stage, sciences naturelles, effectué à Nguekokh, (2002), 22p
166. POUGET, M., «les relations sol-végétation dans les steppes sud-algéroises », Ed. O.R.S.T.O.M. Paris (1980) , 555p.
167. PRAKASH, D., SURI, S., UPADHYAY, G., AND SINGH, B.N., «Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants». *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 58, (2007), 18-28.
168. PRIYA, R., PRATHAPAN, A., RAGHU, K. G., & MENON, A. N., «Chemical composition and in vitroantioxidative potential of essential oil isolated from *Curcuma longa* L. leaves», *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7, (2012), 695-699.
169. QUEZEL, P., et SANTA, M., « Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales » Ed. CNRS. Paris (1962), 1170 p.
170. QUEZEL, P. et MEDAIL, F., « La région circumméditerranéenne, Centre mondial majeur de biodiversité végétale. Institut Méditerranéen d'Ecologie et de la Paléoécologie ». France, (1995), 152-55.
171. REGNAULT-ROGER, C., PHILOGENE, B.J.R et VINCENT C., «Biopesticides d'origine végétale. Edition Tec et Doc. (2002), 337p.

172. REGNAULT-ROGER, C., VINCENT, C., THOR ARNASON, J., « Essential oils in insect control: low-risk products in a highstakes world». *Annual Review of Entomology*, Vol. 57, (2012), 405-424.
173. ROBERT-DEMUET, S., «Méthodes de dilutions. In Antibiotiques et antibiogrammes». Montréal-Canada. (1995), 131-137.
174. ROLLAND, Y., «antioxydants naturels des végétaux», *Review*.11, (2004), 1-6.
175. ROUX, D., « Conseil en aromathérapie ». 2ème édition, *Pro-Officina*, (2008), 187p.
176. SAAD, N.Y., MULLER, C.D., LOBSTEIN, A., « Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components », *Flavour and Fragrance journal*, V. 28, (2013), 269-279.
177. SANON, B.K., DEXHEIMER, J., BÂ, A.M., DIANDA, M. & GERARD, J., «Structure comparée des ectomycorhizes de *Afzelia africana* Sm. et *Scleroderma* sp». *Science et Technique, série Sciences Naturelles et Agronomie*, 1: (2002), 17-28.
178. SANTOYO, S., LIORIA, R., JAIME, L., IBANEZ, E., SENORANS, FJ. ANDREGLERO, G., «Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurusnobilis*L. Chemical and functional characterization». *European Food Res. Technol.*224: (2006),.75–81.
179. SATRANI, B., FARAH, A. & TALBI, M., «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), (2006), 235-242.
180. SCIMECA, D., et TETAU, M., «Votre santé par les huiles essentielles» (2005), 55p.
181. SENNI, R., « Etude de la diversité de la végétation des zones humides Zahrez Chergui et Gharbi (Djelfa) et de Chott el Hodna (M'sila) » Thèse de doctorat en sciences agronomiques ENSA Alger. (2015), 118p.
182. SMARTH, RM., PANWAR, M., SONI A., KUMAR, M., KUMAR A., «Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract». *Food Chemistry*, 106, (2008), 868-873.

183. SMITH, R.B., LOUGHEED, E.C., FRANKLIN, E.W., MC MILLAN, I., «The starch iodine test for determining stage of maturation in apples. Canadian Journal of Plant Science, 59, (1979), 725-735.
184. STEWART, C.R. et LEE, J.A., «The role of proline accumulation in halophytes». *Planta* (120), (1974), 279-289.
185. TALBI, H., BOUMAZA, A., EL-MOSTAFA, K., TALBI, J., HILALI, A., «Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigellasativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigellasativa* L.) ». *Mater. Environ. Sci.* 6 (4), (2015), 1111-1117.
186. TANTAOUI-ELARAKI, A., BERAOU, L., «Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oils of selected plant materials». *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol* 13, (1994), 67-72.
187. TASSOU, C.C., DROSINOS, E.H. & NYCHAS, G.J.E., «Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 and 10°C». *Journal of Applied Bacteriology*, 78, (1995), 593-600.
188. TEIXEIRA-DUARTE, M.C., MARA FIGUEIRA, G., & SARTORATTO, A., «Anticandida activity of Brazilian medicinal plants». *Journal of Ethnopharmacology*, 97, (2005), 305-311.
189. TEPE, B., SOKMEN, M., AKPULAT, H.A., SOKMEN, A., «Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey». *Food Chem.* 95, (2006), 200-204.
190. TRIPATHI, A.K., UPADHYAY, S., BHUIYAN M. BHATTACHARYA P.R., «A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management» *Journal of Pharmacognosy and phytotherapy*, vol 5(1), (2009), 052-063.
191. TERRENTROY, A., « Protection biologique intégrée : la protection des tomates contre *T. absoluta* ». *Bult. Ressources*, collection 2, document 2A (2012).1-4
192. ULTEE, A., KETS, E.P., ALBERDA, M., HOEKSTRA, F.A., SMID, E.J., « Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol ». *Arch microbiol.*, 174: (2000), 233-238

193. VENISSE, J.S., GULLNEE, G., ET BRISSET, M.N., « Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of Pear by *Erwinia amylovora* ». *Journal Plant Physiology* (2012), 125(4), 2164-2172.
194. VERZELE, L., MOUDACHIROU, S., ET RAMANOELINA, G., « Perfumer and flavorist », *flavour and fragrance journal*.13, (1988), 61-67
195. VILLANO, D., FERNANDEZ-PACHON, MS., MOYA, ML., TRONCOSO, AM., GARCIAPARILLA, MC. «Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 7,(2007), 230–235.
196. WANG, Y. et NILE, N., «Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase–oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress » *J. Hortic. Sci. Biotechnol*, Vol. 75, (2000), 623-627.
197. WICHTL, M, ANTON, R., «Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique». 2<sup>ème</sup> édition française. Paris: éd. Tee & Doc; Cachan. Médicale Internationales : ( 2003), 692p.
198. WILLEM, J. P., «Les huiles essentielles : médecine d'avenir ». Ed. Dauphin Paris (2002), 311p.
199. YAZDANPARAST, R. and ARDESTANI, A., «In Vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of *Cyperus rotundus*». *Journal of Medicinal Food*, 10, (2007), 667-674.
200. YI, Z., YAN, Y., LIANG, Y., AND ZENG, B., «In vitro antioxidant and antimicrobial», *Industrial Crops and Products* 62, (2008), 250–264.
201. ZHIRI, A., «Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré». *Nutra News*, Ed. La Fondation pour le libre choix, (2006), 2-16.

