

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ LARBI TEBESSI -TEBASSA-
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES ET DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE APPLIQUÉE



Mémoire en vue de l'obtention d'un Diplôme de Mater L.M.D.

Domaine : Science de la nature et de la vie
Filière : Biologie appliquée
Option : Biochimie appliquée

Thème

Évaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle extraite à partir du Romarin

Présenté par

Mohammed Tahar Haouam

Devant le jury

Dr. Guedri Kamelia	MCA	Université Larbi Tebesi -Tebessa-	Présidente
Dr. Bouzeraa Hayette	MCB	Université Larbi Tebesi -Tebessa-	Examinatrice
Dr. Messaadia Amira	MCB	Université Larbi Tebesi -Tebessa-	Promotrice

Date de soutenance : 16.06.2019

Note /20

Remerciement

Je remercie Allah le tous puissant pour m'avoir donné la force et le courage pour réaliser ce travail.

Un travail n'est jamais l'œuvre de son ou de ses auteurs.....je remercie tous ceux qui par leur aide, par leurs conseils, leurs discussions ou leurs encouragements j'ai réalisé ce travail,

Ma première pensée va tout naturellement à mon encadreur Dr. Messaadia Amira qui m'a fait l'honneur de veiller et diriger ce travail. J'ai beaucoup apprécié sa confiance et sa grande disponibilité.

Mes sincères remerciements vont également aux membres du jury de thèse pour avoir bien accepté de juger ce travail.

J'exprime mes plus vifs remerciements à l'égard de Mme Bougeraa Professeur en botanique à l'université Badji mokhtar Annaba, de m'avoir aidé dans l'identification de la plante.

Je tien à remercier Pr. Mechai, Dr. Azzizi et Dr. Belhadj Enseignants chercheurs à l'université Larbi Tebessi -Tebessa- de m'avoir fourni aimablement les souches microbiennes, sans eux une grande partie du travail n'aurait pas été accomplie.

Je ne remercierais jamais assez « M^{me} Souad » Ingénieur du laboratoire de Biochimie pour les nombreux services qu'elle ma rendus durant la réalisation de ce travail. Ainsi « Mr. Hassen » Ingénieur du laboratoire de géologie pour l'aide précieuse et l'accueil chaleureux.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à

Ma mère et mon défunt père, qui m'ont offert leur amour et leur soutien et qui n'ont cessé de m'encourager et m'enseigner persévérance durant toute les années d'études.

Mes frères, sœurs, cousins et amis

Tous mes camarades de la promotion 2019 Biochimie Appliquée, Et à tous les enseignants qui m'ont accompagné durant les années d'études.

الملخص

إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) من عائلة الشفويات *Lamiaceae* ، نبات طبي جد منتشر ، وينمو تلقائيا في منطقة سيرايا بولاية عنابة في شرق الجزائر. يستخدم في الطب الشعبي باعتباره مدر الصفراء ومضاد للتشنج ومطعم.

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة والقدرة المضادة للميكروبات للزيوت الأساسية المستخرجة من الإكليل عن طريق التقطير المائي.

كشفت تحليل التركيب الكيميائي الذي تم إجراؤه بطريقة FID/CPG عن ثراء الزيت الأساسي بمركب 1.8 سينول.

أظهرت النتائج أن الزيت الأساسي ذو نشاط مضاد للتأكسد معتبر ولكن يبقى أدنى من القدرة المضادة للـ BHT

يُظهر نشاط الزيوت العطرية على سبع سلالات جرثومية مُمرضة ، بما في ذلك ستة من البكتيريا وعفن فطري ، أن القدرة المضادة للميكروبات مهمة للغاية

؛ التقطير المائي؛ زيت أساسي؛ نشاط مضاد للأكسدة؛ نشاط مضاد للميكروبات *Rosmarinus officinalis* الكلمات المفتاحية:

Résumé

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) de la famille des *Lamiaceae*, est une plante médicinale très abondante, poussant à l'état spontané dans la région de Seraïdi de la wilaya d'Annaba à l'Est algérien. Utilisé en médecine populaire comme cholagogue, antispasmodique et emménagogue.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle extraite par hydro-distillation.

L'analyse de la composition chimique effectuée par CPG/FID a révélé la richesse de l'huile essentielle en 1,8 cinéole.

L'étude du pouvoir antioxydant par le test DPPH a démontré que notre huile essentielle possède une activité antioxydant modérée, est reste inférieur que celle de BHT.

L'activité de l'huile essentielle sur sept souches microbiennes pathogènes dont 06 bactéries et 01 champignon montre que le pouvoir antimicrobien est très important et se caractérise par une action bactéricide et antifongique considérable contre les germes testés.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis* ; Huile essentielle ; Activité antioxydante ; Activité antimicrobienne ; Hydro distillation.

Abstract

Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) belongs to family of *Lamiaceae*, is a medicinal plant very abundant, growing spontaneously in the area of Seraidi at wilaya of Annaba in eastern Algeria. Used in folk medicine as a cholagogue, antispasmodic and emmenagogue.

The objective of this study is to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil extracted by hydro-distillation.

The analysis of the chemical composition carried out by CPG / FID revealed the richness of the essential oil in 1,8 cineole.

The study of antioxidant power by the DPPH test has shown that our essential oil has a moderate antioxidant activity, is lower than that of BHT.

The activity of the essential oil on seven pathogenic microbial strains including 06 bacteria and 01 fungus shows that the antimicrobial power is very important and is characterized by a considerable bactericidal and antifungal action against the tested germs.

Key words: *Rosmarinus officinalis*, essential oil, antioxidant activity, antimicrobial activity, hydro distillation.

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Taxonomie botanique de romarin.	03
02	Les différents groupements chimiques présents dans les mono-terpènes.	07
03	Variations de la composition chimique (composé majoritaire) de l'huile essentielle de Romarin.	10
04	Conditions opératoires de la chromatographie en phase gazeuse.	27
05	Les souches bactériennes utilisées dans l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle.	32
06	Caractéristiques physico-chimique de l'huile essentielle extraite à partir de <i>Rosmarinus officinalis</i>	40
07	Composition de l'huile essentielle de Romain obtenue par hydro-distillation	41
08	Résultats IC ₅₀ de l'huile essentielle « <i>Rosmarinus officinalis</i> » et le BHT	44
09	Pourcentage d'inhibition mycélienne	46
10	Diamètre d'inhibition (mm) des différentes souches testées dans l'aromatogramme en milieu solide	47
11	Détermination de la CMI et la CMB de l'huile essentielle de <i>R. officinalis L.</i> sur les souches testées	48

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Optimum écologique : les caractéristiques du sol (A) et du climat (B).	04
02	Structure chimique de certains composés d'huiles essentielles	09
03	Montage d'hydrodistillation	11
04	Montage de distillation à la vapeur d'eau	11
05	Expression à froid des huiles essentielles	12
06	Extraction de l'HE par enfleurage	12
07	Principe d'extraction par CO ₂ supercritique	13
08	Schéma d'un appareillage pour CPG	16
09	Arbrisseau de Romarin	18
10	Région de Seraidi vue par Google earth	19
11	Diagramme climatique de la région de Seraidi	19
12	Préparation du matériel végétal	21
13	Synoptique de l'obtention et de l'analyse de l'huile essentielle extraite à partir de <i>Rosmarinus officinalis</i>	22
14	Galerie de photos résumant les étapes de l'hydro-distillation	24
15	Méthode de conservation de l'huile essentielle	25
16	Réfractomètre	26
17	Galerie de photos résumant les étapes de chromatographie en phase gazeuse	28
18	Réduction du radical DPPH• par un antioxydant	29
19	Galerie de photos résumant le test de piégeage du radical libre DPPH	31
20	Galerie de photos résumant les étapes de l'aromatogramme	34
21	Galerie de photos résumant les étapes de la dilution par gélose	36
22	Galerie de photos résumant l'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle	39
23	Rendement en huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> obtenue par hydro-distillation	40

24	Pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle et l'hydroxytoluène butylé	43
25	Effet de l'huile essentielle sur la croissance de <i>l'Aspergillus niger</i>	45
26	Galerie de photos présentant les résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> L.	46
27	Galerie de photos présentant les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> L.	48
28	Test de détermination de CMI et CMB de l'huile essentielle sur les souches bactériennes testées	49

Liste des abréviations

AAI	:	Indice de l'activité antioxydante
AFNOR	:	Association française de normalisation
ATCC	:	American Type Culture Collection
BHT	:	Hydroxytoluène butylé
CMB	:	Concentration minimale bactéricide
CMI	:	Concentration minimale inhibitrice
CPG	:	Chromatographie en phase gazeuse
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
DPPH	:	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
FID	:	Détecteur d'ionisation de flamme
GN	:	Gélose nutritive
HE	:	Huile essentielle
IC₅₀	:	Concentration d'inhibition à 50%
Ir p	:	Indice de rétention polaire
Ir a	:	Indice de rétention apolaire
IPP	:	Isopentylpyrophosphate
MH	:	Milieu Muller Hinton
MS	:	Spectrométrie de masse
PDA	:	Potato-dextrose-agar
PEP	:	Phosphoénolpyruvate

