



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Appliquée



MEMOIRE DE MASTER
Domaine: Sciences de la Nature et de La Vie
Filière: Sciences Biologique
Option: Biochimie et Biologie Moléculaire

Thème:

**Contribution à l'étude du potentiel biologique
d'une plante médicinale du genre
*Rosmarinus***

Elaboré par:

Moussaoui Amel
Gatoute Saliha

Devant le jury :

Dr. DJABRI Belgacem

MCA Université de Tébessa

Président

Dr. ZEGHIB Assia

MCB Université de Tébessa

Encadratrice

Dr. HAMMOUM Zakia

MAA Université de Tébessa

Examinatrice

Année universitaire 2015/2016



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Appliquée



MEMOIRE DE MASTER
Domaine: Sciences de la Nature et de La Vie
Filière: Sciences Biologique
Option: Biochimie et Biologie Moléculaire

Thème:

**Contribution à l'étude du potentiel biologique
d'une plante médicinale du genre
*Rosmarinus***

Elaboré par:

Moussaoui Amel

Gatoute Saliha

Devant le jury :

Dr. DJABRI Belgacem

MCA Université de Tébessa

Président

Dr. ZEGHIB Assia

MCB Université de Tébessa

Encadratrice

Dr. HAMMOUM Zakia

MAA Université de Tébessa

Examinatrice

Date de soutenance:

Note : 16/20 Mention : Très bien

ملصخ

دهيف هذا المعط إميقة إلى المشنط المضمد دسكلأة اوامضمد اصلختسما ايريتكبالت أريث ارتبلو ولكي ناثور اثيم، ن لاخت الينيل، اوونائيمل ن م ازجلاء اوهالا تيمد *officinalis Rosmarinus* تضرعت. تسيد ن م التينة ص حفا اي نايميكا اطيستل ي تابنل او ضلء إلى ابكرت ن م في عونل ابكرملت الميونائل. وفشك هذا اليلحتل ن هذ انميهد تبيكرت اهيلع المتفلاك ديونوفلاف الأهلئاع ن م م اونيفيلوبل. مة إرجءا ميقت المطنشلاء البيولوجية على اصلختسملت امه تي ن اوصلل دعب اهيلع اعقنل الميذم في متينلت تاذ المقتسب زتمادياوذلي ظارهن أ مختصلص اونائيمل اكن ارم رثكلاود ل *Rosmarinus officinalis*. واصوحف تفشكت ان م تيمكل إي لامج اونيفيلوبل مقيرطب Folin--Cicalteu رثءا ام نمقنل اليبلكلالونيفيلوبل ال بجل. المبتخلار النوعي CCM /DPPH سفير هذا ارتلءا اشذ في فط امضتاد ادسكلأة البولنيفيولية بالسنية ليمجع اصلختسملت. مچئاتن المبتخلار DPPH، الميسنية ميقتا التبيث المبتدكر CCM / DPPH النوعي ثيدن أكثر نسبة امضمد دسكلأة هي (94.8%) لاخل ميسنلاب اينيلال. ميقت المشنط المضمد اصلختسما ايريتكبالت ن طاشنتلا مقيرر في وسط صلب ظارهن اصلختسما تاجت طشنه السلايين

Staphylococcus aureus ATCC 27853 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923.

اممكلت الميحاتفم: *Rosmarinus officinalis*، اصلختسما، تاشنلا طامضمد دسكلأة، المشنط المضمد ايريتكبلا، إي لامج ونيفيلوبل، ص حفا ي نايميكا لتابني.

ABSTRACT

This work aim's to evaluate the antioxidant and antibacterial activities of petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate and methanol extracts from aerial parts of *Rosmarinus officinalis* of Tebessa. The plant was subjected to a phytochemical screening to highlight its qualitative composition of secondary metabolites. This analysis revealed that this composition is dominated by the flavonoids as the most important class of polyphenol family. Evaluation of biological activities was performed on the extracts obtained after maceration of the plant in solvents of increasing polarity and which showed that the methanol extract was the most rendable for *Rosmarinus officinalis*. Quantitative assays of total polyphenols by Folin-Ciocalteu method revealed the richness of rosemary polyphenols. The qualitative test CCM-DPPH interpreted this richness in polyphenolic antioxidant activity pronounced for all extracts. The test results in DPPH, evaluated by the percent inhibition confirmed those of CCM / DPPH test whose ethyl acetate extract proved the most antioxidant (94.8%). The evaluation of antibacterial extracts by method of diffusion in a solid medium showed that the extracts were found to "active" against the strain *Staphylococcus aureus* ATCC 27853 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, extracts, antioxidant activity, antibacterial activity, total polyphenols, phytochemical screening.

RESUME

Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol des parties aériennes de *Rosmarinus officinalis* de Tébessa. La plante a été soumise à un criblage phytochimique pour mettre en évidence sa composition qualitative en métabolites secondaires. Cette analyse a révélé que cette composition est dominée par les flavonoïdes comme étant la classe la plus importante de la famille des polyphénols. L'évaluation des activités biologiques a été effectuée sur les extraits obtenus après une macération de la plante dans des solvants de polarité croissante et qui ont montré que l'extrait méthanolique était le plus rentable pour *R. officinalis*. Les dosages quantitatifs des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu, ont révélé la richesse du *R. officinalis* en polyphénols. Le test qualitatif CCM-DPPH a interprété cette richesse polyphénolique en une activité antioxydante prononcée pour l'ensemble des extraits. Les résultats du test au DPPH, évalués par le pourcentage d'inhibition ont confirmé ceux de test CCM-DPPH qualitatif dont l'extrait acétate d'éthyle s'est révélé le plus antioxydant (94,8%). L'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits par la méthode de diffusion dans un milieu solide, a montré que les extraits sont "actifs" contre *Staphylococcus aureus* ATCC 27853 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis*, extraits, polyphénols totaux, activité antioxydante, activité antibactérienne.

*« On ne peut pas croire à la moitié de ce qu'on entend raconter,
on ne peut pas croire à la plupart des choses qu'on lit,
mais on peut croire à tout ce que l'on fait... »*
Ellen MacArthur (2002), Du vent dans les rêves

REMERCIEMENTS

Au final de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance au Directeur du laboratoire des biomolécules actives et applications (LMBAA), Mr. DJABRI Belgacem (Maître de conférences A à l'université de Tébessa.) pour nous avoir y accueillir afin de réaliser nos travaux dans de bonnes conditions.

C'est avec un grand plaisir que nous remercions notre Directrice de mémoire Mm. ZEGHIB Assia. (Maître de conférences B à l'université de Tébessa) pour nous avoir proposé ce sujet de recherche .Par son savoir, sa droiture et son sérieux, elle a su nous communiquer une méthodologie et une rigueur de travail.

Que Mr. DJABRI Belgacem trouve ici l'expression de notre profonde gratitude pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de présider le jury.

Nous remercions très sincèrement Mm. HAMOUM Zakia. (Maître assistante A à l'université de Tébessa), pour le temps qu'elle nous consacre en examinant ce mémoire.

Enfin, que tous ceux qui nous ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, trouvent ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Un remerciement particulier à FRADJ Khouloud.

DEDICACE

*A la mémoire de mon père, que dieu
repose son âme en paix,*

Moussaoui Amel

DEDICACE

Sans l'apport moral des parents et la conduite divine, je ne pourrai accomplir cette tâche, pour cela toute ma gratitude ira :

Au tout puissant dans toute sa miséricorde

A mon père dans toute son attention

A ma mère dans toute sa douceur

A mon mari qui ne cesse de m'encourager

Au meneur de ce travail , l'encodratrice Mme ZEGHIB Assia

A ma sœur , mes frères et Youcef

A mes amies et les familles Gatoute et Djabri

et enfin à toute personne ayant ,de prés ou de loin, permis d'accomplir ce travail.

Gatoute Saliha

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux N°	Titre	Page
Tableau 01	Résultats de l'enquête ethnobotanique.	13
Tableau 02	Résultats de criblage phytochimique de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	21
Tableau 03	Caractéristiques physico-chimique des extraits.	26
Tableau 04	Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition.	41
Tableau 05	Caractères morphologiques des bactéries utilisées comme germes-tests	42
Tableau06	Détermination de diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de <i>R. officinalis</i> .	45
Tableau 07	Résultats d'antibiogramme.	47

LISTE DES FIGURES

Figure N°	Titre	Page
Figure 01	Aspects morphologiques du romarin	05
Figure 02	Visite des herboristes (Bab Caracalla Tébessa).	12
Figure 03	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Gatoute Saliha, 2016).	14
Figure 04	Localisation de la station de récolte "Djebel Belkif".	15
Figure 05	Teneur en eau de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	16
Figure 06	Illustration commune des méthodes de screening phytochimique	18
Figure 07	Détection des métabolites secondaires par screening phytochimique.	19
Figure 08	Détection des classes de flavonoïdes par screening phytochimique .	20
Figure 09	Résultats qualitatifs du screening phytochimique de <i>R.officinalis</i> .	20
Figure 10	Illustration de protocole d'extraction solide-liquide.	23
Figure 11	Rendements des extraits après extraction solide-liquide.	25
Figure 12	Matériel utilisé pour test de dosage de composés phénoliques.	27
Figure 13	Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols	28
Figure 14	Teneur des polyphénols totaux (en µg EAG/mg d'extrait) des quatre extraits de <i>R. Officinalis</i> .	29
Figure 15	Illustration de matériel nécessaire pour le test qualitatif CCM/DPPH.	31
Figure 16	Illustration du dépôt pour une CCM.	32
Figure 17	Forme libre et forme réduite de DPPH.	33
Figure 18	Illustration de matériels nécessaires pour le test du pouvoir antiradicalaire contre DPPH (spectrophotométrie UV-visible).	33
Figure 19	Comportement des extraits de <i>R.officinalis</i> sur plaque CCM de silice, après pulvérisation par une solution DPPH méthanolique.	35

Figure 20	Schéma représentatif de la réaction de virement de la couleur mauve de DPPH "réduit" en DPPH jaune "oxydé "en présence d'antioxydant (DPPH).	35
Figure 21	Pouvoir antioxydant des 4extraits d'étude prouvé par le virement de DPPH en couleur jaune.	35
Figure 22	Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH par les extraits de <i>R. officinalis</i> .	36
Figure 23	Matériel utilisé pour le test antibactérien.	38
Figure 24	Souches bactériennes d'étude <i>Staphylococcus aureus</i> (a), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (b).	38
Figure 25	Illustration des principales étapes de la méthode de diffusion sur milieu gélose.	40
Figure 26	Illustration de la mesure d'une zone d'inhibition.	41
Figure 27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (Microscope optique x 100).	43
Figure 28	Effet inhibiteur des extraits de <i>R.officinalis</i> sur <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 (A) et <i>S. aureus</i> ATCC 25923(B) par la méthode de diffusion sur milieu gélose.	44
Figure 29	Effet inhibiteur des antibiotiques sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	46
Figure 30	Effet inhibiteur des antibiotiques sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	46

LISTE DES ABREVIATIONS

A1: Absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait)

A2: Absorbance en présence de l'extrait

Abs: Absorbance

AMI : Amikacine

AMP : Ampicilline

ATB : Antibiotique

ATCC: American type culture collection

ATM : Aztreonam

AUG : Amoxicilline

BN : Bouillon nutritif

CAZ : Ceftazidime

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CS : Colistine

CTX : Cefaxime

DM : Dichlorométhane

DPPH : Radical 2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl .

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DZI : Diamètres des Zones d'Inhibition

EA : Ethyl acétate **EP**

:Ether de pétrole GN :

Gélose Nutritive **GNT**

: Gentamycine HE:

Huile Essentielle

MeOH : Méthanol

MH: Mueller Hinton

P.aeruginosa : *Pseudomonasaeruginosa*

PI : Pourcentage d'Inhibition (%)

R : Rendement

RIF :Rifampicine

R.officinalis :*Rosmarinusofficinalis*

S.aureus :*Staphylococcus aureus*

TCC : Ticaracilline + acide clavulanique

µg EAG/mg d'extrait : Microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait

(+) : Sensibilité limitée.

(++) : Sensibilité moyenne.

(+++): Très sensible.

ملخص ABSTRACT
RESUME
REMERCIEMENTS
DEDICACES
LISTE DES TABLEAUX
LISTE DES FIGURES
LISTE DES ABREVIATIONS
TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 01

APPERÇU BIBLIOGRAPHIQUE SUR *R .officinalis*

I. Habitat et origine	04
II. Etymologie	04
III. Caractéristiques botaniques	05
IV. Différents noms du romarin	05
V. Carte chimique	06
VI. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin	07
VII. Utilisation	07
VII.1. Utilisation traditionnelle	07
VII.2. Utilisations thérapeutiques	08
VII.2.1. Usage interne	08
VII.2.2. Usage externe	09
VII.2.3. Utilisation du romarin en gemmothérapie	09
VII.2.4. Utilisation du romarin en aromathérapie	09
VII .3. Utilisations non thérapeutiques	09

ETUDE EXPERIMENTALE

I. Etude Ethnobotanique	12
II. Matériel végétal	14
II.1. Origine géographique et période de récolte	14
III. Taux d'humidité	16
III.1. Méthode	16
III.2. Résultats	16
III.3. Discussion	17
IV. Screening phytochimique	18
IV.1. Matériel	18
IV.2. Méthode	18
IV.3. Résultats	20
IV.4. Discussion	21
V. Extraction des polyphénols totaux	23
V.1. Matériel	23
V.2. Extraction solide-liquide (Macération)	24
V.3. Calcul de rendement	24
V.4. Résultats	25
V.5. Discussion	25
V.6. Les échantillons obtenus après l'extraction	26
VI. Dosage des composés phénoliques	27

VI.1.Matériel	27
VI.2.Méthode	27
VI.2.1.Principe	27
VI.2.2.Mode opératoire	28
VI.2.3.Expression des résultats	28
VI.3.Résultats	28
VI.4.Discussion de la teneur en polyphénols	29
VII. Evaluation de l'activité antiradicalaire des polyphénols	31
VII.1.Test de CCM/DPPH	31
VII.1.1.Matériel	31
VII.1.2.Mode opératoire	32
VII.2. Test d'activité antioxydant (DPPH)	32
VII.2.1.Principe	32
VII.2.2.Matériel	33
VII.2.3.Méthode	34
VII.2.4.Expression des résultats	34
VII.3.Résultat	34
VII.3.1. Le CCM/DPPH	34
VII.3.2. Evaluation de pouvoir anti radicalaire contre le DPPH	35
VII.4.Discussion	36
VIII.Activité antibactérienne	38

VIII.1. Protocole d'application	38
VIII.1.1. Matériel	38
VIII.1.2. Méthode de détection	38
VIII.1.3. Souches bactériennes	38
VIII.1.4. Vérification de la pureté des souches	39
VIII.1.5. Conservation des souches	39
VIII.1.6. Repiquage des espèces bactériennes	39
VIII.1.7. Préparation de l'inoculum	39
VIII.1.7.1. Enrichissement	39
VIII.1.7.2. Préparation de la suspension bactérienne	39
VIII.1.8. Préparation des milieux de culture	40
VIII.1.9. Ensemencement / Test antibactérien	40
VIII.1.10. Lecture	41
VIII.2. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme	41
VIII.2.1. Principe	41
VIII.2.2. Mode opératoire	42
VIII.3. Résultats	42
VIII.4. Discussion	47
• Discussion générale	48

CONCLUSION

GLOSSAIRE REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION



Introduction

Le 21^{ème} siècle s'ouvre et de nombreuses maladies à fort taux de mortalité restent encore sans traitement malgré que les médicaments contre la plupart des maladies aient été découverts. Entre rejet excessif du "chimique" et les effets néfastes de ces médicaments sur l'environnement et l'économie, la vague bio ramène la phytothérapie sur le devant de la scène.

Le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. La famille des polyphénols, largement représentés dans la quasi-totalité des plantes, fait partie intégrante de notre nourriture quotidienne. Ils possèdent potentiellement des activités biologiques, anti-inflammatoires, anti-cancérigènes, antimicrobiennes et anti-oxydantes. Les épices et les herbes aromatiques sont considérés comme des sources importantes de polyphénols (**Marfak, 2003**). Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude de ces composés. Il nous a semblé donc, intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche encore reculé en Algérie malgré sa biodiversité immense.

La plante d'étude sélectionnée est *Rosmarinus Officinalis L.* faisant l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires. C'est une herbe aromatique de la famille des *Lamiacées*, appréciée pour ses propriétés aromatiques, anti-oxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, emménagogues et anti-tumorales, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle (**Atikbekkara et al., 2007**).

Le but de cette étude est de valoriser deux des activités biologiques de *Rosmarinus Officinalis* : antioxydante et antibactérienne.

Notre recherche est structurée en deux parties. Dans la première partie, nous aborderons les différentes connaissances bibliographiques sur cette plante, sa composition chimique, ses propriétés et utilisations thérapeutiques.

Dans la partie expérimentale, nous développerons le matériel et les méthodes utilisées pour l'extraction, le dosage des poly phénols, l'activité anti-oxydante et finalement l'activité antibactérienne ainsi que les résultats obtenus dans notre étude.

A la lumière des résultats obtenus, différentes perspectives de recherche seront évoquées.

**APPERÇU
BIBLIOGRAPHIQUE
SUR**

Rosmarinus officinalis



I. Habitat et origine

Dans le monde

Le romarin se répartit tout au long de la mer méditerranéenne et le reste de l'Europe, d'où son nom « rose de la mer » « Rose », « marinus » (**Guinoch et, 1973**). Il est typiquement méditerranéen. (**Angeno et al., 1981**).

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) où il remonte même jusqu'au massif central (Provence, Roussillon, Languedoc) (**Garnier et al., 1961**).

