

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

Université SAAD DAHLAB de Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des biotechnologies

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER ACADEMIQUE EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Spécialité: phytopharmacie et protection des végétaux

INCIDENCE DU MODE CULTURAL SUR L'ACTIVITE
ANTIMICROBIENNE DES HUILES ESSENTIELLES DU ROMARIN

Présenté par :

Ayadi Meriem

Benamar Nahla

Soutenu le 29/09/2020 devant le jury composé de :

Mme BABA AISSA K	M .A. A	U.Blida 1	Présidente
Mr MOUSSAOUI K	M .A. A	U.Blida 1	Examineur
Mr DJAZOULI Z,D.	Professeur	U.Blida 1	Promoteur
Mme GUESMI F	Doctorante	U.Blida 1	Co-promotrice

Année Universitaire 2019/2020

REMERCIEMENT

Nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience pour réaliser ce modeste travail.

Nous tenons tout particulièrement à adresser nos plus vifs remerciements, à notre promoteur, **Mr DJAZOULI.Z.**, d'avoir accepté de nous encadrer et de nous avoir laissé la liberté nécessaire à l'accomplissement de notre travail, tout en y gardant un œil critique et avisé. Merci pour sa rigueur scientifique, ses conseils ainsi que sa sympathie. Nous le remercions également de nous avoir responsabilisées tout au long de notre travail.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à **Mme KISSIERA**. Nous la remercions de nous avoir accueillies au sein de son laboratoire.

Un grand et respectueux remerciement à **Mr MOUSSAOUI.K.** et **BABA AISSA.K.** de nous avoir fait l'honneur d'examiner notre travail. Veuillez accepter l'expression de notre profond respect.

Nous tenons aussi à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près pour la réalisation de ce travail, en particulier **Mme GUESMI.F.** pour sa gentillesse et ces précieux conseils.

DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail à ceux qui me sont chers,

A la mémoire de mon père

Ce travail est dédié à mon père, qui nous a quitté très tôt, et qui est toujours présent dans nos cœurs. J'espère que, du monde qui est le sien maintenant, il apprécie cet humble geste, preuve de reconnaissance de sa petite fille qui a toujours prié pour lui. Que Dieu, tout puissant, te garde dans son vaste paradis.

A ma chère mère

Aucune dédicace ne serait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as toujours été le père et la mère, rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuit pour mon éducation et mon bien être, toute cette abnégation dont tu as fait preuve afin que je devienne ce que je suis, je t'en serai éternellement reconnaissante. Que Dieu, tout puissant, te préserve et t'accorde la bonne santé, longue vie et bonheur.

A mes chères adorable frères Abd el fettah, et Abd el razzak Amar.

A mes chère adorables sœurs Rania, et. Lamis

A ma chère binôme Meriem.

A toute ma grande famille (en particulier mes oncles Fethi, Amine et son épouse Sissi).

A tous mes amis, et toute personne que je connais, a toute la promotion Master II Phytopharmacie et protection des végétaux 2020.

NAHLA.

DÉDICACES

Aux êtres les plus chers à mon cœur, mon père Ayadi Rabah et ma mère Nefradji Assia, qui ont consacré leur noble existence à bâtir la mienne. De ma vie je ne saurai assez leur exprimer mon affection, ma reconnaissance et mon amour.

A ma chères sœurs Maria, Marwa et Maram qui font une partie de mon bonheur.

A mon fchère mari kerrouche Nouredine, qui a su de loin m'encourager et me soutenir.

A ma chère cousine, ma binôme Nahla et, avec qui j'ai grandi, et que je partage ce moment si précieux.

A toute ma famille, oncles et tantes, cousins et cousines, petit et grand, sans exception. A la mémoire de mon grand-père Nefradji Mohamed. Qui m'a toujours tenu la main et qui ne m'a jamais lâché de son existence.

A tous mes amis, et toute personne que je connais, a toute la promotion Master II Phytopharmacie et protection des végétaux 2020.

MERIEM.

Incidence du mode cultural sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles du romarin

Résumé

Dans le cadre de la recherche sur les procédés de lutte biologique basées sur l'essai de l'utilisation de substances végétales connues comme agents antimicrobiens, Antiparasitaires et insecticides et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, nous nous sommes intéressés à deux espèces spontanées *Rosmarinus officinalis L.*, *Rosmarinus tournefortii L.* Cette étude a visé l'évaluation du pouvoir bactéricide de l'huile essentielle du Romarin issues de différentes conduites d'apport stimulateurs par application foliaire (application du vermicompost liquide, application du vermicompost solide, application d'une solution saline et application de l'eau de ville), vis-à-vis trois souches de bactéries *Escherichia coli*, *staphylococcus aureus* et *pseudomonas aerogenosa*. Les huiles essentielles sont obtenues par extraction par hydrodistillation. Les résultats de l'extraction révèlent, que le rendement de *Rosmarinus officinalis L* est plus intéressant que celui de *Rosmarinus tournefortii L.* Cependant, les mêmes résultats font apparaitre que le rendement en huile essentielle augment sous l'effet stimulateurs pour les deux espèces du Romarin, les résultats des activités antibactériennes procédés par la méthode de diffusion a dénoncé que l'activité des huiles essentielles était liée à l'effet stimulateur.

Néanmoins Les bactéries *E coli* et *staphylococcus aureus* étaient plus sensible par rapport au *pseudomonas aerogenosa* (résistante)

Mots clés : activité antibactérienne, huiles essentielles, mode cultural, *Rosmarinus officinalis L.*, *Rosmarinus tournefortii L.*, Stimulateurs.

Impact of the cultivation method on the antibacterial activity of rosemary essential oils

Abstract

As part of research on biological control processes based on testing the use of plant substances known to be antimicrobial agents, antiparasitics and insecticides and as part of the enhancement of the Algerian flora, we were interested in two spontaneous species *Rosmarinus officinalis* L., *Rosmarinus tournfortii* L. This study aimed to evaluate the bactericidal power of the essential oil of Rosemary from different stimulator supply lines by foliar application (application of liquid vermicompost, application of solid vermicompost, application of a saline solution and application of tap water), vis-à-vis three strains of bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The essential oils are obtained by extraction by hydrodistillation. The results of the extraction reveal that the yield of *Rosmarinus officinalis* L is more interesting than that of *Rosmarinus tournfortii*. However, the same results show that the yield of essential oil increases under the stimulatory effect for the two species of rosemary, the results of the antibacterial activities carried out by the diffusion method denounced that the activity of essential oils was linked to the stimulating effect. However, *E coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria were more sensitive compared to *Pseudomonas aeruginosa* (resistant)

Key words: antibacterial activity, essential oils, cultivation mode, *Rosmarinus officinalis* L., *Rosmarinus tournfortii* L., Stimulators

تأثير طريقة الزراعة على النشاط المضاد للبكتيريا لزيوت إكليل الجبل الأساسية

الملخص

كجزء من البحث في عمليات مكافحة البيولوجية على أساس اختبار استخدام المواد النباتية المعروفة بأنها عوامل مضادة للميكروبات، مضادات الطفيليات والمبيدات الحشرية وكجزء من تعزيز النباتات الجزائرية، كنا مهتمين بنوعين عفويين *Rosmarinus officinalis L.* و *Rosmarinus tournfortii L.* هدفت هذه الدراسة إلى تقييم قوة مبيد الجراثيم للزيت العطري لإكليل الجبل. خطوط إمداد محفز مختلفة عن طريق التطبيق الورقي (تطبيق السماد الدودي السائل، تطبيق السماد الدودي الصلب، تطبيق محلول ملحي وتطبيق ماء الصنبور)، مقابل ثلاث سلالات من بكتيريا *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aerogenosa*. يتم الحصول على الزيوت الأساسية عن طريق الاستخلاص بالتقطير المائي. وتكشف نتائج الاستخراج أن محصول *Rosmarinus officinalis L.* أكثر إثارة للاهتمام من محصول *Rosmarinus tournfortii L.* ومع ذلك، أظهرت نفس النتائج أن محصول الزيت العطري يزداد تحت التأثير التحفيزي لنوعي إكليل الجبل، وقد دحضت نتائج الأنشطة المضادة للبكتيريا التي نفذتها طريقة الانتشار أن نشاط الزيوت الأساسية كان مرتبطاً بتأثير محفز. ومع ذلك، كانت بكتيريا *E coli* و *Staphylococcus aureus* أكثر حساسية مقارنةً بكتيريا *Pseudomonas aerogenosa*

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للبكتيريا، الزيوت الأساسية، طريقة الزراعة، المنبهات،

Rosmarinus tournfortii L. *Rosmarinus officinalis L.*

TABLE DE MATIERE

REMERCIEMENT

Dédicaces

Résumé

Abstract

الملخص

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE	01
CHAPITRE 1 : APERÇUS BIBLIOGRAPHIQUES	02
1. Investigation des caractéristiques des plantes modèles.....	02
1.1. Présentation des caractéristiques de Rosmarinus officinalis et de Rosmarinus tournefortii	02
1.1.1. Famille botanique d'appartenance	02
1.1.2. Aire de répartition en Algérie et dans le monde.....	03
1.1.3. Description botanique.....	03
1.1.4. Composition en métabolites secondaires	03
1.1.5. Utilisation et intérêts du genre Rosmarinus	04
2. Nature et distribution des huiles essentielles	06
3. Classification et voies de synthèse des huiles essentielles.....	07
3.1.1. Variabilité phytochimique	07
3.1.2. Propriétés physico-chimiques.....	08
3.1.3. Méthodes d'extraction	09
3.1.3.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :.....	09
3.1.3.2. Extraction par hydro distillation.....	09
3.1.4. Méthodes d'analyses (Chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse « CPG/SM»)	10
4. Réponse des plantes au concept stress « facteurs biotiques et abiotiques » par requête au huiles essentielle	10
5. Implication des huiles essentielles comme molécules de défense chez les plantes	11
6. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles	12

7.Expression des molécules bioactives en cas de bio agression par des agents pathogènes microbiens	12
7. 1. Interaction plante hôte / agents pathogènes	12
7.1.1. La résistance passive	12
7.1.2. La résistance active.....	13
7.2. Les plantes, leurs activités et leurs composés antimicrobiens	13
8. Nutrition organique des plantes aromatiques par le vermicompost	16
8 .1. Effet de la nutrition organique sur le rendement des huiles essentielles	16
8.2. Effet de la nutrition organique sur la composition des huiles essentielles	16
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	17
1. Objectif du travail.....	17
2. Situation géographique de la région d'étude	17
3. Caractéristiques climatiques	18
4. Présentation des sites d'étude	19
4 .1 .Site d'étude de jardin d'essai du Hamma	19
4 .2. Site d'étude Mausolée royal de Maurétanie	20
5. Matériel d'étude.....	20
5.1. Matériel végétale	20
5.2. Matériel bactérien.....	21
5.3. Milieu de culture	23
6. Méthode d'extraction et de caractérisation des huiles essentielles	23
6.1. Extraction de l'huile essentielle hydro- distillation.....	23
7. Calcul du rendement en huiles essentielles	24
8. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles.....	25
8.1. Préparation du milieu de culture.....	25
8.2. Préparation des dilutions.....	25
8.3. Préparation des disques.....	25
8.4. Ré-isolément des souches bactériennes.....	25
8.5. Préparation des disques bactériens	26
8.6. Application des disques.....	26
8.7. Incubation.....	26
9. Expression des résultats	27
10. Analyse statistique des données	27
Chapitre 3 : Résultats et discussion.....	28

1. Estimation du rendement de l'huile essentielle du romarin sous l'effet des différents stimulateurs.	28
1 .1. Le rendement de l'huile essentielle de Rosmarinus officinalis sous l'effet des différents stimulateurs	28
1 .2. Le rendement de l'huile essentielle de Rosmarinus tournefortei sous l'effet des différents stimulateurs	28
2. Étude comparative entre l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et la préparation formulée à base d'huile essentielle	28
3. Étude comparative entre la sensibilité des souches bactériennes à l'huile essentielle et à la préparation formulée à base d'huile essentielle.....	31
DISCUSSION	34
Conclusion	37
Références bibliographiques	38

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

Figure 1 : Méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau.....	09
Figure 2 : Localisation géographique de la plaine de la Mitidja.....	18
Figure 3 : Image satellite du carré botanique de jardin d'essai	19
Figure 4 : Image satellite de zone d'étude au niveau de Mausolée royal Mauritanie..	20
Figure 5 : Peuplement des deux romarins du site d'étude A : <i>Rosmarinus officinalis</i> B : <i>Rosmarinus tournefortii</i>	21
Figure 6 : Dispositif d'hydrodistillation type Clevenger.....	24
Figure 7 : Disposition des disques sur la gélose	26
Figure 8 : Sensibilité d' <i>Escherichia coli</i> aux huiles essentielles et aux préparations formulées à base d'huiles essentielles de <i>Rosmarinus</i>	29
Figure 9 : Sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> aux huiles essentielles et aux préparations formulées à base d'huiles essentielles de <i>Rosmarinus</i>	30
Figure 10 : Comparaison de l'activité antibactérienne de <i>Rosmarinus tournefortii</i> en absence et en présence de l'adjuvant	32
Figure 11 : comparaison de l'activité antibactérienne de <i>Rosmarinus officinalis</i> en absence et en présence de l'adjuvant	33

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classe majeure de composés antimicrobiens des plantes et mécanisme d'action	14-15
Tableau 2 : Déterminismes des caractéristiques pathogènes des souches bactériennes testées	22

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Boussoussaa ,2016).