Table des matières

Remerciement et dédicace	
Résumé (arabe-français-anglais)	
Liste des Tableaux	
Liste des Figures	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Rappels bibliographiques	
Chapitre I : Matériel végétal	
1.1. Quelques mots de l'histoire	03
1.2. Position systématique	03
1.3. Habitat et aires de répartition	04
1.4. Utilisations	04
1.4.1. En phytothérapie	04
1.4.2. Dans l'industrie	05
Chapitre II : Huile essentielle	
2.1. Définition	06
2.2. Répartition dans la plante	06
2.3. Les caractéristiques physicochimiques des HE	06
2.4. Composition chimique de l'huile essentielle	07
2.4.1. Les composés terpéniques	07
2.4.1.1. Les monoterpènes	07
2.4.1.2. Les sesquiterpènes	08
2.4.2. Les phénylpropanoïdes	08
2.4.3. Composés d'origine divers	08
2.5. Notion de chémotype	10
2.6. Techniques d'extraction des huiles essentielles	10
2.6.1. Hydrodistillation simple	11
2.6.2. Entraînement à la vapeur d'eau	11
2.6.3. Extraction par expression à froid	12
2.6.4. Extraction par enfleurage	12
2.6.5. Extraction par les solvants volatils	13
2.6.6. Extraction au fluide supercritique	13
2.6.7. Extraction par micro-onde	13
2.7. Activités biologiques de l'huile essentielle	14
2.7.1. Activités antibactérienne, antifongique et antivirale	14
2.7.2. Activité antioxydante	14
2.7.3. Activité anti-inflammatoire	14
2.7.4. Activité anti-cancérogènes	15
2.8. Toxicité des huiles essentielles	15
2.9. Analyse de la composition chimique de l'HE par (CPG)	15

Partie expérimental

Chapitre III : Matériels et Méthodes

3.1.	Matériel végétal	18
3.1.1.	Critères de choix de la plante	18
3.1.2.	Récolte	18
3.1.3.	Situation géographique du site de récolte	19
3.1.4.	Identification	20
3.1.5.	Description botanique	20
3.1.5.1.	Appareil végétatif	20
3.1.5.2.	Appareil reproducteur	20
3.1.6.	Conservation	21
3.2.	Méthodes	23
3.2.1.	Extraction de l'huile essentielle	23
3.2.1.1.	Principe	23
3.2.1.2.	Mode opératoire	23
3.2.1.3.	Calcul du rendement	23
3.2.2.	Conservation des HE	25
3.2.3.	Détermination des propriétés physicochimique	25
3.2.3.1.	pH	25
3.2.3.2.	Densité relative 20	25
3.2.3.3.	Indice de réfraction	26
3.2.4.	Identification chimique des huiles essentielles	26
3.2.4.1.	Principe	26
3.2.4.2.	Condition opératoire	27
3.2.5.	Etudes des activités biologiques	29
3.2.5.1.	Evaluation de l'activité antioxydante test DPPH	29
3.2.5.2.	Mesure de l'activité antimicrobienne de l'HE	32
3.2.5.2.1.	Activité antibactérienne	32
3.2.5.2.2.	Activité antifongique	37
Chapitre IV : Résultats et discussion		
4.1.	Caractéristiques organoleptiques et physicochimiques de l'HE	40
4.2.	Etude de la composition chimique de l'HE	41
4.3.	Evaluation de l'activité antioxydante	43
4.4.	Evaluation de l'activité antimicrobienne	44
4.4.1.	Activité antifongique	45
4.4.2.	Activité antibactérienne	47
Conclusion		51
Références bibliographiques		52

Introduction générale

Introduction

L'intérêt pour les produits naturels connaît depuis quelques années une importance grandissante. Cet intérêt se manifeste par une demande croissante de substances bioactives dénuées de tout effet nocif. Actuellement, plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire.

En effet, la peroxydation des lipides au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments sous l'action des radicaux libres conduit à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments. Les antioxydants de synthèse, généralement utilisés en industrie alimentaire pour retarder l'oxydation des lipides, sont suspectés d'avoir des effets néfastes sur la santé du consommateur (**Ames, 1983 ; Wang *et al.*, 2008**). De plus, l'usage excessif d'agents antibactériens et antifongiques chimiques dans la médication humaine conduit au développement de microorganismes résistants à la plupart des antibiotiques (**Essawi et Srour, 2000**). Suite à cette préoccupation, il semble donc important de trouver une alternative. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ces phénomènes de résistance bactérienne et d'oxydation des aliments.

La région méditerranéenne d'une manière générale, l'Algérie tout particulièrement, avec son climat doux et ensoleillé est favorable à la culture des plantes aromatiques et médicinales, parmi lesquelles figure la famille des Lamiacées. Elle comprend environ 258 genres pour 6900 espèces plus ou moins cosmopolites tel que le thym, la lavande et le romarin (**Botineau, 2010**). La plupart des genres ont une importance économique due à leur richesse en huiles essentielles. Ainsi, ils ont fait l'objet de plusieurs études scientifiques dans le but est d'évaluer la présence de certains métabolites secondaires typiques (**Wink, 2003**).

Le romarin, communément appelé, Yazir (en Kabylie), Halhal (en ouest), Aklil (en est) ; est un arbrisseau vivace à feuillage étroitement lancéolées linéaires, faibles et coriaces, les fleurs sont bleue pale, maculées intérieurement de violet et disposées en courtes grappes denses s'épanouissent presque tout au long de l'année (**Gonzalez-trujano *et al.*, 2007 ; Atik bekkara *et al.*, 2007**). Son caractère ensoleillé et son effort de reproduction élevé lui permettent de coloniser les paysages découverts (**Sardans *et al.*, 2005**).

Bénéficiant d'une popularité universelle aussi bien sur le plan culinaire que thérapeutique, le romarin jouit depuis toujours des propriétés anti-inflammatoires et

antispasmodiques (**Cheung et Tai, 2007 ; Ventura-Martínez, 2011**). C'est une excellente source de molécules antioxydantes et antimicrobiennes (**Cheung et Tai, 2007 ; Praveen et Sharmishtha, 2012**). Son utilisation s'est avérée efficace pour soulager les migraines et les douleurs rhumatismales (**baba, 1991**).

Pour ces raisons, le romarin (*Rosmarinus officinalis*) a fait l'objectif de notre étude. Ainsi, la composition chimique par une analyse CPG est réalisé et une éventuelle activité antimicrobienne est recherchée par le biais d'un test aromatoigramme.

Rappels Bibliographiques

Chapitre 1

Matériel végétal

1.1. Quelques mots de l’histoire

Le romarin a fait l’objet de très nombreuses mentions historiques et légendaires dans plusieurs civilisations. Les Anciens Grecs lui vouaient une grande vénération, servis généreusement dans toutes les fêtes, qu’il s’agisse de cérémonies nuptiales ou funéraires. Les couronnes de romarins trouvaient à l’époque plusieurs utilisations : symbole d’amour et de fidélité pour les mariées, stimulateur de mémoire pour les étudiants en période d’examen et même chasseurs de cauchemars et de mauvais esprits. Les Égyptiens plaçaient des branches de romarin dans la tombe des pharaons afin de fortifier leur âme. Les Romains considéraient également le romarin comme une plante sacrée, les écrits de Horace le poète l’atteste "*Si tu veux gagner l’estime des dieux, apporte leur des couronnes de romarin et de myrte*" (**Jean-Baptiste et Guibourt**).

Durant l’épidémie de peste, le romarin était très populaire, des rameaux sont brûlés pour purifier l’air contaminé. Il est utilisé sous forme d’extrait à base d’alcool pour aseptiser les plaies et sous forme de baume pour soulager les rhumatismes et les névralgies. Ajouté à l’eau de bain, le romarin stimule la circulation sanguine (**Babar et al., 2015**).

1.2. Position systématique

Le romarin tien son nom du latin, *ros* : rosée, et *marinus* : de mer, allusion à son parfum et à son habitat sur les coteaux maritimes.

Tableau1 : Taxonomie botanique de romarin (Web1)

Règne	Plantes
Embranchement	Spermaphyte
Sous-embranchement	Angiosperme
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales (Labiales)
Famille	Lamiaceae

Le romarin forme un genre (*Rosmarinus*), comprenant trois espèces dans le monde : *R. eriocalyx*, *R. tomentosus*, et *R. officinallis*, croient naturellement dans les pays du bassin méditerranéen, ainsi que dans les zones qui entourent l’Himalaya (**Tyler et al., 1976 ; Quezel et Santa, 1963**).

1.3. Habitat et aires de répartition

Le Romarin pousse naturellement dans le sud de l'Europe, aujourd'hui il est réparti un peu partout dans le monde plus particulièrement dans les régions tempérées (Chevallier, 2017). Ne résistant pas aux hivers rigoureux, il apprécie les climats chauds et modérément secs (McVicar, 2010). Les principales régions de culture sont : les pays méditerranéens (sud de la France, Espagne, Portugal, nord de l'Afrique), l'Inde, les Antilles, le Mexique, l'Afrique du Sud, les Etats-Unis, les Philippines et l'Australie (Anton et Lobstein, 2005). Le romarin est cultivé à partir de semis ou de boutures sur le bord de la mer jusqu'à 900 mètres d'altitude au sud et 600-700 mètres au nord (Heinrich *et al.*, 2006).