Cette plante est également cultivée dans de nombreux pays tel que l'Espagne, l'Italie, la Tunisie, le Maroc et l'Algérie.

En Algérie

Plante indigène poussant spontanément dans toute l'Algérie (**Quezel et Santa, 1963**). Le *Rosmarinus* est originaire du bassin méditerranéen. Commun dans les maquis, les garrigues et les forêts claires, des broussailles et des matorrals, sur substrats calcaires bien drainés il est sub-spontané en plusieurs endroits privilégiant un sol calcaire, de faible altitude, ensoleillé et modérément sec. Il se développe dans les bioclimats semi-arides et subhumides, à variantes chaudes à fraîches au niveau des étages de végétation thermoméditerranéen et mésoméditerranéen. C'est une plante résistante à la sécheresse qui présente des caractères apparents de xérophytisme (petites feuilles etc..) (**Heinrich et al., 2006**).

II. Etymologie

Le nom latin *Rosmarinus* est habituellement interprété, comme dérivé "ros" de la rose et "marinus" d'appartenir à la mer, bien qu'elle se développe habituellement en dehors 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**).

III. Caractéristiques botaniques

Cette plante appartient à la famille des *Lamiaceae*. Elle se présente sous forme d'arbuste ,sous arbrisseau ou herbacée (**Atik bekkara et al., 2007**), mesurant environ de 0,8 à 2m de hauteur (**Gonzalez et al., 2007**). Les feuilles sont étroitement lancéolées linéaires, friables et coriaces, les fleurs d'un bleu pâle ou blanchâtre (**Schauenberg et paris,2006**), maculées intérieurement de violet sont disposées en courtes grappes denses, s'épanouissent presque tout au long de l'année (**Atik bekkara et al., 2007**).Il est toujours vert, très aromatique, très rameux ,très feuillé(**Hans,2007**).Son écorce s'écaille sur les branches les plus âgées et son odeur est extrêmement odorante et tenace (**Delille,2007**).



Règne : Plantes
Embranchement : Spermaphytes
Classe : Dicotylédones
Ordre : Lamiales (Labiales)
Famille : Lamiaceae
Genre : *Rosmarinus*
Espèce : *Rosmarinus officinalis* L.
(**Quezel et Santa, 1963**).

Figure 01 : Aspects morphologiques du romarin(Site web : www.Wikipedia) .

IV. Différents noms du romarin

- Nom scientifique : *Rosmarinus*
- Nom français : Romarin, Rose Marine
- Nom arabe : Iklil Aljabal
- Nom berbère : Mazir (**2.trwww.cndp.fr/crdp-dijon/IMG/pdf/Fiches-**)
- Autres noms : Rose marine, Encensier, Romarin des troubadours, Herbe aux couronnes(**3.descriptives_plantes_1.pdfade.com/ressources/pdf/MBPC_Romarin_Francais.pdf**).

V. Carte chimique

Le Romarin est un composé de puissantes huiles essentielles (de 1 à 2% de la plante) contenant du Cineol (30%) , Bornéol (20%), camphres, pinènes, diterpènes (acide carnosique) choline, un glucoside, acides organiques amers , deux hétérosides (la romaricide et la romaninocide)(<http://www.reconstitution-romaine.com/romarin%20herboristerie%20romaine%20antique.html>), pigments flavoniques , principes amers dont l'acide rosmarinique (Fadi,2011),triterpènes et stéroïdes (acide aléanolique, acide ursotique),lipides (n-alkanes, isolalkanes, alkènes)(Akroum,2006), des tannins et un peu de saponines (<http://flore.lecolebuissonniere.eu/page102.html>) .

Le romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) peut produire des antioxydants similaires aux antioxydants synthétiques. Et l'activité antioxydante de ses extraits est, en effet, produite par des polyphénols qui sont essentiellement l'acide rosmarincus, camosole, rosmanole et acide carnosique (Ibanez, 1999).

Les acides organiques phénols dont l'acide rosmarinique (2 à 3%), qui améliore la concentration et la mémoire (<http://flore.lecolebuissonniere.eu/page102.html>), confère au romarin un effet anti-inflammatoire (<http://www.pharmaciedelepouille.com/romarin.htm>), a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1, est utilisé par la glande thyroïde pour produire les hormones thyroïdiennes(<http://www.elixanatur.com/fr/846-romarin>) ainsi qu' une grande action antimicrobienne (Akroum , 2006).

Cette plante est très riche en flavonoides, dont 07 principaux : lutéoline (03 structures connues : 3'-O-béta -D-glucuronide,3'-O-(4''-O-acyl)-béta-D-glucuronide, 3'-O-(3''-O-acyl)-béta- D-glucuronide), ériocitrine, hespiridine, diosmine, isoscutellarin7-0-glucoside, hispidulin7-0-glucoside, genkwanine.Ces composés sont localisés dans les feuilles, les fleurs, les racines et les tiges. Leur concentration change durant l'évolution de la plante. La lutéoline3-0-béta-D-glucuronide qui a été longuement étudiée montre un pic de concentration aux environs de juin- août. Ceci indique qu'il y a une relation entre les phyto-régulateurs et les flavonoides (Akroum, 2006).

VI. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin

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

- ✓ Anti spasmodiques, diurétiques, hépatoprotectrices, soulagement des désordres respiratoires (**Lemonica et al., 1996**).
- ✓ Antibactériennes, antimutagéniques, antioxydantes, chémopréventives (**Ibañez et al. 2000**).
- ✓ Anti-inflammatoires, antimétastatiques (**Cheung et al., 2007**).
- ✓ Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires (**Singletery et al., 1991**) et la prolifération des tumeurs cutanées (**Huang et al., 1994**).

D'autres études montrent que les composants du romarin inhibent les phases d'initiation et de promotion de cancérogénèse (**Offord et al., 1995**). Carnosol du romarin possède une activité antivirale contre le virus du SIDA (HIV) (**Aruoma et al., 1996**), alors que l'acide carnosique a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1 (**Paris et al., 1993**).

VII. Utilisation

VII.1. Utilisation traditionnelle

Le romarin est souvent cultivé pour son huile aromatique et considérée utile pour contrôler l'érosion du sol. Dans la médecine traditionnelle, ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique (**Gonzalez et al., 2007**).

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

En Espagne, l'huile du romarin est très populaire pour beaucoup de genres de douleur, y compris les douleurs musculaires, rhumatismales et traumatiques (**Heinrich et al., 2006**).

Au Maroc, l'infusion des feuilles est utilisée comme apéritif, cholagogue, stomachique et emménagogue. En usage externe, les cataplasmes faits avec les compresses de la décoction concentrée sont appliqués comme vulnéraires. La poudre des feuilles est saupoudrée comme cicatrisant et antiseptique. La fumigation du romarin est indiquée pour calmer les maux de dents. Depuis quelques décennies, l'huile essentielle du romarin est utilisée en massage sédatif dans les rhumatismes et la sciatique. Les feuilles séchées servent à conserver la laine de l'attaque des mites (**Bellakhdar, 1997**).

En Turquie, la décoction de feuilles du romarin a été traditionnellement employée pour traiter les diabétiques (**Bakirel et al., 2008**).

L'infusion des feuilles est tonique, antitussive, carminative, antiasthmatique, fébrifuge, et anti-paralytique (**Arnold et al., 1997**). On le recommande dans les asthénies, les troubles du foie, contre les dyspepsies atoniques ainsi que contre les céphalées et les migraines d'origine nerveuse, les vertiges et les troubles de mémoire (**Poletti, 1988**).

Il a été également employé en tant qu'analgésique, antiépileptique, diurétique, (**Soyal et al., 2007**), ainsi que pour traiter l'ictère et sa fumée a été employée contre la peste (**Heinrich et al., 2006**).

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

VII.2.Utilisations thérapeutiques

VII.2.1 Usage interne

L'efficacité du romarin pour soulager les spasmes gastriques et de la vésicule biliaire (diurétique) et les rhumatismes, est scientifiquement prouvée. Le romarin est réputé fortifier en cas de fatigue extrême, de surmenage, d'hypotension et suite à une maladie .Comme il a une action bénéfique en cas de contractures, il est utilisé pour soulager les maux de tête, les dysménorrhées et les troubles liés à la ménopause et aux règles douloureuses. En cas de dépression légère, il possède également des vertus anti-dépressives(**Anonyme, 2011**).

L'infusion des feuilles est utilisée comme apéritif, cholagogue, stomachique, emménagogue, tonique, antitussive, carminative, antiasthmatique, fébrifuge, et anti-paralytique (**Arnold et al. , 1997**).

Sa composition chimique lui confère une large gamme d'effets; anti-oxydant,anti-inflammatoires ,antibactériens , antimutagéniques , chémopréventives antimétastatiques (Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires et la prolifération des tumeurs cutanées) ainsi qu' un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1(**Madjour, 2014**).

VII.2.2. Usage externe

En cosmétique, il est intégré dans la composition de crèmes, dentifrices, savons, shampooing, l'eau de cologne surtout masculine (Le premier parfum alcoolique dont on connait l'existence est *l'eau de Hongrie*, datant du xive siècle) et lotions capillaires. La lotion de romarin appliquée sur le visage donne le teint frais, raffermi la peau et atténue les rides (Fechtal *et al.*, 2005).

Les compresses de romarin sont désinfectantes et antifongiques. La poudre des feuilles est saupoudrée comme cicatrisant et antiseptique (Athamena, 2009). Les bains ou les compresses sont également indiquées en cas de douleurs musculaires, articulaires et rhumatismales (Athamena, 2009).

La fumigation du romarin est indiquée pour calmer les maux des dents (Athamena, 2009).

VII.2.3. Utilisation du romarin en gemmothérapie " médecine des bourgeons "

Les bourgeons et jeunes pousses de romarin (*Rosmarinus officinalis*) sont plus actifs dans la protection hépatique que les préparations de plante adulte. Ils sont aussi indiqués dans les allergies et les défenses immunitaires (Athamena, 2009).

VII.2.4. Utilisation du romarin en aromathérapie "huile essentielle"

L'huile essentielle de romarin à cinéole est mucolytique, anti catarrhale, expectorante. Cette huile essentielle active la microcirculation au niveau du bulbe capillaire, d'où provient son action antichute et fortifiante pour les cheveux (Athamena, 2009).

VII .3.Utilisations non thérapeutiques

- **Usage culinaire**

Pour assaisonner les grillades, le riz ou pour relever les pommes de terre, comme condiment dans les plats de légumes de viandes rôties ou encore à l'intérieur des volailles rôties et les soupes. Ses branches feuillues sont utilisées pour parfumer l'huile d'olive, vins ou vinaigres. Il peut aussi être incorporé en touche légère dans certaines confitures et gelées ou après infusion pour aromatiser aussi crèmes salées, sucrées et les glaces (<http://www.elixanatur.com/fr/846-romarin>).

Apperçu bibliographique sur R .officinalis

- **Industrie agroalimentaire** Les extraits de romarin sont utilisés comme antioxydants et conservateurs .
- **Industrie alimentaire** elle est utilisée dans la confection de bonbons, confiseries, boissons, etc..(Kaloustian *et al.* , 2008).



I. Etude Ethnobotanique

Avant de se lancer dans cette étude, nous avons rendu visite à plusieurs herboristes (**Figure 02**), consulté des tradithérapeutes réputés par leur traitements jugés fiables, consulté les âgés , pour avoir une idée générale sur les plantes utilisées dans la région Tébéssa . Ceci nous a orienté pour le choix d'une plante nommée "klil", "*Rosmarinus officinalis* "scientifiquement.



Figure 02 : Visite des herboristes (Bab Caracalla TEBESSA).

Le questionnaire que nous avons réalisé met en lumière :
que 100% des sujets consultés connaissent cette plante, largement utilisée traditionnellement dans plusieurs domaines. **Le Tableau 01** résume les résultats de cette enquête.

Tableau 01 :Résultats de l'enquête ethnobotanique .

Partie utilisée	Mode de préparation	Maladies traitées
Feuilles et fleurs	infusion	Migraine maux de tête maux de gorge hypotension troubles digestifs et de règles
Feuilles et fleurs	pansements	douleurs rhumatismales
Feuilles et fleurs	Décoction	Toux
Feuilles et fleurs	poudre	Fromagerie
Feuilles et fleurs	fraiche	plats de cuisine

Ces propriétés confirment les travaux d'**Abdoun (2002)** et **Maiza *et al.* (1993)** ainsi que l'inventaire national de plantes médicinales de l'Algérie réalisé par **Halimi *et al.* (1997)**. Ces derniers décrivent en détail les bienfaits du Romarin : ralentir les moisissures, stimulateur cardiaque et nerveux, améliorer la vue

Quant au mode d'utilisation, nous avons conclu que les parties les plus utilisés sont les feuilles et les fleurs à l'état sec avec plusieurs modes de préparation : en poudre (préparation des soupes....) , décocté ou infusé dans l'eau chaude, macéré dans l'eau ou l'huile d'olive, comme pansement .La voie d'administration se fait orale ou cutanée (**Makhloufi, 2013**).

II. Matériel végétal

II.1. Origine géographique et période de récolte

A l'Est Algérien, la wilaya de Tébessa s'étend sur une superficie de 14227Km². Elle est constituée de plusieurs zones géographiques : un domaine saharien au Sud, des monts au Nord dont les principaux sont : Djebel Serdies et Djebel Bouroumane. C'est une zone de transition météorologique, elle se distingue par quatre étages bioclimatiques: le Sub-humide (400 à 500 mm/an), le Semi-aride (300 à 400 mm/an), le Sub-aride (200 à 300 mm/an), l'aride ou saharien doux (inférieur à 200 mm/an).

L'espèce *Rosmarinus officinalis* L. (**Figure 03**) a été récoltée dans ses habitats naturels de l'Est de Tébessa. Les cueillettes sont effectuées à Djebel Belkif (**Figure 04**).

La plante a été cueillie à la fin de la période de floraison (Juin 2015). Elle est ensuite lavée, séchée à l'air libre et à l'abri de la lumière, pendant une quinzaine de jours à température ambiante.

Cette espèce a été identifiée par Mme. Hayoune S.



Figure 03 : *Rosmarinus officinalis* L. (Gatoute Saliha, 2016)

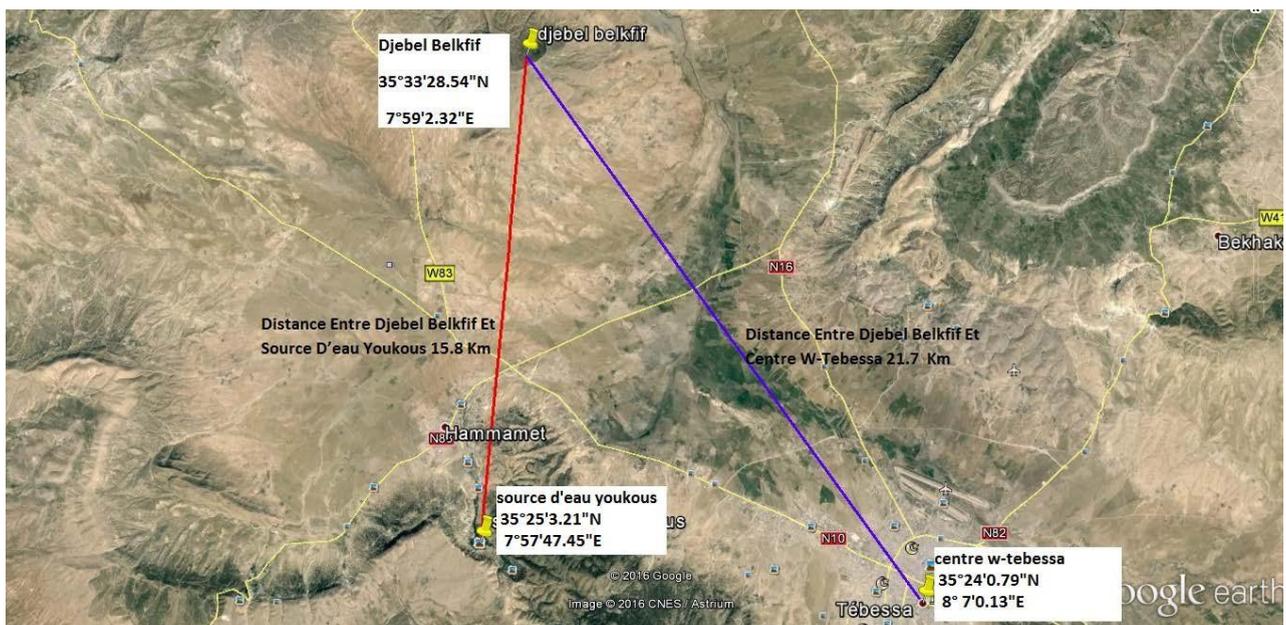


Figure 04: Localisation de la station de récolte "Djebel Belkif".

III .Taux d'humidité

III.1.Méthode

Le taux d'humidité a été déterminé par le procédé de séchage à l'ombre, à une température ambiante (en été). C'est une méthode gravimétrique qui consiste à la perte du poids (Lazouni et al.,). Considérons :

$$H\% = \frac{(\text{poids } \alpha - \text{poids } \beta)}{\text{poids } \alpha} \times 100$$

α : poids de l'échantillon « plante fraîche » ;

β : Poids de l'échantillon « plante sèche » ;

H% :taux d'humidité exprime en pourcentage.

La teneur en matière sèche est calculée selon la relation suivante :

$$\text{Matière sèche (MS\%)} = 100 - H\%$$

III. 2.Résultats

Le taux d'humidité de la plante fraîche atteint 76,20%. Cela signifie, approximativement, que la totalité du poids de la plante fraîche est constituée par l'eau.