## Annexe A

### 1. Détermination de l'indice de réfraction ( $n_R$ )

#### • Mode opératoire

- L'instrument est réglé à une température ambiante;
- Verser une goutte d'H.E sur la surface du prisme ;
- Fermer le couvercle du prisme, assurer que le film d'H.E ne contient pas de bulles d'air, puis pointer le réfractomètre en direction d'une source lumineuse;
- Quand il y a du liquide sur le prisme, le champ est divisé en une partie claire et une partie sombre. Le point auquel la ligne de démarcation entre ces deux parties traverse l'échelle verticale, donne la mesure. On peut ajuster la ligne sur l'échelle verticale à l'aide de vis située au-dessus ou au -dessous de la boîte contenant le prisme, et on lie avec précision la valeur affichée.

### 2. Détermination de l'indice d'acide

#### • Mode opératoire

- Introduire dans un erlenmeyer 0.5 g/l d'huile essentielle, 25 ml d'éthanol ;
- Ajouter 5 gouttes de solution de phénophtaléine, comme indicateur et
- Neutraliser la solution avec l'hydroxyde de potassium contenu dans la burette jusqu'à ce que la coloration rose persiste pendant une dizaine de secondes.

### 3. Détermination de l'indice d'ester

#### • Principe

Hydrolyse des esters par chauffage dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium et dosage de l'excès d'alcali par une solution titrée d'acide chlorhydrique

#### • Réactifs

- Ethanol à 95% volumique.
- C (KOH)= 0.5 mol/l
- C (HCl)= 0.5 mol/l

- **Mode opératoire**

- Introduire dans un ballon 0.5 g d'huile essentielle, ajouter à l'aide d'une burette 25ml de la solution d'hydroxyde de potassium KOH ainsi que des fragments de pierre de ponce ;
- Adapter un tube en verre au réfrigérant puis placer le ballon sur le bain d'eau bouillante pendant une heure et
- Laisser le ballon refroidir, démonter le tube, ajouter 20 ml d'eau puis 5 gouttes de solution de phénophtaléine, comme indicateur et enfin titrer l'excès d'hydroxyde de potassium avec une solution d'acide chlorhydrique.

- **Milieu levane :**

- Extrait de levure ..... 2,0 g
- Bactopeptone (Difco) ..... 5,0 g
- Saccharose ..... 50,0
- Chlorure de sodium ..... 5,0 g
- Agar bactériologique ..... 20,0 g

Ajuster le pH à 7,2. Après autoclavage à une température >à 121°C pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le couler en boîtes de Pétri.

## Annexe B

### 1. Matériel et méthodes



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

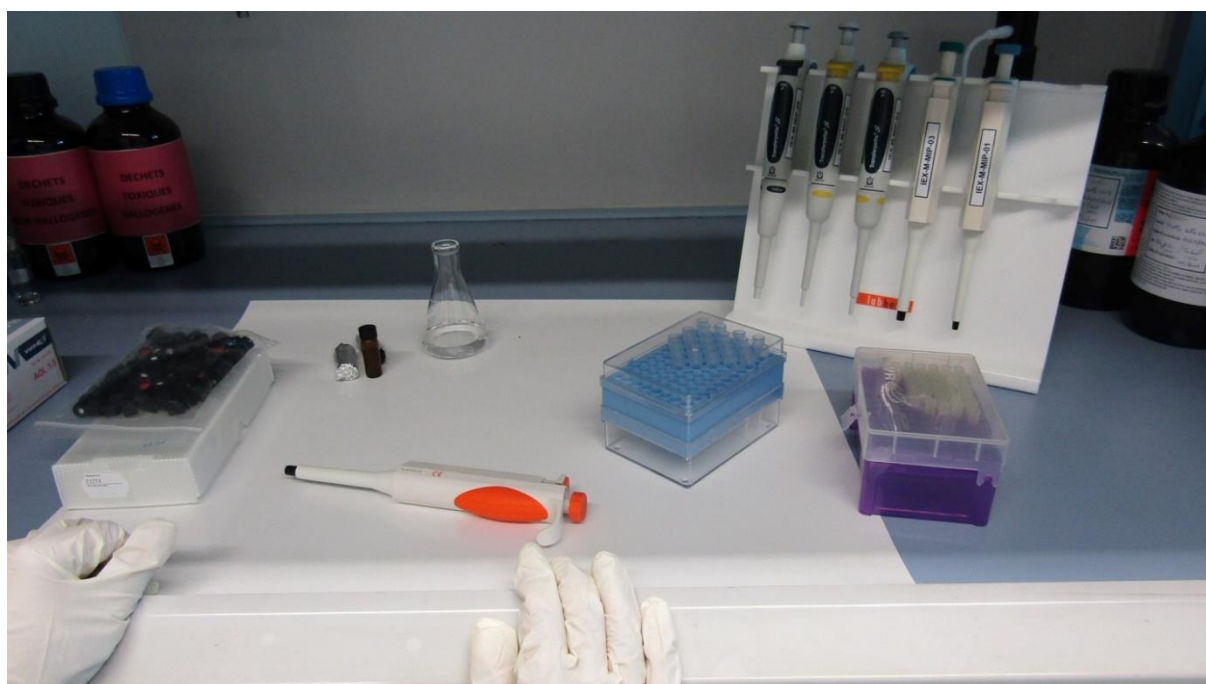


Figure : Paillasse de travail (CG/MS)

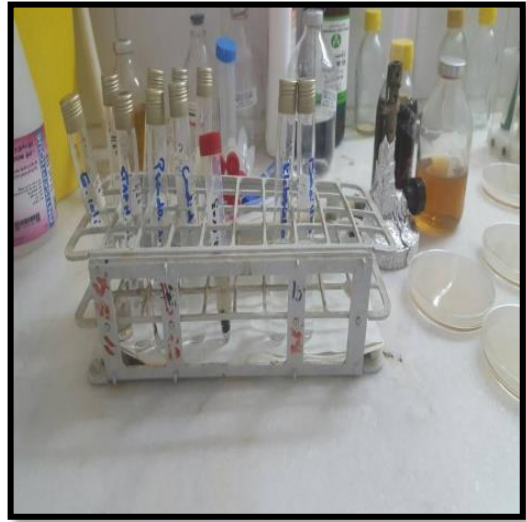


Figure: Préparation de l'inoculum bactérien



Figure : Préparation des milieux de culture.





Figure : diffusion des extraits de romarin en milieu solide.