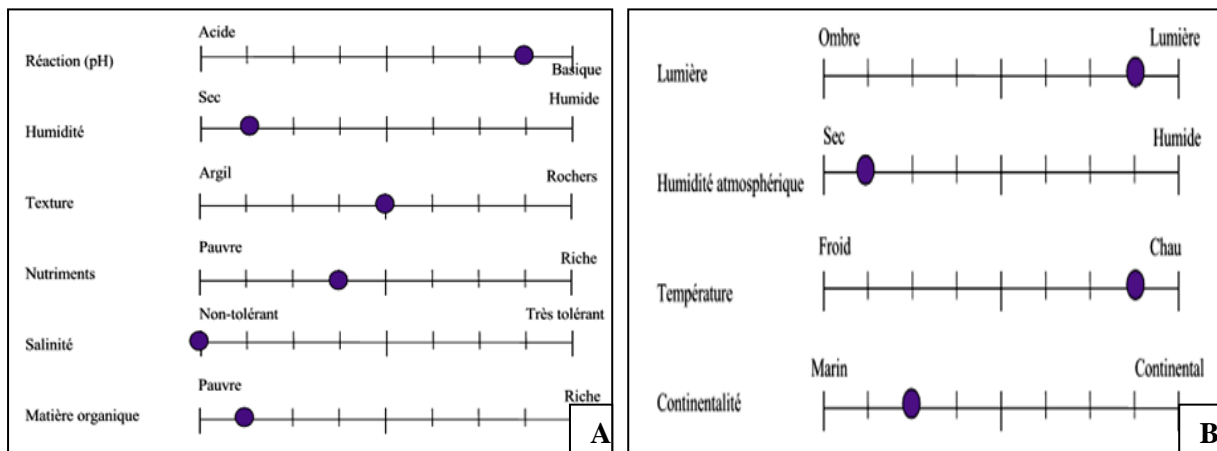


Figure 1 : Optimum écologique : les caractéristiques du sol (A) et du climat (B) (Leplat, 2017)

1.4. Utilisations

1.4.1. En phytothérapie

Pour les traitements externes, les extraits alcooliques de romarin agissent sur les plaies et les dermatoses parasitaires (Weckesser *et al.*, 2007). La décoction aqueuse s'utilise en gargarismes pour les angines et en bains de bouche pour traiter les aphtes et la carie dentaire (Tsai *et al.*, 2007).

En voie interne, le romarin est indiqué pour ses qualités :

- Stimulantes** : l'extrait méthanolique du romarin a montré une inhibition modérée de l'acétylcholinestérase prouvant ainsi son effet pour améliorer la mémoire et la concentration (Adersen *et al.*, 2006).
- Antispasmodiques et cholagogues** : utilisé dans les cholécystites chroniques, certaines ascites, cirrhoses et ictères (Atik Bekkara *et al.*, 2007);
- Emménagogues et diurétique** (Haloui *et al.*, 2000).

□ **Antivirale et anti-carcinogénique: (Atik Bekkara *et al.*, 2007).**

1.4.2. Dans l'industrie

De nos jours les extraits de romarin sont largement utilisés comme composant aromatique dans l'industrie des cosmétiques (savons, shampooings, parfums, crèmes, etc.), mais aussi dans l'industrie alimentaire (boissons alcoolisées, desserts, bonbons, etc.) (**Calabrese *et al.*, 2000 ; Zivanovic *et al.*, 2005 ; Georgantelis *et al.*, 2007 ; Ponce *et al.*, 2008).**

Chapitre 2

Huile essentielle

2.1. Définition

Une huile essentielle est un liquide concentré en substances organiques, de nature hydrophobe, volatile et odorante qu'on obtient par extraction mécanique, distillation à la vapeur d'eau ou distillation à sec de plantes aromatiques (AFNOR, 2000).

2.2. Répartition dans la plante

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux, en particulier les sommités fleuries (ex. lavande), les feuilles (ex. laurier) et bien que cela soit moins habituel, dans les écorces (ex. cannellier), les bois (ex. santal, camphrier), les racines (ex. vétiver), les rhizomes (ex. curcuma, gingembre), les fruits (tout-épices, anis, badiane), les graines (ex. muscade) et les boutons floraux (ex. clou de girofle) (Paris et Hurabielle, 1981). La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées à proximité de la surface de la plante (Bruneton, 1999 ; Baser et Buchbauer, 2010). Il existe en fait quatre structures sécrétrices :

- Les cellules sécrétrices : Chez les Lauracées et les Zingibéracées.
- Les poils glandulaires épidermiques : Chez les Lamiacées, Géraniacées, etc.
- Les poches sphériques schizogènes : se rencontrent chez les familles des Astéracées, Rosacées, Rutacées, Myrtacées, etc.
- Les canaux glandulaires lysigènes : On les retrouve chez les Conifères, Ombellifères, etc.

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes (Bruneton, 1999).

2.3. Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (les huiles essentielles de girofle ou de cannelle constituent des exceptions). Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Les huiles essentielles sont solubles dans les alcools, dans les huiles fixes et dans la plupart des solvants organiques (Baser et Buchbauer, 2010). Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité (Zabeirou et Hachimou, 2005).

2.4. Composition chimique de l'huile essentielle

Du point de vue chimique, les huiles essentielles sont constituées de mélanges extrêmement complexes. ils peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes (composés terpéniques) et les phénylpropanoïdes (**Buchanan et al., 2000**). Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

2.4.1. Les composés terpéniques : sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence d'unités isopréniques (C_5H_8) dans leur squelette (**Bakkali et al., 2008**). Le matériau de base est l'IPP (isopentylpyrophosphate), il est dérivé de l'Acétyl CoA, lui-même issu du PEP (phosphoenolpyruvate) provenant directement du fructose. Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en

- * **monoterpènes** → formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$)
- * **sesquiterpènes** → formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$)
- * **diterpènes** → formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$)
- * **tetraterpènes** → sont constitués de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes
- * **polyterpènes** → ont pour formule générale $(C_5H_8)_n$ ou n est compris entre 9 à 30
- * **Terpénoïdes** → sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide)

2.4.1.1. Les monoterpènes : représentent la majorité des constituants des H.E, Volatils à odeur souvent agréable, ils peuvent être acyclique (myrcène, ocimène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène, camphène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de substances à fonction chimique (**Bruneton, 2009**):

Tableau 2 : Les différents groupements chimiques présent dans les mono-terpènes (Bruneton, 2009)

Alcools	acycliques (géraniol, linalol, citronellol) monocycliques (menthols, α -terpinéol, 1-terpinènes-4-ol) ou bicycliques (bornéol, fenchol)
Aldéhydes	le plus souvent acycliques (géraniol, citronellal, sinénal)
Cétones	acycliques (tagétone), monocyclique (carvone, menthone, pulégone) ou bicyclique (camphre, fenchone, thuyones)
Esters	acycliques (acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle), monocycliques (acétate de menthyle, d' α -terpinyl) ou bicycliques (acétate d'isobornyle)
Peroxydes	Ascaridole
Ethers	cinéole (on dit aussi eucalyptol)
Phénols	thymol, carvacrol

2.4.1.2. Les sesquiterpènes : il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple : β -caryophyllène, β -bisabolène, α -humulène, α -bisabolol, farnesol (**Bruneton, 2009**).

2.4.2. Les phénylpropanoïdes : les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C6-C3), mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente (**Buchanan et al., 2000**). Les phénylpropanoïdes ou composés phénoliques, sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle (**Buchanan et al., 2000**).

Bruneton (1999) considère que ces composés sont très souvent des allyl- et propenyl phénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiacées (anis, fenouil: anéthole, anisaldehyde, estragole. persil : apiole) mais aussi de celles du girofle (eugénol), de la muscade (safrol, eugénol), de l'estragon (eugénol), du basilic (eugénol), de l'acore (asarone) ou de la cannelle (cinnamaldéhyde, eugénol, safrol).

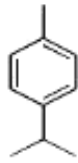
2.4.3. Composés d'origine diverses : Compte tenu de leur mode d'extraction, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation : carbures, acides et lactones (**Teisseire, 1991**). Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras et de terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares. Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits (**Bruneton, 1999**).

1. Terpenes

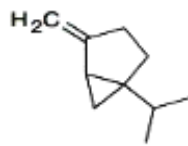
-Monoterpenes

Carbure monocyclic

Cymene ("y") or p.cymene

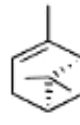


Sabinene

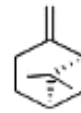


Carbure bicyclic

Alpha-pinene

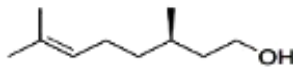


Betapinene

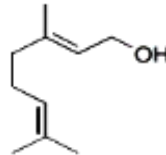


Alcohol acyclic

Citronellol

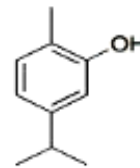


Geraniol

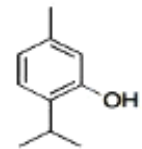


Phenol

Carvacrol



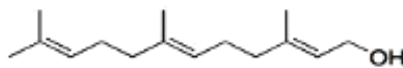
Thymol



-Sesquiterpenes

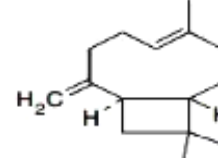
Carbure

Farnesol



Alcohol

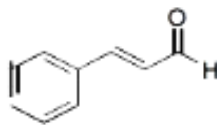
Caryophyllene



2. Aromatic compounds

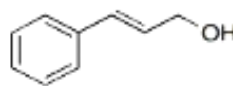
Aldehyde

Cinnamaldehyde



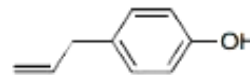
Alcohol

Cinnamyl alcohol



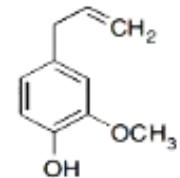
Phenol

Chavicol



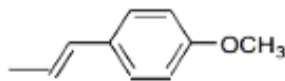
Phenol

Eugenol



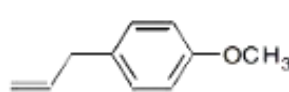
Methoxy derivative

Anethole



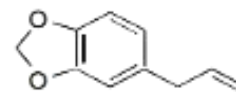
Methoxy derivative

Estragole



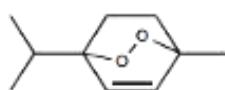
Methylene dioxy compound

Safrole



3. Terpenoides (Isoprenoides)

Ascaridole



Menthol

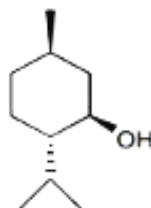


Figure2 : Structure chimique de certains composés d'huiles essentielles
(Bakkali *et al.*, 2008)

2.5. Notion de chémotype

Le chémotype est une forme de classification chimique, biologique et botanique désignant la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle (Cosentino *et al.*, 1999). Cette classification dépend de facteurs qui peuvent influencer la composition de l'HE à savoir le climat, le sol, la période de récolte, le choix de la méthode d'extraction, etc. (Müller-Riebau, 1997 ; Zygadlo et Juliani, 2003 ; Bozin *et al.*, 2006). Biochimiquement différents, deux chémotypes présenteront non seulement des activités thérapeutiques différentes mais aussi des toxicités très variables (Pibiri, 2006).