Parmi les plantes aromatiques et médicinales utilisées dans la médecine moderne le Romarin (*Rosmarinus officinalis*, *Rosmarinus tourni fortei*), le Romarin a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutiques il possède d'excellentes propriétés anti-oxydants et antibactériennes, le romarin comme toutes les plantes aromatiques et médicinales, contient des composés chimiques ayant des propriétés antibactériennes, l'utilisation de ces molécules à base de plantes peut présenter de nombreuses avantages par rapport aux produits de synthèses actuels (jones, 1998)

Les bactéries sont responsables de plusieurs maladies infectieuses, leur résistance aux antibiotiques et aux produits de synthèses actuels est de plus en plus prononcée. Pour arrêter ce process de synthèse - résistance, il est nécessaire de chercher une autre approche alternative afin de diminuer ou d'éliminer les affections sans l'utilisation des produits synthétiques donc il est évident de trouver des solutions par l'utilisation des molécules bioactives qui sont à base de plante (vanden berghe et vlietinck , 1991) .

Dans cet ordre de réflexion, nous avons orienté nos travaux de recherche vers l'exploitation des ressources végétales locales. Malgré l'existence d'une bibliographie relativement riche sur le genre *Rosmarinus*, peu de données ont été proclamées sur ces espèces préconisées dans cette étude et sur leurs origines géographiques. Or, la valorisation de ces espèces passe principalement par leur évaluation biochimique et biotechnologique à travers l'extraction, l'analyse et l'identification de leurs constituants composés biactifs. Suite à des bio-prospections nous nous sommes intéressés aux l'huiles essentielles.

Chapitre 1 :
Aperçus
bibliographiques

CHAPITRE 1 : APERÇUS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Investigation des caractéristiques des plantes modèles

1.1. Présentation des caractéristiques de *Rosmarinus officinalis* et de *Rosmarinus tournefortii*

1.1.1. Famille botanique d'appartenance

La famille des Lamiacées comprend environ 3000 espèces dont l'aire de répartition est extrêmement étendue, mais avec une prépondérance dans les régions méditerranéennes (Spichiger et *al.*, 2002). Ce sont le plus souvent des plantes herbacées, des arbustes et rarement des arbres ou des lianes, producteurs d'huiles essentielles, largement répandues autour du monde et dans tout type de milieux (Harley et *al.*, 2004). L'ordre des Lamiales regroupe 260 genres et entre 6500- 7000 espèces. Cosmopolites mais concentrées dans la région méditerranéenne, elles sont généralement des plantes des milieux ouverts. (Dupont et Guigrand, 2007).

La famille des lamiacées est une famille des plantes herbacées à buissonnantes à tiges quadrangulaires, à feuilles simples, opposées décussées et stipulées, souvent velues et à poils sécréteurs, aromatiques. L'adaptation xérophile est fréquente. L'inflorescence est cymeuse ou racémeuse, parfois en faux verticilles. (Small et Grace ,2001).

Taxonomie et systématique des espèces

Le nom provient du latin (*Rosmaris*) qui signifie rosée de la mer, sa classification est la suivante (Goetz et Ghedira, 2007)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta
Sous-embranchement	Magnoliophytina
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales

Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Rosmarinus</i>

1.1.2. Aire de répartition en Algérie et dans le monde

Rosmarinus officinalis est une plante commune à l'état sauvage, c'est sans doute l'une des plantes les plus populaires, car elle se rencontre dans les jardins et les parcs en bordures odorantes (Quezel et Santa, 1963). Elle est spontanée de tout le bassin méditerranéen et plus particulièrement du littoral qui demande un sol calcaire, de faible altitude, ensoleillé et modérément sec. De par ces exigences elle est indigène des pays méditerranéens tels que, Italie, Espagne, Tunisie, Maroc, Algérie, Ex-Yougoslavie, Albanie, Egypte, Palestine, Grèce, Chypre et jusqu'en Asie mineure, au Portugal, au nord-ouest de l'Espagne (Davis, 1982 ; Tutin et al., 1972 ; Greuter et al., 1986). En France, elle est abondante dans les garrigues du Midi (Provence, Languedoc, Pyrénées Orientales, Corse). *Rosmarinus tournefortii* est présente dans toute l'Algérie sauf dans les Hauts plateaux algérois et oranais, Oranais et Algérois est rare (Adil et Yousfi, 2001).

1.1.3. Description botanique

Rosmarinus officinalis L : Inflorescences et calice à pilosité pruineuse très courte constituée par des poils étroitement appliqués. Inflorescences en épis très courts, à bractées squamiformes de 1-2 mm, rapidement caduques (incl. *Rosmarinus laxiflorus* (de Noé). (Quezel et Santa, 1963) *Rosmarinus tournefortii* de Noé : Inflorescences et calice à pilosité double, l'une courte, l'autre constituée par de longs poils dressés glanduleux au sommet. Inflorescences plus longues, à bractées amples cordiformes longues de 3-4 mm (incl. *R. officinalis* L. var. *lavandulaceus* Batt. Non de Noé). (Quezel et Santa, 1963).

1.1.4. Composition en métabolites secondaires

Le romarin est riche en principes actifs. Il contient des flavonoïdes, des acides phénols, notamment l'acide rosmarinique (2 à 3 %) (Bérenge et al., 2000). Les feuilles de romarin contiennent de la résine, de tanin, une substance amère et environ 1.50 %

d'une essence spéciale à odeur aromatique, saveur chaude et camphrée, de cinéole et de camphre ordinaire. Perrot a découvert la présence de poils sécréteurs de deux sortes dans le limbe de la feuille de Romarin. Les sécrétions sont les produits du métabolisme végétal qui comprennent les huiles essentielles, les gommes et les mucilages, les tanins, les alcaloïdes, les nectars, etc. D'autre part, Spiro et Chen rapportent que l'huile essentielle de Romarin est contenue dans des glandes épidermiques appelées trichomes, divisées essentiellement en deux types principaux (peltate et capitate glands). Le premier type serait le site de stockage le plus important de l'huile essentielle de romarin. Il faut rappeler que la libération de l'huile n'est possible que si un facteur externe intervient (Zermane,2010).

Les principaux constituants de l'huile essentielle de Romarin sont :

- Huile essentielle : 1,8 cinéole, β -pinène, camphre
- Acides phénols : acides caféique, rosmarinique et chlorogénique
- Diterpènes phénoliques : acide carnosolique etcarnosol
- Tanins
- Triterpènes et stéroïdes : acides oléanoliques et ursoliques
- Flavonoïdes glucosides de flavones simples (Brunton.,1999)

1.1.5. Utilisation et intérêts du genre *Rosmarinus*

Depuis longtemps, le romarin est utilisé à des fins très diverses.

- **Usage interne**

Le romarin est connu pour ces multiples propriétés. En raison de sa teneur en huile essentielle, la drogue est utilisée comme carminatif et stomachique dans les troubles digestifs, les ballonnements, les flatulences, mais aussi pour stimuler l'appétit et les sécrétions gastriques. Son usage comme cholagogue et cholérétique, rare en Allemagne, plus répandu en France, est surtout dû aux principes amers. Le romarin présente aussi, des propriétés emménagogues dues à l'hyperémie qu'il détermine dans les organes du bassin. Ses propriétés emménagogues, sont mises à profit dans le traitement de l'aménorrhée, oligoménorrhée, dysménorrhée (Garnier et al.,1961). La drogue est également employée en traitement complémentaire dans les troubles circulatoires. Et l'acide rosmarinique développe une activité antiinflammatoire in vivo chez le rat (Anton et Wichil,1999). C'est de plus un bactéricide, son extrait aqueux tue

les colibacilles (Diaz et al., 1988). L'infusion de feuilles de romarin, calme les nerfs, surtout au moment de la ménopause (Volak et Stodola, 1983). Il est donc l'ami des femmes et il combat aussi les infections de la peau (Messegur, 1983).

- **Usage externe :**

Le romarin entre dans la composition du « vinaigre des 4 voleurs ». Il entre dans la composition du vin aromatique, des baumes tranquilles, de l'eau de dardel (stimulant), du baume nervin (stimulant, antirhumatismal) (Valnet, 1984).

L'huile essentielle et certaines préparations à base de romarin entrent dans la composition d'huile et de pommades comme liniment analgésique contre les rhumatismes et comme additif de bain pour une stimulation sanguine locale et leur effet vasodilatateur (Anton et Wichtl, 1999). Elle est aussi utilisée en cas de nez bouché, de rhume et de bains de l'oppression, l'insomnie, la nervosité et les troubles intestinaux.

- **En médecine traditionnelle :**

La drogue est utilisée en compresse pour éviter les retards et cicatrisation et l'eczéma, et d'une façon plus générale, comme insecticide (Anton et Wichtl, 1999). Elle utilise largement les vertus du romarin que ce soit en usage externe (antiseptique, cicatrisant) ou interne (tonique, cholérique et cholagogue) (Bezanger et al., 1990).

- **En alimentation**

L'utilisation du romarin en tant qu'aromate se fait sous plusieurs formes et plusieurs conditionnements : En sec, les feuilles sont utilisées pour accompagner viande et poissons grillés ; les bouquets garnis aromatisent les sauces tomates ou les ragoûts (avec thym et laurier sauce) (I.T.E.I.P.M.A.I, 1991). En frais, le romarin entre dans la composition des vinaigres. Sa forte teneur en bornéol lui confère de puissantes propriétés antiseptiques qui font de lui un bactéricide de choix en conserverie (I.T.E.I.P.M.A.I, 1991). La plante est très utilisée en agroalimentaire comme conservateur et antioxydant, pour la conservation de la viande et des graisses (Perrot et Paris, 1971). L'huile essentielle de romarin se trouve avoir plusieurs activités, antimicrobiennes (Farg et al., 1986 ; Romero et al., 1989).

- **En parfumerie :**

L'utilisation du romarin en parfumerie est très ancienne. On connaît en particulier l'eau de la Reine de Hongrie, alcoolat fréquemment utilisé au XVII^e-ème siècle et qui pourrait avoir été conçu dès le XIV^e-ème siècle, dont le romarin était un des principaux composants. L'eau florale de romarin est très souvent utilisée en cosmétique pour son pouvoir purifiant. Elle est excellente pour les peaux grasses ou acnéiques, grâce à ses vertus régulatrices et ré équilibrantes, elle purifie et assainit la peau. On l'introduit dans les shampoings pour éliminer les pellicules, dans lotions capillaires elle permet d'encourager la croissance du cheveu en améliorant la circulation du sang du cuir cheveu. Elle est donc tout particulièrement utilisée en usage externe dans les lotions capillaires pour ses effets stimulants sur les follicules des cheveux et éviter les calvities précoces (Kaufman et *al.*,1999). Le romarin entre dans la composition de parfums surtout masculins, hespéridés aromatiques (eaux de Cologne), boisés et fougères aromatiques, ainsi que dans la formulation des pommades dermiques (Calabrese et *al.* ,2000) étudièrent la faculté des extraits de romarin a protégé la peau des lésions cutanées induites par les radicaux libres. Ils sont montrés la validité réelle de la biotechnologie des antioxydants naturels dans la gestion de l'antivieillessement de la peau (Eberhard et *al.* ,2005).