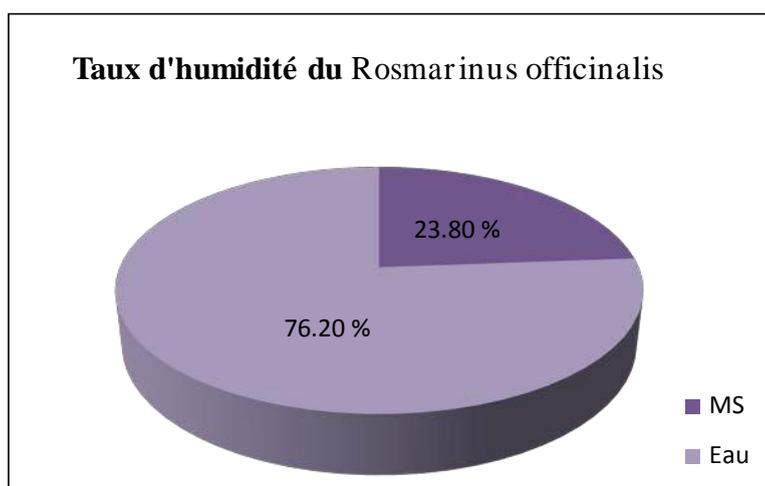


Figure 05 : Teneur en eau de *Rosmarinus officinalis*.

III.3. Discussion

La teneur en eau est très élevée chez la plante (76, 20 %) d'où sa composition non fibreuse et son broyage facile, menant à expliquer sa bonne utilisation .

Nos résultats diffèrent de ceux trouvés par **Rahmoun et Messai (2011)** , qui avancent un taux de 51,7% malgré que la plante a été récoltée de la même région de notre étude (EL Hammamet à 15 km). La teneur en eau de *R.officinalis* de la présente étude ,laisse apparaître qu'il est très humide par rapport à celui étudié par **Rahmoun et Messai(2011)**.

Le taux d'humidité de *R.officinalis* de la présente étude s'approche de celui de *R.officinalis* du Sud Algérien (**Athamena,2009**) , d'une part , et ,d'autre part ,il est très supérieur de celui (28,17%) de *R.officinalis* de Béchar (**Makhloufi ,2013**).

Les variations rencontrées dans la teneur en eau de *R.officinalis* peuvent être dues à certains facteurs écologiques, l'âge de la plante, la période du cycle végétatif, ou même à des facteurs génétiques(**Athamena, 2009**).

Ainsi, notre plante reflète la notion

"Les végétaux riches en eau"(**Rahmoun et Messai,2011**).



IV. Screening phytochimique

Cette analyse a été effectuée au niveau de laboratoire des biomolécules actives et applications, département de Biologie Appliquée, Faculté de Sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie, Université Larbi Tebéssi, Tébessa. Elle nous a permis d'analyser la composition chimique de *R. officinalis* (Matériel végétal sec et broyé).

IV.1. Matériel

Le matériel utilisé est résumé sous forme d'une illustration dans la figure ci-après.

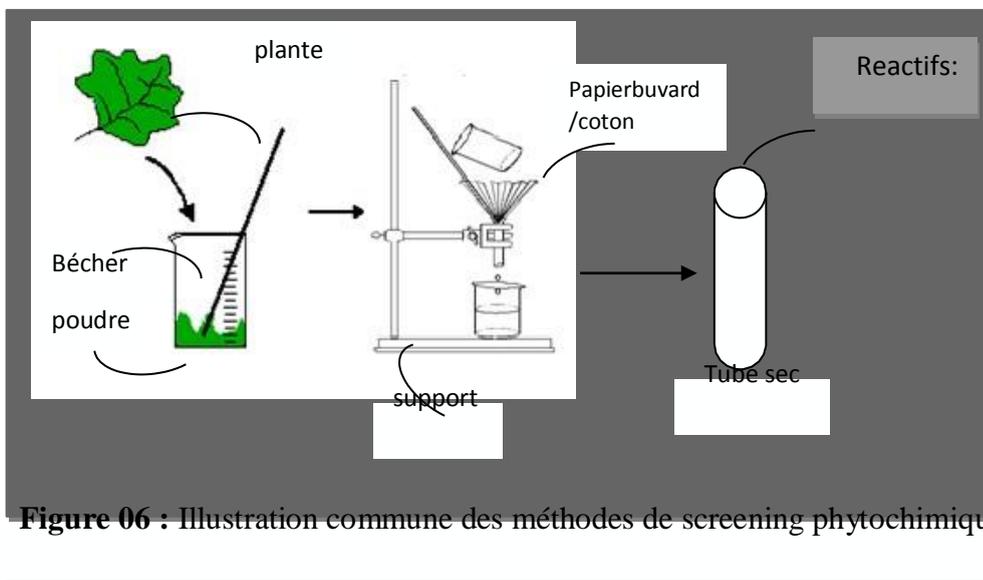


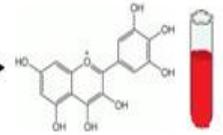
Figure 06 : Illustration commune des méthodes de screening phytochimique

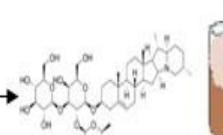
IV.2. Méthode

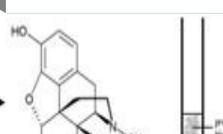
La phytochimie qualitative, basée sur des réactions de coloration et de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques, a été réalisée sur le matériel végétal sec. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation (Yemoa *et al.*, 2008).

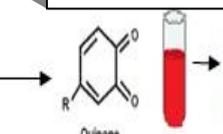
La recherche des composés chimiques s'est limitée à un nombre restreint selon, la disponibilité des réactifs au laboratoire. Le schéma suivant récapitule les différentes réactions réalisées pour la recherche des métabolites secondaires au sein de notre plante d'étude.

FLAVONOÏDES
10 g matière végétale + 150 ml HCl (1%) $\xrightarrow{\text{filtration}}$ 10 ml filtrat + NH₄OH $\xrightarrow{3\text{ h}}$ 

LEUCOANTHOCYANES
05 g MV + 50 ml H₂O bouillante $\xrightarrow{30\text{ min}}$ 2 ml filtrat + $\left\{ \begin{array}{l} 1. \text{NaOH} \\ 2. \text{H}_2\text{O D} \\ 3. \text{HCl} \end{array} \right.$ \rightarrow 

SAPONINES
05 g MV + 50 ml H₂O $\xrightarrow[\text{refroidissement}]{\text{decoction}}$ 05 ml filtrat + agitation manuelle \rightarrow 
Mousse savonnée

ALCALOÏDES
05 g MV + 50 ml HCl $\xrightarrow{\text{filtration}}$ filtrat + quelque goutte de R. Meyer \rightarrow 
Précipité blanc

QUINONE
05 g MV + quelque goutte HCl + 10 ml EP $\xrightarrow[\text{filtration}]{\text{macération } 24\text{ h}}$ 2 ml filtrat + NaOH \rightarrow 
Quinone

TANNINSCATECHIQUES
05 g MV + 50 ml H₂O bouillante $\xrightarrow{\text{ébullition}}$ 2 ml filtrat + goutte FeCl₃ (1%) \rightarrow 
Changement de couleur

TANNINS GALLIQUES
1.5 g MV + 100 ml CH₃ OH (80%) $\xrightarrow{\text{filtration}}$ 2 ml filtrat + goutte FeCl₃ (1%) \rightarrow 
Couleur noir bleu

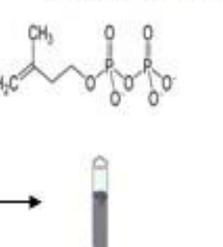
TERPENOÏDES
5 g mv + 20 ml EP $\xrightarrow{\text{filtration}}$ filtrat + 1 ml H₂SO₄ + 0.5 ml CH₃ COOH \rightarrow 

Figure 07 : Détection des métabolites secondaires par screening phytochimique.

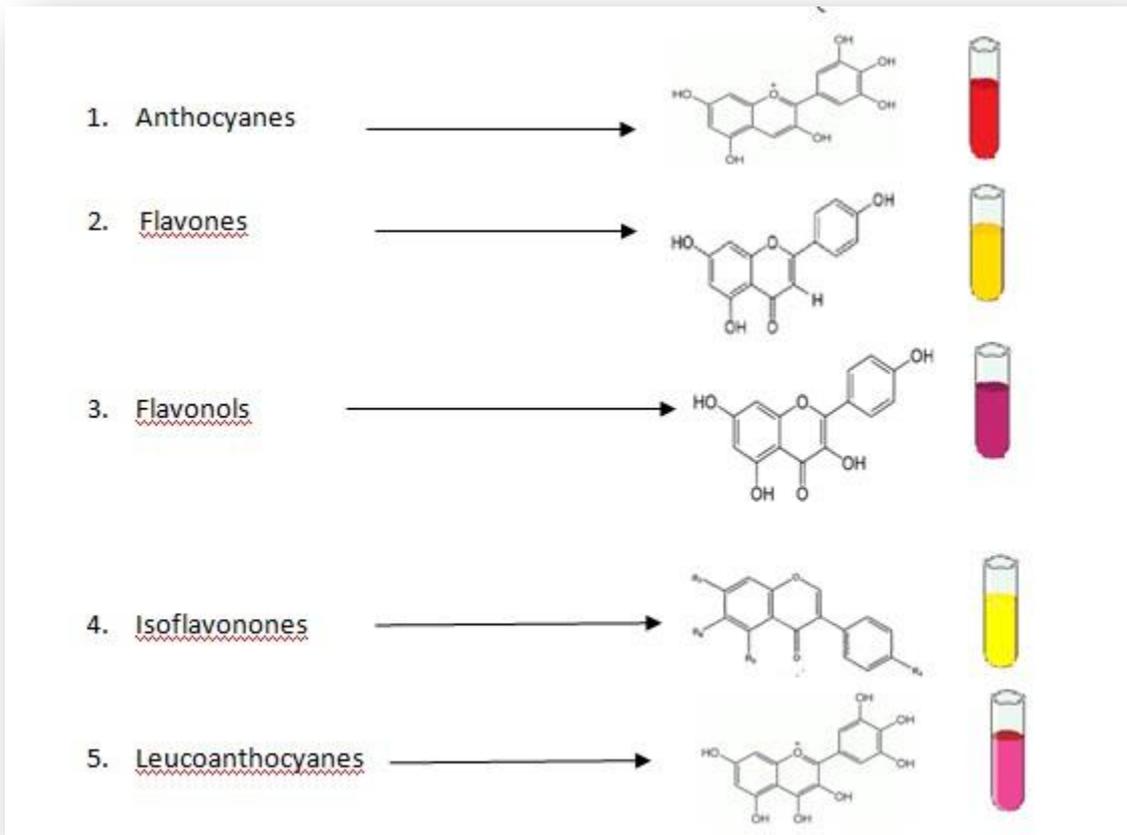
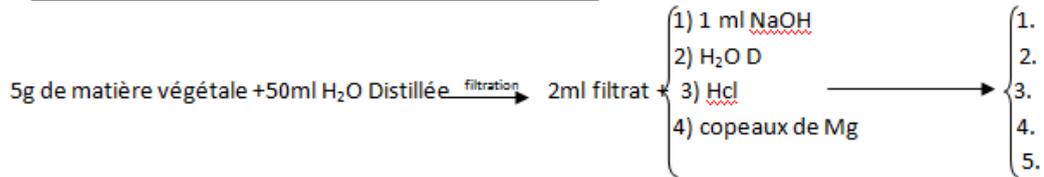
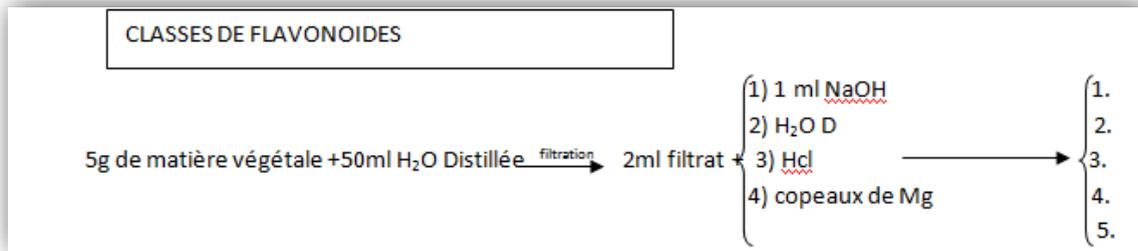


Figure 08 : Détection des classes de flavonoïdes par screening phytochimique .

IV.3. Résultats

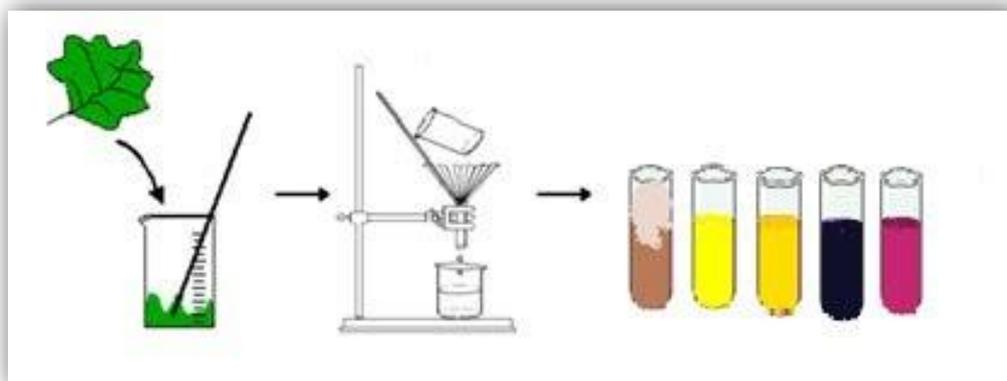


Figure 09 : Résultats qualitatifs du screening phytochimique de *R.officinalis*.

Les résultats du screening photochimique réalisé pour les parties aériennes de *Rosmarinus officinalis*, sont regroupés dans le tableau ci-après.

Tableau 02 : Résultats de criblage phytochimique de *R. officinalis*.

Groupe chimique	Résultats
Saponines	+++
Flavonoïdes	++
Flavones	++
Tannins galliques	++
Tannins catéchiques	+
Quinones	+
Alcaloïdes	-
Terpénoides	-
Leucoanthocyanes	-

(+) : présence ; (++) : abondance ; (-) : absence

Cette étude qualitative nous a permis de mettre en évidence 6/9 des composés chimiques recherchés. Nous avons constaté que la plante d'étude contient abondamment de saponines, flavonoïdes et tannins galliques, modérément de tannins catéchiques et quinones mais n'a plus d'alcaloïdes, terpénoides et leucoanthocyanes.

IV.4. Discussion

Nous nous servons du tableau ci-après pour comparer nos résultats à ceux réalisés par d'autres chercheurs, pour les mêmes métabolites secondaires recherchés pour notre plante d'étude.

Un aperçu général sur ce tableau nous a permis de mettre en exergue ce qui suit :

- Nous constatons l'absence des alcaloïdes et de leucoanthocyanes alors qu'il y a présence des flavonoïdes incolores, saponines, flavonoïdes, tannins et quinones.

Groupes chimiques	Notre résultat	Fadili ^{et al.} (2015)	Makhloufi (2013)
Saponines	+++	++	++
Flavonoïdes	++	++	+
Flavones	++	/	/
Tannins galliques	++	++	+
Tanninscatechiques	+	+	/
Quinones	+	-	+
Alcaloïdes	-	-	-
Terpénoides	-	Triterpène/stérol ++/++	Triterpène +
Leucoanthocyanes	-	-	-

- L'abondance de flavonoïdes explique leur rôle prononcé dans la protection des plantes contre le stress hydrique et la génération d'une tolérance aux métaux lourds présents dans les sols. Hors la plante, les flavonoïdes possèdent plusieurs effets pharmacologiques (Makhloufi, 2013).
- Ils sont les promoteurs dans les traitements des troubles veineux et capillaires et les agents responsables de la protection vasculaire (vierling, 2008). Les flavonoïdes protègent les aliments d'origine végétale de l'oxydation, ce sont des antioxydants réputés pour leur action antiradicalaire (Makhloufi, 2013).
- Nous notons aussi la présence des tannins. Selon Iserin (2001), les tannins permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Ces tannins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Cavin, 1999).
- Également, le contenu de *R.officinalis L.* en composés réducteurs peut être la raison de l'effet antioxydant élevé de romarin (Celiktaset *al.*, 2007).
- Les plantes sont très riches en saponosides, ces molécules ont des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et anti-oedémateuses (Roux *et al.*, 2007). Ce qui justifie leur utilisation dans les traitements traditionnels pour l'insuffisance veineuse, des signes fonctionnels de la crise hémorroïdaire et des troubles de la fragilité capillaire (Makhloufi, 2013).

V. Extraction des polyphénols totaux

L'extraction a été réalisée au niveau de laboratoire des biomolécules actives et applications, département de Biologie Appliquée, Faculté de Sciences exactes et de sciences de la nature et de la vie, Université Larbi Tebéssi, Tébessa.

Le but de cette étape est la récupération des composés phénoliques totaux de la plante d'étude, en se basant sur leur solubilité qui est en fonction de leur degré de polymérisation, l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé (Falleh *et al.* 2008).