Tableau 3: Variations de la composition chimique (composé majoritaire) de l'huile essentielle de Romarin (Makhloufi, 2013)

Composé majoritaire	%	Origine	Références
α pinène	23,1	Algérie (Tlemcen)	(Atik Bekkara <i>et al.</i> , 2007)
Camphre	14,5		
β pinène	12,2		
α pinène	14,9	Iran (Tehran)	(Gachkar <i>et al.</i> , 2007)
inalool	14,9		
Pipéritone	23,7		
α pinène	10,9	Turquie (Izmir)	(Yesil Celiktas <i>et al.</i> , 2007)
1,8-cinéole	61,4		
α -pinène	11,4	Maroc	(Ouraini <i>et al.</i> , 2007)
1,8-cinéole	50,2		
Camphre	9,1		
α -pinène	13,5	SERBIE(Vojvodina)	(Bozin <i>et al.</i> , 2007)
Limonène	21,7		
Camphre	21,6		

2.6. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Avant de pouvoir utiliser ou analyser les huiles essentielles, il est nécessaire de les extraire de leur matrice. Plusieurs méthodes d'extraction ont été mises au point (France Ida, 1996) :

2.6.1. Hydrodistillation simple : la plante est mise en contact avec l'eau dans un ballon, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles se séparent de l'eau par différence de densité. Cette méthode est généralement utilisée pour les huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants. Elle est aussi utilisée dans l'extraction des huiles à partir des feuilles et des fleurs fraîches ou séchées (Franchomme, 1990).

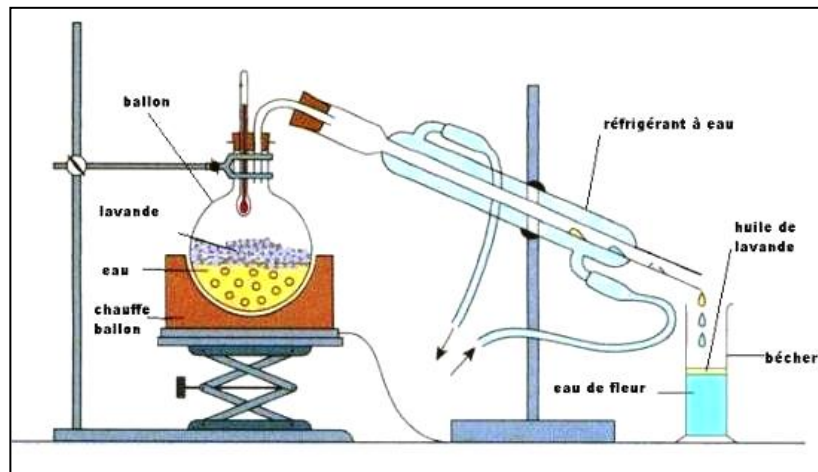


Figure 3: montage d'hydrodistillation (Web2)

2.6.2. Entraînement à la vapeur d'eau : à la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Le but de cette méthode est d'emporter avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée de l'essence, se condense dans un essencier. Les parties insolubles dans l'eau sont décantées pour donner l'huile essentielle, alors que la partie contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat ou eau florale) (Dastmalchi *et al.*, 2008).

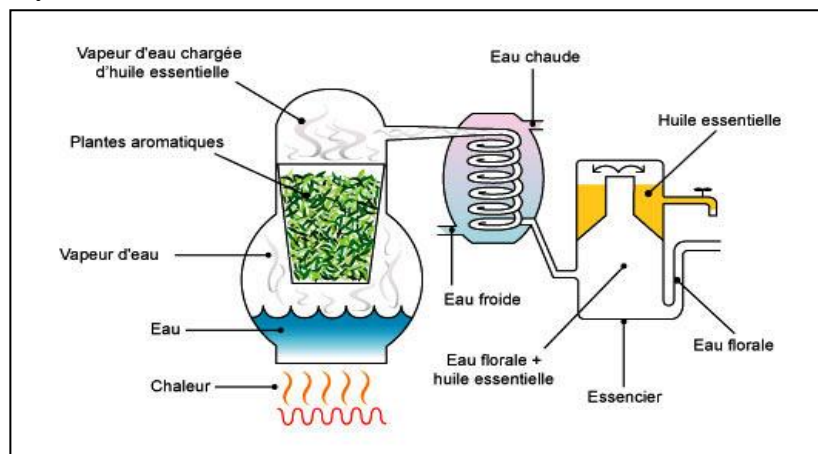


Figure 4: montage de distillation à la vapeur d'eau (Web2)

2.6.5. Extraction par les solvants volatils : Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut pas extraire par distillation. Dans ce procédé, un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé «concrète». Le traitement de concrète par l'alcool absolu permet d'éliminer les cires et conduit à «l'absolue» (Luque de Castro *et al.*, 1999).

2.6.6. L'extraction au fluide supercritique : L'extraction au fluide supercritique consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au-delà de son point critique ($P=72.8$ bars et $T= 31.1^{\circ}\text{C}$). Le fluide ainsi obtenu traverse la plante et se charge en composé à extraire. Ensuite, il est détendu et passe en phase gazeuse et finalement se sépare du composé extrait (Pellerin, 2001). L'extraction des huiles essentielles par le CO_2 supercritique fournit des huiles de très bonne qualité et en un temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques (Kazazi *et al.*, 2007).

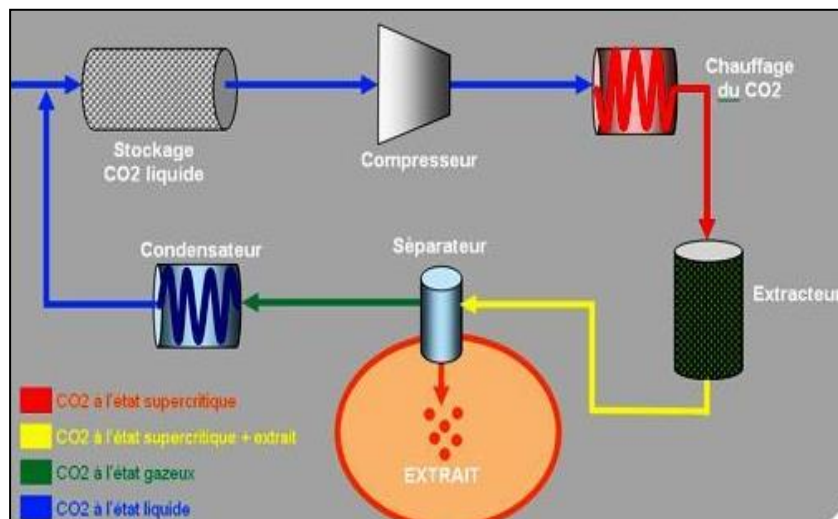


Figure7 : Principe d'extraction par CO_2 supercritique (Web1)

2.6.7 L'extraction par micro-ondes : Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant. On filtre et on récupère ensuite l'extrait. L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes (Paré, 1997).

2.6.5. Extraction par les solvants volatils : Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut pas extraire par distillation. Dans ce procédé, un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé «concrète». Le traitement de concrète par l'alcool absolu permet d'éliminer les cires et conduit à «l'absolue» (**Luque de Castro et al., 1999**).

2.6.6. L'extraction au fluide supercritique : L'extraction au fluide supercritique consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au-delà de son point critique ($P=72.8$ bars et $T= 31.1^{\circ}\text{C}$). Le fluide ainsi obtenu traverse la plante et se charge en composé à extraire. Ensuite, il est détendu et passe en phase gazeuse et finalement se sépare du composé extrait (**Pellerin, 2001**). L'extraction des huiles essentielles par le CO_2 supercritique fournit des huiles de très bonne qualité et en un temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques (**Kazazi et al., 2007**).