2.Nature et distribution des huiles essentielles

Les huiles essentielles ou essences végétales sont des produits huileux, volatils, odorants et incolores ou légèrement teintés, obtenus par distillation à la vapeur d'eau, par expression, par incision ou par enfleurage du matériel végétal (Budavari et *al.*, 1996). Ces essences végétales sont largement distribuées dans le règne végétal et n'existent que chez les végétaux supérieurs. En effet, elles se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles botaniques comme par exemple chez les Lamiacées (lavande, basilic, menthe...), les Myrtacées (eucalyptus...), les Lauracées (cannelle et sassafras), et les Apiacées (coriandre, cumin, fenouil, persil, ...) (Richter ,1993). Les huiles essentielles se trouvent dans tous les organes de la plante : racines, fruits, graines, fleurs, feuilles, écorces, bois, etc... Elles se forment dans des cellules spécialisées, le plus souvent, regroupées en canaux ou en poches sécréteurs et elles sont ensuite transportées dans les différentes parties de la plante, lors de la croissance de cette dernière (Bernard ,1988). Elles se différencient des huiles grasses, par leurs propriétés physiques et leur composition, du fait qu'elles se volatilisent à la

chaleur et que leurs taches sur le papier sont passagères (Sallé, 1991) Elles se caractérisent par leurs propriétés organoleptiques (odeur, couleur, goût). A la température ambiante, elles sont généralement liquides de densité souvent inférieure à celle de l'eau. Elles sont incolores ou jaune pâle, sauf quelques exceptions comme les H. Es de la cannelle (orange), de l'absinthe (vert) ou de la camomille (bleu).

3. Classification et voies de synthèse des huiles essentielles

Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes (Buchanan et *al.*, 2000). La classe des terpénoïdes est la plus variée au niveau structural. Les terpénoïdes, dont 25 000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopenténylpyrophosphate. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C5), qui sont formés d'une seule unité isoprénique. Les autres molécules, appartenant à cette classe, résultent de la condensation de plusieurs isoprènes. Ainsi, les monoterpénoïdes (C10) sont constitués de deux unités isopréniques alors que les sesqui-terpénoïdes (C15) sont formés par l'association de trois isoprènes. Les monos et les sesquiterpénoïdes sont les plus représentés dans les huiles essentielles. Les phénylpropanoïdes, ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle.

3.1.1. Variabilité phytochimique

Les compositions chimiques de nombreuses huiles essentielles ont été décrites. Elles varient en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (Delaquis et *al.*, 2002 ; Gonny et *al.*, 2004) . Au sein d'une même espèce la composition chimique de l'huile essentielle peut être différente : on parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Il s'agit d'un polymorphisme chimique : une espèce peut être homogène au niveau de son caryotype et produire des huiles essentielles de compositions différentes. Le cas de *Chromoleana odorata* qui présente divers chémotypes (Bedi et *al.*, 2001).

3.1.2. Propriétés physico-chimiques

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène (Bruneton, 1993). Les principales caractéristiques sont :

- Liquides à température ambiante.
- Volatiles et très rarement colorée
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en terpènes
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en terpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en mon terpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse.
- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants Organiques mais peu solubles dans l'eau.
- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés Asymétriques.
- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité (Zabeirou et Hachimou ,2005).

3.1.3. Méthodes d'extraction

3.1.3.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'un des procédés d'extraction les plus anciens et l'une des méthodes officielles pour l'obtention des HE. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un flux de vapeur descendant ou ascendant sans macération préalable. Le plus souvent, de la vapeur d'eau est injectée au bas d'une charge végétale. Les vapeurs chargées en composés volatils sont condensées avant d'être décantées et récupérées dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles (Peyron., 1992). Les principales variantes de l'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont l'hydrodistillation, la distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion.

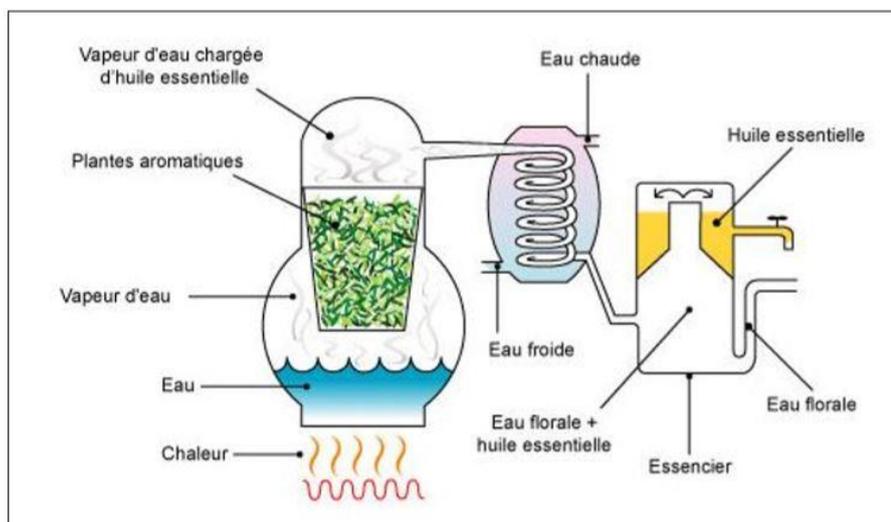


Figure 01 : Méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau

(Elaerts, 2014)

3.1.3.2. Extraction par hydro distillation

Le principe de l'hydro-distillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur

du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux (Chemat, 2009)

3.1.4. Méthodes d'analyses (Chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse « CPG/SM »)

Chromatographie en phase gazeuse est une méthode de référence à l'analyse des huiles essentielles ; elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature volatil très variées (Chikhi, 2014). Elle consiste à injecter le mélange complexe diluée dans un solvant (non retenu par la phase stationnaire) dans une colonne (Heni ., 2016) . Les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification (Labiod., 2016). L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). C'est la technique la plus utilisée, car elle permet de réaliser une analyse complète de plus d'une centaine de molécules chimiques que contient l'huile. Le spectromètre de masse (SM), que l'on associe souvent à la chromatographie (CPG-SM), permet lui d'obtenir la composition précise de l'huile essentielle (Bouhaddouda, 2016)

4.Réponse des plantes au concept stress « facteurs biotiques et abiotiques » par requête au huiles essentielle

Les plantes ont élaboré des stratégies de défense envers les bioagresseurs leur permettant de résister à la plupart des agressions parasitaires. Bien que des barrières constitutives confère à la plante une résistance générale hautement efficace, l'induction de défenses plus adaptées à l'infection est nécessaire. Si les réponses sont tardives ou peu intenses, la plante sera sensible au parasite ; l'interaction est dite compatible. Si La défense active est rapidement induite avec une forte intensité, l'extension de la maladie est bloquée et la plante résiste. Si la résistance résulte de l'activation de gènes de résistance (R), l'interaction est dite incompatible et son phénotype est, dans la plupart des cas une réaction d'hypersensibilité (RH) (Duhoux et Nicole, 2004).

Les conditions environnementales comme la température, la lumière, le déficit hydrique ou encore l'ozone peuvent influencer la production des terpènes volatils (Bertin et Staudt, 1996). Chez le maïs, les émissions de composés organiques volatils suite à l'attaque par un herbivore sont modifiées par la température, la lumière, l'humidité du sol, l'humidité de l'air et le degré de fertilisation (Gouinguéné et Turlings 2002). Les auteurs ont mis en évidence une très forte action de la lumière puisqu'aucune émission n'est détectée sans lumière. De plus, la quantité totale d'émission de composés organiques volatils est inversement proportionnelle à l'augmentation de l'humidité du sol. Pourtant, tous les composés du bouquet ne réagissent pas de la même façon. Les quantités de linalol (monoterpène), β -caryophyllène (sesquiterpène) et (E)- α -bergamotène (sesquiterpène) augmentent avec l'humidité tandis que le géranyl acétate (monoterpène) et (E)- β -farnésène (sesquiterpène) sont peu abondants quand l'humidité du sol est forte. Devant le grand nombre d'études montrant les effets des stress abiotiques sur la production et l'émission de terpènes volatils (Bertin and Staudt 1996;Lavoir et *al.*, 2009), leur rôle dans la tolérance au stress a été proposé. Les terpènes volatils seraient impliqués dans la thermotolérance (Singsaas et *al.*, 1997; Velikova et *al.*, 2011), la tolérance à l'ozone et la tolérance au stress oxydant (Affek et Yakir , 2002).

5.Implication des huiles essentielles comme molécules de défense chez les plantes

Pour certains auteurs, les huiles essentielles constitueraient « les déchets » du métabolisme cellulaire de la plante (Salle, 1991). Pour d'autres, elles serviraient à attirer les insectes pour permettre la fécondation ou alors à les éloigner de la plante. L'attrait des insectes pour les plantes à fleurs en vue de la pollinisation est également crédité aux huiles essentielles que ces plantes contiennent. Les huiles essentielles constitueraient enfin un moyen de défense de la plante vis-à-vis des prédateurs tels que les microorganismes (bactéries et champignons) et les herbivores (Bruneton, 1999). Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes en tant que substances antibactérienne, antiviral, antifongique, insecticide et aussi contre les herbivores en réduisant leur appétit pour une telle plante. Elles peuvent

attirer aussi des insectes en favorisant la dispersion de pollens et graines, ou au contraire repousser d'autres indésirables (Bakkali et *la*,2008).

6.Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (Sipailiene et *al* ., 2006). Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudo-mycéliums alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

7.Expression des molécules bioactives en cas de bio agression par des agents pathogènes microbiens

7. 1. Interaction plante hôte / agents pathogènes

Le fonctionnement des compartiments végétal et microbien étant fortement lié, alors l'étude des plantes implique celle des microorganismes. Ainsi, les services imputés à chaque partenaire résultent souvent de l'interaction entre les deux. En effet, les services écosystémiques fournis par les plantes sont indirectement dus aux microorganismes car ils interviennent dans l'établissement même des communautés végétales et régulent la productivité, la composition et la diversité des communautés végétales ainsi que leur qualité nutritionnelle. La diversité microbienne est donc importante (Gamfeldt et *al.*, 2008) de même que la diversité végétale (Finlay et *al.* ,1997).

7.1.1. La résistance passive

La présence de substances plus ou moins toxiques, huiles essentielles, alcaloïdes, etc., doit être également comptée parmi les moyens de défense de la plante contre les microorganismes. Les composés phénoliques, en particulier, paraissent jouer souvent un rôle assez efficace, d'après Dufrenoy, qui fait remarquer que les variétés colorées en rouge par l'anthocyane se montrent souvent résistantes aux parasites

capables d'infester (des plantes de même espèce dépourvues de ce pigment). Les travaux D'angeix, Walker et Link ont montré que cette résistance est due à la présence, dans les écailles extérieures, de deux composés phénoliques incolores, l'acide protocatéchique et le catéchol, qui sont associés avec les composés colorés et qui, en solution dans l'eau, empêchent la germination des spores du Champignon en entravant la croissance du mycélium. Mais si l'on enlève les écailles extérieures, le parasite pénètre aussi facilement que dans les variétés à pelure blanche. Il en est donc de ce mode de défense comme des obstacles mécaniques, il ne peut assurer une immunité absolue (Pierre, 1946).