V.1. Matériel

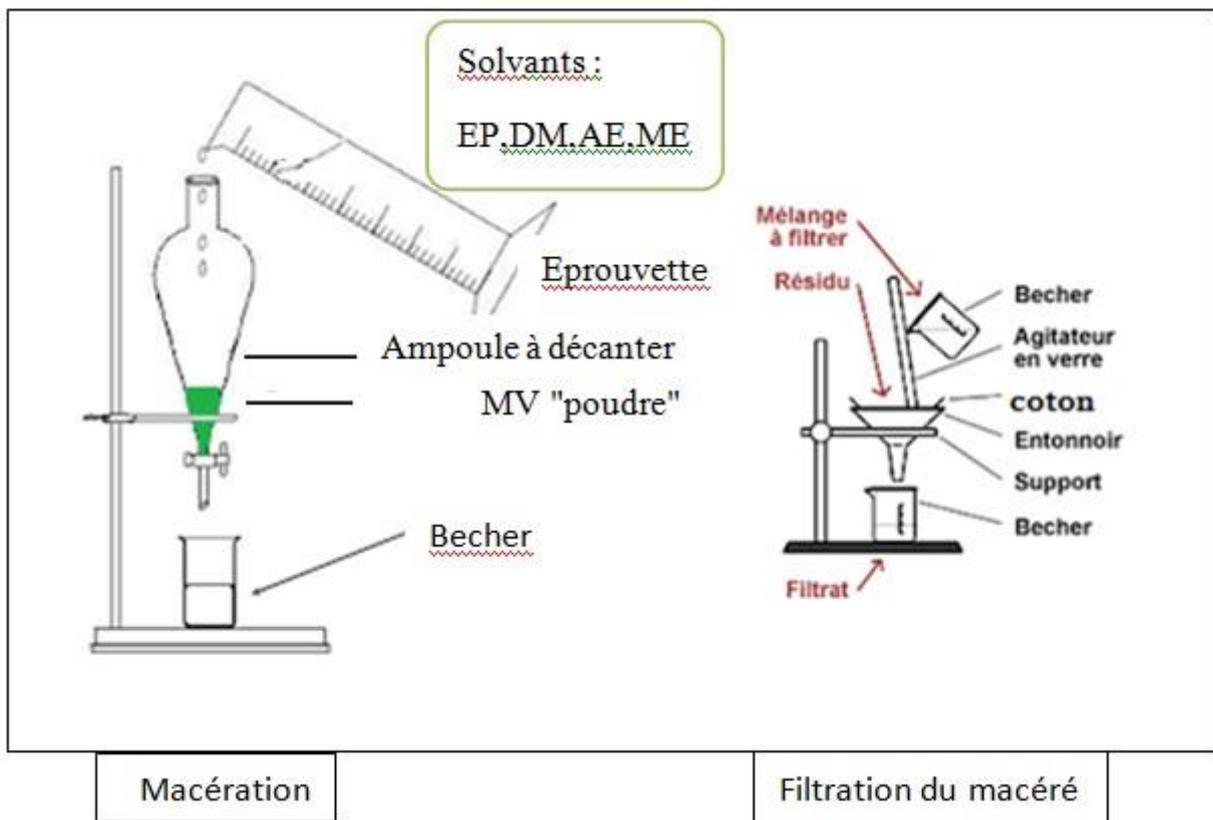


Figure 10 : Illustration de protocole d'extraction solide-liquide.

V.2. Extraction solide-liquide (Macération)

Nous avons effectué un broyage de la plante à l'aide d'un robot électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène. Puis nous avons pesé une quantité de cette poudre. Selon la technique utilisée, nous avons réalisé une extraction solide-liquide par macération.

Cette dernière consiste à laisser séjourner la plante dans un dissolvant approprié, pendant un temps déterminé à la température ordinaire; après décantation le résidu s'appelle le marc et le produit s'appelle macéré (Alnamer, 2014).

Selon le protocole d'extraction suivi, la matière végétale a été mise à macérer, à l'abri de la lumière, dans un volume d'un solvant organique pendant un temps déterminé. L'obtention des extraits bruts a été menée en utilisant successivement quatre solvants organiques de polarités croissantes : Ether de pétrole (EP), Dichloromethane (DM), Acétate d'éthyle (AE) et Méthanol (ME).

Les macéras sont réunis puis ils ont été filtrés via un entonnoir pourvu du coton. Les filtrats sont évaporés presque à sec à l'air libre et au moyen d'un Evaporateur rotatif, afin d'éliminer totalement le solvant. Les extraits secs sans solvant ont été pesés puis stockés dans des flacons en verre jusqu'à leur utilisation.

A ce stade, le rendement de chaque extrait est calculé par rapport au poids obtenu (Al namer, 2014).

V.3. Calcul du rendement

Le rendement se calcule à partir de l'extrait final par rapport au poids de la plante sèche (Al namer, 2014). Il est exprimé en pourcentage et est calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{m}{M} \times 100$$

R : rendement (%)

m : masse de l'extrait après évaporation du solvant.

M : masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction.

V.4. Résultats

Les rendements des différents extraits de *R.officinalis* ont été exprimés en %. Les résultats sont présentés sous forme de diagramme en barre (**Figure 11**).

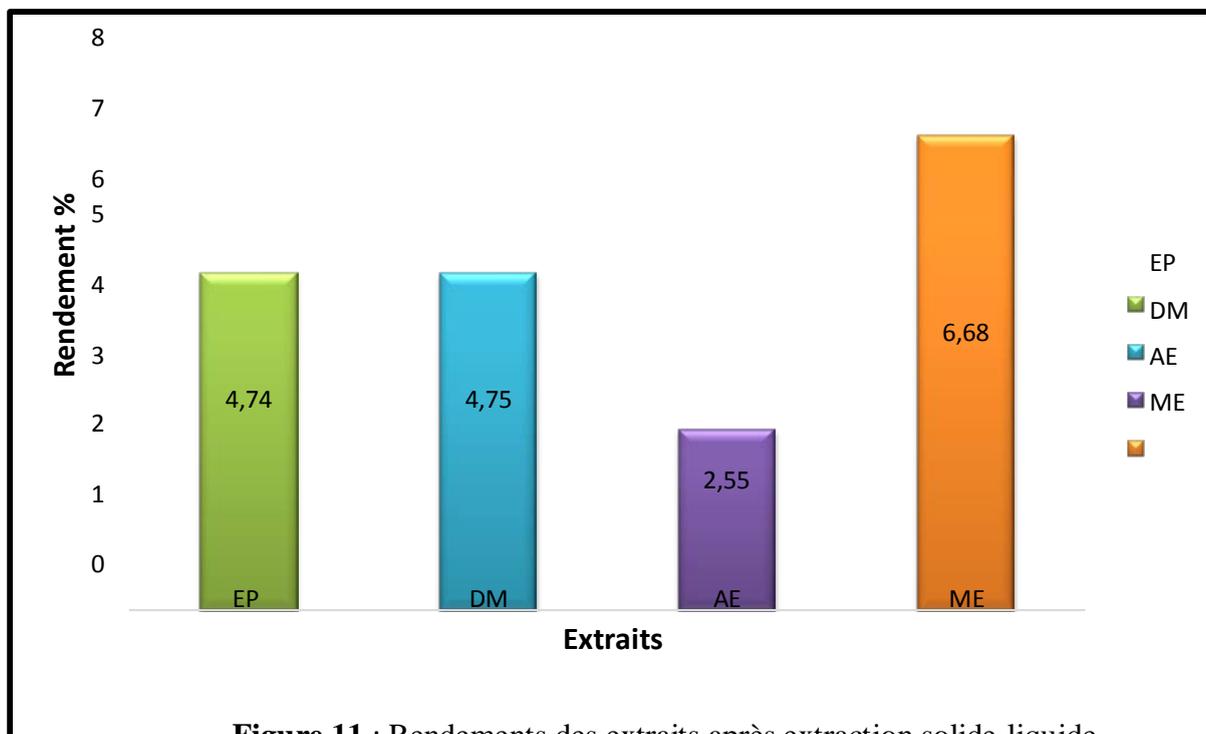


Figure 11 : Rendements des extraits après extraction solide-liquide.

Pour la matière végétale macérée, nous avons observé une variation prononcée entre les rendements de *R.officinalis*, allant de 2,55% pour l'extrait AE à 6,68 % pour l'extrait ME. Les rendements des extraits EP et DM semblent être similaires avec respectivement 4,74 % et 4,75%.

V.5. Discussion

Il est facile d'en tirer des résultats que le rendement de l'extrait ME (6,68%) domine les autres extraits mais il est plus faible que celui (13,06%) révélé par *Fadili et al (2015)* pour *R.officinalis* des Hauts Atlas Oriental du Maroc. Les rendements des extraits EP et DM sont identiques avec des valeurs moyennement importantes (4,74%), alors que celui d'AE s'est avéré le plus faible, soit de 2,55 %.

V.6. Les échantillons obtenus après l'extraction

Cette série d'extraction a permis d'obtenir quatre extraits bruts présentant chacun des caractéristiques physico-chimiques spécifiques (**Tableau 03**).

Tableau 03: Caractéristiques physico-chimique des extraits.

Extrait	Couleur	Aspect	Odeur de la plante
EP	Jaune/jaune - citron	Cire	Vick (Robb)
DM	Vert d'olive	Poudre humide	Huile d'olive
AE	Vert clair	Poudre sèche	Citron
ME	Vert gazon	Solide	Henné

Ces extraits seront sujets de l'étude des activités antioxydante et antibactérienne, après avoir déterminé leurs teneurs en polyphénols totaux.

En conclusion , L'extraction de ces principes actifs par des solvants organiques de polarité croissante (EP, DM, AE, ME) , a révélé que l'extrait le plus rendable était le ME avec une valeur de d'ordre de 6,68%.

VI. Dosage des composés phénoliques

Afin de connaître le produit "extrait" d'une manière la plus poussée possible. La détermination de la teneur en polyphénols est nécessaire. Cette étape a été réalisée au niveau du laboratoire de géologie, Université de Larbi Tebessi, Tébessa.

VI.1. Matériel

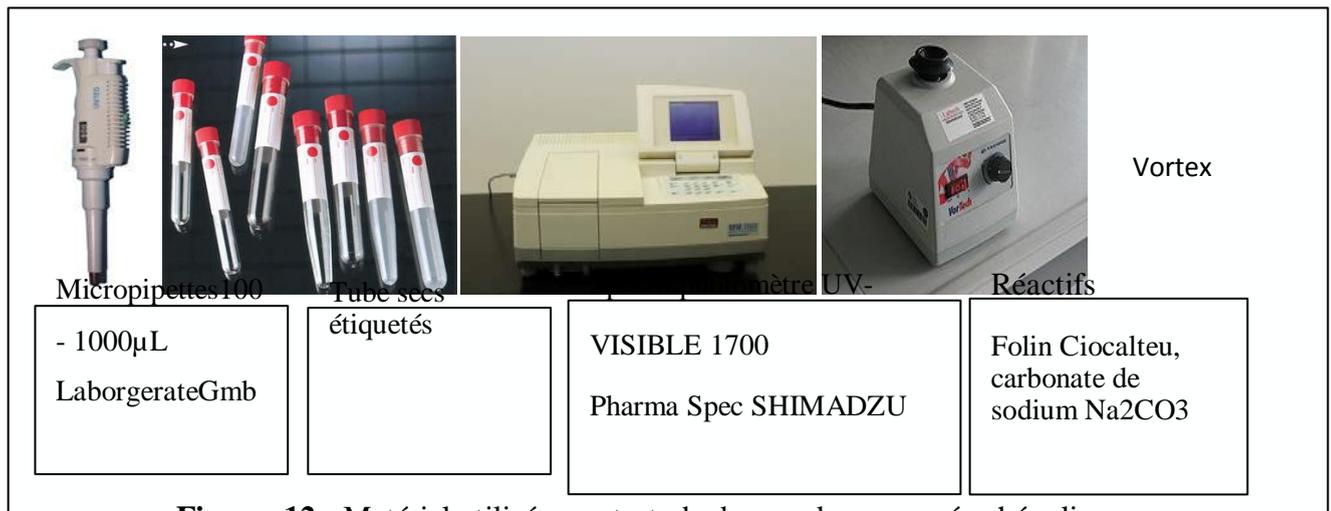


Figure 12 : Matériel utilisé pour test de dosage de composés phénoliques.

VI.2. Méthode

La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, tel que décrite par (Singleton et Rossi, 1965 ; Marian et Fereidoon, 2004). C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, des plantes médicinales et les nourritures (Abdel-Hameed, 2009). L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu (Maisuthisakulet al., 2008).

VI.2.1. Principe

La teneur phénolique totale est, habituellement, déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis, en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline (Vuorela, 2005).

VI.2.2. Mode opératoire

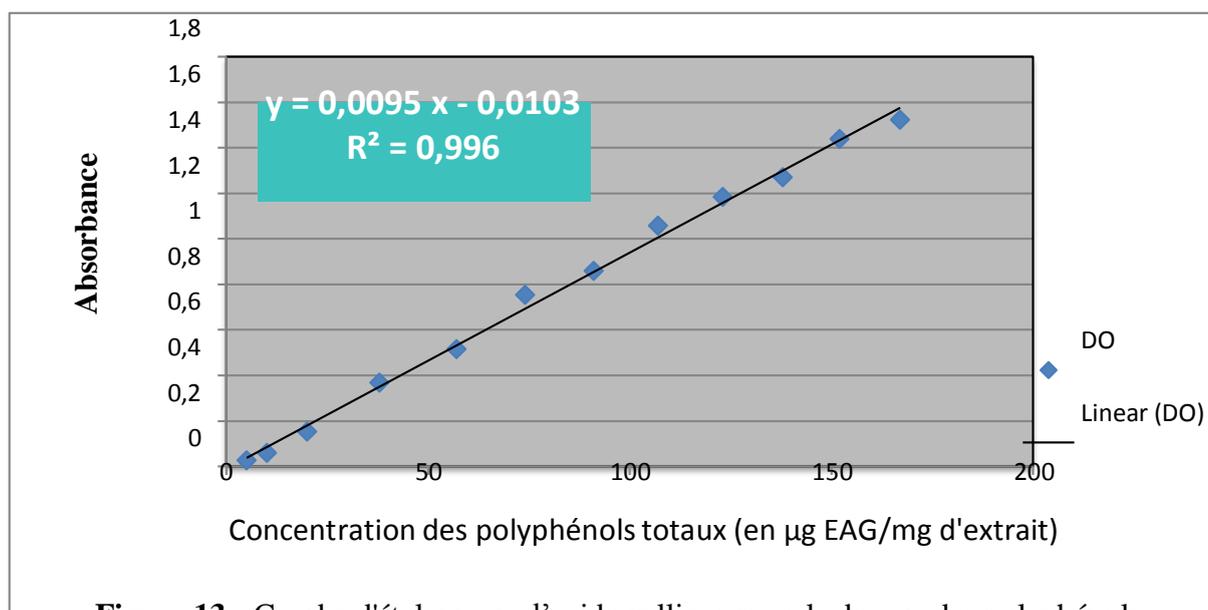
Brièvement 200µL de chaque extrait (0,5 mg/mL) ont été ajoutés à 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes. Après l'incubation, 800 µL de la solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (75g /L) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée à une longueur d'onde de 765 nm.

VI.2.3.Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (**Figure13**) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg) (**Singleton et Rossi, 1965 ; Liet al., 2007 ; Athamena, 2009**).

VI.3.Résultats

La spectrophotométrie UV/Visible a permis de quantifier la concentration moyenne des polyphénols présents dans les extraits préparés de la plante d'étude (**Figure 14**). Les résultats sont représentés et ont été déterminés à partir de l'équation: $Y = 0,0095 X - 0,0103$, $R^2 = 0,996$ et exprimés en (µg EAG/mg d'extrait).



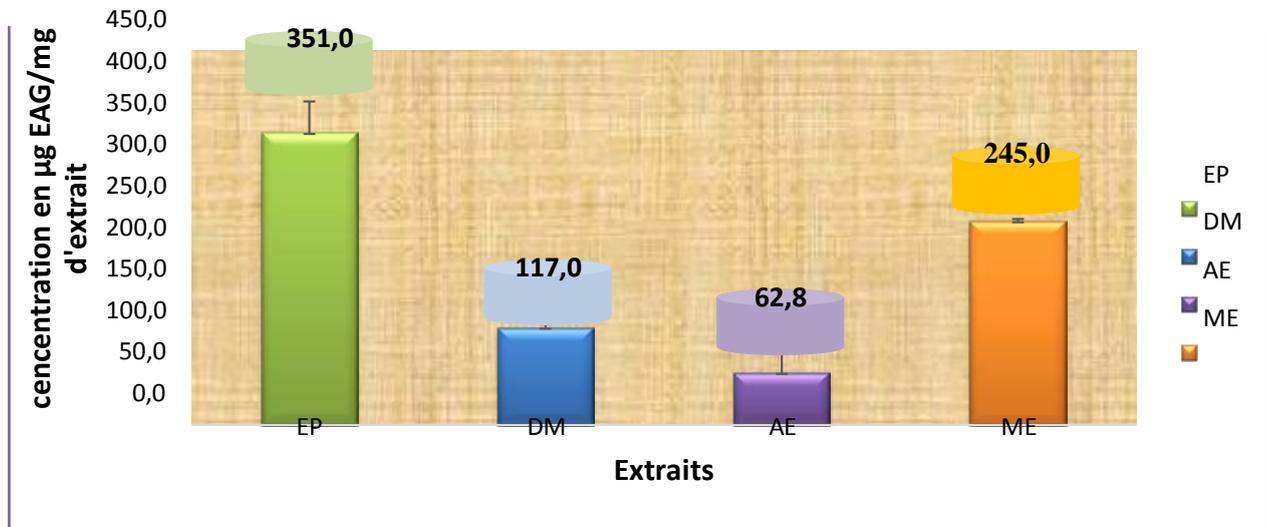


Figure14: Teneur des polyphénols totaux (en µg EAG/mg d'extrait) des quatre extraits de *R. Officinalis*.