Figure : Préparation des dilutions des extraits du romarin  
(activité anti-oxydante)

## 2. Résultats

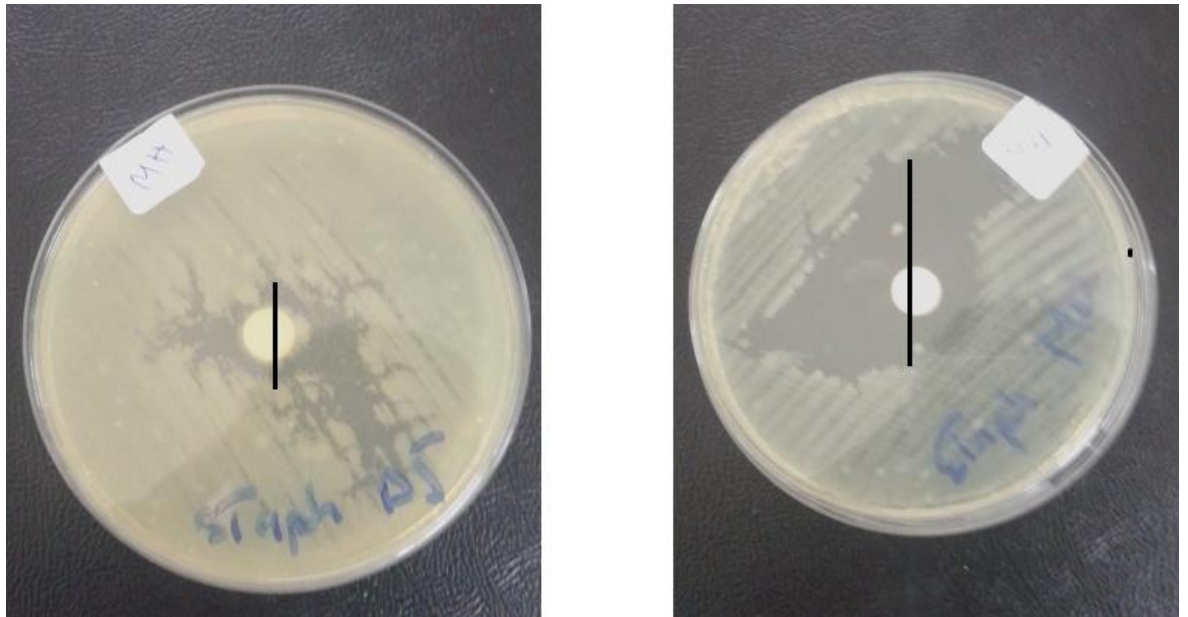


Figure : Effet de l'HE du romarin sur *Staphylococcus aureus*

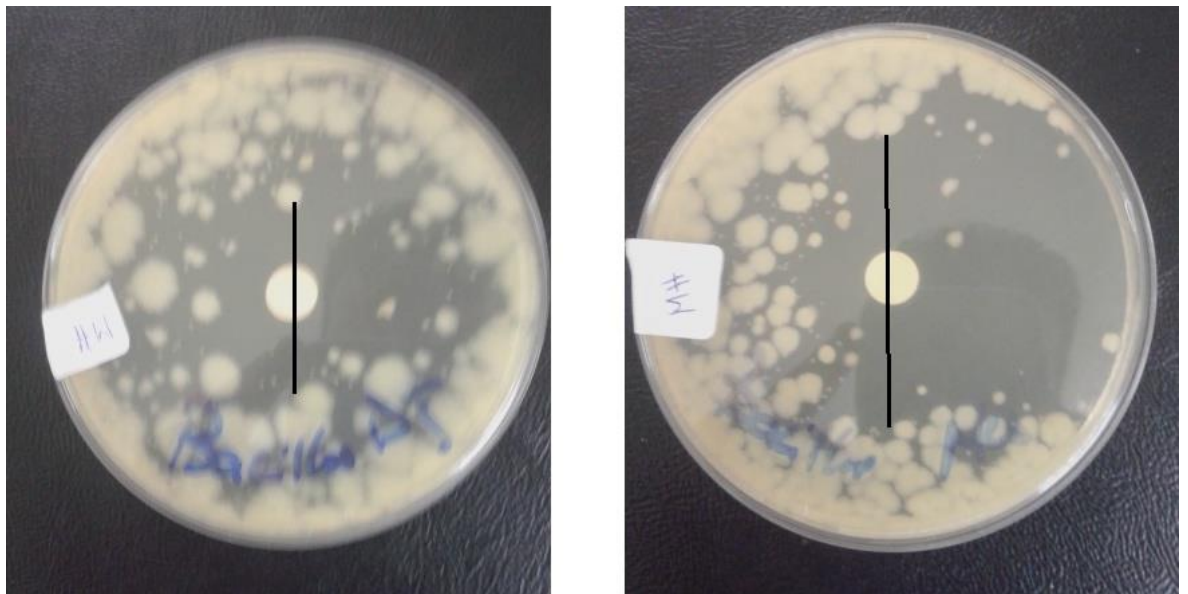


Figure : Effet de l'HE du romarin sur *Enterococcus faecalis*

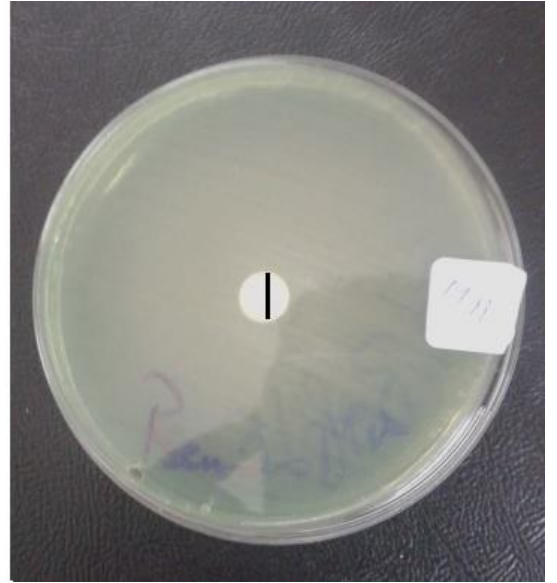


Figure : Effet de l'HE du romarin sur *Enterococcus faecalis*  
*Pseudomonas aeruginosa*