7.1.2. La résistance active

Les étapes chronologiques impliquées dans l'initiation des différentes réactions de défense élaborées par les plantes suite à une attaque par un agent pathogène ont fait l'objet d'études approfondies (Yoshikawa *et al.*, 1993). Ainsi, il a été clairement démontré que les événements les plus précoces, intervenant dans les minutes suivant le contact avec l'agent pathogène, incluaient une dépolarisation membranaire, une production intense de formes actives de l'oxygène, un phénomène dénommé « burst oxydatif » ou stress oxydatif, et une augmentation du taux de Ca^{2+} intracellulaire liée à une fuite d'électrolytes (Bolwell et Wojtaszek, 1997). Les études portant sur la nature du stimulus d'élicitation menant à de tels changements de l'intégrité membranaire ont conduit à l'identification et à la caractérisation de plusieurs molécules élicitrices, ainsi qu'à la mise en évidence de sites très spécifiques de liaison, les récepteurs membranaires (Cote et Hahn, 1994). Cependant, en dépit des nombreux efforts fournis pour isoler et purifier ces récepteurs, leur caractérisation moléculaire demeure encore fragmentaire.

7.2. Les plantes, leurs activités et leurs composés antimicrobiens

Un grand nombre de plantes, aromatiques, des plantes épicées et autres, possèdent des propriétés antimicrobiennes très importantes qui trouvent des applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture (Bahorun, 1997).

Les recherches actuelles sur les molécules antimicrobiennes d'origine naturelle se concentrent principalement sur les plantes, car ils peuvent être achetés plus facilement et seront sélectionnés sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle (Yano et al., 2006). Le mécanisme d'action de ces composés passe par la désorganisation de la membrane plasmique, la formation des complexes avec la paroi, l'inhibition des enzymes, l'interaction avec l'ADN (Tableau 1) (Cowan, 1999)

Tableau 1 : Classe majeure de composés antimicrobiens des plantes et mécanisme d'action (Cowan, 1999).

Classes	Sous classe	Exemples	Mécanisme d'action
Phénols	Phénols simples	Catéchol	Privation en substrat
	Acides phénoliques Quinones	Acide cinnamique	Perturbation de la membrane Liaison aux adhésines, complexe avec la paroi cellulaire, inactive les enzymes
		Hypéricine	
	Flavonoïdes Flavones	Chrysin	Liaison aux adhésines, Complexe avec la paroi cellulaire Inactive les enzymes Inhibe la transcriptase reverse du HIV
		Abyssinone	
	Flavonols Tannins	Totarol	Liaison aux protéines Liaison aux adhésines Inhibition des enzymes Privation en substrat Complexe avec la paroi cellulaire
		Ellagitannine	
	Coumarines	Warfarine	Complexe aux ions de métaux
	Terpenoïdes, huiles essentielles		
Alcaloïdes			

Lectines et polypeptides		Capsaïcine Berberine Pipérine Agglutinine spécifique du mannose Fabatine	Interaction avec l'ADN eucaryote (activité antivirale) Perturbation de la membrane Intercalle avec la paroi et/ou l'ADN Bloque la fusion ou l'adsorption virale
--------------------------	--	--	--

8. Nutrition organique des plantes aromatiques par le vermicompost

Il existe une forte relation entre la teneur en matière organique du sol et la fertilité du sol (Melero et al., 2007). À l'heure actuelle, l'utilisation d'engrais organiques et de biofertilisants, tels que le vermicompost, a entraîné une diminution de l'application d'engrais chimiques et fournit des produits de haute qualité sans produits agrochimiques nocifs pour la sécurité humaine (Mahfouz et Sharaf Eldin, 2007) De plus, le vermicompost peuvent avoir un effet positif sur l'amélioration des propriétés chimiques du sol en libérant progressivement des nutriments et ils améliorent également l'état physique du sol (Darzi et al, 2009).

8.1. Effet de la nutrition organique sur le rendement des huiles essentielles

Le vermicompost est enrichi de plusieurs microbes du sol bénéfiques et contient également de nombreux nutriments comme N, P et K (Sinha et al., 2010). Certaines études ont rapporté que le vermicompost peut augmenter la quantité et la qualité de l'huile essentielle dans quelques plantes médicinales comme le basilic (Singh et Ramesh, 2002), la coriandre (Singh et al., 2009), le fenouil (Darzi et al., 2009; Moradi et al., 2011), la camomille (Haj Seyedhadi et al., 2011), le cumin (Saeid Nejad, 2011).

8.2. Effet de la nutrition organique sur la composition des huiles essentielles

Certaines études ont montré que les lixiviats de vermicompost ou les extraits d'eau de vermicompost utilisés comme additifs de substrat ou pulvérisations peuvent stimuler la floraison tardive, augmenter la biomasse et le nombre de fleurs (Arancon et al., 2008) En outre, l'application de différents niveaux de vermicompost dans *Ocimum basilicum* L. a augmenté le rendement de la biomasse et a également amélioré la qualité et le rendement en huile essentielle (Anwar et al., 2005). L'effet de l'amélioration de la vermicompost sur la teneur et la composition des huiles essentielles a été signalé dans *Ocimum basilicum* et *Rosmarinus officinalis* (Esmail et al., 2017).

Chapitre 2 :

Matériel et méthodes

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Objectif du travail

Notre étude a pour objectif d'étudier les potentialités antibactériennes des huiles essentielles de deux espèces de romarin *Rosmarinus officinalis* L. et *Rosmarinus tournefortii*, issues de différentes conduites d'apport stimulateurs par application foliaire (application du vermicompost liquide, application du vermicompost solide, application d'une solution saline avec 25 Mm de concentration et application de l'eau de ville).

2. Situation géographique de la région d'étude

Les régions d'étude (Tipaza et Alger) font partie de la plaine de la Mitidja. C'est la plus vaste plaine sublittoral de l'Algérie, elle s'étend sur une longueur de 100Km, et une largeur de 5 à 20 km, sa superficie est de 140 000hectares.Elle est limitée au nord par la ride de sahel, qui l'isole de la mer méditerranéenne, au nord-ouest par djbel Chenoua, et la retombe de la chaine de ben Mraade, avec le djbel Zaccor formant ainsi la plaine. Au sud par l'atlas mitidjien, constitué de chainons de Zaccor (800m), et l'atlas blidienne proprement dit avec 160m au pic de Mouzaya et 1692m au djbel de Guerroumen. A l'est ce sont les hauteurs et les collines de basses Kabylie qui forment la plaine. La plaine ne s'ouvre directement sur la mer que sur quelques kilomètres séparent l'oued Reghaia et l'oued Boudouaou, elle constitue une vaste carène dissymétrique sur fond incliné, Dajoz (1971), (Fig., 2).

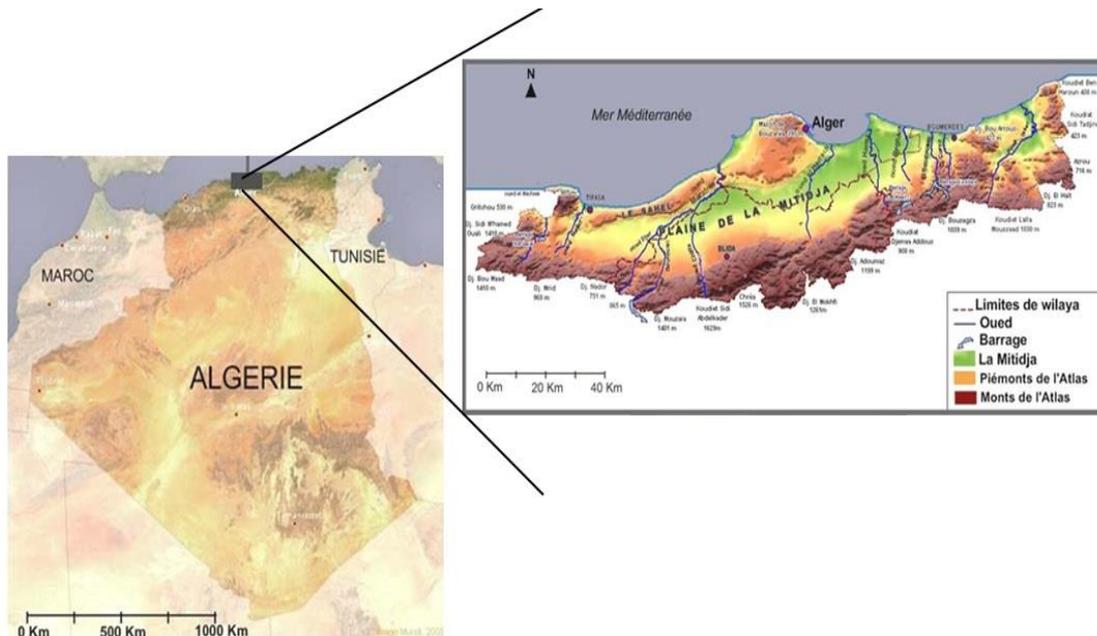


Figure 2 : Localisation géographique de la plaine de la Mitidja (Google -Earth)

3. Caractéristiques climatiques

Le diagramme ombrothermique de BAGNOULS et GAUSSEN et le climagramme pluviométrique d'EMBERGER dégagent certaines caractéristiques de climat de la région d'étude. Le diagramme Ombrothermique établie pour la période (1995 à 2013) se caractérise par deux périodes fondamentales : l'une humide de sept mois s'étalant de janvier à avril puis d'octobre à décembre, l'autre sèche d'un intervalle de cinq mois de mai à septembre. Sur le plan thermique, Les mois les plus froids sont janvier et février avec des températures moyennes minimales respectives de 4,49 °C et 4,48 °C, et une température moyenne maximale de 20,31 °C et 22,56 °C, tandis que les mois les plus chauds sont juillet et août avec des températures moyennes maximales respectives de 37,2°C et 37,00°C et de 20,54°C suivie de 22.01°C comme température moyenne minimales. En Mitidja, les précipitations sont caractérisées par une grande variabilité en fonction des années, et aussi en fonction des mois de la même année. Dans un intervalle de plus de 380 mm et moins de 787,88 mm et ont lieu durant l'hiver et le printemps, le mois le plus humide est décembre et le plus sec est juillet (Aroun, 2015).

4. Présentation des sites d'étude

4.1. Site d'étude de jardin d'essai du Hamma

La conduite des différents régimes de nutrition organique et la cueillette du matériel végétal (*Rosmarinus officinalis*) a été réalisée au niveau du carré botanique de jardin d'essai, situé dans le quartier du Hamma à Alger, est un jardin luxuriant, qui s'étend en amphithéâtre, au pied du musée national des Beaux-Arts, de la rue Mohamed-Belouizdad à la rue Hassiba-Beb-Bouali sur une superficie de 32 hectares.



Figure 3 : Image satellite du carré botanique de jardin d'essai (Google -Earth)

4 .2. Site d'étude Mausolée royal de Maurétanie

La conduite des différents régimes de nutrition organique et la cueillette du matériel végétal (*Rosmarinus tournefortii*) a été réalisée au niveau de Mausolée royal de Maurétanie situé sur l'actuelle commune de Sidi Rachad à une soixantaine de kilomètre à l'ouest d'Alger.



Figure 4 : Image satellite de zone d'étude au niveau de Mausolée royal Mauritanie (Google -Earth)

5. Matériel d'étude

5.1. Matériel végétale

Les échantillons ont été récoltés au niveau des allées du jardin d'essai du Hamma (Alger) et au niveau de Mausolée royal Mauritanie (Tipaza), ils ont été séchés à l'air libre et à l'ombre pendant quelques jours, seule la partie aérienne (feuilles, fleurs et jeunes tiges).



Figure 5 : Peuplement des deux romarins du site d'étude A :*Rosmarinus officinalis* B :*Rosmarinus tournefortii* (Originale)

5.2. Matériel bactérien

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. et *Rosmarinus tournefortii* étudiées a été réalisée dans le centre hospitalier universitaire CHU Isaad Hassani de Beni messous, Bouzeriaa-Alger), les souches utilisées sont deux de gram négatif (*Escherichia. Coli.Pseudomonax aeroginosa*) et une de gram positif (*Staphylococcus aureus*) .