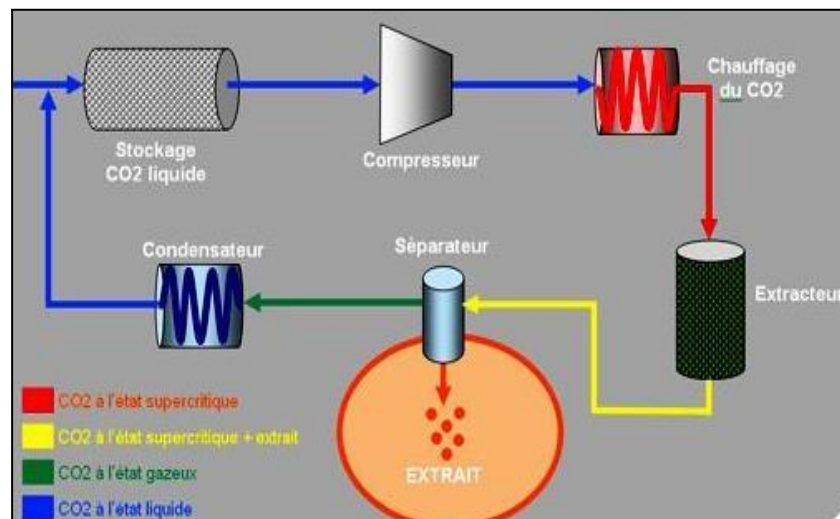


Figure7 : Principe d'extraction par CO_2 supercritique (Web1)

2.6.7 L'extraction par micro-ondes : Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant. On filtre et on récupère ensuite l'extrait. L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes (**Paré, 1997**).

2.7. Activités biologiques de l'huile essentielle

Les plantes aromatiques produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, pour :

- attirer les insectes et favoriser la pollinisation (**Web3**);
- conserve l'humidité des plantes dans les climats désertiques (**Nagggar et Iharchine, 2016**)
- repousse les herbivores, les insectes et les micro-organismes (**Web4 ; Prévosto et al., 2015**).

Chez l'homme : La diversité moléculaire des métabolites que les huiles essentielles contiennent, leurs confèrent des rôles et des propriétés biologiques très variés.

2.7.1. Activités antibactérienne, antifongique et antivirale : La majorité des huiles essentielles ont un spectre d'action très étendu contre un large éventail de microorganismes dont les bactéries, les champignons, les levures, les virus et les protozoaires. Les activités antibactérienne et antifongique sont estimées à la grande complexité de la composition des huiles essentielles. Les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficient antibactérien et antifongique le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol) et des aldéhydes (néral, géraniol) (**Benjilali et al., 1986**).

Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolus jusqu'à ce jour. Les huiles essentielles constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux. En effet, les virus sont très sensibles aux phénylpropanoïdes, monoterpènes et sesquiterpènes présents dans les huiles essentielles (**Astani et al., 2009 ; Astani et al., 2010**).

2.7.2. Activité antioxydante : Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques, ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs. La capacité antioxydante des huiles essentielles est étroitement liée à tout le contenu en phénol (**Yanishlieva et al., 1999**).

2.7.3. Effets anti-inflammatoires: L'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles peut être attribuée non seulement à leurs activités antioxydantes, mais aussi à leurs interactions avec les cascades de signalisation impliquant les cytokines et les facteurs de transcription régulateurs (**Miguel, 2010**).

2.7.4. Effets anti-cancérigènes: Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle de (*Nigella sativa L.*) démontre une activité cytotoxique in vitro contre différentes lignées cellulaires tumorales. In vivo, elle limite la prolifération de métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur P815 (**Ait Mbarek et al., 2007**).

2.8. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Certaines d'entre elles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de citrus contenant des furacoumarines), d'autre ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' α -thujone) (**Guba, 2001**).

2.9. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par (CPG)

En séparant les molécules d'un mélange complexe, la chromatographie en phase gazeuse donne la composition de l'HE et permet de s'assurer de son identité biochimique et de son chémotype. Dans le four à chaleur tournante du chromatographe est injecté 0,2 à 0,5 mL de l'échantillon de l'HE. Il sera transformé en gaz par la chaleur du four pendant 1 à 2 minutes (**Arpino et al., 1995**). A chaque augmentation de température (celle-ci est adaptable de 20 à 450°C), grâce à l'arrivée du gaz vecteur (azote, hydrogène, hélium et air comprimé), le constituant sensible à cette température sera propagé vers le haut du four où il sera emporté, soufflé vers une colonne capillaire. Dans cette colonne, les molécules contenues dans l'HE injectée se séparent selon leur affinité avec la phase stationnaire. Celle-ci provoque un phénomène de rétention chromatographique ; plus le composé aura d'affinités avec la phase stationnaire, plus il sera long à sortir de la colonne. Le constituant parcourt toute la longueur de la colonne jusqu'au détecteur qui envoie alors un signal, représenté par un pic. Le temps de rétention qui correspond à chaque pic est le temps s'écoulant entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du signal maximum du soluté au détecteur.

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) (**Kováts, 1965**) ou en programmation de température (indices de rétention) (**Van Den Dool et Kratz, 1963**). Les indices de rétention polaire ($I_r p$) et apolaire ($I_r a$) sont comparés à ceux d'échantillons authentiques contenus dans des bibliothèques de référence élaborées au

laboratoire, dans des bibliothèques commerciales ou répertoriés dans la littérature (Adams, 1995 ; Joulain et König, 1998 ; König *et al.*, 2001).

Afin de faire une analyse plus complète, les chromatographes sont souvent couplés à d'autres instruments analytiques comme la spectroscopie infrarouge ou la spectrométrie de masse (Bicchi, 2008). Cette analyse présente l'avantage de se rendre compte des fraudes et de déterminer un pourcentage de chaque composant pour chaque chimiotype. Les normes internationales exigent la CPG pour déterminer la qualité des HE à usage thérapeutique.

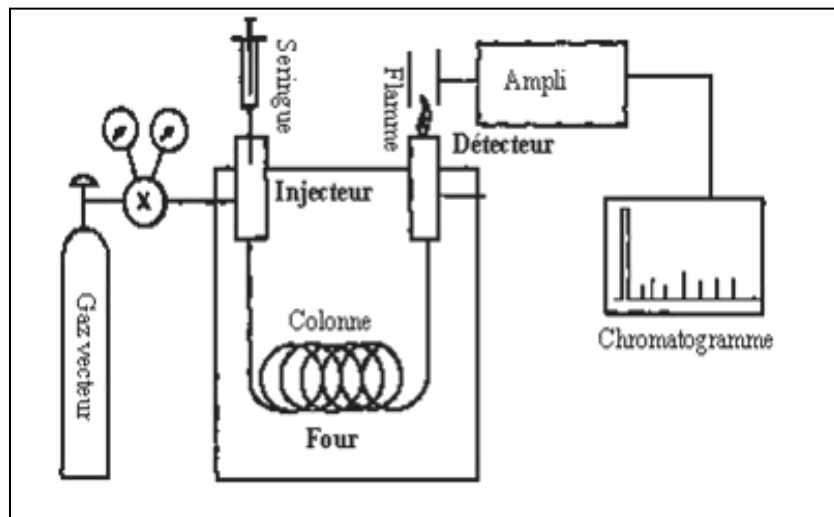



Figure 8 : Schéma d'un appareillage pour CPG (Benazzouz, 2011)


Partie expérimentale

Chapitre 3

Matériels et Méthodes



L'ensemble des expérimentations sont réalisées à l'Université Cheikh Larbi
Tbessi au sein du laboratoire de Biochimie et de Microbiologie sur une
période de 02 mois allant de mars au mois de mai 2019.



3.1. Matériel végétal

3.1.1. Critères de choix de la plante

Pour mieux valoriser la biodiversité des plantes dans l'Est Algérien, notre étude s'est intéressée au Romarin «*Rosmarinus officinalis*», espèce végétale appartenant à la famille des Lamiacées. Une étude bibliographique et une simple enquête auprès de la population locale ayant une connaissance en médecine traditionnelle nous ont permis d'effectuer ce choix. Ainsi, les critères de sélection sont les suivants:

- Abondance de la plante dans la région de Seraïdi.
- Utilisation traditionnelle dans le traitement des maladies d'origine microbienne.
- La non toxicité de la plante, vu qu'elle est utilisée dans les préparations culinaires et dans les tisanes.
- Richesses en substances aromatique (huiles essentielles).

3.1.2. Récolte

Les parties aériennes (tige, feuilles et fleurs) du romarin au stade de floraison, où il y'a une accumulation importante des substances bioactives, ont été récoltées au mois de juin de l'année 2018, dans la région de Seraïdi.



Figure 9: Arbrisseau de Romarin

3.1.3. Situation géographique du site de récolte

La commune de Seraïdi s'étale sur une superficie de 138 Km², située dans le nord ouest de la wilaya de Annaba à une latitude de 36°55'00'' Nord, longitude 7°40'00'' Est et une altitude par rapport au niveau de la mer égale à 850 m.



Figure 10: Région de Seraïdi vue par Google earth (Web5)

Bénéficiant d'un climat tempéré chaud, l'hiver se caractérise par des précipitations bien plus importantes qu'en été. Cet emplacement est classé comme Csa par Köppen et Geiger. Seraïdi affiche 13.6 °C de température en moyenne sur toute l'année. Il tombe en moyenne 990 mm de pluie par an.