NL:  
4.16E8  
TIC F: MS  
ech-p

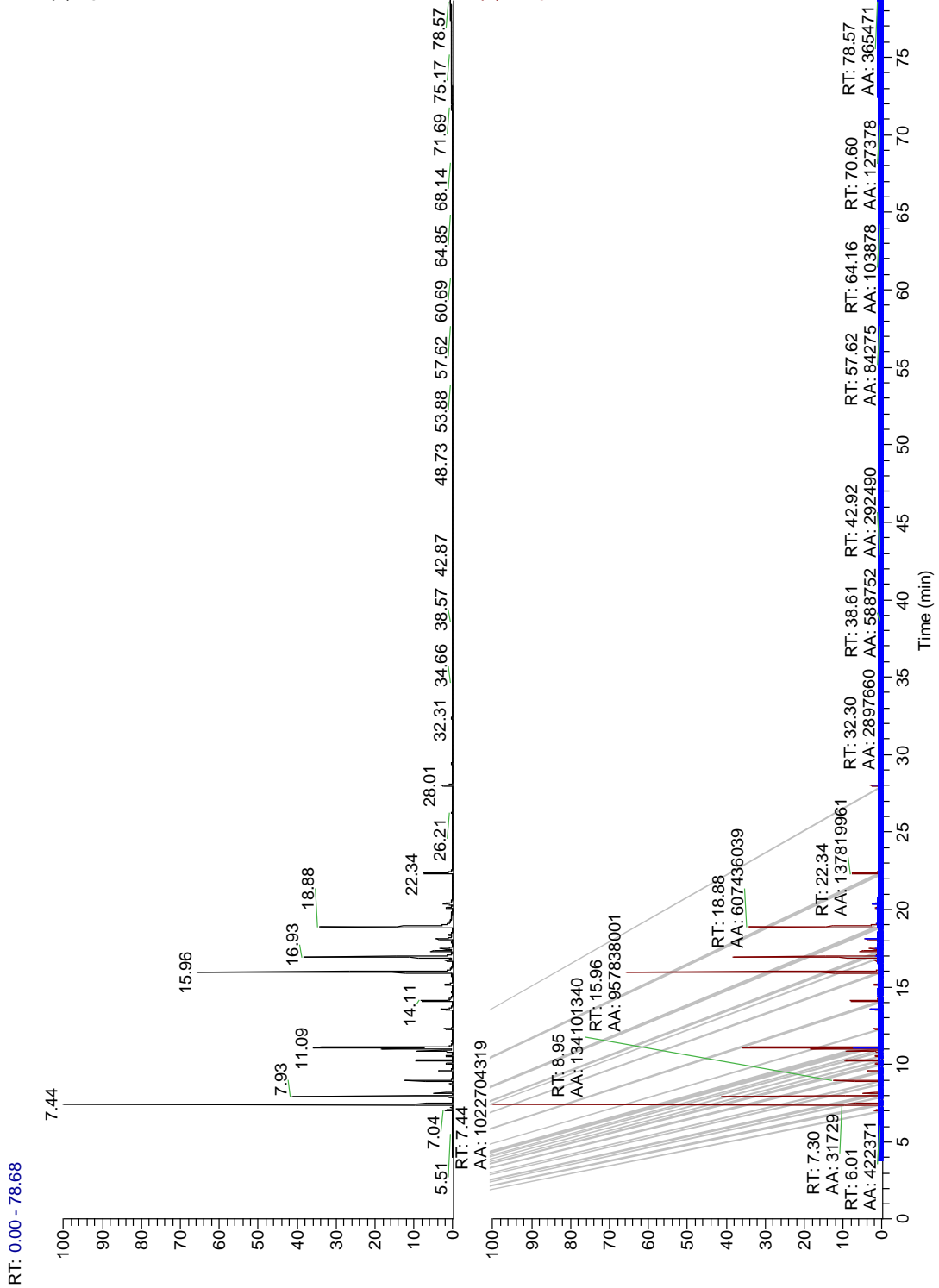


Figure: Composition chimique de l'HE du romarin récolté au printemps.

NL:  
4.16E8  
TIC F: MS  
ech-h

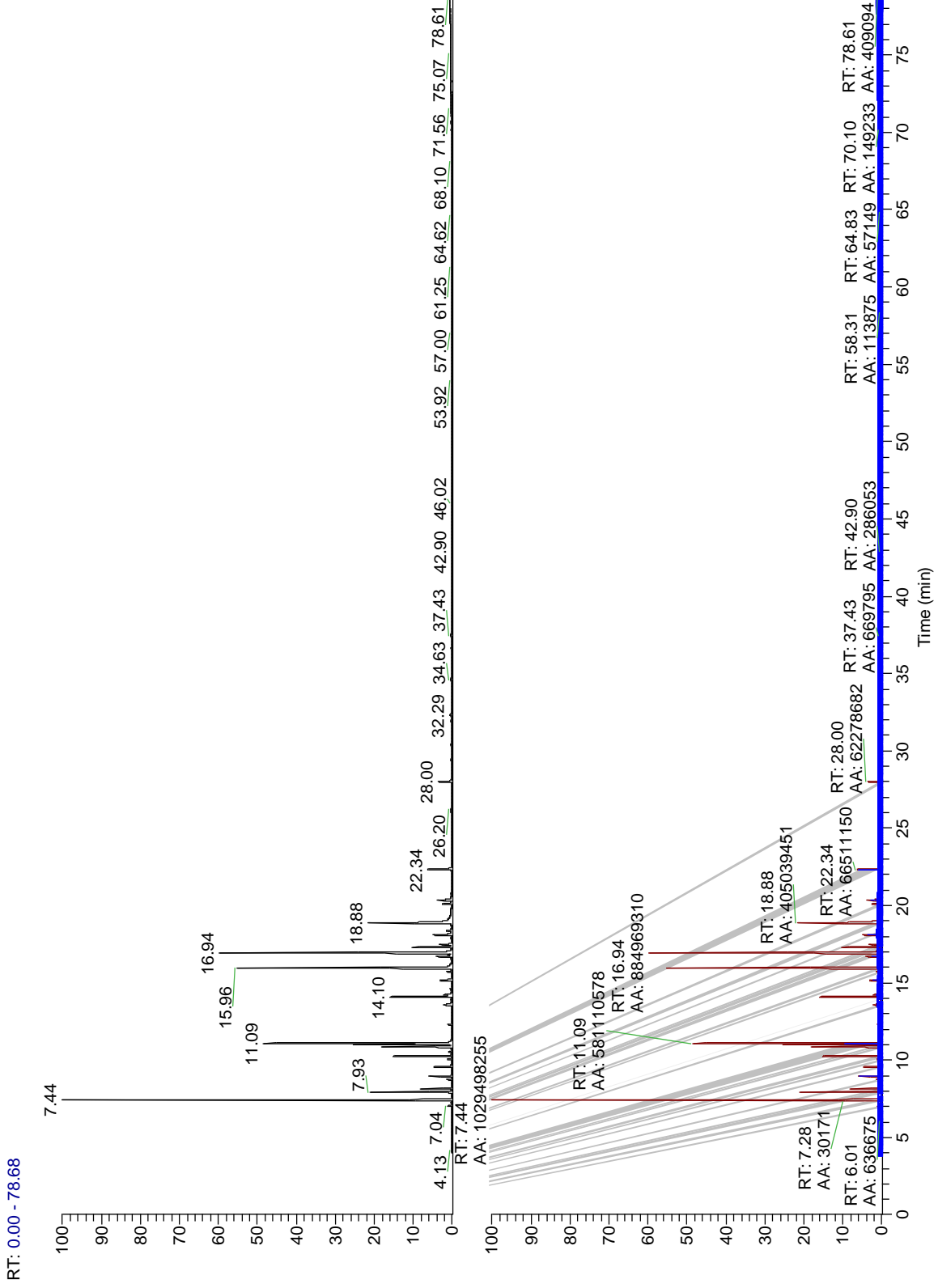


Figure: Composition chimique de l'HE du romarin récolté en hiver .