Tableau 2 : Déterminismes des caractéristiques pathogènes des souches bactériennes testées (Hart et *al.*,1997)

Souches bactériennes testées	Caractères bactériologiques	Habitats	Pouvoir pathogène
Staphylococcus aureus	Gram +	-Les fosses nasales - La gorge - Le tube digestif	-Infection hospitalière. -Responsables des abcès, des plaies, des septicémies, de pneumonie et de l'intoxication alimentaire
Escherichia coli	Gram -	- Le tube digestif	-toxi-infection alimentaire -Infections urinaires -Septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastro-entérites
Pseudomonas aeruginosa	Gram -	- Eau et sols humides - Surface des végétaux	Infections nosocomiales (personnes fragilisées ou immunodéprimées) Infections urinaires, oculaires et pulmonaires

5.3. Milieu de culture

Pour assurer la survie des bactéries et tester l'activité antimicrobienne des huiles essentielles des plantes modèles le milieu de culture Muller-Hinton est utilisé comme un milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion ou de dilution en gélose homogénéiser la poudre contenue dans le flacon, mettre 38 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau fraîchement distillée. Il faut miser pour chauffer en agitant, mettre en ébullition pendant une minute. Stériliser la gélose à l'autoclave durant 15 minutes 121,1C. Au moment de l'emploi, faire fondre le milieu au bain Marie et répartir en boîte de pétri rondes l'intégralité du flacon, l'épaisseur de la couche de gélose doit être de 4 mm sécher les boîtes 30 minutes à 37 C° .

6. Méthode d'extraction et de caractérisation des huiles essentielles

6.1. Extraction de l'huile essentielle hydro- distillation

L'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* a été réalisée par hydrodistillation de type Clevenger (Fig. 6). Il est constitué d'un chauffe ballon, un ballon de 1L, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) et un collecteur en verre qui reçoit les extraits de la distillation. L'huile essentielle obtenue est conservée au réfrigérateur dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement à 4°C et à l'ombre. Le principe de cette méthode est basé sur un entrainement des constituants volatiles de l'huile essentielle par la vapeur d'eau. Cette dernière chargée des produits volatils est condensée dans un réfrigérant pour donner de l'huile essentielles après décantation .60g des échantillons séchés de *Rosmarinus officinalis* et de *Rosmarinus tournefortii*. Sont mises dans un ballon, additionné de 700 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition, après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur, l'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par un condensateur, fixé par un support approprié en position verticale pour faciliter l'écoulement du distillat. Le temps de cette extraction est d'environ deux heures et demi. Le distillat obtenu est récupéré dans une ampoule à décanter. Le mélange est laissé au repos quelques minutes, ce qui résulte l'apparition de deux phases, l'une est

organique (huile essentielle) et l'autre est aqueuse. En fin, le distillat est recueilli dans un tube à essai et l'huile essentielle des sommités fleuries de *Rosmarinus officinalis* sera par la suite récupérée dans un flacon approprié.



Figure 6: Dispositif d'hydrodistillation type Clevenger (originale)

7. Calcul du rendement en huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, il est exprimé par la formule suivante :

$$\text{RHE}\% = (m_h / m_v) \times 100$$

Avec :

RHE : Rendement en huile essentielle en %.

M' : Masse d'huile essentielle en gramme.

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme

8. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

Pour mettre en évidence l'activité antibactérienne de *Rosmarinus officinalis* L. et de *Rosmarinus tournefortii*. Nous avons utilisé la méthode de diffusion par disques.

8.1. Préparation du milieu de culture

Le Muller-Hinton est stérilisé à l'autoclave pendant 20min à 120°C, ensuite couler aseptiquement dans les boites de pétrie à 4mm d'hauteur et laisser refroidir et se solidifier (Harrar, 2012).

8.2. Préparation des dilutions

La formulation consiste à additionner à l'huile essentielle un adjuvant afin de faciliter sa conservation et d'homogénéiser son étalement et son absorption par le substrat. Nous avons préparé la formulation à partir de l'HE des Romarins, comme suit : les huiles essentielles ont été mélangées avec le DMSO. Le témoin est réalisé dans même condition sans HE. Un gradient de dilution a été retenu 100µl/ml, 50 µl/ml, selon le protocole établi par Kucukbay et *al.* (2011)

8.3. Préparation des disques

Les disques sont préparés à partir du papier wattman de 6 mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave 20 minutes à 120°C, puis stockés à une température ambiante.

8.4. Ré-isolement des souches bactériennes

On a prélevé quelque colonie bactérienne à l'aide d'une anse de platine puis disposées sur le centre d'une boite de pétri préalablement coulée du milieu de culture spécifique pour les bactéries (Muller Hinton) puis incubés à 27°C pendant 5 à 6 jours.

8.5. Préparation des disques bactériens

Après incubation des disques mycéliens de 8mm de diamètre issu d'une culture âgée de 7 jours de *E-Coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ont été prélevé avec un emporte-pièce et inoculés au centre de chaque boîte de pétri précédemment coulé avec 15ml de Muller_ Hinton(1disque/boîte) .

8.6. Application des disques

Les disques sont disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée au bec bun zen, et à l'aide d'une micropipette on imbibe chaque disque par 10 μ l de dilution préconisée (Fig. 6).



Figure 7 : Disposition des disques sur la gélose (originale)

8.7. Incubation

Les boîtes sont fermées avec le parafilm et incubées à température ambiante pendant 20 min, ensuite dans une étuve à 25°C pendant 7 jours. Après diffusion de l'HE durant 1 heure les boîtes ont été incubées à l'obscurité à une température de 27 C°, durant 7 jours.

9. Expression des résultats

L'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, déterminée par les différentes préparations d'huiles essentielles. La Cinétique de la croissance bactérienne correspond aux variations dans le temps, du diamètre des bactéries avec les différentes préparations. La cinétique de croissance bactérienne a été évaluée toutes les 24 heures en mesurant la moyenne de cinq diamètres perpendiculaires passant par le milieu de la rondelle. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins dans les mêmes conditions et en utilisant une règle. La croissance bactérienne a été évaluée à la fin de l'expérience, à savoir au bout de 168h (7 jours) d'incubation, en mesurant la moyenne de cinq diamètres sans prendre en compte le diamètre du disque. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins ayant démarré le même jour et dans les mêmes conditions.

L'efficacité des huiles essentielles est déterminée par le calcul du pourcentage d'inhibition (Indice d'inhibition) :

$$I (\%) = (X - X_i) / X * 100$$

X : Estimation de la croissance bactérienne (mm) dans un milieu sans huile essentielle (témoin)

X_i : Estimation de la croissance bactérienne (mm) dans un milieu contenant de l'huile essentielle (traité)

10. Analyse statistique des données

Les résultats sont rapportés comme valeurs de trois répétitions (moyennes ± SE) sur la base d'un C.V. <15%. La comparaison par paire (test de Wilcoxon) a été utilisée pour établir l'effet de l'activité antibactérienne des différentes préparations des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii* issues des différentes conduites d'apport stimulateurs, les différences ont été considérées comme significatives à p <0,05. Les données ont été traitées par le logiciel SYSTAT ver. 12.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Estimation du rendement de l'huile essentielle du romarin sous l'effet des différents stimulateurs.

1.1. Le rendement de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sous l'effet des différents stimulateurs

- Rendement de l'huile essentielle sous l'effet du sel (NaCl) est 0,875%
- Rendement de l'huile essentielle sous l'effet du vermicompost solide est 0,812%
- Rendement de l'huile essentielle sous l'effet du vermicompost liquide est 0,762 %
- Rendement de l'huile essentielle sous l'effet de l'eau est 0,725%
- Rendement de l'huile essentielle du témoin est 0,712 %

1.2. Le rendement de l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortei* sous l'effet des différents stimulateurs

- Rendement de l'huile essentielle sous l'effet du sel (NaCl) est 0,375 %
- Rendement de l'huile essentielle sous l'effet du vermicompost solide est 0,301%
- Rendement de l'huile essentielle sous l'effet du vermicompost liquide est 0,291 %
- Rendement de l'huile essentielle sous l'effet de l'eau est 0,282%
- Rendement de l'huile essentielle du témoin est 0,201 %

2. Étude comparative entre l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et la préparation formulée à base d'huile essentielle

Les résultats d'étude comparative entre l'activité antibactérienne de l'huile essentielle brute et la préparation formulée à base d'huile essentielle montrent que les pourcentages de l'indice d'inhibition de l'huile essentielle brute de *Rosmarinus tournefortei* et de *Rosmarinus officinalis* contre la bactérie *E.coli* sont supérieurs à

celui de l'huile essentielle formulée (HE+DMSO) fig 1 :a,b).Cependant ,nous constatons que les deux stimulateurs vermicompost liquide et vermicompost solide s'avèrent les plus efficaces par rapport aux sel et l'eau pour l'huile essentielle brute de *Rosmarinus officinalis*(fig1 :b) .Les stimulateurs Nacl et l'eau sont les plus efficaces suivi par le vermicompost liquide et le vermicopost solide de *Rosmarinus tournefortei* (fig 1 : a)

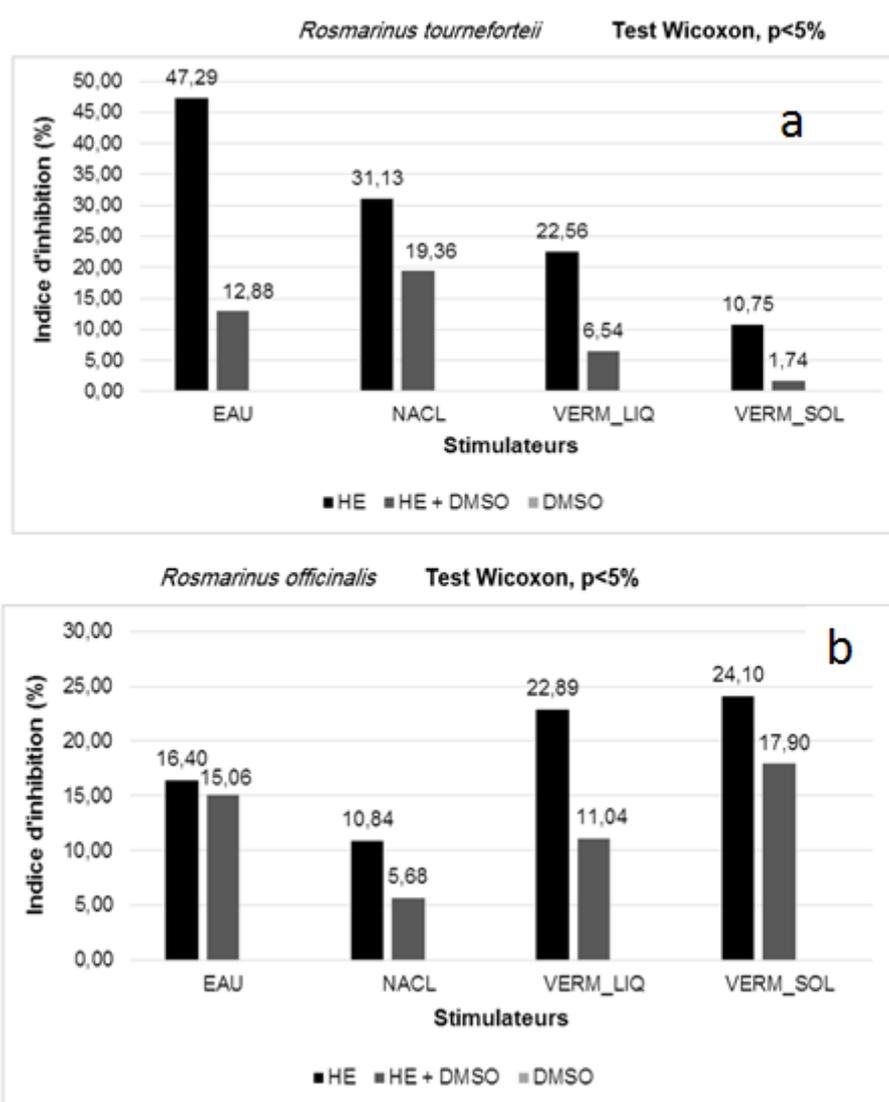
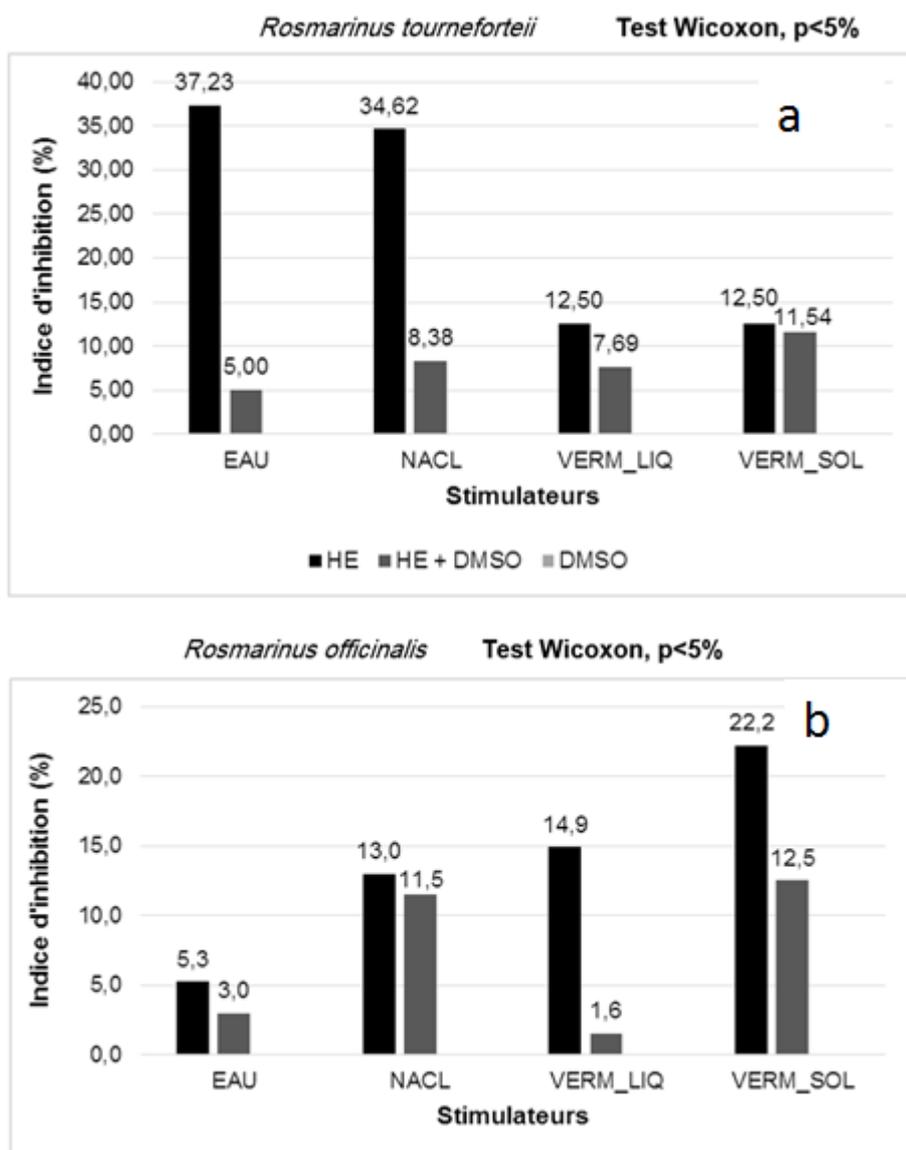