Nos résultats montrent que la teneur en composés phénoliques varie d'un extrait à l'autre. L'extrait le plus riche en polyphénols est celui de EP (351µg EAG/mg), suivi de ME (245µg EAG/mg). L'extrait DM renferme une teneur modérée (117µg EAG/mg) par rapport à celle de EP et de ME. L'extrait AE présente le plus faible rendement (62,8µg EAG/mg).

VI.4. Discussion

Généralement, toutes les plantes de la famille des *Lamiacées* sont connues pour leurs composés phénoliques (Gortzi *et al.*, 2007; Feckaet *al.*, 2008). Ceci est en accord avec nos résultats montrant la présence de polyphénols totaux dans tous les extraits variant entre $62,82 \pm 28,2$ mg et $351 \pm 37,7$ µg EAG/mg d'extrait.

Nos résultats concordent avec ceux de Fadili *et al.* (2015) qui confirment la richesse de *R. Officinalis* en polyphénols totaux, mais avec une teneur variant entre 33 mg et $185,71 \pm 4$ mg. Leur étude a défini l'extrait AE comme l'extrait majoritaire en polyphénols.

Les valeurs de Celiktaset *al.*, (2007 (a)) s'étendent de 34,1 à 119 mg GAE/g, résultats clairement lointains des nôtres.

Les résultats décalés résultent vraisemblablement de:

- ✓ Facteurs physiques et chimiques qui gouvernent les méthodes d'extraction solide-liquide :

Etude expérimentale

Dosage des polyphénols totaux

le réactif solvant et son volume, masse de la plante, la température, la durée d'extraction .**Perez et al., (2007)** ont montré l'effet du traitement de pré-extraction (irradiation ionisante) et du solvant d'extraction, sur la concentration des composés phénoliques totaux dans les extraits du romarin.

- ✓ La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. (**Vuorela, 2005 ; Gomez-Caravaca et al., 2006**).
- ✓ Le solvant d'extraction emporte des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique(**Djeridane et al., 2006**).
- ✓ Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (**Tawaha et al., 2007**).
- ✓ La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (**Falleh et al., 2008**).
- ✓ En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (**Falleh et al., 2008 ; Podsedek, 2007 et Athamena, 2009**).

En conclusion, nous avons constaté que nos extraits sont riches en "polyphénols ". Ces derniers sont réputés pour leur pouvoir "antioxydant". La partie suivante dans cette recherche a été consacrée pour valoriser ce "pouvoir " chez nos extraits d'étude. L'estimation quantitative des polyphénols totaux pour chaque extrait (par la méthode de Folin-Ciocalteu) a montré que l'extrait EP est le plus riche en ces composés (351µg EAG/mg d'extrait) malgré son rendement modéré (4,74 g).

VII. Evaluation de l'activité antiradicalaire des extraits d'étude

Les radicaux libres peuvent être considérés comme des éléments très importants pour la vie de l'organisme suite à l'implication de leurs effets bénéfiques, par exemple les radicaux oxygéniques exercent des actions critiques sur les signaux de traduction, et sur les gènes de transcription. Les cellules phagocytaires (macrophages) utilisent, également, les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) pour combattre les agents infectieux (bactéries et virus). Cependant, ces mêmes radicaux peuvent causer des dégâts oxydatifs cellulaires, endommagement des tissus et même la mort des cellules et le développement des processus pathologiques (**Fotsing Matene, 2005 ; Wang *et al.*, 2008**).

Les antioxydants naturels sont présents dans l'alimentation ; pour la plupart ce sont des composés phénoliques qui possèdent au moins un noyau aromatique, contenant un ou plusieurs substituant. En effet, cette propriété antioxydante est en relation directe avec la structure de ces molécules (**Cosioet *al.*, 2006**).

Cette partie d'étude est menée par deux étapes ; la première vise à définir qualitativement l'extrait "antioxydant" par un test de CCM/DPPH qui nous a orientés à réaliser une estimation quantitative de celui révélé "antioxydant". Ce qui nous permettrait de ne pas gaspiller le réactif de DPPH.

VII.1. Test CCM/DPPH

La chromatographie sur couche mince est une méthode facile à mettre en œuvre. Elle donne l'avantage de nécessiter peu de matériel et de fournir des résultats facilement interprétables et toujours très reproductibles (**Bataille, 2000**). A l'origine, la CCM a été utilisée pour la séparation des substances colorées (d'où son nom). Aujourd'hui, elle est considérée comme une méthode puissante pour les analyses qualitatives et quantitatives (**Akroum, 2006**).

VII.1.1. Matériel

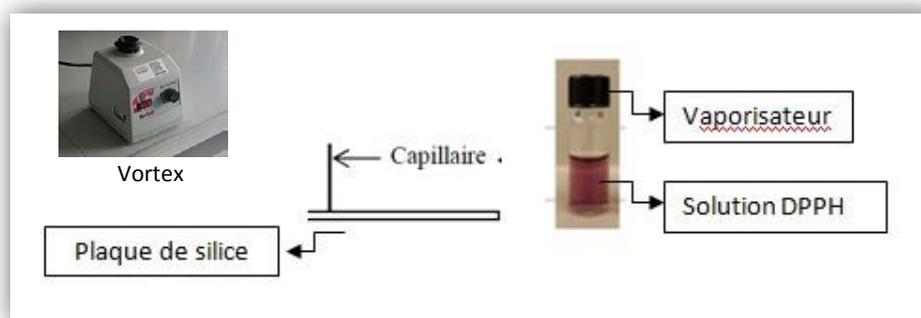


Figure 15 : Illustration de matériel nécessaire pour le test qualitatif CCM/DPPH.

VII.1.2. Mode opératoire

a. Préparation de la phase stationnaire : La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques pré-étalées de gel de silice.

b. Préparation de la phase mobile: Absence de phase mobile du fait que les extraits d'étude seront testés sans aucun développement.

c. Le dépôt : le dépôt se fait avec des tubes capillaires en verre à usage unique, d'une façon perpendiculaire et linéairement. Il faut sécher après chaque dépôt avec un sèche-cheveux, par exemple (Figure 16) (Sine, 2003 ; Akroum,2006 et Zeghad, 2009).

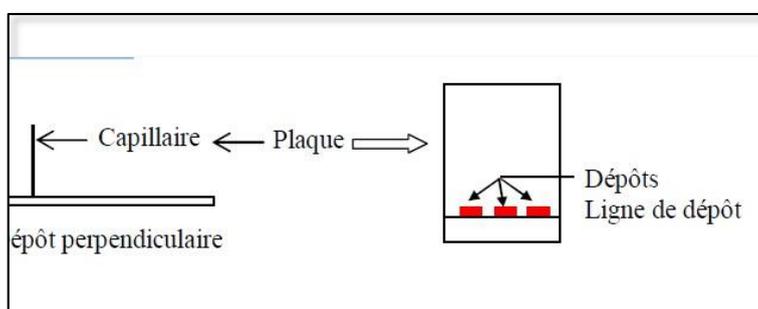


Figure 16 : Illustration du dépôt pour une CCM.

d. Révélation: la plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée, puis elle est pulvérisée à l'aide d'un vaporisateur par une solution méthanolique du DPPH (2mg/mL) préalablement préparé (Sine, 2003).

e. Lecture : un résultat positif (présence de potentiel antioxydant) est manifesté par l'apparition de spots jaunes-blancs sur fond violet.

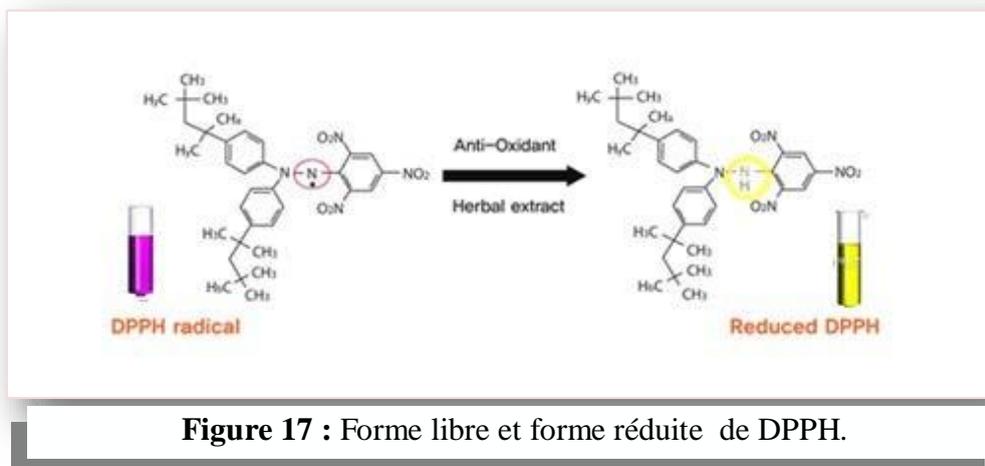
Cette expérience est réalisée deux fois avec et sans désignation de concentration de solution-mère d'extrait/volume de dépôt de spot.

VII.2. Test antiradicalaire contre le DPPH (spectrophotométrie UV-Visible)

VII.2.1. Principe

L'activité antioxydante des flavonoïdes peut être mesurée par l'utilisation d'une méthode simple, rapide et facile à mettre en œuvre ; c'est la méthode de DPPH. Ce dernier est un radical libre, stable, qui possède une bande maximum d'absorption entre 515-528 nm (Athamena, 2009), employé pour évaluer l'activité antioxydante des composés purs ou de mélange complexe. La méthodologie est basée sur la décroissance de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH suite à l'addition de l'antioxydant (Bernardiet *al.*, 2007).

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphényl 1 picrylhydrazyl)(**Figure 14**) de couleur violette se réduit en 2,2 diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (**Maataouiet al.,2006**).



Ce radical est un oxydant qui peut être réduit par l'antioxydant (AH) selon la réaction suivante :(**Athamena,2009 ; Celiktas et al., 2007 b**) :



VII.2.2. Matériel

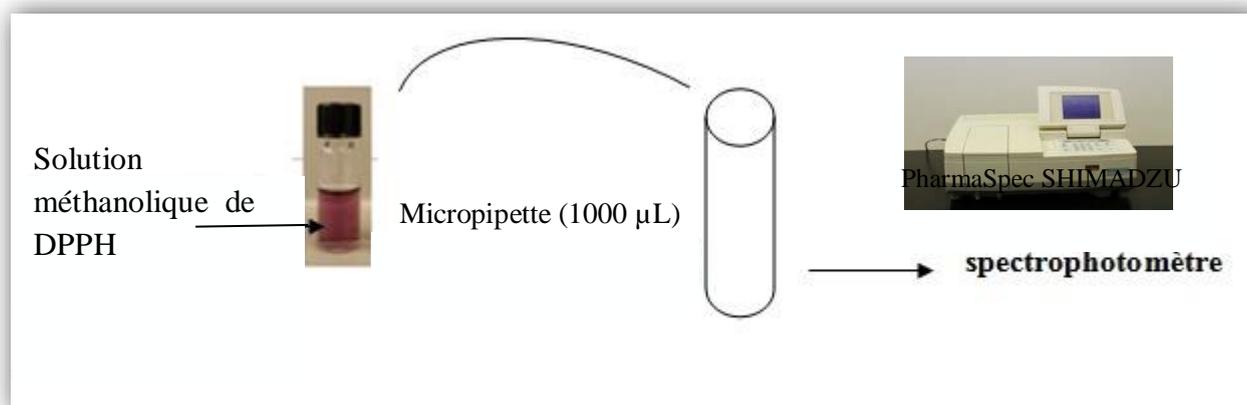


Figure18 :Illustration de matériels nécessaires pour le test du pouvoir antiradicalaire contre DPPH (spectrophotométrie UV-visible).

VII.2.3. Méthode

La mesure de l'activité antiradicalaire des quatre extraits de *R. officinalis* a été effectuée par le test au **DPPH** selon la méthode de (**Looet al., 2008**).

- 100 µL de l'extrait à tester à une concentration de 5mg/mL.
- 3 mL d'une solution méthanolique de DPPH à une concentration de 0,037 mg/mL, préparée à partir de 9,30 mg de DPPH solubilisé dans 250mL du méthanol absolu.

La densité optique (DO) est mesurée à 517 nm, après 30 minutes d'incubation à l'obscurité à température ambiante.

VII.2.4. Expression de résultats

Les résultats sont exprimés en tant que pourcentage d'inhibition du radical DPPH (PI). La décroissance de l'absorbance est convertie en pourcentage d'activité Scavenger selon l'équation suivante (**Looet al., 2008**) :

$$PI = [(A1 - A2) / A1] \times 100$$

PI : pourcentage d'inhibition (%)

A1 : absorbance du contrôle(solution du DPPH sans extrait).

A2 : absorbance en présence de l'extrait.

Chaque extrait est testé répété en duplicata, sauf celui de ME(triplicata), à cause de non disponibilité de DPPH. Les résultats ont été présentés par la moyenne de deux expériences différentes.

VII.3. Résultats

VII.3.1. Test CCM/DPPH

La pulvérisation de la plaque CCM par une solution méthanolique de DPPH, révèle l'apparition de quatre taches jaunes, clairement nettes dans la figure ci-après.



Figure 19 : Comportement des extraits de *R.officinalis* sur plaque CCM de silice, après pulvérisation par une solution DPPH méthanolique.

En terme d'intensité de couleur, la plus élevée est celle de ME, par la suite celles de EP et DM qui sont d'intensité identique. Quant à l'extrait AE, il présente la couleur la moins intense.

VII.3.2. Evaluation du pouvoir antiradicalaire contre le DPPH (spectrophotométrie UV-Visible)

Le changement de la couleur de la solution méthanolique de DPPH en présence de chacun des extraits à tester, a été mesuré à 517 nm. Les résultats des pourcentages d'inhibition (Figure 20, 21) du radical libre DPPH par les extraits de *R.officinalis*, sont présentés dans la Figure 22.

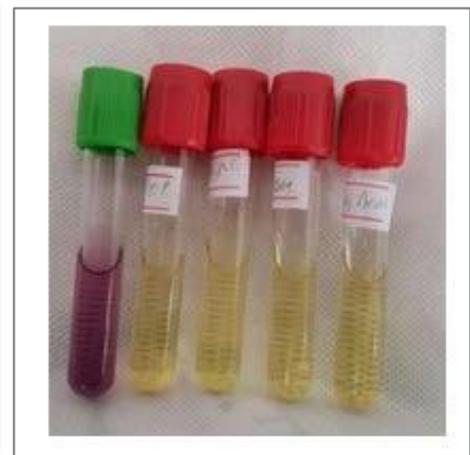
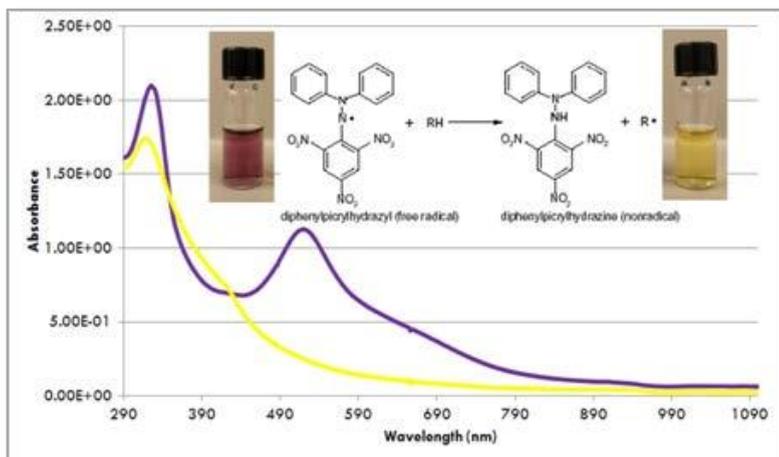


Figure 20: Schéma représentatif de la réaction de virement de la couleur mauve de DPPH "réduit" en DPPH jaune "oxydé" en présence d'antioxydant (DPPH).

Figure 21: Pouvoir antioxydant des 4 extraits d'étude prouvé par le virement de DPPH en couleur jaune.

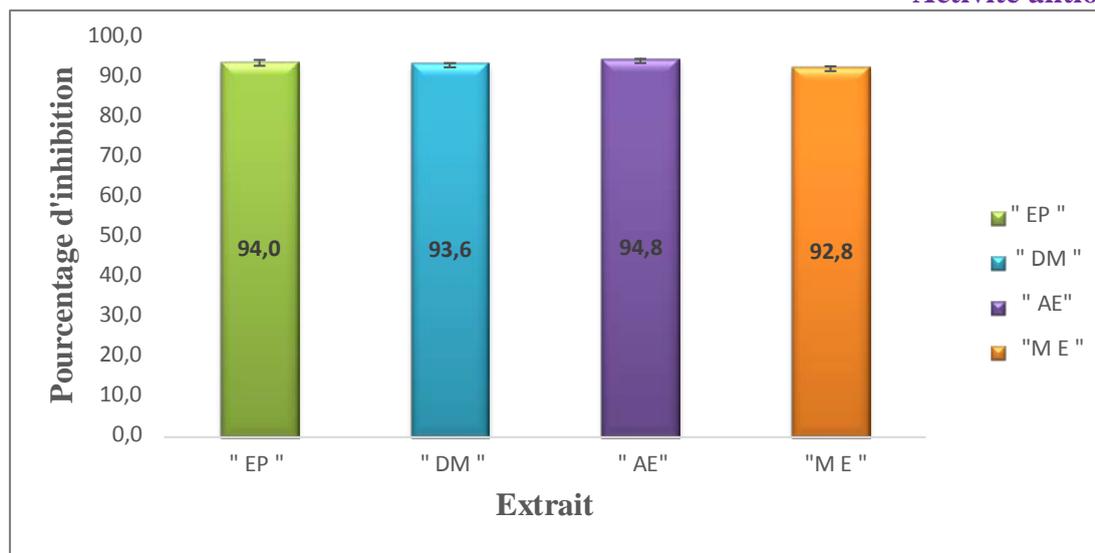


Figure 22 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH par les extraits de *R. officinalis*.