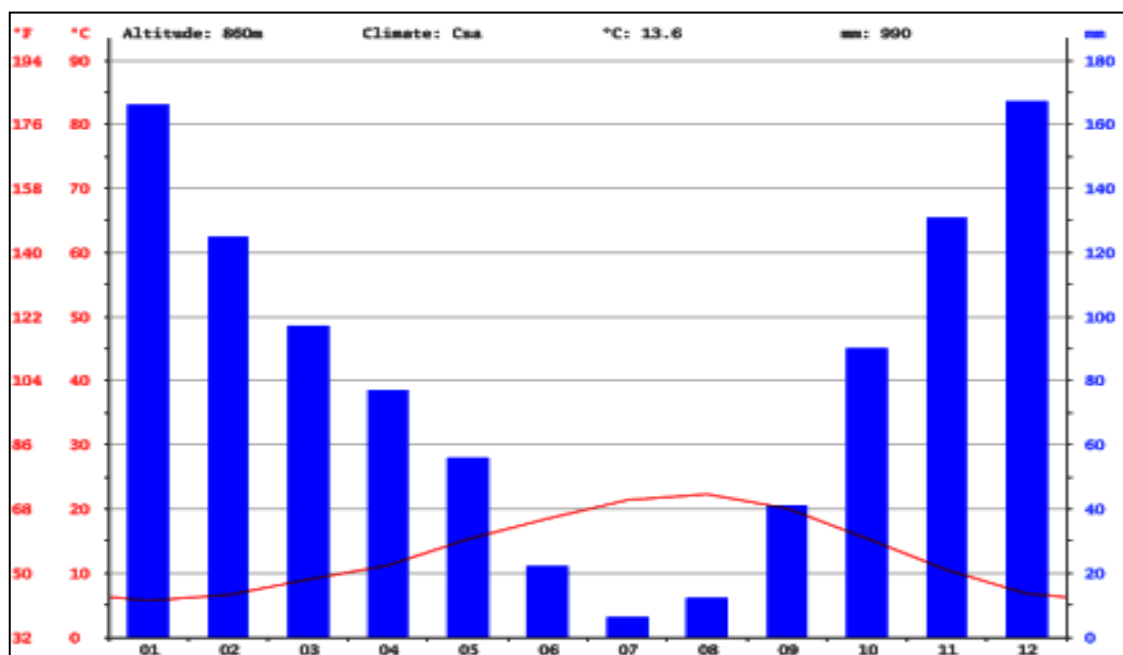


Figure11 : Diagramme climatique de la région de Seraïdi (Web 6)

3.1.4. Identification

L'identification botanique a été faite sur un spécimen d'herbier par le Pr. Bouzeraa, botaniste à l'Université Badji Mokhtar Annaba. Sa taxonomie est la suivante (Quezel et Santa, 1963).

Règne : Plantes

Embranchement: Spermaphytes

Classe: Dicotylédones

Ordre : Lamiales (labiales)

Famille : Lamiaceae

Genre : Rosmarinus

Espèce: *Rosmarinus officinalis L.*

3.1.5. Description botanique

Le Romarin est un arbrisseau touffu, toujours vert à feuilles persistantes et très aromatique, mesurant cinquante centimètres à deux mètres de haut. Il possède :

3.1.5.1. Appareil végétatif

Les tiges

ligneuses, sub-arrondies à écorce brun foncé des fois grisâtre, se divisant en de nombreux rameaux opposés.

Les feuilles

Étroites et lancéolées avec des bords fortement réfléchis, d'une couleur vert foncé, blanchâtres et tomenteuses sur la face inférieure où la nervure médiane est saillante (Anton et Lobstein, 2005).



3.1.5.2. Appareil reproducteur

Les fleurs

bleue pale maculées intérieurement de violet, groupées par trois ou quatre, disposées à l'aisselle des feuilles vers le sommet des rameaux en courtes grappes denses axillaires et terminales formant un ensemble spiciforme s'épanouissent presque tout au long de l'année (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2007 ; Atik Bekkara *et al.*, 2007).



3.1.6. Conservation

Le matériel végétal est séché à température ambiante à l'air libre et à l'abri du soleil pendant quinze jours. Afin de préserver au maximum l'intégrité de ses molécules, les parties aériennes ainsi obtenues sont conservées dans des flacons fermés hermétiquement en vue des expérimentations.



Figure 12: Préparation du matériel végétal

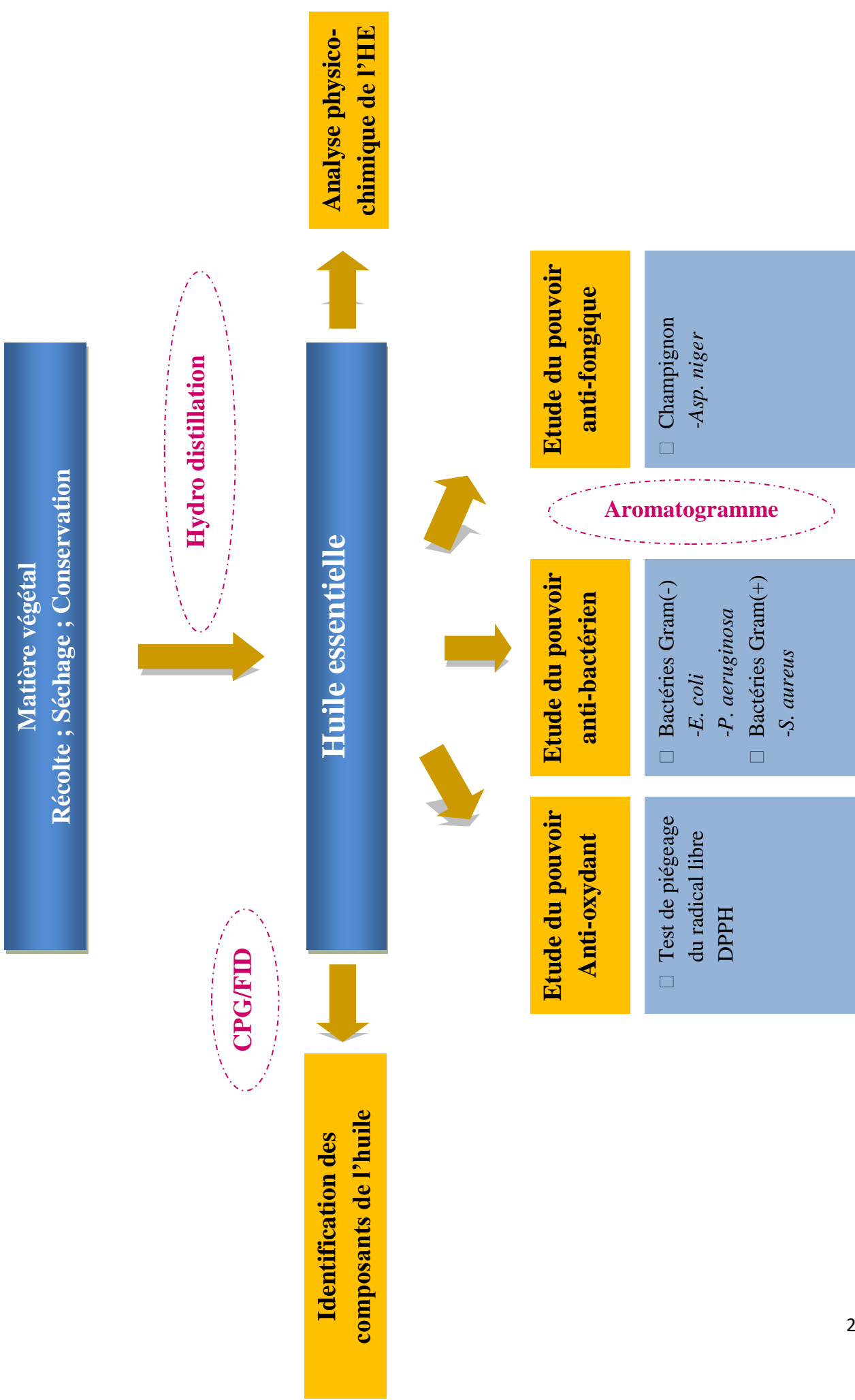


Figure 13: Synoptique de l'obtention et de l'analyse de l'huile essentielle extraite à partir de *Romarinus officinalis*

3.2. Méthodes

3.2.1. Extraction de l'huile essentielle

3.2.1.1. Principe

L'huile essentielle du (*R. officinalis*) est extraite par le procédé d'hydrodistillation, grâce à un appareil de type *Clevenger* qui est constitué d'un chauffe ballon permettant la distribution homogène de la chaleur, un ballon en verre pyrex où l'on place la matière végétale séchée et l'eau distillée et une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant). Cette technique est basée sur l'immersion d'un échantillon solide dans l'eau portée à ébullition. La vapeur saturée en huiles essentielles traverse un serpentin où elle se condense pour donner deux produits: l'eau florale et l'huile essentielle (**Tongnuanchan et Benjaku, 2014**).

3.2.1.2. Mode opératoire

- 100 g de la partie aérienne séchée de la plante est émietée puis introduite dans un ballon monocol de 1 L.
- Une quantité suffisante d'eau distillée est ajoutée dans le ballon sans pour autant le remplir, pour éviter tous débordements lors de l'ébullition.
- À l'aide d'un chauffe ballon, le mélange est porté à ébullition pendant 3 h.
- Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation.
- Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans un collecteur. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière.
- L'huile ainsi obtenue est récupérée par décantation puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium (Na_2SO_4), pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile. Elle est alors conservée dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4 à 5°C).