Figure 8 : Sensibilité d'Escherichia coli aux huiles essentielles et aux préparations formulées à base d'huiles essentielles de Rosmarinus

VERM_Sol :vermicopost solide .VERM_LIQ :vermicompost liquide .HE :l'huile essentielle
 DOSO :Diméthylesufoxyde

Les résultats d'étude montrent que les pourcentages de l'indice d'inhibition de l'huile essentielle brute de *Rosmarinus tournefortei* et *Rosmarinus officinalis* contre la bactérie *Staphylococcus aureus* sont supérieurs à celui de l'huile essentielle formulée sous l'effet de tous les stimulateurs (fig 2 :a,b) . *Staphylococcus aureus* paraît très sensible sous l'effet stimulateur de l'huile essentielle brute et formulée de *Rosmarinus officinalis* par le vermicompost solide et le vermicopost liquide (fig 2 : b), pour *Rosmarinus touneforteii* la bactérie paraît réagir différemment (fig 2 :a)



. **Figure 9 : Sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux huiles essentielles et aux préparations formulées à base d'huiles essentielles de *Rosmarinus***

VERM_Sol :vermicopost solide .VERM_LIQ :vermicompost liquide .HE :l'huile essentielle
 DOSO :Diméthylesufoxyde

3. Étude comparative entre la sensibilité des souches bactériennes à l'huile essentielle et à la préparation formulée à base d'huile essentielle

L'histogramme comparatif illustré dans la figure montre que les pourcentages de l'indice d'inhibition de l'huile essentielle brute de *Rosmarinus tournefortei* contre la bactérie *Escherichia coli* sont plus élevés que la bactérie *S. aureus* sous l'effet de tous les stimulateurs (fig 3 :a ,b). Cependant les bactéries paraissent très sensible au l'huile essentielle brute de *Rosmarinus tournefortei* sous l'effet stimulateur par l'eau courante et le sel (NaCl) (fig 3 :a) . En revanche les pourcentages de l'indice d'inhibition de l'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortei* formulée par l'adjuvant (DMSO) contre la bactérie *E.coli* sont plus élevée que la bactérie *S.aureus* (fig 3 :b). *E. coli* paraît très sensible sous l'effet stimulateurs par le sel (NaCl) et l'eau courante de l'huile essentielle formulée . Pour *S.aureus* paraît sensible sous l'effet stimulateur par le vermicompost solide et le sel (NaCl) (fig 3:a ,b)

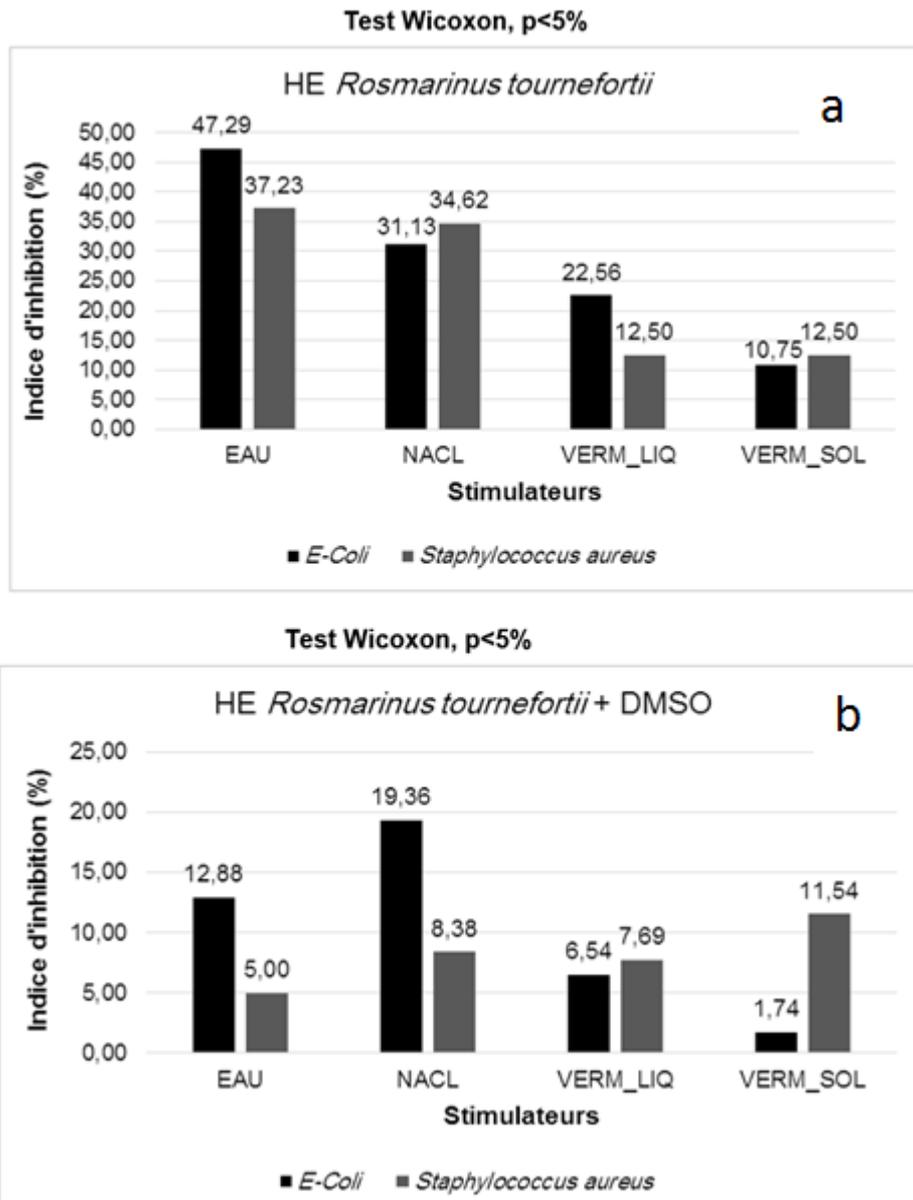


Figure 10 : Comparaison de l'activité antibactérienne de *Rosmarinus tournefortii* en absence et en présence de l'adjuvant

VERM_Sol :vermicopost solide .VERM_LIQ :vermicopost liquide .HE :l'huile essentielle
 DOSO :Diméthylesufoxyde

Les résultats comparatif ont montrés que les pourcentages de l'indice d'inhibition de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* en absence de l'adjuvant contre la bactérie *E. coli* et *S. aureus* sont plus élevés que en présence de l'adjuvant sous l'effet de tous le stimulateurs (fig 4:a,b) , en effet *E -coli* parait très sensible au l'huile

essentielle en présence et en absence de l'adjuvant par rapport *S-aureus* .Cependant l'effet stimulateur par le vermicompost solide et liquide de l'huile essentielle a montré la forte sensibilité de *E-coli* .Néanmoins l'effet antibactérien sur *S-aureus* apparait moins important .

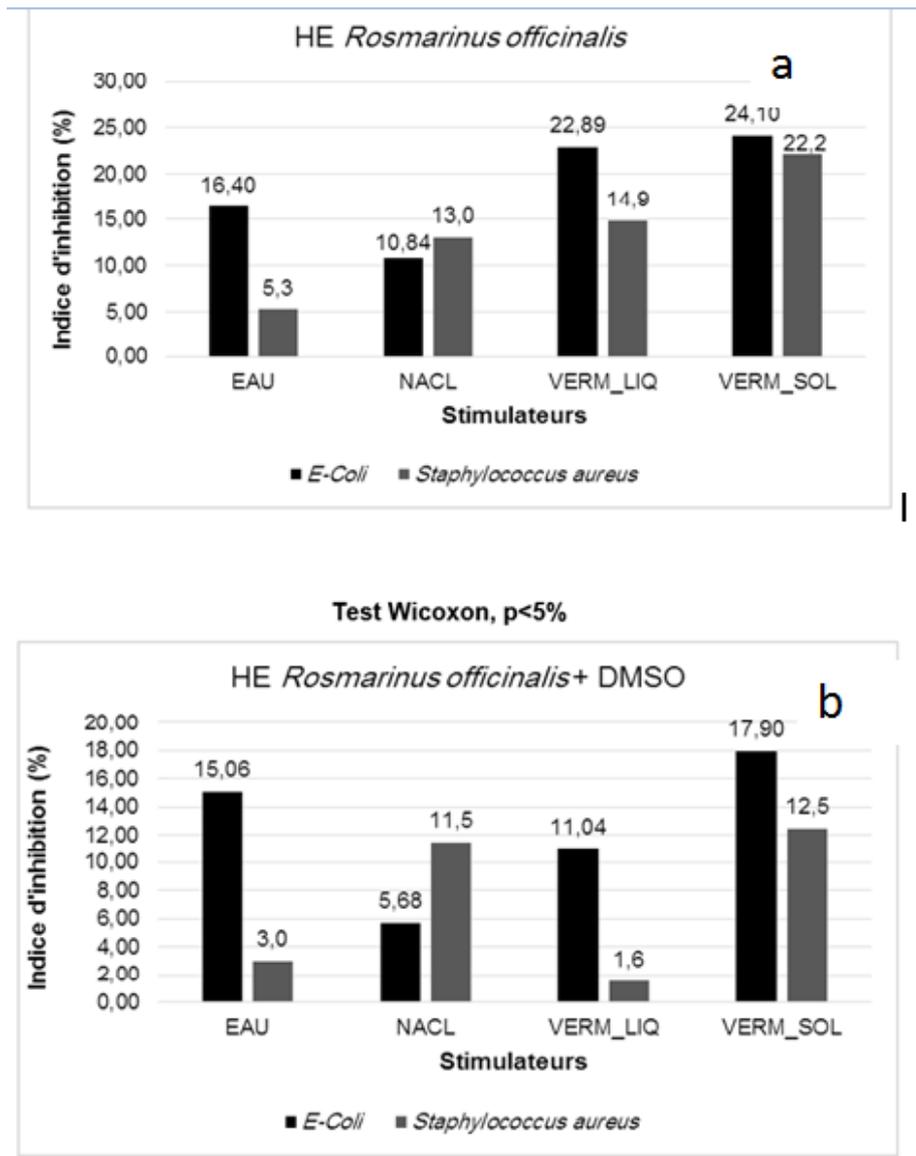


Figure 11 : comparaison de l'activité antibactérienne de *Rosmarinus officinalis* en absence et en présence de l'adjuvant

VERM_Sol :vermicopost solide .VERM_LIQ :vermicompost liquide .HE :l'huile essentielle
 DOSO :Diméthylesufoxyde

DISCUSSION

Les résultats de l'extraction révèlent que le rendement de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est plus intéressant que celui de *Rosmarinus tournefortii*, en effet l'effet stimulateur sur le rendement des huiles essentielles paraît très important par le vermicompost solide et le sel .