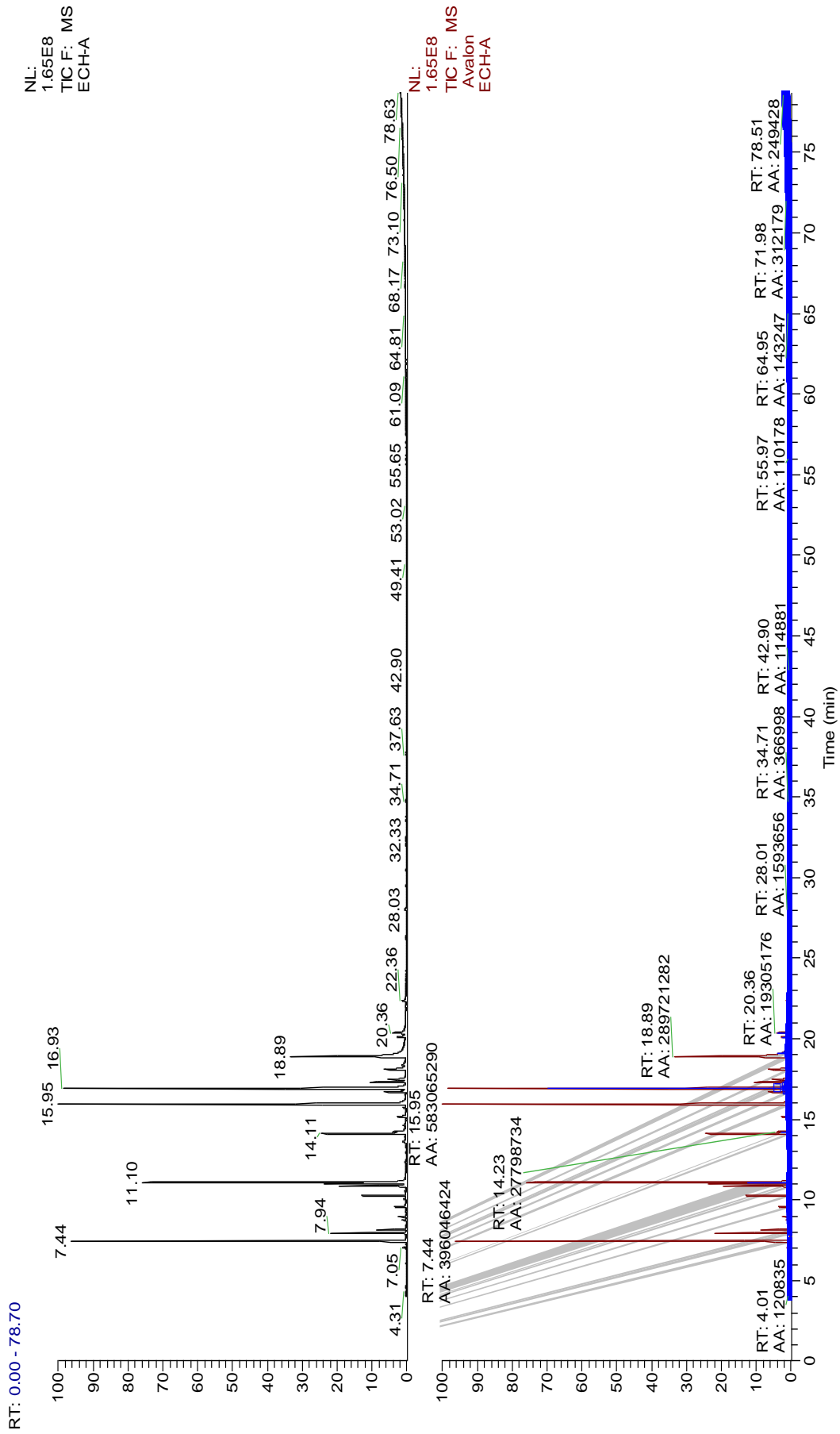


Figure: Composition chimique de l'HE du romarin récolté en automne.

Composition chimique de l'HE du romarin récolté à M'sila

BULLETIN D'ANALYSE N°: 22903

Huile essentielle de Romarin 1 Region Msila

Analyse chromatographique par GC/MS



+

Tr	Composés	%	Tr	Composés	%
4,72	Tricyclène	0,143	8,49	Chrysanténone	1,040
4,82	Alpha-Thujène	0,062	8,93	Camphre	22,054
4,96	Alpha-Pinène	10,405	9,04	Camphène-Hydrate	0,151
5,29	Camphène	3,607	9,12	Trans-Pinocamphone	0,528
5,38	Thuja-2,4(10)-diène	0,567	9,15	Pinocarvone	0,454
5,74	Sabinène	0,124	9,33	Boméol	10,617
5,85	Béta-Pinène	1,328	9,38	Cis-Pinocamphone	3,189
6,00	1-Octène-3-ol	0,196	9,44	Terpinène-4-pl	1,175
6,08	3-Octanone	0,080	9,68	Alpha-Terpinéol	2,081
6,12	Myrcène	1,120	9,87	Verbénone	6,714
6,42	Alpha-Phellandrène	0,264	10,45	Géraniol	1,063
6,46	Delta-3-Carène	1,335	10,90	Acétate de Lavandulyle	0,048
6,63	Alpha-Terpinène	0,284	10,96	Acétate de Bomyle	2,055
6,78	Para-Cymène	0,984	12,12	Alpha-Ylangène	0,157
6,86	Limonène	3,284	12,19	Alpha-Copaène	0,075
6,92	Eucalyptol	12,171	12,77	Béta-Caryophyllène	1,142
7,01	(Z)-Béta-Ocimène	0,096	13,46	Gamma-Murolène	0,072
7,39	Gamma-Terpinène	0,456	13,86	Alpha-Amorphène	0,035
7,63	Cis-Hydrate de Sabinène	0,131	13,93	Gamma-Cadinène	0,057
7,86	Terpinolène	0,901	13,98	Delta-Cadinène	0,121
7,97	Para-Cyménène	0,083	14,76	Oxyde de Caryophyllène	0,426
8,15	Linalol	4,923	15,08	Humulène-1,2-Epoxyde	0,055
8,26	Filifolone	0,218		Total	96,071

Composition chimique de l'HE du romarin récolté à Djelfa

BULLETIN D'ANALYSE N°: 22904

Heuile essentielle de Romarin 2 Region Djelfa

Analyse chromatographique par GC/FID



Tr	Composés	%
4,72	Tricyclène	0,852
4,82	Alpha-Thujène	0,134
4,97	Alpha-Pinène	19,250
5,30	Camphène	19,036
5,38	Thuja-2,4(10)-diène	0,105
5,77	Sabinène	0,100
5,85	Béta-Pinène	4,483
6,12	Myrcène	0,481
6,43	Alpha-Phellandrène	0,212
6,63	Alpha-Terpinène	0,392
6,78	Para-Cymène	1,545
6,86	Limonène	3,411
6,92	Eucalyptol	3,560
7,01	(Z)-Béta-Ocimène	0,069
7,39	Gamma-Terpinène	0,399
7,63	Cis-Hydrate de Sabinène	0,043
7,86	Terpinolène	0,177
8,16	Linalol	0,104
8,47	Chrysanténone	0,127