3.2.1.3. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse de la matière végétale utilisée (**AFNOR, 2000**). Le rendement (R) est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$R = \frac{P_h}{P_p} \times 100$$

Où P_h : Poids de l'huile essentielle en g
 P_p : Poids de la plante en g

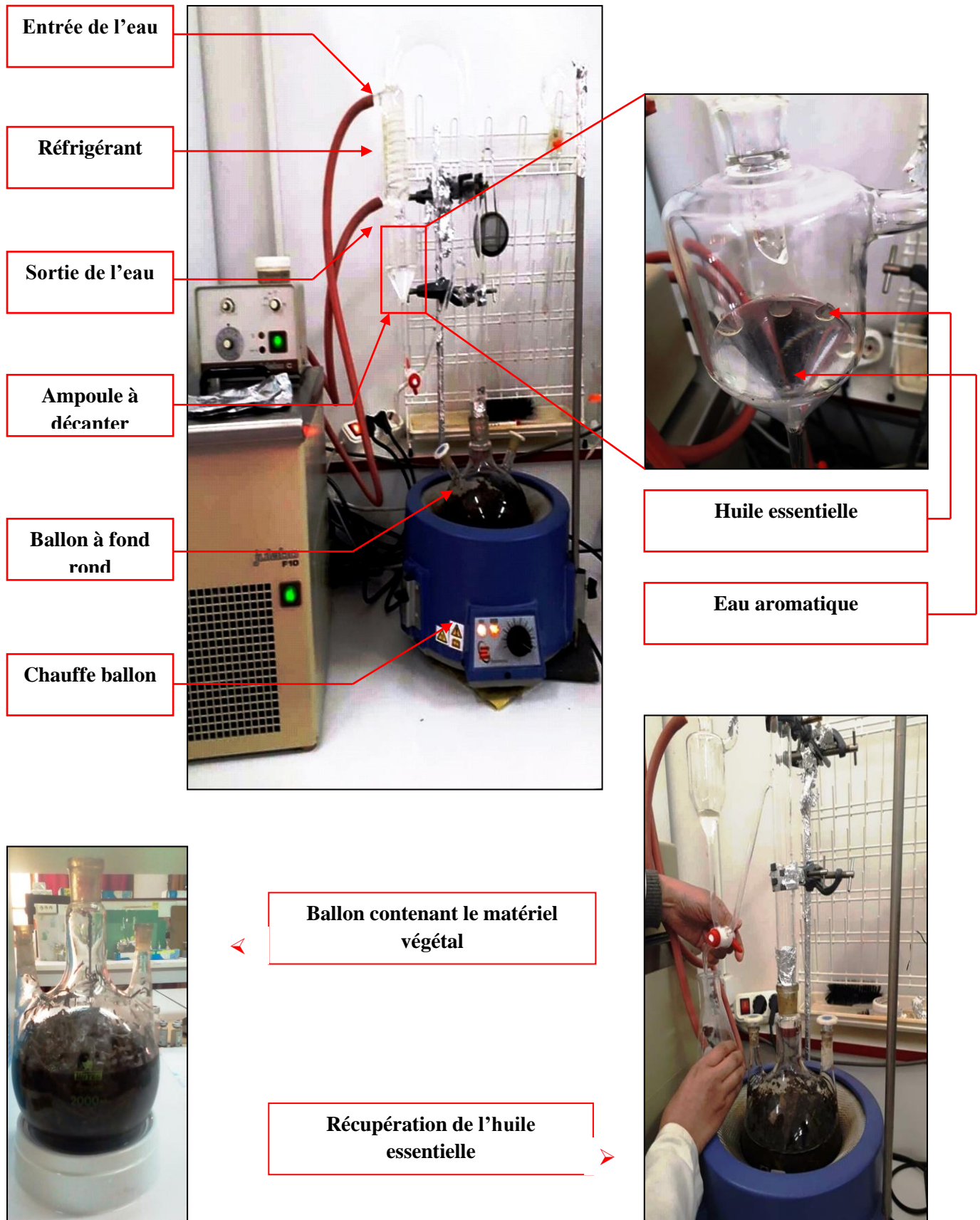


Figure 14: Galerie de photos résumant les étapes de l'hydro-distillation

3.2.2. Conservation des huiles essentielles

L'instabilité relative des molécules constitutives des huiles essentielles rend leur conservation délicate et indispensable. Trois facteurs interviennent dans l'altération des huiles essentielles :

1. La température : obligation de stockage à basse température (entre 4 °C et 8 °C).
2. La lumière : stocker dans l'obscurité et dans des flacons opaques, brun de préférence.
3. L'oxygène : les flacons doivent être hermétiquement fermés. Dans ces conditions la durée de conservation admise est de 2 à 5 ans.

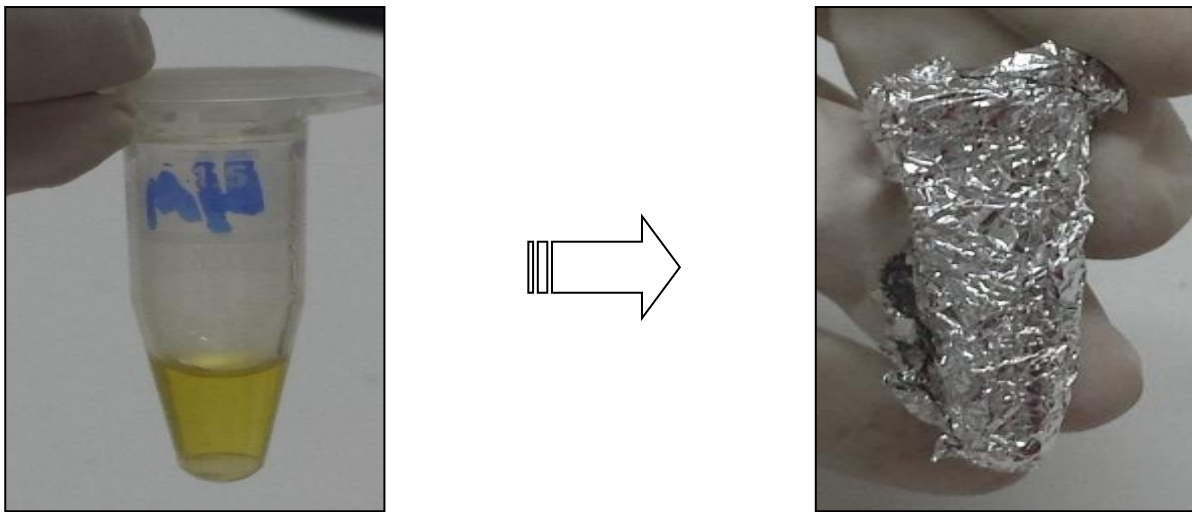


Figure15 : Méthode de conservation de l'huile essentielle

3.2.3. Détermination des propriétés physico-chimiques

3.2.3.1. pH

Le pH de notre huile essentielle est estimé par l'utilisation de papier pH.

3.2.3.2. Densité relative d₂₀

C'est le rapport du poids d'un certain volume d'huile au poids du même volume d'eau distillée à la température de 20°C (AFNOR, 2000).

$$d^{20} = d_{\theta} + 0.00068 * (\theta - 20^{\circ}\text{C})$$

d²⁰	: Densité à 20°C.
d_θ	: Densité à la température de mesure
θ	: Température de mesure
0.00068	: Constant de variation de la densité quand la température varie de 1°C

3.2.3.3. Indice de réfraction

La mesure est effectuée à l'aide d'un réfractomètre de marque Atago. Après nettoyage de l'appareil, on place 2 à 3 gouttes d'huile essentielle au milieu du prisme, puis on note directement la valeur de l'indice et la température de mesure.



Figure 16: Réfractomètre ➤

Une formule empirique permet d'évaluer l'indice de réfraction d'un liquide à 20°C quand on l'a mesuré à une température légèrement différente :

$$I_{20} = I_{\theta} + 0.00045 * (\theta - 20^{\circ}\text{C})$$

I₂₀	: Indice de réfraction à 20°C
I_θ	: Indice à la température de mesure
θ	: Température de mesure
0.00045	: Constant de variation de l'indice quand la température varie 1° C

3.2.4. Identification chimique des huiles essentielles

L'huile essentielle récupérée par hydro-distillation est analysée par chromatographie en phase gazeuse (CPG/FID). Cette analyse est réalisée par le centre de recherche scientifique et technique en analyse physico-chimique (CRAPC), de Bous-Ismail, Tipaza.

3.2.4.1. Principe

La CPG s'est montrée être la méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une huile essentielle, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative. Elle est basée sur le principe de la chromatographie de partage (Skoog *et al.*, 2003). La phase stationnaire étant un liquide non volatil réparti ou greffé sur un support inerte. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile (H₂, N₂, He). La solution est injectée au moyen d'une seringue soit manuellement, soit avec un injecteur automatique qui permet d'obtenir une meilleure reproductibilité. La séparation des composés dépend du type de colonne utilisée et de la polarité de la phase stationnaire.

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. La détection des

composés élués est obtenue par un détecteur FID (flamme ionisation detector). On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé. Dans le cas des huiles essentielles, le FID est le détecteur le plus cité dans la littérature (**Figueredo, 2006**).

Le pourcentage de composition de l'huile essentielle est calculé par intégration électronique des aires des pics FID. Pour chacun des composants, les indices de rétention sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane.