D'après Kelen et Teb (2008), ce rendement peut changer selon le choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement et de la qualité de l'huile essentielle. Le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, la période de séchage et la méthode d'extraction employée, etc., sont des facteurs entre autres, qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement en huile essentielle.

Les résultats de notre présente étude ont montré que les huiles essentielles pures de *Rosmarinus* obtenues à travers l'application de plusieurs stimulateurs en mode d'irrigation foliaires (eau courante, eau saline, vermicompost liquide et vermicompost solide), exercent une activité antibactérienne contrastée contre les bactéries testées selon les signalisations de l'aromatogramme. Seulement, il faudrait mentionner que la sensibilité des souches testées varie selon la présence ou l'absence de l'adjuvant.

L'effet antibactérien des deux huiles testées diminue avec la diminution de la concentration en HE utilisée. En effet, plus l'huile essentielle est pure (brute) plus, l'activité biologique est importante sur les bactéries.

Les résultats des deux types d'huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *R. tournefortii* sur les deux souches (*E. coli* et *S. aureus*) sous l'effet des stimulateurs, montrent qu'*E. coli* et *S. aureus* sont très sensibles vis-à-vis des différentes huiles essentielles brute obtenues sous l'effet des différents stimulateurs par comparaison aux mêmes huiles diluées avec l'adjuvant DMSO (HE avec DMSO). Jordán et al. (2013), mentionnent qu'une forte proportion d' α -pinène augmente l'efficacité des huiles essentielles du romarin contre *Staphylococcus aureus*, tandis que la présence de 1,8 cinéole, comme composé le plus abondant, diminue considérablement l'efficacité de ces huiles.

La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du gram (Dorman et Deans, 2000), ou dépendante des huiles essentielles utilisées (Deans et Ritchie, 1987). La sensibilité des micro-organismes peut varier selon le germe testé car une huile essentielle peut être bactéricide vis-à-vis de certaines souches, bactériostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet (Hermal, 1993).

Le mécanisme d'action des huiles essentielles est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries. L'huile essentielle 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 de l'intérieure 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). En revanche, les bactéries à Gram- sont plus résistantes que les Gram+, ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes (Burt, 2004).

La sensibilité d'un microorganisme à l'huile dépend des propriétés de l'huile et du microorganisme (Guesmi et Boudabous, 2006). En comparant l'activité antibactérienne des huiles essentielles brutes de *Rosmarinus tournefortii* et de *Rosmarinus officinalis* avec leurs dilutions (HE+ DMSO), les résultats ont montré que pour *E.coli* : l'huile essentielle brute *Rosmarinus tournefortii* obtenue par irrigation à l'eau courante et à l'eau saline exprime des indices d'inhibitions (indice d'inhibition = 47,29% et 31,13%) plus active que l'huile essentielle diluée sous les mêmes modes d'irrigation (EAU et NAEL). L'huile essentielle brute de *Rosmarinus officinalis* obtenue par irrigation foliaires au vermicompost liquide et solide exprime des indices d'inhibitions (indice d'inhibition = 22,89% et 24,10%) plus active que l'huile essentielle sous les mêmes modes d'irrigation (VERM LIQ et VERM SOL).

Pour *S.aureus* : l'huile essentielle brute *Rosmarinus tournefortii* obtenue par irrigation à l'eau courante et à l'eau saline exprime des indices d'inhibitions (indice d'inhibition = 37.23% et 34.62%) est plus active que l'huile essentielle diluée obtenue par irrigation au VERM LIQ et VERM SOL. L'huile essentielle brute de *Rosmarinus officinalis* obtenue par irrigation au VERM LIQ et VERM SOL (indice d'inhibition = 14,9% et 22,2%) est plus

active que l'huile essentielle diluée obtenues par irrigation foliaires au NACL et VERM SOL.

D'après ces résultats, on peut dire que *R. officinalis* et *R. tournefortii* ont des propriétés antimicrobiennes très appréciés et cela justifie son utilisation dans les traitements traditionnels comme un remède antimicrobien. Par ailleurs, la sélectivité des huiles essentielles envers certaines bactéries reste encore mal élucidée. Cette sélectivité est le résultat de la composition variée des fractions actives des huiles, qui présentent souvent des actions synergiques (Hammer et *al.*, 1999). Des études antérieures sur l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Moreira et *al.*, 2005 ; Belkhiri et *al.*, 2015), révèlent une activité antimicrobienne certaine et indiquent une similitude avec les résultats obtenus dans le présent travail.

En raison de leur activité antimicrobienne, les huiles essentielles du romarin peuvent être utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour la production de nouveaux agents synthétiques dans le traitement des maladies infectieuses causées par les bactéries étudiées ou peuvent être suggérées comme agents naturels de conservation des aliments comme il a été rapporté par plusieurs auteurs dont Fernández-López et *al.* (2005), Davidson et *al.* (2016).

Conclusion

Conclusion

Au terme de cette étude et à travers les résultats obtenus il apparait que l'activité biologique des huiles essentielles purs de *Rosmarinus tournefortii* et *Rosmarinus officinalis* obtenues par différents modes de stimulation, sont caractérisées par un fort pouvoir antibactérien vis-à-vis de *S. aureus* et *E.coli*. Ces huiles essentielles peuvent servir sans doute comme base de lutte biologique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

ADIL B., ET YOUSFI I.,2001- Contribution à l'étude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Djelfa.Thèse de l'obtention de MAGISTER : Université ZIANE ACHOUR Djelfa, 31P.

AFFEK ET YAKIR, 2002-L'arouse encyclopédie des plantes médicinales, Paris.335p,

ANTON R., WICHTL M., 1999- Plantes thérapeutique (tradition, pratique officinale, science et thérapeutique), 3eme édition allemande sous la direction de MAX WICHTL, MARBURG, édition française par ROBERT ANTON, Strasbourg avec la collaboration de MARTINE BERNARD

ANWAR, M., PATRA, D.D., CHAND, S., KUMAR, A., NI, A.A. et K, S.P.S.,2005-Effet des engrais organiques et des engrais inorganiques sur la croissance, le rendement en herbes et en huile, l'accumulation de nutriments et la qualité de l'huile de basilic français. Communications en science du sol et analyse des plantes. 36 (1-14): 1737-1746.19.

ARANCON.Q., EDWARD, C.A., BABENKO, A., CANNON, J., GALVIS, P. et METZGER, J.D.,2008- Influences des vermicomposts, produits par les vers de terre et les microorganismes issus de l'élevage, des déchets alimentaires et des déchets de papier, sur la germination, la croissance et la floraison des pétunias en serre, Applied Soil Ecology. 39: 91-99.22.

AROUN M. El., ,2015-Le complexe aphides et ennemis naturels en milieux cultivé et forestier en Algérie. Thèse, Doctorat, Ento .Appl., Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie– EL- Harrach Alger,Algérie .

BAHORUN T., 1997- Substances Naturelles Actives : La Flore Mauricienne, Une Source D'approvisionnement Potentielle. AMAS. Food and Agricultural Research Council. Réduit. Mauritius

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., & IDAOMAR, M.,2008- Biological effects of essential oils – A Review. Food and Chemical Toxicology, 46(2), 446-475.

BEDI G., HAMZA M et TABTI B., 2001- Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta Chalepensis* L, Algérie.Afrique SCIENCE Tlemcen,05(1).67 – 81p

BELKHIRI, BENYOUCEF M., BENKADA D. , SOUSSA ELISA M.B.D., GALVAO E.L., MARQUE M.M.O, MUSELLI A., DESJOBERT J.M., BERNARINI A.F., COSTA j., 2015- Influence of the processus extraction on essential oil of *Origanum glandulosum*. Journal of applied sciences 7(8) : 1152-1157.

BERENGE R S., GOETZ P.,2000- Paris M, Les plantes médicinales. selection du rearer's digest, Paris,235p.

BERNARD, T.; PERINEAU, F.; BRAVO, P.; DELMAS, M. et GASET, A. , 1988- «Informations chimie », Oct, n° 298, 179.

BERTIN ET STAUDT., 1996- Les Huiles Essentielles,These pour le diplome d'etat de docteur en pharmacie . U.F.R.Médecine-Pharmacie de ROUEN,153p.

BEZANGER-BEAUQUESLNE, P INKAS,M . , TORCK,M . , TROTIN,F . , 1990- PIANtES médicinalesd es régionst empérées,P ARIS: Ed Maloine,2 35p.**BOELENS, M.H., 1990,** The Essential Oil from *Rosmarinus officinalis* L., *Pertumer and favorist*, 10, 21-37

BOLWELL, G.P. et P. WOJTASZEK., 1997-Mecha- nisms for the génération of reactive oxy- gen species in plant defence - a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51 : 347-366.

BOUHADDOUDA N.,2016- Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes dusol local *Origanum vulgare* et *Mentha pulegium* .,thèse doctorat ., Université Badji Mokhtar-Annaba.

BOUSSOUSSAA H., KHACHEBA I., DJERIDANE A., MELLAH N., YOUSFI M., 2016 - Antibacterial activity from *Rhanterium adpressum* flowers extracts, depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products*. 83, pp: 44-47.

BRUNETON J.,1993- Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} édition. Édition Tec et Doc .Paris, France, 3

BRUNETON J.,2016- Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales - (5[°] Edition). Lavoisier.

BRUNTON J., 1999- Romarin (*Rosmarinus officinalis*), institue européen des substance végétale, (v2), 249-250p

BRUNTON, J.,1999- "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales". Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris.1120p.

BUCHANAN B.B., GRISSEM W., Jones R.L., 2000 - Biochemistry & Molecular Biology of plants. American Society of plant Physiologists: Rockville, MA, p 1367.

BUDAVARI, S.; O'Neil, M. J.; SMITH, A.; HECKEIMAN, P.E.; KINNEARY, J.F., 1996- The Merk Index-Twelfth edition, Whitehouse Station : Merk and Co, INC, 2350.

BURT S., 2004- Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 223-253.

CAILLET S. & LACROIX M., 2007- Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, RESALA, 1-8.

CALABRESE, V ; SCAPAGNINI, G ; CATALONA, C ; DINOTTA, F ; GERACI, D ET MARGANT,P 2000-Biochemical studies of o naturel antioxidant isolated from rosemary and its application in cosmetic dermatology. *Int. J. Tissue Reac.* Vol.22,pp:5-13

CARSON C.F., MEE B.J. & RILEY T.V., 2002 - Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 1914–1920.

CHEMAT F., 2009-Essential oils and aromas: Green extractions and Applications. HKB Publishers, Dehradun, 311 pages. ISBN : 978-81-905771-3-7.