L'activité anti-radicalaire la plus importante est représentée par AE (94,8%) suivie, respectivement, par EP (94,0%), DM (93,6%) et ME (92,8%).

Discussion

Dans Le test CCM-DPPH, les antioxydants réduisent et décolorent le radical DPPH, à un composé jaune le diphényl picryl hydrazine. L'ampleur de la réaction dépendra de la capacité des antioxydants de donner l'hydrogène (Ardestani et Yazdanparast, 2007).

Nos résultats, exprimés en pourcentage de l'activité anti-radicalaire (%) (Figure 22), ont révélé que tous les extraits testés sont des anti-radicalaires dont le plus oxydant est AE traduit par un pourcentage d'inhibition de 94,8 %. Les extraits EP et DM ont marqué un pouvoir antioxydant important avec une valeur au voisinage de 94,0%. Le ME a donné un résultat de l'ordre de 92,8%, ce qui lui a permis d'être "antioxydant". D'après ces résultats, nous pouvons constater que tous les extraits de *R. officinalis* sont de puissants antioxydants.

Le résultat de l'activité anti-radicalaire de l'extrait AE est très proche de celui (95,81%) obtenu par Athamena (2009). Néanmoins, il est très loin de celui trouvé par Akroum (2006) dont le pourcentage est très faible (47,65 %). Almela et al., (2006) ont confirmé notre résultat pour le ME. Selon leur étude, le ME s'est avéré un antioxydant très puissant (96,18%). Selon Turkmen et al., (2007), les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale.

Activité antioxydante

La présence de composés phénoliques (flavonoïdes, coumarines), alcaloïdes et des terpénoïdes, seraient probablement à l'origine de l'activité antioxydante de *R. officinalis*. Les flavonoïdes, reconnus comme d'excellents antioxydants (**Bruneton, 1999**), pourraient jouer un rôle important dans le système de défense. Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques l'un avec l'autre, devrait être prise en considération dans l'activité biologique (**Bourgou et al., 2008**). D'un autre côté, la fraction phénolique n'incorpore pas tous les antioxydants et les interactions synergiques entre les antioxydants dans un mélange fait que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et la nature des antioxydants (**Fallehet al., 2008**).

En conclusion, les résultats des tests 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 connu pour leurs propriétés anti-oxydantes et que la plupart de leurs composants antioxydants ont été identifiés (**Tepeet al., 2006 ; Kivilompoloet al., 2007**). Le romarin fait partie des antioxydants naturels accepté en tant qu'une des épices avec l'activité anti-oxydante la plus élevée (**Peng et al., 2005**). Cette dernière est dûe principalement aux composés phénoliques, appartenant à trois groupes : les diterpènes phénoliques, les acides phénoliques et les flavonoïdes (**Almelaet al., 2006**).

Nous expliquons de ce , l'utilisation des composés polyphénoliques dans la fabrication des médicaments antiradicalaires (flavay, daflon...). Certains de ces composés sont, aussi, doués d'une activité antioxydante leur permettant d'être utilisés contre les différentes maladies cardiovasculaires, peroxydation lipidique, cancer...) (**Bonchy, 2001; Nomoto, 2004 et Lahouel, 2004**).

Pour conclure , l'évaluation de l'activité antioxydante par le radical libre DPPH montre que les pourcentages d'inhibition varient entre 92,8% et 94,8% .Ces résultats ont prouvé que nos extraits sont "antioxydants naturels réputés".

VIII. Activité antibactérienne

Ce test est réalisé au niveau de laboratoire de contrôle de qualité, Département de Biologie Appliquée, Faculté des Sciences exactes et des Sciences de la nature et de la vie ,Université de Tébéssa dont le but de test est le pouvoir antibactérien des extraits de notre plante.

VIII.1. Protocole d'application balance

VIII.1.1. Matériel

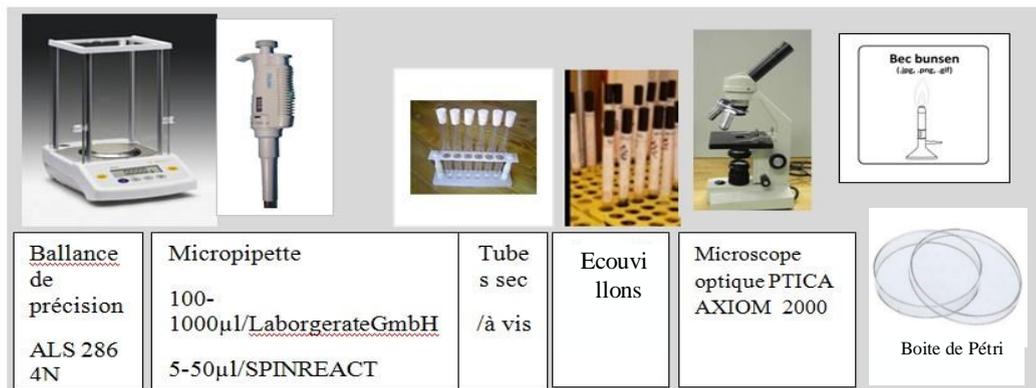


Figure 23 : Matériel utilisé pour le test antibactérien.

VIII.1.2. Méthode de détection "diffusion en milieu solide sur milieu gélose "

L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu solide sur milieu gélose de Mueller-Hinton, encore appelée méthode de diffusion par puits sur gélose, décrite par Kirby-Bauer *et al.*(1966), Berghe et Vlietinck(1991)et reprise par Kechkar (2008). Deux souches bactériennes (Figure ci-dessous) ont été choisies pour leur particularité structurale et métabolique(Athamena, 2009), ainsi que pour leur pathogénéicité (la contamination des denrées alimentaires) (Riyaha,2013).

VIII.1.3.Souches bactériennes

Le support microbien est composé de deux souches de références :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

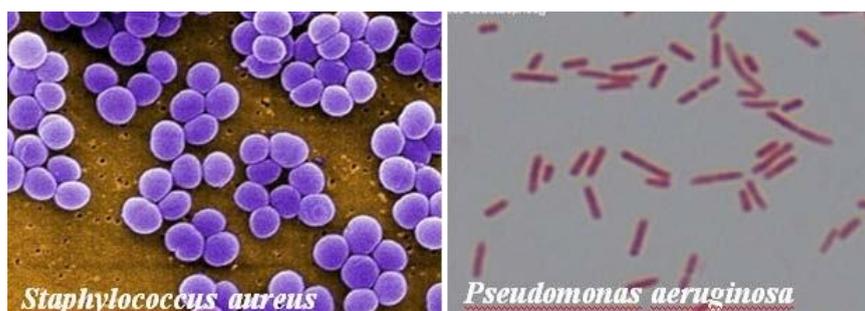


Figure 24 :Souches bactériennes d'étude(www.santelog.com, www.Microbiologyinpictures.com)

VIII.1.4. Vérification de la pureté des souches

La vérification des puretés des souches bactériennes est basée sur :

- l'observation macroscopique des colonies (couleur, aspect et diamètre) et l'observation microscopique des bactéries (mobilité, forme et le mode de réarrangement) ;
- la coloration de Gram ;
- le test de la catalase et de l'oxydase (**Makhloufi, 2013**)

La pureté des bactéries d'étude a été confirmée par la coloration de Gram pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, quant au *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 la confirmation est fournie par Mr. Menasria (M.A.A. Département de Biologie Appliquée, Faculté des Sciences exactes et de Sciences de la vie et la nature, université de Tébessa).

VIII.1.3. Conservation des souches

Les souches pures sont conservées à 4°C dans la gélose nutritive inclinée.

VIII.1.4. Repiquage des espèces bactériennes

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum (**Dulger et Gonuz, 2004 ; Parekh et Chanda, 2007 ; Rota et al., 2008**)

VIII.1.5. Préparation de l'inoculum

VIII.1.5.1. Enrichissement

Deux colonies bien séparées et uniformes des espèces bactériennes concernées, ont été prélevées, à l'aide d'une anse de platine, pour être homogénéisées dans 5 mL de bouillon nutritif (25 g de BN dans un litre d'eau distillée stérile), puis portées à l'incubation pendant 18-24 h à 37°C dans l'étuve. Pour chaque bactérie préparer trois tubes à vis.

VIII.1.5.2. Préparation de la suspension bactérienne

Dans 5 mL d'eau physiologique stérile, mettre 500 µL de la suspension bactérienne de 18-24 h présentant une turbidité élevée.

VIII.1.7 Préparation des milieux de culture

La gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée (13 mL) dans des boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre .L'épaisseur de la gélose est de 5 mm répartie uniformément dans les boîtes. Ces dernières doivent être séchées de 15-45 mn à une température ambiante du laboratoire ,dans la zone stérile du bec bunsen avant leur emploi.

VIII.1.8.Ensemencement / Test antibactérien

Mettre 13 mL de la gélose MH dans chaque boîte de pétri (épaisseur de 5 mm) et laisser sécher pendant 15 mn à température ambiante de laboratoire, dans la zone stérile du bec bunsen. A l'aide d'un écouvillon stérile, ensemencer, sous forme de stries serrées, la bactérie d'étude. Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois. Ensuite, inonder la surface de la gélose avec 1mL de la suspension bactérienne et laisser pendant 15 mn à température ambiante. Par la suite, éliminer l'excès de la suspension bactérienne. Creuser trois puits (diamètre 6 mm) dans chaque boîte de pétri, à l'aide d'une pipette pasteur stérile, dans lesquels 15 μ L d'extrait d'étude (10 mg/mL) sont introduits. Laisser à température ambiante, pendant 30 mn, pour la prédiffusion et incuber pendant 18-24 h à 37°C dans l'étuve. Les essais ont été effectués en triplicata pour chaque extrait, vis-à-vis les deux bactéries d'étude, pour deux expériences.

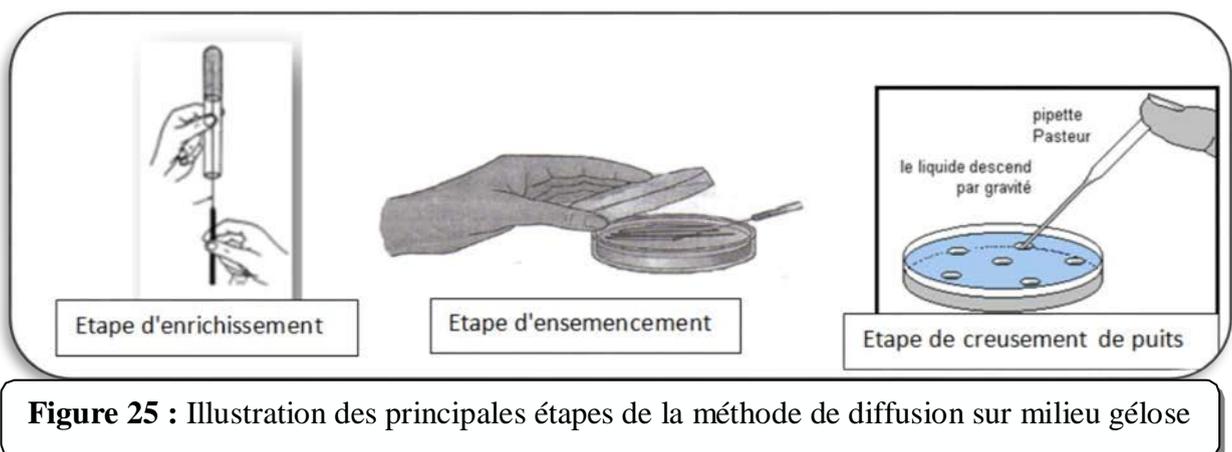


Figure 25 : Illustration des principales étapes de la méthode de diffusion sur milieu gélose

Remarque: Pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, l'ensemencement est réalisé par écouvillonnage.

VIII.1.9. Lecture

L'inhibition, quand elle est présente, se manifeste par des zones de stérilité autour des puits imprégnés d'extraits. Ces zones sont dites : zones d'inhibition. Leur diamètre nous permet d'évaluer le degré d'action des composés traités sur la croissance des bactéries (Akroum, 2006). La mesure a été faite à l'aide d'une règle.

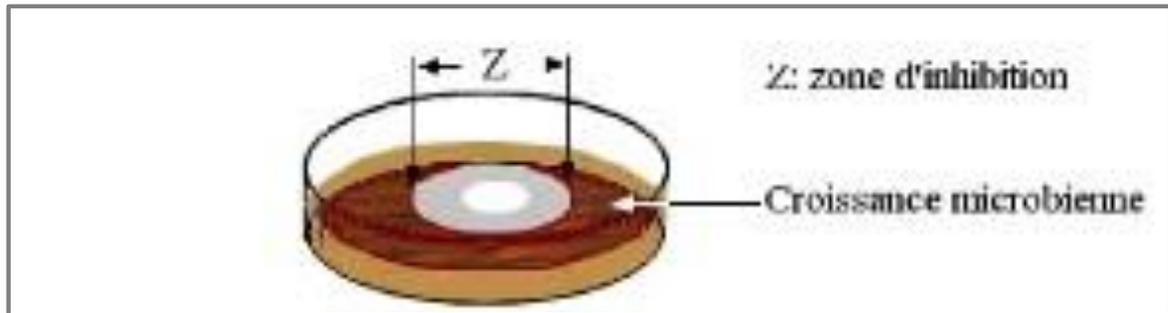


Figure 26: Illustration de la mesure d'une zone d'inhibition.

Les résultats peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits d'étude (Athamena, 2009).

Tableau 04 : Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition (Athamena, 2009).

Diamètre d'inhibition (X)	Degré de sensibilité des germes	Résultat
$X < 8 \text{ mm}$	Non sensible	-
$9 \text{ mm} < X < 14 \text{ mm}$	Sensible	+
$15 \text{ mm} < X < 19 \text{ mm}$	Très sensible	++
$X \geq 20 \text{ mm}$	Extrêmement Sensible	+++

VIII.2. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

VIII.2.1. Principe

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard de souches utilisées et le comparer avec l'effet de nos extraits bruts. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablementensemencé avec une culture pure de la souche à étudier.

VIII.2.2. Mode opératoire

Les antibiotiques utilisés pour

✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sont :

Ticaracilline + acide clavulanique 85 µg, Ceftazidime 30 µg, Gentamycine 10 µg, Amikacine 30 µg, Colistine 10 µg, Aztreonam 30 µg, Ampicilline 10 µg et Ceftaxime 30 µg.

✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sont :

Amoxicilline 30 µg, Gentamycine 10 µg, Titracilline 75 µg, Amikacine 30 µg, Cefotaxime 30 µg, Rifampicine 5 µg .

Déposer les disques d'antibiotiques dans des boîtes de pétri contenant 13 mL de milieu de MH gélifié, ensemencée avec la bactérie d'étude. Incuber pendant 18-24 h à 37°C dans l'étuve. Les résultats obtenus sont exprimés en millimètre (diamètres des zones d'inhibition). Les essais ont été effectués en deux expériences pour chaque antibiotique et pour chaque espèce bactérienne étudiée. Les résultats expérimentaux sont exprimés selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type (SD).

VIII.3. Résultats

1. Confirmation de la pureté des souches

Les tests réalisés pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont prouvé qu'elles sont pures : elles ne présentent ni contamination, ni mutation n'est observée (Tableau 05, Photo 06).

Tableau 05 : Caractères morphologiques des bactéries utilisées comme germes-tests.

Nom des bactéries	Morphologie	Couleur	Gram
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Bacille	rose	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Cocci	violet	+

ATCC: American type culture collection

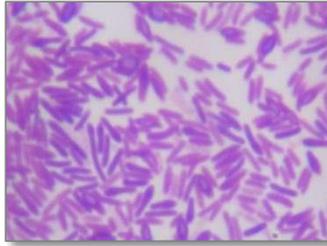


Figure 27: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

(Microscope optique x 100)

Remarque : La confirmation de la pureté de *Staphylococcus aureus* est fournie par Mr. Menassria Taha.

2. Sensibilité aux extraits de *R. officinalis*

Cette activité est mise en évidence par la méthode de diffusion sur gélose. Cette méthode nous permet de déterminer la sensibilité ou la résistance des bactéries aux extraits, mais elle est peu efficace pour mesurer l'action inhibitrice de ces derniers (Akroum, 2006).

Les résultats de l'évaluation antibactérienne des extraits sont repris ci-dessous (**Figure 28 , Tableau 07**).