Tr	Composés	%
8,95	Camphre	38,008
9,05	Camphène-Hydrate	0,230
9,16	Pinocarvone	0,082
9,32	Delta-Terpinéol	2,482
9,44	Terpinène-4-pl	1,085
9,68	Alpha-Terpinéol	0,769
10,96	Acétate de Bomyle	0,315
12,11	Alpha-Ylangène	0,020
12,20	Alpha-Copaène	0,095
12,77	Béta-Caryophyllène	0,851
13,23	Alpha-Humulène	0,133
13,46	Gamma-Murolène	0,105
13,86	Alpha-Amorphène	0,032
13,93	Gamma-Cadinène	0,074
13,98	Delta-Cadinène	0,174
14,76	Oxyde de Caryophyllène	0,126
15,09	Humulène-1,2-Epoxyde	0,015
	Total	99,076



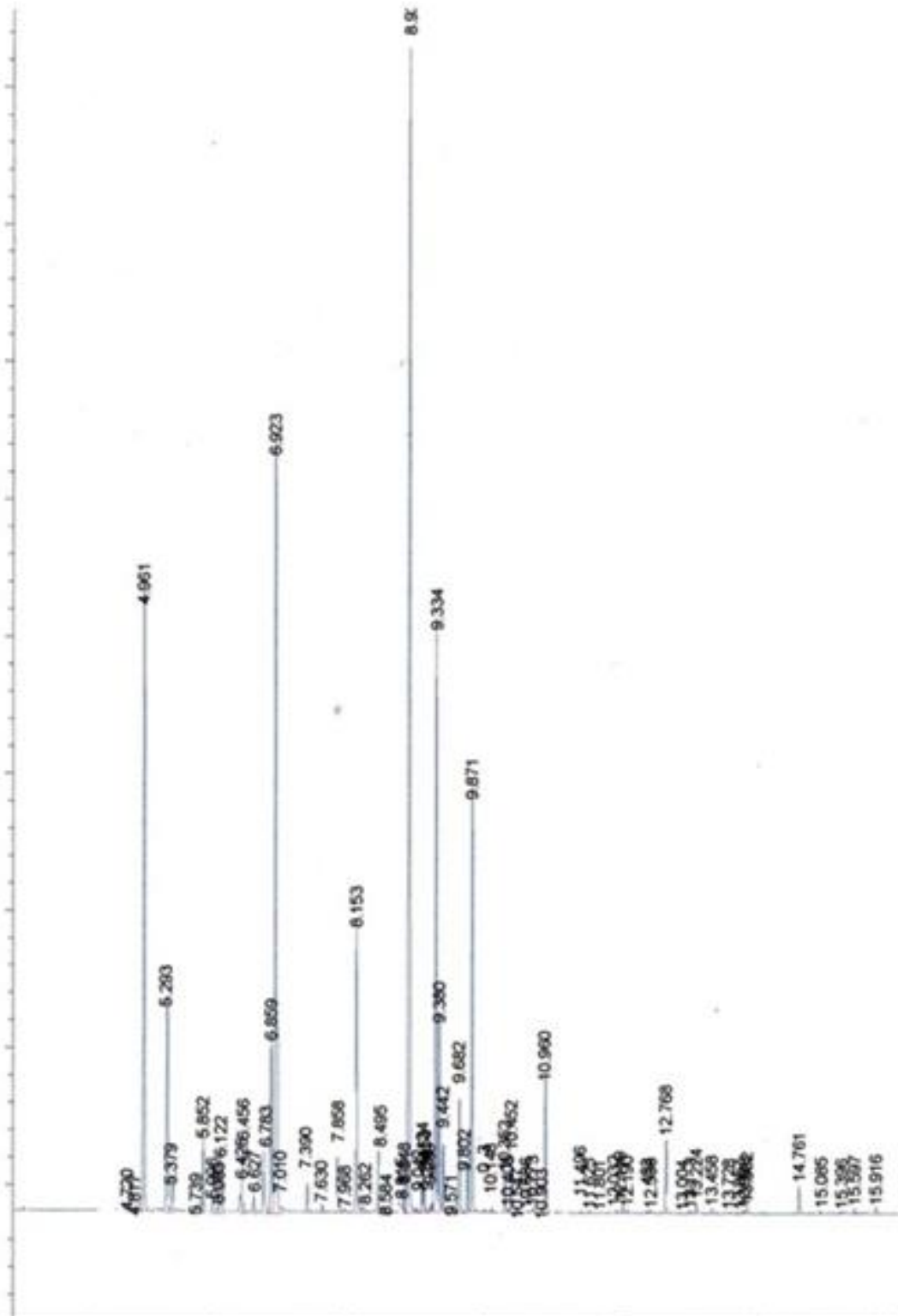


Figure: Composition chimique de l'HE du romarin récolté à Djelfa

## Annexe C

### 1. Analyses statistiques : Région

#### Analyse ANOVA : Paramètres physiologiques et biochimiques

Variable dépendante			Signification	Intervalle de confiance à 95%	
				Borne inférieure	Borne supérieure
Ch a	Blida	Djelfa	0,00	-0,40	-0,10
		Msila	0,33	-0,07	0,22
	Djelfa	Blida	0,00	0,10	0,40
		Msila	0,00	0,18	0,47
	Msila	Blida	0,33	-0,22	0,07
		Djelfa	0,00	-0,47	-0,18
Ch b	Blida	Djelfa	0,01	-0,35	-0,08
		Msila	0,18	-0,05	0,23
	Djelfa	Blida	0,01	0,08	0,35
		Msila	0,00	0,17	0,44
	Msila	Blida	0,18	-0,23	0,05
		Djelfa	0,00	-0,44	-0,17
Ch a+b	Blida	Djelfa	0,00	-0,61	-0,32
		Msila	0,03	0,02	0,31
	Djelfa	Blida	0,00	0,32	0,61
		Msila	0,00	0,48	0,78
	Msila	Blida	0,03	-0,31	-0,02
		Djelfa	0,00	-0,78	-0,48
Proline	Blida	Djelfa	0,00	-1,04	-0,75
		Msila	0,22	-0,23	0,05
	Djelfa	Blida	0,00	0,75	1,04
		Msila	0,00	0,66	0,95
	Msila	Blida	0,22	-0,05	0,23
		Djelfa	0,00	-0,95	-0,66
Sucres Solubles	Blida	Djelfa	0,14	-0,95	0,14
		Msila	0,19	-0,91	0,19
	Djelfa	Blida	0,14	-0,14	0,95
		Msila	0,97	-0,50	0,59
	Msila	Blida	0,19	-0,19	0,91
		Djelfa	0,97	-0,59	0,50