CHIKHI I.,2014- Composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales de l'ouest d'Algérie. ,thèse doctorat ., Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.

COTE, F. et M. HAHN., 1994-Oligosaccharins : structures and signal transduction. *Plant Mol. Biol.* 26 : 1379-1411.

COWAN M.M., 1999- Plant product as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews.* 12 (4), 564-582

DAJOZ,1971-Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett.* 1992, 33: 5227-30., Stoeckel C, Wigand MC, Brouillard R. Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett.* 33: 5227-30.

DARZI MT, GHAIVAND A, SEFIDKON F et REJALI F.,2009- Les effets de l'application de mycorhize, de lombricompost et de biofertilisant phosphaté sur la quantité et la qualité de l'huile essentielle de fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Iran J Med Aroma Plants* 24: 396-413.

DAVIDSON P.M., 2016- Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville (eds.) ASM, Washington. *Food Microbiology.* 520-556 p.

DAVIS, P.H., 1982- Flora of Turkey and the East Aegan Islands, 7, EDINBURGH: Ed EdinburghU niversityP ress,7 5-76

DEANS et RITCHIE, 1987- Arômes alimentaires. Techniques de l'ingénieur, F 4 100, Paris.

DELAQUIS P.J., STANICH K., GIRARD B. & MAZZA G. 2002- Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74:101-109.

DIAZ R., QUEVEDO S. J., RAMOS C. A., 1988- Phytochemical and antibacterial screening of some species of spanish lamiaceae, *Fitoterapia*, 19(4), 329-332.

DORMAN H.J.D. & DEANS S.G., 2000- Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308–316.

DUHOUX E. Et NICOLE M., 2004- Association et interactions chez les plantes. Édition Dunod, Paris.

DUPONT, F et GUIGRAND, J.L., 2007- Botanique : systématique moléculaire. Edition 14. Publié par Elsevier Masson, p285.

EBERHARD, T ; ROBERT, A et ANNELESE, L., 2005- *Plantes aromatiques, épice aromates, condiments et huiles essentielles. Tec et Doc. Lavoisier. Paris France*

EIAERTS. V., 2014- La phytothérapie de la femme enceinte. Lulu.com. (Ed.). 14461

ESMAIEL, B., RAHMANIAN, M., HEIDARPOUR, O. et SHAHRIYARI, M.H., 2017- Effet du lombricompost et du compost de champignons usés sur la composition en nutriments et en huiles essentielles du basilic (*Ocimum basilicum* L.). *J. Essent. Usines de roulement à huile*. 20 (5): 1283-129

FARAG R. S., SALEM H., BADEI A. Z.-M.A., HAASANEI, D.E., 1986- Biochemical studies on the essential oils of some medicinal plants. *Fette Serfen Anstrichmittel*, 88 (2). pp.69-72

FERNÁNDEZ-LÓPEZ J., ZHI N., ALESON-CARBONELL L., PÉREZ-ALVAREZ J.A. & KURI V., 2005- Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69: 371-380.

FINLAY, BRYSKIER A. 1997- Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongiques. Paris: Ellipses. p55.

GAMFELDT., KABOUCHE A.,BIANC M.,2008- Propriétés et usage médical des produits de la ruche .pour le diplome d'état de docteur en pharmacie. universite de limoges ,144p

GARNIER G., BEZANGER BEAUQUESNE L., DEBRAUX G., 1961- Ressources médicinales de la flore française. Ed. Vigot Frères .Tome II. Paris

GONNY M., BRADESI P. & CASANOVA J., 2004- Identification of the components of the essential oil from Corsican *Daucus carota* L. using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavour and Fragrance Journal*. 19: 424-433.

GOUETZ et GHEDIRA.,2007- Huiles essentielles : l'essentiel - Conseils pratiques en aromathérapie pour toute la famille au quotidien

GOUINGUENE et TURLINGS, 2002- La plante et son environnement biotique, in: *Biologie végétale : croissance et développement*. Dunod, Paris, 187-216.

GREUTER, W ; BURDET, H.M et LONG, G.,1986-A critical inventory of vascular plants of the circum-mediterranean countries.3.Dicotyledones (ConvolvulaceaeLabiatae).Edition des conservatoire et jardin botanique de la ville de Genève.Secretariat MedChecklist Botanischer Garten & Botanisches Museum Berlin-Dahlem

GUESMI ET BOUDABOUS, 2006- Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne. 192 p

HAJ SEYADHADI MR, DARZI MT, GHANDEHARZI Z et RIAZI GH.,2011-Effets du vermicompost et des acides aminés sur le rendement des fleurs et la production d'huile essentielle de *Matricaria camomille* L. *J Medicinal Plants Res* 5: 5611-5617.

HAMMER K.A., CARSON C.F. & RILEY T.V., 1999- Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiology*, 86: 985-990

HART RM; ATKINS, S ;BUDANTSEV,AL ; CANTINO,PD ; CONN,BJ ; MORALES , R ; PATON ,AJ et UPSON,T.,1997-Labiatae.In :Kadereit JW (ed) *The families and genera of vascular plantsVII. Flowering plants dicotyledons:Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae).*Springer, Berlin,pp:167-275..

HENI S.,2016-Sélection d'extraits bio-actifs des espèces du genre *Thymus* comme conservateurs antibactériens naturels., thèse doctorat., Université Badji Mokhtar - Annaba..

HERMAL C., 1993- Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles. Thèse, Faculté de pharmacie, Université Montpellier I. 87 p.

I.T.E.I.P.M.I., 1991- Généralités sur le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.).Fiches techniques élaborées à partir de sources multiples. Mise à jour (Janvier), pp.2-5,7-12.

JONES C., 1998- Rosmary's whole . Plant properties counter cancer . *Nutrition science News* , 1-4

KAUFMAN,P.B; CSEKE, L; WARBER, S; DUKE, J et BRIELMANN, H. 1999- Natural products from plants. CRC Press L.L.C; chap, Vol.6,pp:190-192.

KELEN AND TEB., 2008-Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current medicinal chemistry.10.8012-829p,2003

KELLEN M., TEPE B., 2008- Chemical composition antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three saliva species from Turkish Flora. Biotechnology.99.4096-4104p

KUCUKBAY, 2011-test de sensibilité utilisé aux traitements antibiotique, Médecine du Maghreb, (v3):p 22-25

LABIOD R.,2016-Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide., thèse doctorat., Université Badji Mokhtar -Annaba .

LAVOIR , TONZIBO Z.F., CHALCHAT J.C. & N'GUESSAN Y.T., 2009- Composition chimique des huiles essentielles de *Chromolaena odorata* L. King Robinson (Asteraceae) Abidjan Côte d'Ivoire. Journal de la Société Ouest Africaine de Chimie. 11: 29-37.

MAHFOUZ SA et SHARAF ELDIN MA.,2007- Effet du minéral par rapport au biofertilisant sur la croissance, le rendement et la teneur en huile essentielle du fenouil (*Foeniculum vulgare* Mill). International Agrophysics 21: 361-366

MELERO SD, GALA F, BORBONE N, ZOLLO F, VITALINI S, VISIOLI F et LORRIZI M.,2007-Glycosides phénoliques du fruit de *Foeniculum vulgare* et évaluation de l'activité antioxydante. Phytochem 68: 1805-1812.

MESSEGUR., 1983- Mon herbier de santé. Ed. Robert Laffont. Paris. pp : 126

MORADI R, NASIRI MAHALLATI M, REZVANI MOGHADDAM P, LAKZIAN A et NEJAD ALI.,2011- L'effet de l'application d'engrais organiques et biologiques sur la quantité et la qualité de l'huile essentielle de fenouil (*Foeniculum vulgare*). J Horti Sci 25 (1): 25-33

MOREIRA M.R., PONCE A.G., DE VALLE C.E. & ROURA S.I., 2005- Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food borne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- LWT*, 38: 565-570.

PERROT E., PARIS P., 1971- Les plantes médicinales, presses universitaires de France. 27p

PEYRON, L., 1992- Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques, Chapitre 10 : 217-238. Cité dans : Les arômes alimentaires. Coordinayeurs H. Richard et J.L. Multon. Tec et Doc-Lavoisier et Apria,p: 438, Paris,

PIERRE N., 1946- Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale, 26^e année, bulletin n°287-288, pp. 529-542

QUEZEL P.et SANTA S .,1963-Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques 23méridionales Tome II. C.N.R.Sc. Paris.pp.781-783-793

RICHTER, G. , 1993- « Métabolisme des végétaux », Physiologie et Biochimie. Presses polytechniques et universitaires, Romandes, 292.

ROMERO E., TATEO F., DEBIAGGI M., 1989- Antiviral activity of Rosmarinus officinalis L. extracts. *Mitteilungen aus dem Gebiete der lebensmittel untersuchung und hygiene*. 80(1).pp. 113-119

SAEID NEJAD, D., 2011- "Resistance response physiology and signal transduction". *Current Opinion in Plant Biology*. 1(4): 305-310.

SALLE, J. L. , 1991- « Les huiles essentielles; Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie », Edition Frison – Roche, Paris, 21.

SEINGSAS A.G., FRITZ R., DEL VALLE C.E. & ROURA S.I., 1997- Antimicrobial activity of essential oils on the native microfora of organic Swiss chard, *lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36 :679-686 .

SINGH B, MASIH MR et CHOUGHARI RL.,2009-Évaluation des engrais organiques enrichis en P et S et de leur effet sur le rendement en graines et la qualité de la coriandre (*Coriandrum sativum*). *International J Agric Sci* 5: 18-20.

SINGH M et RAMESH S.,2002-Réponse du basilic doux (*Ocimum basilicum*) aux engrais organiques et inorganiques dans des conditions tropicales semi-arides. *J Med Aroma Plant Sci* 24: 947-950.

SINHA J, BISWAS CK, GHOSH A et SAHA A.,2010-Efficacité du lombricompost contre les engrais sur *Cicer* et *Pisum* et sur la diversité des populations de bactéries fixatrices de N₂. *J Environ Biol* 31: 287-292.

SIPAILEINE A., VENSKUTONIS, P.R., BARANAUSKIENE, R. et SARKINAS, A. , ,2006-Antimicrobial activity of commercial samples of thyme and majoral oils. *Journal of Essential Oil.Research*, vol 18p698-703.

SMALL,E et GRACE,D.,2001- Herbes culinaires pour nos jardins de pays froid par conseil national de recherches Canada, fabrary, In Edition, p193.

SPICHIGER R. E., SAVOLAINEN V., FIGEAT M. & JEANMONOD D., 2002- Botanique systématique des plantes à fleurs. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 2e édition, 413 p.

TUTIN, T.G., HEYWOOD, V.H., BURGESS, N.A., MOORE, D.M., VALENTINE D.H.,WALTERS, S.M., WEBB, D.A., 1972- Flora Europaea, Diapensiaceae to Myoporaceae, vol.3, CAMBRIDGE: Ed University press, p -187

VALNET J., 1984- Aromathérapie, traitement des maladies par les essences des plantes. 10ème Ed. Maloine, S.A.Editeurs

VANDEN BERGHE D.A. & VLIENTICK, A.,J.,1991-Screening antiviral agents. In: Hostettmann, K. (Ed), *Methods in plant Biochemistry Bioactivity.*, London , Academic press, 47-59

VELIKOVA, Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C. Gustafson J.E., Warmington J.R ., 2011- Plant product as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 12 (4), 564-582.

VOLAK S., STODOLA J., 1983- Plantes médicinales. Illustrations de Frantisek seven. Ed. Gründ. Paris.

YANO, Y., SATOMI, M., OIKAWA, H., 2006-Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International J. Food Microbiology*, 111: 6-11.

YOSHIKAWA, M., N. YAMAOKA et Y. TAKEUCHI., 1993- Elicitors: their significance and primary modes of action in the induction of plant défense reactions. *Plant Cell Physiol*. 34 : 1163-1173.

ZABEIRO et HACHIMO, 2005- Etude de pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de TLEMEN. Thèse de l'obtention de MAGISTER : Université Abou Bakr Belkaid,115P.

ZERMANE A.,2010- etude de l'extraction super critique applicationaux système agroalimentaire, diplôme de doctora, constantine. Université mentouri,.148p