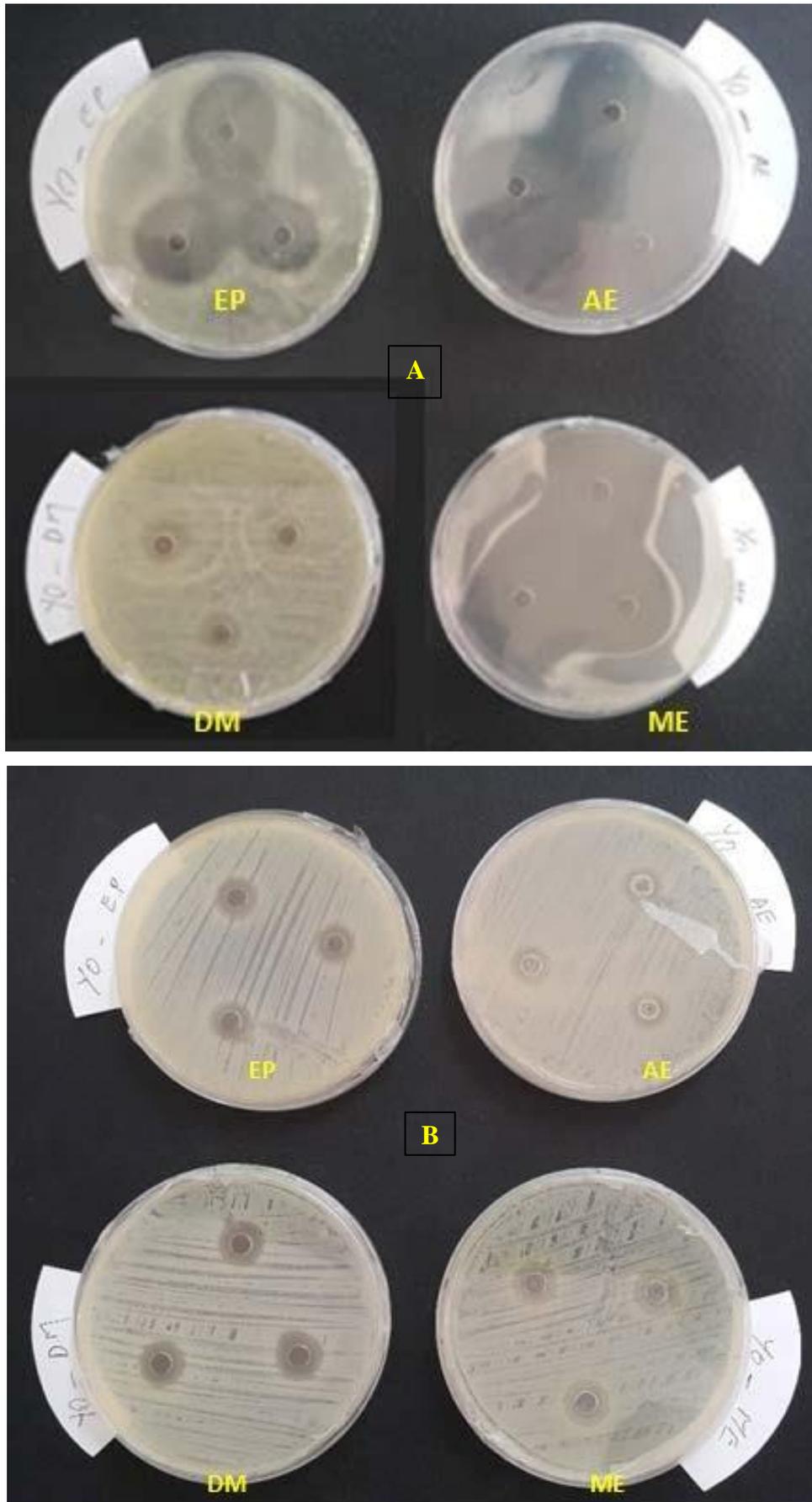


Figure 28: Effet inhibiteur des extraits de *R. officinalis* sur *P. aeruginosa* ATCC 27853 (A) et *S. aureus* ATCC 25923(B) par la méthode de diffusion sur milieu gélose.

Tableau 06 : Détermination de diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits de *R. officinalis*

	Essai	EP	DM	AE	ME
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Essai 01 (24 h)	10,7 ± 1 (+)	14,5 ± 5,7 (++)	13,0 ± 2 (+)	15,3 ± 2,2 (++)
	Essai 02 (48h)	24,1 ± 8,3 (+++)	25,5 ± 1,4 (+++)	47,5 ± 21,0 (+++)	32,3 ± 16,1 (+++)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Essai 01(24 h)	11,4 ± 0,5 (+)	13,5 ± 0,2 (+)	10,1 ± 0,6 (+)	12,8 ± 0,1 (+)

(+) : Sensible ; (++) : très sensible ;(+++) extrêmement sensible

Nous prenons en considération les résultats de lecture après 24h d'incubation pour les deux bactérie-test .Nos résultats montrent que les extraits DM et ME sont très actifs sur *P. aeruginosa* ATCC 27853 par rapport aux extraits EP et AE .Ces quatre types d'extraits de *R. officinalis* ont le même niveau d'activité sur *S. aureus* ATCC 25923

3. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques.

Les résultats de la sensibilité des souches testées aux antibiotiques sont résumés dans les Figures et le Tableau ci-dessous.



Figure 29:Effet inhibiteur des antibiotiques sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Abidat et Mebarki, 2015).

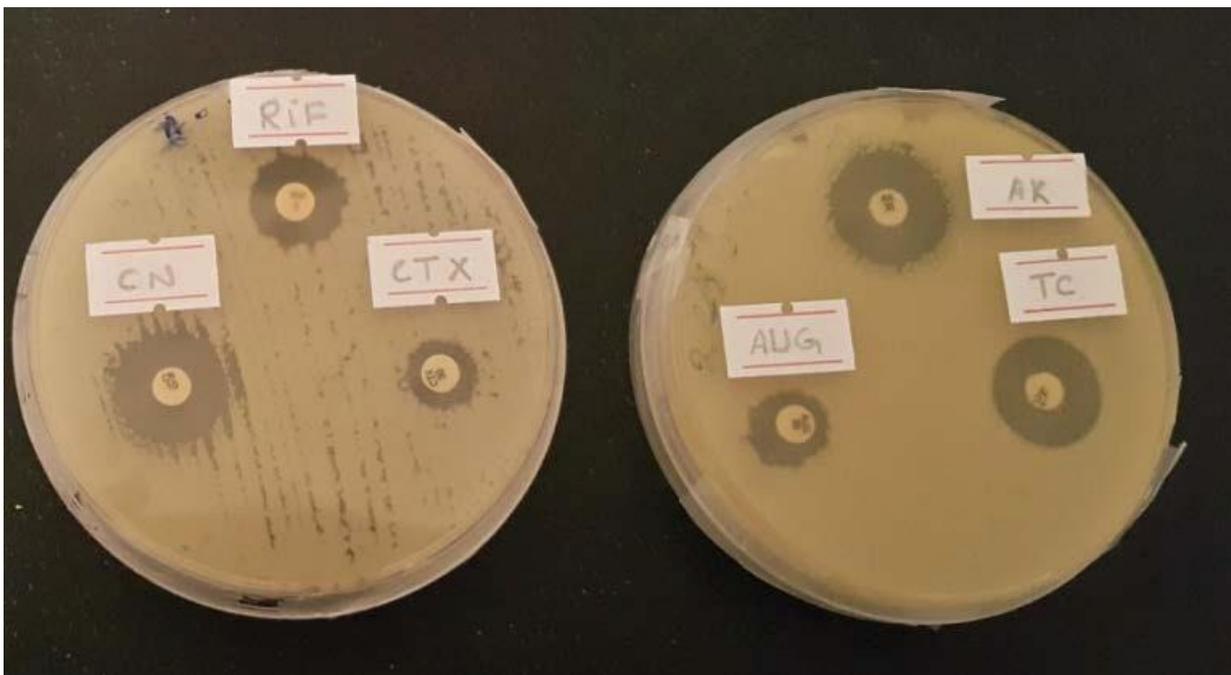


Figure 30:Effet inhibiteur des antibiotiques sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Abidat et Mebarki, 2015).

Tableau 07 : Résultats d'antibiogramme.

	Zones d'inhibition (mm)							
	GNT	AMI	TCC	CTX	ATM	AMP	CS	CAZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	15 ± 0.00 (++)	22.25± 0.35 (+++)	27.5±0.35 (+++)	30 ± 0.00 (+++)	30 ± 0.00 (+++)	15.13± 0.18 (++)	13 ± 0.00 (+)	24 ± 0.00 (++)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	20.75±1.06 +++	20.9± 0.14 +++	10.7±0.42 +	20.06± 1.5 +++	AUG 16.29± 0.77 ++		RIF 12.37 ± 0.05 +	

(+) : Sensibilité limitée ; (++) : Sensibilité moyenne ; (+++) : Très sensible.

GNT : Gentamycine ; **AMI** : Amikacine ; **TCC**: Ticaracilline + acide clavulanique ; **CS** : Colistine ; **ATM** : Aztreonam ; **AMP** :Ampicilline ; **CTX** : Ceftaxime ; **CAZ** :Ceftazidime;**AUG**:Amoxicilline; **RIF** :Rifampicine.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923ont montré des sensibilités différentes aux antibiotiques testés.

VIII.4.Discussion

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) (Koné *et al.*, 2004 ; Hayouni *et al.*, 2007 ; Shan *et al.*, 2007 ;Turkmen *et al.*, 2007 ; Falleh *et al.*,2008). Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle ,la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Néanmoins, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da(Georgantelis *et al.*, 2007). Donc, il est facile de prévenir que la souche "hypersensible" est celle de *Staphylococcus aureus* ATCC. Or, ce n'est pas le cas dans cette étude .C'est la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATTC qui s'est avérée "hypersensible" aux extraits de *R.officinalis*.

La sensibilité élevée de *P. aeruginosa* pour les extraits DM et ME est comparable à celle des antibiotiques GNT , AMP , CAZ , moindre que celle des AMI,TCC,CTX,ATM et plus élevée que CS. Les extraits EP et AE ont présenté une efficacité comparable à celle de CS mais plus faible qu'AMI, TCC, CTX, ATM,GNT, AMP et CAZ.

Pour la souche *S. aureus* nous avons noté une sensibilité similaire vis-à-vis de tous les extraits .Cette sensibilité est identique à celle de TCC et de RIF et plus faible que GNT, AMI, CTX,AUG .

L'activité antibactérienne des extraits de *R. officinalis* peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes qui se fait, soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes ,la chélation des ions métalliques, inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (**Karouet al., 2005**).

Généralement, toutes les plantes de la famille *Lamiaceae* connues pour ses composés phénoliques, ont été prouvé actifs contre une variété de micro-organismes (**Gortziet al., 2007**).

Nos résultats justifient l'utilisation de *R. officinalis* dans les traitements traditionnels comme un remède antibactérien (**Makhloufi, 2013**).

On conclure que l'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , par la méthode de diffusion dans un milieu solide, a montré que ces deux souches sont "sensibles" à tous les extraits de *R.officinalis*.

Discussion générale

I. La teneur en eau

La teneur en eau est très élevée chez la plante (76, 20 %) d'où sa composition non fibreuse

Nos résultats diffèrent de ceux trouvés par **Rahmoun et Messai (2011)**, qui avancent un taux de 51,7% malgré que la plante a été récoltée de la même région de notre étude (EL Hammamet à 15 km). La teneur en eau de *R.officinalis* de la présente étude, laisse apparaître qu'il est très humide par rapport à celui étudié par **Rahmoun et Messai(2011)**.

Le taux d'humidité de *R.officinalis* de la présente étude s'approche de celui de *R.officinalis* du Sud Algérien (**Athamena,2009**), d'une part, et, d'autre part, il est très supérieur de celui (28,17%) de *R.officinalis* de Béchar (**Makhloufi, 2013**).

II. Screening phytochimique

Nos résultats des tests de caractérisation phytochimique pour *Rosmarinus Officinalis* contient abondamment de Saponines, Flavonoïdes, Tannins galliques, Tannins catechiques mais il a été observé l'absence des alcaloïdes, ces résultats sont comparable a celles de **Fadili et al.(2015) ; Makhloufi (2013)**

III. Extraction des polyphénols totaux

Le rendement de l'extrait ME (6,68%) domine les autres extraits mais il est plus faible que celui (13,06%) révélé par **Fadili et al (2015)** pour *R.officinalis* des Hauts Atlas Oriental du Maroc. Les rendements des extraits EP et DM sont identiques avec des valeurs moyennement importantes (4,74%), alors que celui d'AE s'est avéré le plus faible, soit de 2,55 %.

IV. Dosage des composés phénoliques

Nos résultats concordent avec ceux de **Fadili et al. (2015)** qui confirment la richesse de *R.Officinalis* en polyphénols totaux, mais avec une teneur variant entre 33 mg et 185,71±4mg. Leur étude a défini l'extrait AE comme l'extrait majoritaire en polyphénols.

Les valeurs de **Celiktaset *al.*, (2007 (a))** s'étendent de 34,1 à 119 mg GAE/g , résultats clairement lointains des nôtres.

V. l'activité antiradicalaire des extraits

Dans Le test CCM-DPPH, les antioxydants réduisent et décolorent le radical DPPH, à un composé jaune le diphényl picryl hydrazine. L'ampleur de la réaction dépendra de la capacité des antioxydants de donner l'hydrogène (**Ardestani et Yazdanparast, 2007**).

Nos résultats, exprimés en pourcentage de l'activité anti-radicalaire (%) , ont révélé que tous les extraits testés sont des anti-radicalaires dont le plus oxydant est AE traduit par un pourcentage d'inhibition de 94,8 %.Les extraits EP et DM ont marqué un pouvoir antioxydant important avec une valeur au voisinage de 94,0%. Le ME a donné un résultat de l'ordre de 92,8%, ce qui lui a permis d'être "antioxydant". D'après ces résultats, nous pouvons constater que tous les extrais de *R.officinalis* sont de puissants antioxydants.

Le résultat de l'activité anti-radicalaire de l'extrait AE est très proche de celui(95,81%). obtenu par **Athamena (2009)**.Néanmoins, il est très loin de celui trouvé par **Akroum (2006)** dont le pourcentage est très faible (47,65 %).**Almela *et al.*,(2006)** ont confirmé notre résultat pour le ME. Selon leur étude, le ME s'est avéré un antioxydant très puissant (96,18%). Selon **Turkmen *et al.*, (2007)**, les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale.

VI. Activité antibactérienne

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) (**Koné *et al.*, 2004 ; Hayouni *et al.*, 2007 ; Shan *et al.*, 2007 ;Turkmen *et al.*, 2007 ; Falleh *et al.*,2008**). Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+). Les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle ,la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Néanmoins, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da(**Georgantelis *et al.*, 2007**).

Donc, il est facile de prévenir que la souche "hypersensible" est celle de *Staphylococcus aureus* ATCC. Or, ce n'est pas le cas dans cette étude .C'est la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATTC qui s'est avérée "hypersensible" aux extraits de *R.officinalis*.

La sensibilité élevée de *P. aeruginosa* pour les extraits DM et ME est comparable à celle des antibiotiques GNT , AMP , CAZ , moindre que celle des AMI,TCC,CTX,ATM et plus élevée que CS. Les extraits EP et AE ont présenté une efficacité comparable à celle de CS mais plus faible qu'AMI, TCC, CTX, ATM,GNT, AMP et CAZ.

Pour la souche *S. aureus* nous avons noté une sensibilité similaire vis-à-vis de tous les extraits .Cette sensibilité est identique à celle de TCC et de RIF et plus faible que GNT, AMI, CTX,AUG .

L'activité antibactérienne des extraits de *R. officinalis* peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes qui se fait, soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes ,la chélation des ions métalliques, inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (**Karouet al., 2005**).

Généralement, toutes les plantes de la famille *Lamiaceae* connues pour ses composés phénoliques, ont été prouvé actifs contre une variété de micro-organismes (**Gortziet al., 2007**).

Nos résultats justifient l'utilisation de *R. officinalis* dans les traitements traditionnels comme un remède antibactérien (**Makhloufi, 2013**).

CONCLUSION



Conclusion

Dans la présente étude nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits préparés à partir de la partie aérienne de *Rosmarinus Officinalis* récoltée de "djebel Belkif", situé à 21km d'El Hammamet, Tébessa, Algérie.

Le criblage phytochimique de la plante a montré une composition chimique dominée par les polyphénols "molécules d'or".

L'extraction de ces principes actifs par des solvants organiques de polarité croissante (EP, DM, AE, ME) , a révélé que l'extrait le plus rendable était le ME avec une valeur de d'ordre de 6,68%.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux pour chaque extrait (par la méthode de Folin-Ciocalteu) a montré que l'extrait EP est le plus riche en ces composés (351µg EAG/mg d'extrait) malgré son rendement modéré (4,74 g).

L'évaluation de l'activité antioxydante par le radical libre DPPH montre que les pourcentages d'inhibition varient entre 92,8% et 94,8% .Ces résultats ont prouvé que nos extraits sont "antioxydants naturels réputés"

L'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , par la méthode de diffusion dans un milieu solide, a montré que ces deux souches sont "sensibles" à tous les extraits de *R.officinalis*.

Cette étude montre que la plante *Rosmarinus officinalis* est un "antioxydant" et un "antibiotique naturel", renfermant une teneur prononcée de polyphénols. Les polyphénols, groupes de molécules de structures variées, trouvent d'or et déjà une large utilisation en phytothérapie. Pour autant, leur connaissance est encore imparfaite. Ils suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison des bienfait qu'ils pourraient apporter en terme de prévention des maladies.

GLOSSAIRE

Acétate d'éthyle

L'acétate d'éthyle est un liquide, à l'odeur caractéristique fruitée. C'est un ester résultant de l'éthanol et de l'acide acétique utilisé principalement comme solvant dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant.

Activité antibactérienne

correspond à l'activité d'une molécule ou d'un composé présent au sein d'un végétal qui, à très faible concentration, inhibe le développement d'une bactérie ou la tue.

Antioxydant

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

Dichlorométhane ou **chlorure de méthylène** (dénommé R30 dans la liste des gaz fluorés et frigorigènes), est un composé chimique se présentant à température ambiante comme un liquide incolore et volatil émettant une odeur douceâtre relativement forte pouvant mettre certaines personnes mal à l'aise.

Ether de pétrole

est un mélange d'alcane plus ou moins complexe. L'appellation vient du fait qu'il s'agit de la fraction de distillation du pétrole ayant le même point d'ébullition (35°C) que l'éthylique. Elles sont encore appelées « essences ». L'éther de pétrole est un produit dangereux. Il possède trois pictogrammes de danger. Il est nocif, dangereux pour l'environnement et inflammable.

Extraction

consiste à retirer (extraire) une ou des espèces chimiques d'un milieu solide ou liquide.