## Interactions inter-paramètres

Région de  
M'sila

### Corrélations

		Ch a	Ch b	Ch a+b	proline	sucre s
Ch a	Corrélation de Pearson Sig. (bilatérale)	1	-,909	,855	-,730	,237
			,273	,347	,479	,848
Ch b	Corrélation de Pearson Sig. (bilatérale)	-,909	1	-,562	,380	-,620
		,273		,620	,752	,575
Ch a+b	Corrélation de Pearson Sig. (bilatérale)	,855	-,562	1	-,979	-,301
		,347	,620		,132	,806
proline	Corrélation de Pearson Sig. (bilatérale)	-,730	,380	-,979	1	,491
		,479	,752	,132		,673
sucre s	Corrélation de Pearson Sig. (bilatérale)	,237	-,620	-,301	,491	1
		,848	,575	,806	,673	

Région  
de Djelfa

Corrélations

		Ch a	Ch b	Ch a+b	proline	sucres s
Ch a	Corrélation de Pearson Sig. (bilatérale)	1	-,909	,855	-,730	,237
			,273	,347	,479	,848
Ch b	Corrélation de Pearson Sig. (bilatérale)	-,909	1	-,562	,380	-,620
		,273		,620	,752	,575
Ch a+b	Corrélation de Pearson Sig. (bilatérale)	,855	-,562	1	-,979	-,301
		,347	,620		,132	,806
proline	Corrélation de Pearson Sig. (bilatérale)	-,730	,380	-,979	1	,491
		,479	,752	,132		,673
sucres s	Corrélation de Pearson Sig. (bilatérale)	,237	-,620	-,301	,491	1
		,848	,575	,806	,673	

## Région de Blida

### Corrélations

		Ch a	Ch b	Ch a + b	proline	sucres
Ch a	Corrélation de Pearson	1	-,999*	-,998*	-,112	-,679
	Sig. (bilatérale)		,029	,038	,928	,525
Ch b	Corrélation de Pearson	-,999*	1	1,000**	,067	,711
	Sig. (bilatérale)	,029		,009	,957	,496
Ch a + b	Corrélation de Pearson	-,9998*	1,000**	1	,053	,721
	Sig. (bilatérale)	,038	,009		,966	,487
Proline	Corrélation de Pearson	-,112	,067	,053	1	-,654
	Sig. (bilatérale)	,928	,957	,966		,547
sucres	Corrélation de Pearson	-,679	,711	,721	-,654	1
	Sig. (bilatérale)	,525	,496	,487	,547	

\*. La corrélation est significative au niveau 0.05 (bilatéral).

\*\*.. La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).

## Analyse MANOVA : Activité antimicrobienne

### Comparaisons par paire

Variable dépendante				Différence des moyennes (I-J)	Erreur standard	Sig. <sup>b</sup>	Intervalle de confiance de la différence à 95% <sup>b</sup>	
							Borne inférieure	Limite supérieure
<i>E coli</i>	H	Blida	Djelfa	-0,25	0,81	0,76	-2,02	1,52
		Djelfa	Blida	0,25	0,81	0,76	-1,52	2,02
	E	Blida	Djelfa	0,00	0,81	1,00	-1,77	1,77
		Djelfa	Blida	0,00	0,81	1,00	-1,77	1,77
<i>P aéroginosa</i>	H	Blida	Djelfa	0,00	0,00		0,00	0,00
		Djelfa	Blida	0,00	0,00		0,00	0,00
	E	Blida	Djelfa	0,00	0,00		0,00	0,00
		Djelfa	Blida	0,00	0,00		0,00	0,00
<i>E faecalis</i>	H	Blida	Djelfa	8,500*	1,13	0,00	6,04	10,96
		Djelfa	Blida	-8,500*	1,13	0,00	-10,96	-6,04
	E	Blida	Djelfa	1,50	1,13	0,21	-0,96	3,96
		Djelfa	Blida	-1,50	1,13	0,21	-3,96	0,96
<i>S aureus</i>	H	Blida	Djelfa	7,000*	0,80	0,00	5,26	8,74
		Djelfa	Blida	-7,000*	0,80	0,00	-8,74	-5,26
	E	Blida	Djelfa	2,250*	0,80	0,02	0,51	3,99
		Djelfa	Blida	-2,250*	0,80	0,02	-3,99	-0,51
<i>B, cereus</i>	H	Blida	Djelfa	0,00	1,10	1,00	-2,40	2,40
		Djelfa	Blida	0,00	1,10	1,00	-2,40	2,40
	E	Blida	Djelfa	3,500*	1,10	0,01	1,10	5,90
		Djelfa	Blida	-3,500*	1,10	0,01	-5,90	-1,10

Basée sur les moyennes marginales estimées

\*. La différence des moyennes est significative au niveau ,05.

b. Ajustement des comparaisons multiples : Différence la moins significative (équivalent à aucun ajustement).

## 2. Analyse statistique : Saison

Tableau : Analyse ANOVA Paramètres physiologiques et biochimiques

Variable dépendante			Signification	Intervalle de confiance à 95%	
				Borne inférieure	Borne supérieure
Ch a	Automne	Hiver	0,00	-0,22	-0,09
		Printemps	0,00	-0,33	-0,20
	Hiver	Automne	0,00	0,09	0,22
		Printemps	0,00	-0,17	-0,04
	Printemps	Automne	0,00	0,20	0,33
		Hiver	0,00	0,04	0,17
Ch b	Automne	Hiver	0,42	-0,18	0,07
		Printemps	0,85	-0,15	0,10
	Hiver	Automne	0,42	-0,07	0,18
		Printemps	0,71	-0,09	0,16
	Printemps	Automne	0,85	-0,10	0,15
		Hiver	0,71	-0,16	0,09
Ch a+b	Automne	Hiver	0,00	-0,32	-0,11
		Printemps	0,00	-0,39	-0,18
	Hiver	Automne	0,00	0,11	0,32
		Printemps	0,15	-0,18	0,03
	Printemps	Automne	0,00	0,18	0,39
		Hiver	0,15	-0,03	0,18
Proline	Automne	Hiver	0,86	-0,02	0,02
		Printemps	0,00	-0,06	-0,02
	Hiver	Automne	0,86	-0,02	0,02
		Printemps	0,00	-0,06	-0,02
	Printemps	Automne	0,00	0,02	0,06
		Hiver	0,00	0,02	0,06
Sucres Solubles	Automne	Hiver	0,00	-1,30	-0,35
		Printemps	0,00	-2,83	-1,88
	Hiver	Automne	0,00	0,35	1,30
		Printemps	0,00	-2,00	-1,05
	Printemps	Automne	0,00	1,88	2,83
		Hiver	0,00	1,05	2,00