Extraction solide –liquide

consiste à laisser un végétal au contact du solvant froid ou chaud afin que certains de ses constituants s'y dissolvent.

Gemmothérapie

Le mot gemmothérapie provient du latin « gemmae », qui signifie à la fois bourgeon et pierre précieuse, se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux .

Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydro distillation par pressage ou incision des végétaux qui les contiennent des bourgeons et les radicules.

Macération

action de laisser séjourner, à froid, dans un solvant organique une substance pendant quelques heures à quelques semaines pour en extraire les constituants solubles.

Méthanol

Le méthanol (CH_3OH , CAS [67-56-1]) est un alcool servant de solvant ou de matière première dans la synthèse de nombreux composés organiques. C'est un liquide clair volatil, toxique, incolore et inflammable.. Le méthanol est utilisé comme antigel, solvant et carburant.

Métabolite secondaire

Le terme «métabolite secondaire», qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891, est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphériques indirectement essentielles à la vie des plantes. Telles que la communication intercellulaire, la défense, la régulation des cycles catalytiques.

Phytothérapie

Traitement ou prévention des maladies par l'usage des plantes, la phytothérapie fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces.

Solvant

est une substance, liquide à sa température d'utilisation, qui a la propriété de dissoudre, de diluer ou d'extraire d'autres substances sans les modifier chimiquement et sans lui-même se modifier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Abdel-Hameed E.S. (2009) .Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem.* **114**:1271-1277 .

Abdoun F., Beddiaf M. (2002) . *Cupressus dupreziana* A. Camus : répartition, dépérissement et régénération au Tassili n° Ajjer, Sahara central . doi:10.1016/S1631-0691(02)01433-6. V 325, Issue 5, May 2002, Pages 617–627 .

Abidat K., Mebarki K., (2015) . Etude des activités antioxydante et antibactérienne d'extraits polaires méthanoliques d'espèces endémiques du genre *Thymus*. Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de MASTER en Sciences Biologiques. Université Larbi Tébessi – Tébessa.

Akroum S. (2006) . Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba L.* Magister. Université Mentouri Constantine

AL Namer Rashad Mohammed Musleh.(2014).Valorisation Pharmacologique de *Rosmarinus Officinalis* et de *Lavandula Officinalis*: Toxicité aigue ,Potentiel Psychotrope et Antibactéries. Thèse de doctorat, Pharmacologie et Toxicologie. Univrsité Mohammed V – AGDAL.

Albu et ses collaborateurs. (2004) . In Makhloufi A .(2013).Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis L*) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Doctorat en biologie .Université Abou Baker Belkadir.

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

Angenot M., Caprasse M., Coune C., Tits M. (1981). Se soigner par les plantes .Ed. De l'association des consommateurs. Bruxelles . In Mostefai A .(2012). Contribution à une étude

Références bibliographique

morphométrique de *Rosmarinus officinalis* L (Lamiacées) dans la région de Tlemcen . Master .Université Abou Beker Belkaid – Tlemcen.

Anonyme . Herbes. 96 p.

Ardestani A., Yazdanparast R. (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem*

Arnold N., Valentini G., Bellomaria B., Laouer H . (1997). Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. from Algeria and *R. officinallis* L. from other countries. *Journal.essent.Oil Res.* **9**: 167-175.

Aruoma O. I., Spencer J. P., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A.,Butler J. et Halliwell B. (1996). An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provençal herb. *Food and Chemical Toxicolog* **34** (5):456.

Askun T., Tumen G., Satil F., Ates M. (2009). *In vitro* activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *Food Chem.* **116**: 289-294.

Athamena S. (2009). Etude Quantitative Des Flavonoïdes Des Graines De *Cuminum cyminum* et Les Feuilles De *Rosmarinus officinalis* Et L'évaluation De L'activité Biologique. Magister en biologie . Université El-Hadj Lakhder-Batna.

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

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

, Pellerin P., Cemli R. (2003). Activité antioxydante du romarin et perspectives **Bannour F.** d'utilisation = The antioxidative activity of rosemary and it's utilisation perspective. Magister. Tunisie.

Références bibliographique

- Bataille.x .(2000)** . L'usine chimique. 9^{ème}conférence de l'université de tous les savoirs. France. p1-16. *In* Zeghad Nadia.(2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Magister (Ecole doctorale), Biotechnologie végétale . Université Mentouri Constantine.
- Bellakhdar J. (1997)**. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis Press (Ed). Paris,764 p.
- Bernardi A. P. M., López–Alarçon C., Aspee A., Rech S., Von Poser G. L., Bride R. et Lissp E. (2007)**. Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Hypericum ternum*. *Journal of the chilean chemical Society*.
- Bouquet A. (1972)**. Plantes Médicinales du Congo Brazzaville. Ed: O.R.S.T.O.M.
- Bourgou S., Ksouri R., Bellila A ., Skandrani I ., Falleh H., Marzouk B. (2008)** . Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. Elsevier. V 331, Issue 1, P48-55.
- Cavin L. , Didier B Duthei . (1999)**. A new Cenomanian ichthyofauna from southeastern Morocco and its relationships with other early Late Cretaceous Moroccan faunas. *Geologie en Mijnbouw*. 78. 3-4. 261-266 .
- Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., Baser K.H.C. (2007a)** . Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* **100**: 553-559.
- Cheung S. et Tai J. (2007)**. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosmarin *Rosmarinus officinalis*. *Oncology reports.* **17** (6): 1525-1531.
- Cosio M. S., Buratti S., Mannino S. et Benedetti S. (2006)**. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. *Food chemistry.*, **97** (4) : 725-731.

Références bibliographique

Delille L .(2007). Les plantes médicinales d'Algérie. Édition BERTI. Alger,122.

Djeridane A., Yous M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006).

Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic Compounds . *Food Chem* .

Dohou et al.. (2003). *Screening phytochimique d'une endémique ibéro marocaine*

Thymelaealythroïdes. Bull. Soc Pharm. Bordeaux. 142.Pp : 61-78. In Berrah Ramzi ,Gattal Brahim. (2015). Etude de quelques composés phénoliques de *Thymelaeahirsuta* et leur activité antioxydante : Mémoire de Master. Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie. Université Larbi Tebessi- Tébéssa .

Drissa Diallo, Rokia Sanogo, Hamsétou Yasambou, Aminata Traoré, Kassoum

Coulibaly, Ababacar Maïga. (2004). Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali . Elsevier Science.DOI 10.1016/j.crci.2003.12.035.

Dulger B. et Gonuz A. (2004). Antimicrobial activity of some turkish medicinal plants.

Pakistan journal of biological sciences., 7 (9) : 1559-1562 . In Zeghad Nadia. (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne . Magister (Ecole doctorale) en Biotechnologie Végétale . Université Mentouri Constantine.

Fadi Z . (2011). le romarin, *Rosmarinus Officinalis*, "le bon procédé d'extraction pour un effet thérapeutique optimal". Doctorat en pharmacie. Université Mohamed V.

Fadili K. , Amalich F., Soro K. N'DEDIANHOUA. , Bouachrine M , Mahjoub M. , El

Hilali F. , and Zair H. (2015). Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc: *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides*

[Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: *Rosmarinus officinalis* and *Thymus satureioides*, International Journal of Innovation and Scientific Research .

Références bibliographique

- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies.* **331**: 372-379.
- Fechtal M. ,Zine el Abidine A. ,Hachmi M. ,Sesbou A. ,Karkouzi R. (2005).** Variabilité infra spécifique du rendement et de la composition chimique des huiles essentielles du Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.). vol. 36, pp. 98-106.
- Fosting Matene S. (2005).** Etude phytochimique et activités biologiques de *Maerua angolensis* DC (Capparidaceae). Thèse de docteur en pharmacie de l'université de Bamako. p77-79.
- Garnier G., Bezanger Beauquesne L., Debraux G. (1961).** Ressources médicinales de la flore française. Ed. Vigot Frères .Tome II. Paris *In* Mostefai A .(2012). Contribution à une étude morphométrique de *Rosmarinus officinalis* L (*Lamiacées*) dans la région de Tlemcen . Master .Université Abou Beker Belkaid – Tlemcen.
- Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G., Georgakis S. A. (2007).** Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science.* **76**: 172-181.
- Gonzalez-Trujano M.E., Pena E.I., Martinez A.L., Moreno J., Guevara-Fefer P., Deciga-Campos M., Lopez-Munoz F.J. (2007) .** Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacol.* **111**: 476-482 .
- Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., Tsaknis, J. (2007).** Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Origanum dictamnus* Extracts before and after Encapsulation in Liposomes. *Molecules.* **12**: 932-945.
- Guinochet M. (1973) .** Phytosociologie. Paris. Masson éd. p227. *In* Mostefai A . (2012). Contribution à une étude morphométrique de *Rosmarinus officinalis* L (*Lamiacées*) dans la région de Tlemcen . Master .Université Abou Beker Belkaid – Tlemcen.

Hans W. K. (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. p6-7.

Hayouni E.A , Abedrabba M ., Bouix M., Hamdi M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.* (in press).

Heinrich M., Kufer J., Leonti M., Pardo-de-Santayana M . (2006). Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. *Journal of Ethnopharmacol.*

107: 157-160. In Athamena S.(2009). Etude Quantitative Des Flavonoïdes

Des Graines De *Cuminum cyminum* Et Les Feuilles De *Rosmarinus officinalis* Et L'évaluation De L'activité Biologique. Magister. Université El-Hadj Lakhder-Batna.

Huang M. T., Ho C. T., Wang Z. Y., Ferraro T., Lou Y. R., Stanber K., Ma W., Hoffman L., Besseau S., Geoffroy P., Rizenhaler C., Meyer D., Lepierre C., Pollet B. et Legrand M. (1994). Silencing of Hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell.* **16** (4): 1446-1465.

Ibañez E., Cifuentes A., Crego A. L., Señoráns F. J., Caveró S. et Reglero G. (2000). Combined use of supercritical fluid extraction, Micellar electrokinetic chromatography and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, **48** (9): 4060-4065.

Imen K . (2010) . Effet Antioxydant D'extraits De Plantes (*Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Oléa Europea* L.) Dans L'huile De Canola. Des études supérieures de l'Université Laval. Université Laval.

Kaloustian J et al. (2008). étude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. Springer. DOI 10.1007/s10298 -008-0307-1.

Références bibliographique

Karou D., Dicko M. H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. et Traoré A. S. (2005).

Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Maîtrise des procédés en vue d'améliorer la qualité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire. 8-11 novembre. Ouagadougou .

Kivilompolo M., Hyotylainen T. (2007). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *Journal of Chromatography A*. **1145**: 155-164.

Kuete V., Penlap Beng V., Etoa F-X., Modjo S.L., Bogne P., Assob J. C., Lontsi D. (2004). Activités antimicrobiennes de l'extrait total et Des fractions de jus de fruit de citrus medica lin. (Rutaceae) Pharm. Méd. Trad. Afr. Vol.13.

Lemonica I. P., Damasceno D. C. et Di-Stasi L. C. (1996). Study of the embryo toxic effects of an extract of Rosmary (*Rosmarinus officinalis*). Brazilian journal of medical and biological research. **29** (2): 223-227.

Li J., Jiang Y. (2007) . Litchi Flavonoids: Isolation, Identification and Biological Activity. *Molecules*. **12**: 745-758.

Loo AJain y K. I. Darah.(2008). Antioxydant activity of compound isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. Food chemistry.

Maataoui B. S., Hmyene A. Hilali S. (2006). Activites anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*.

Madjour S . (2014) .Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée *rosmarinus officinalis*. Master. Université Med Khider Biskra.

Maiza K., Brac de La Perriere R.A., Hammiche V .(1993). Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. Médicaments et aliments : l'approche

Références bibliographique

ethnopharmacologique. Actes du 2ème Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11ème Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg, 24-27 mars 1993, 169-171.

Makhloufi A. (2013) . Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Doctorat D'Etat en Biologie. Université Aboubaker Belkaid.

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

Offord E. A., Macé K., Ruffieux C., Malnoë A. ET Pfeifer A. M. (1995). Rosmary components inhibit benzo [a] pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis*. **16** (9): 2057-2062.

Parekh J. et Chanda S. V. (2007) . *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. *Turkish journal of biology.*, **31** : 53-58 .

Paris A., Strukelj B., Renko M., Turk V., Pukl M., Umek A. et Korant B. D. (1993). Inhibition effects of carnolic acid on HIV-I protease in cell free assays. *Journal of natural products*. **56** (8): 1426-1430.

Peng Y., Yuan J., Liu F., Ye J. (2005) . Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

Perez M.B., Calderon N.L., Croci C.A. (2007) . Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chem.* **104**: 585-592.

Références bibliographique

Perrot E. et Paris P. (1971) . Les plantes médicinales. Presses universitaires de France

Poletti A. (1988). Fleurs et plantes médicinales. 2ème Edition. Delachaux & Niestlé (Ed).

Paris, 222p. *In* Athamena S.(2009). Etude Quantitative Des Flavonoïdes Des Graines De *Cuminum cyminum* Et Les Feuilles De *Rosmarinus officinalis* Et L'évaluation De L'activité Biologique. Magister. Université El-Hadj Lakhder-Batna .

Quezel P. et Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Tome I*, C.N.R.S. Paris .

Rahmoun G. et Messai W. (2011) .Normes ,structure et activités biologiques de l'huile essentielle d'une plante :Romarin .Master en biologie. Université Cheikh larbi Tebessi-Tébessa.

Ramirez P., Santoyo S., Garcia-Risco M.R., Senorans F.J., IbanezE., Reglero. (2007) .

Use of specially designed columns for antioxidants and antimicrobials enrichment by preparative supercritical fluid chromatography (Prep-SFC). *Journal of Chromatography A*.1143: 234-242 .

Roux D., Catier O.(2007). Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3ème édition, Wolters Kluwer .(2007) : pp 141.

Rota M. C., Herrera A., Martinez R. M., Sotomayor J. A. et Jordán M. J. (2008).

Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food control.*, **19** : 681-687. *In* Zeghad Nadia.(2009).Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Magister (Ecole doctorale) en Biotechnologie Végétale . Université Mentouri Constantine .

Riyaha H. (2013).Valorisation des plantes aromatiques et médicinales: étude du potentiel chimique et antibactérien des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* (sauvage et domestiqué). Master Sciences et Techniques .Université Sidi Mohamed Ben Abdellah .

Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D., Corke H. (2007). The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*. **117**: 112-119 .

Sine J. P. (2003). Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques cours et exercices. Ellipses editions marketing S A. p 99-101. In Zeghad N. (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Magister (Ecole doctorale), Biotechnologie végétale Université Mentouri Constantine.

Singleton V.L.et Rossi J.A. (1991). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technology and Viticulture*.16, 144-153.
1965. In Fadili K . , Amalich F., Soro K., N'dedianhoua , Bouachrine M . , Mahjoub M . , El hilalli F . , and Zair H . (1 Aug 2015). Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc: *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides* [Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: *Rosmarinus officinalis* and *Thymus satureioides*, *International Journal of Innovation and Scientific Research* .

Solfo R.R.(1973). Etude d'une Plante Médicinale Malgache *Buxusmadagascariensis* Bail et ses variétés. Ed : O.R.S.T.O.M .

Soyal D., Jindal A., Singh I., Goyal P.K. (2007). Modulation of radiation-induced biochemical alterations in mice by rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract. *Phytomedicine*.**14**: 701-705.

Souad A. (2006) . Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba L.* Magister Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri de Constantine.

Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El-Elimat T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* (in press).

Références bibliographique

Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Sokmen A. (2006). Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.* **95**: 200-204.

Turkmen N., Velioglu Y., S Sari F., Polat G. (2007). Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules.* **12**:484-496.

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

Vagi Rapavi M., Hadolin K., Vâsârhelyiné Perédi A. , Balâzs A., Blâzovics ET B. Simândi. Phenolic and Triterpenoid Antioxidants from *Origanum majorana* L. Herb and Extracts Obtained with Different Solvents. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53 (1), pp 17-21 103 . *In* Imen Kahouli . (2010) . Effet Antioxydant D'extraits De Plantrs (*Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Oléa Europea* L.) Dans L'huile De Canola. Des études supérieures de l'Université Laval. Université Laval.

Vierling, E. (2008) .2è édition. Chapitre VII: la conservation des aliments. In: Aliments et boissons: Technologies et aspects réglementaires. Éd. Doin, p.95, 98.

Vuorela S. (2005) . Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki.

Wang W., Wu N., Zu Y. G. et Fu Y. J. (2008). Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L oil compared to its main compounds. *Food chemistry.*, **108** (3) : 1019-1022. *In* Zeghad Nadia.(2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne.

Magister (Ecole doctorale), Biotechnologie végétale Université Mentouri Constantine.

Zeghad N. (2009). Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne.

Magister (Ecole doctorale), Biotechnologie végétale . Université Mentouri Constantine .

WEBOGRAPHIE

- www.Wikipedia
- 2.trwww.cndp.fr/crdp-dijon/IMG/pdf/Fiches-3.descriptives_plantes_1.pdf
- ade.com/ressources/pdf/MBPC_Romarin_Francais.pdf
- <http://www.reconstitution-romaine.com/romarin%20herboristerie%20romaine%20antique.html>
- <http://flore.lecolebuissonniere.eu/page102.html>
- <http://www.pharmaciedelepouille.com/romarin.htm> <http://www.elixanatur.com/fr/846-romarin>

Staphylococcus aureus https://www.santelog.com/news/infection-plaies-cicatrisation-un-staphylocoque-dore-d-origine-communautaire-hautement-pathogene_7510_lirelasuite.htm

Pseudomonas aeruginosa www.Microbiologyinpictures.com

Dr. Halimi ,

اتابنت الطبية

احتلالا دظفحذ وملاعد الطيبة