**Corrélations**  
**Blida**  
**Saison de printemps**

Corrélations

		Ch a	Ch b	Ch a+b	proline	sucre s
Ch a	Corrélation de Pearson	1	-,999*	-,998*	-,112	-,679
	Sig. (bilatérale)		,029	,038	,928	,525
Ch b	Corrélation de Pearson	-,999*	1	1,000**	,067	,711
	Sig. (bilatérale)	,029		,009	,957	,496
Ch a+b	Corrélation de Pearson	-,998*	1,000**	1	,053	,721
	Sig. (bilatérale)	,038	,009		,966	,487
Proline	Corrélation de Pearson	-,112	,067	,053	1	-,654
	Sig. (bilatérale)	,928	,957	,966		,547
sucre s	Corrélation de Pearson	-,679	,711	,721	-,654	1
	Sig. (bilatérale)	,525	,496	,487	,547	

\*. La corrélation est significative au niveau 0.05 (bilatéral).

\*\* . La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral).



**Corrélations  
Blida  
Saison d'hiver**

**Corrélations**

		Ch a	Ch b	Ch a+b	proline	sucres s
Ch a	Corrélation de Pearson	1	-,924	,789	,965	,582
	Sig. (bilatérale)		,250	,421	,169	,605
Ch b	Corrélation de Pearson	-,924	1	-,493	-,790	-,225
	Sig. (bilatérale)	,250		,671	,420	,855
Ch a+b	Corrélation de Pearson	,789	-,493	1	,923	,959
	Sig. (bilatérale)	,421	,671		,252	,184
proline	Corrélation de Pearson	,965	-,790	,923	1	,775
	Sig. (bilatérale)	,169	,420	,252		,435
sucres s	Corrélation de Pearson	,582	-,225	,959	,775	1
	Sig. (bilatérale)	,605	,855	,184	,435	

**Corrélations**  
**Blida**  
**Saison d'automne**

**Corrélations**

		Ch a	Ch b	Ch a+b	proline	sucre s
Ch a	Corrélation de Pearson	1	,057	,793	,278	,619
	Sig. (bilatérale)		,964	,417	,821	,575
Ch b	Corrélation de Pearson	,057	1	,653	-,943	,819
	Sig. (bilatérale)	,964		,547	,216	,389
Ch a+b	Corrélation de Pearson	,793	,653	1	-,364	,969
	Sig. (bilatérale)	,417	,547		,763	,158
proline	Corrélation de Pearson	,278	-,943	-,364	1	-,582
	Sig. (bilatérale)	,821	,216	,763		,604
sucre s	Corrélation de Pearson	,619	,819	,969	-,582	1
	Sig. (bilatérale)	,575	,389	,158	,604	

## Analyse MANOVA : Activité antimicrobienne

Variable dépendante	Saison	Saison	Signification	Intervalle de confiance à 95%	
				Borne inférieure	Borne supérieure
S aureus	Automne	Hiver	,013	1,6608	10,3392
		Printemps	,000	7,6608	16,3392
	Hiver	Automne	,013	-10,3392	-1,6608
		Printemps	,013	1,6608	10,3392
	Printemps	Automne	,000	-16,3392	-7,6608
		Hiver	,013	-10,3392	-1,6608
E coli	Automne	Hiver	,718	-4,7477	8,0810
		Printemps	,540	-4,0810	8,7477
	Hiver	Automne	,718	-8,0810	4,7477
		Printemps	,946	-5,7477	7,0810
	Printemps	Automne	,540	-8,7477	4,0810
		Hiver	,946	-7,0810	5,7477

## Analyse MANOVA : Activité bactéricide

[C]	(I) saison	(J) saison	Sig. <sup>b</sup>	Intervalle de confiance de la différence à 95% <sup>b</sup>	
				Borne inférieure	Limite supérieure
0	Automne	Hiver	1,000	-,652	,652
		Printemp	1,000	-,545	,545
	Hiver	Automne	1,000	-,652	,652
		Printemp	1,000	-,618	,618
	Printemp	Automne	1,000	-,545	,545
		Hiver	1,000	-,618	,618
25	Automne	Hiver	,026	-1,250	-,084
		Printemp	,000	-1,916	-,750
	Hiver	Automne	,026	,084	1,250
		Printemp	,026	-1,250	-,084
	Printemp	Automne	,000	,750	1,916
		Hiver	,026	,084	1,250
50	Automne	Hiver	,000	-3,250	-2,084
		Printemp	,000	-3,083	-1,917
	Hiver	Automne	,000	2,084	3,250
		Printemp	,564	-,416	,750
	Printemp	Automne	,000	1,917	3,083
		Hiver	,564	-,750	,416
75	Automne	Hiver	,000	-2,250	-1,084
		Printemp	,000	-2,583	-1,417
	Hiver	Automne	,000	1,084	2,250
		Printemp	,252	-,916	,250
	Printemp	Automne	,000	1,417	2,583
		Hiver	,252	-,250	,916
100	Automne	Hiver	,000	-3,250	-2,084
		Printemp	,000	-1,916	-,750
	Hiver	Automne	,000	2,084	3,250
		Printemp	,000	,750	1,916
	Printemp	Automne	,000	,750	1,916
		Hiver	,000	-1,916	-,750

## Analyse MANOVA : Activité insecticide

Variable dépendante: Taux de mortalité (T absoluta)

Concentration			Différence des moyennes (I-J)	Erreur standard	Sig. <sup>b</sup>	Intervalle de confiance de la différence à 95% <sup>b</sup>	
						Borne inférieure	Limite supérieure
Dilution 5	Automne	Hiver	8,882E-16	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Printemps	3,375E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
	Hiver	Automne	-8,882E-16	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Printemps	3,286E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
	Printemps	Automne	-3,375E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Hiver	-3,286E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
Dilution 4	Automne	Hiver	8,882E-16	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Printemps	3,375E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
	Hiver	Automne	-8,882E-16	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Printemps	3,286E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
	Printemps	Automne	-3,375E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Hiver	-3,286E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
Dilution 3	Automne	Hiver	-3,516E-15	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Printemps	2,609E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
	Hiver	Automne	3,516E-15	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Printemps	2,961E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
	Printemps	Automne	-2,609E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Hiver	-2,961E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
Dilution 2	Automne	Hiver	-3,516E-15	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Printemps	2,609E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
	Hiver	Automne	3,516E-15	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Printemps	2,961E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
	Printemps	Automne	-2,609E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Hiver	-2,961E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
Dilution 1	Automne	Hiver	5,625E-15	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Printemps	-3,938E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
	Hiver	Automne	-5,625E-15	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Printemps	-4,500E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
	Printemps	Automne	3,938E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076
		Hiver	4,500E-14	1,029	1,000	-2,076	2,076