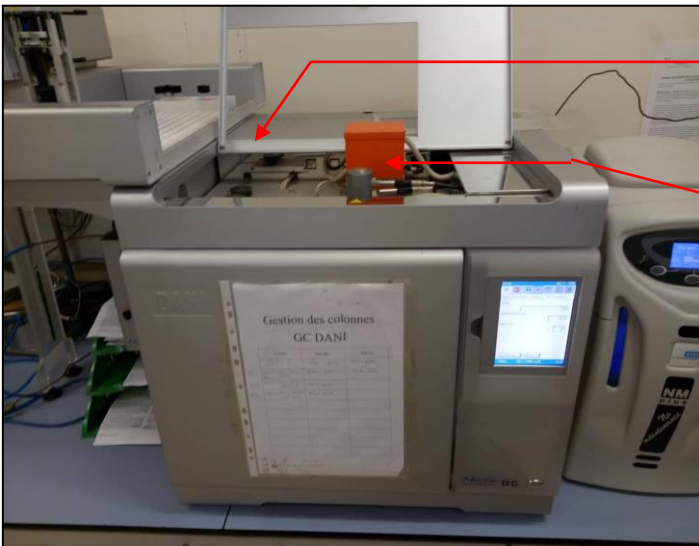
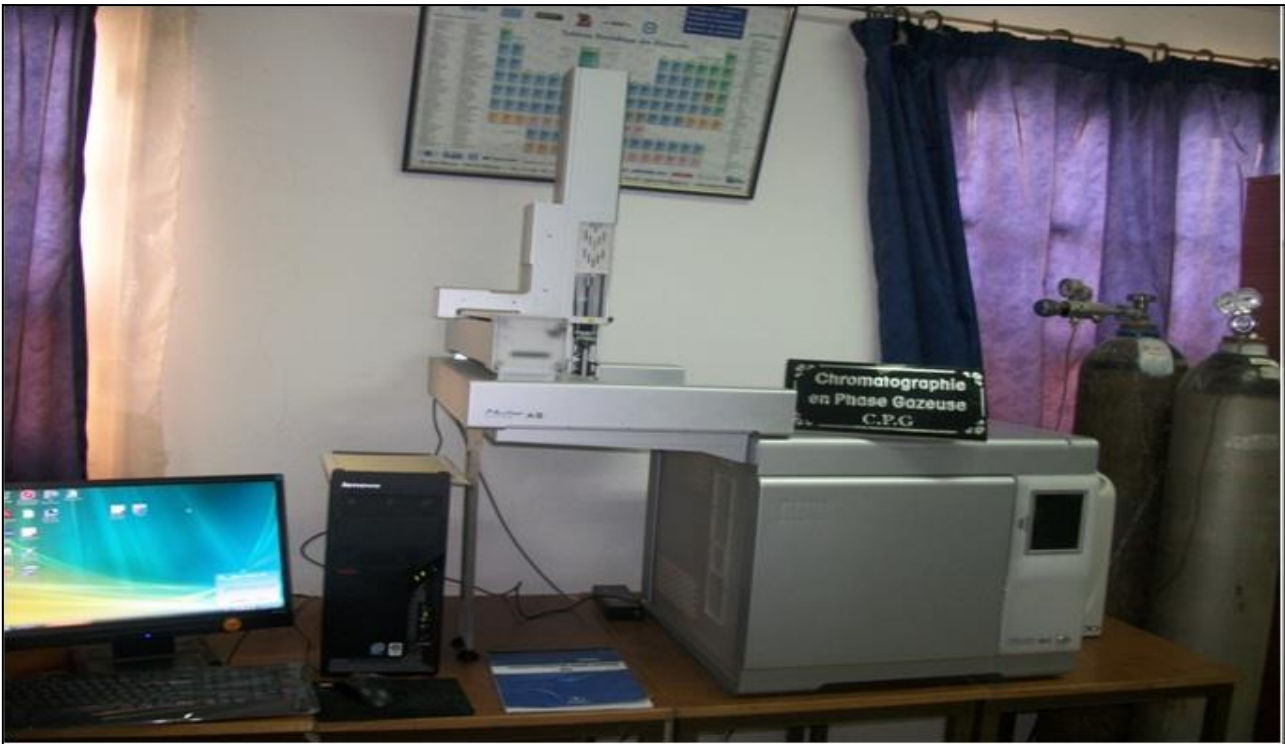
$$I_R = 100 \times \frac{(t_R)_i - (t_R)_n}{(t_R)_{n+1} - (t_R)_n}$$

I_R	: Indice de rétention du soluté considéré
(t_R)_i	: Temps de rétention du soluté considéré
(t_R)_n	: Temps de rétention de l'alcane contenant "n" atomes de carbone et dont le pic précède celui du soluté
(t_R)_{n+1}	: Temps de rétention de l'alcane contenant "n+1" atomes de carbone et dont le pic sort après celui du soluté
n et n+1	: nombre de carbones des hydrocarbures paraffiniques (n-alcane)

3.2.4.2. Condition opératoires

Tableau 4: Conditions opératoires de la chromatographie en phase gazeuse

Chromatographe		GC MASTER DANI
Durée d'analyse		103 minutes
Injecteur	température	250°C
	Volume	0.2µl
	Mode d'injection	Split 1/50
Vecteur	Gaz vecteur	Azote
	Débit	0.5 ml/min
Colonne	Type	HP-5MS
	Longueur	30 m
	Diamètre interne	0.25 mm
	Épaisseur de phase	0.25 µm
	Phase stationnaire	5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane
T°C du Four	Programmation 1	8 min à 60°C
	Programmation 2	2°C/min jusqu'à 240°C
	Programmation 3	5 min à 240°C
Ejecteur	Type	FID : détecteur à ionisation de flamme
	Température	270°C



Injecteur

Détecteur

Régulateur de pression

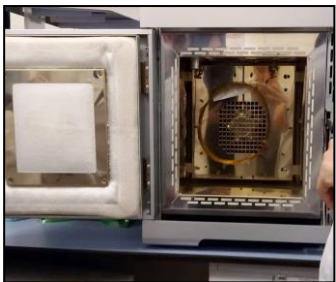
Gaz vecteur



Enregistrement du signal



Enceinte thermostatée



Colonne



Figure 17: Galerie de photos résumant les étapes de chromatographie en phase gazeuse

3.2.5. Etudes des activités biologiques

Afin d'évaluer la qualité thérapeutique de notre huile essentielle, nous proposons de tester *in vitro* ses effets antioxydants et antimicrobiens.

3.2.5.1. Evaluation de l'activité antioxydante par un test de piégeage du radical libre DPPH

La méthode DPPH est largement utilisée en raison de sa simplicité et de la stabilité des résultats (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Takao *et al.*, 1994 ; Brand-Williams *et al.*, 1995 ; Yen et Chen-Ya, 2000). La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence de composés phénoliques. Le radical synthétique DPPH initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie à l'antioxydant. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir anti-radicalaire direct de différentes substances phénoliques des extraits (Molyneux, 2004).

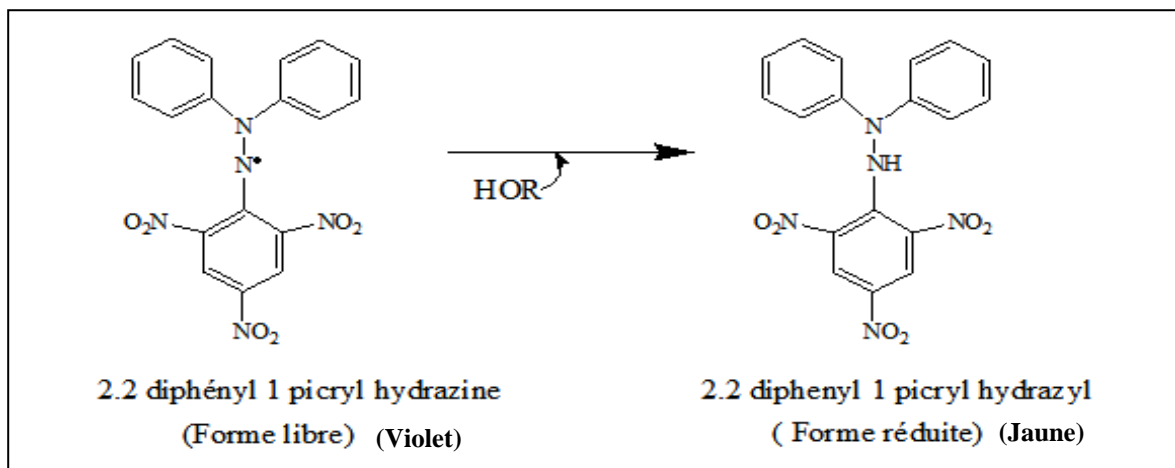


Figure 18: Réduction du radical DPPH• par un antioxydant

La mesure de la décroissance de la coloration violette au cours du temps permet de déterminer l'IC₅₀, temps au bout duquel 50% de coloration est perdue, généralement interprétée sur la base de la quantité d'un antioxydant nécessaire pour faire diminuer de 50% la quantité initiale

de DPPH (IC₅₀). On pourrait standardiser la méthode, en ramenant par exemple les résultats à un équivalent, le BHT.

Mode opératoire

La capacité de notre huile essentielle à piéger le radical libre DPPH est évaluée en utilisant la méthode décrite par **Yen et chien-Ya (2000)**, suivi du calcul de l'IC₅₀ et de l'indice de l'activité antioxydante (AAI) (**Scherer et Godoy, 2009**). Le BHT est utilisé comme contrôle positif.

- On prépare une solution mère de l'huile essentielle dans le méthanol à une concentration 2mg/ml. Une série de dilution en progression géométrique à raison de 2 est réalisée pour obtenir des concentrations allant de (1 à 0.03 mg/ml).
- 100 µl de chaque solution sont mélangés avec 02 ml d'une solution méthanolique de DPPH préparée préalablement.
- Le mélange réactionnel est agité vigoureusement et incubé 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Les absorbances sont mesurées à 517 nm. L'essai est répété trois fois pour chaque concentration.
- Le contrôle négatif est composé de 2ml de la solution méthanolique au DPPH avec 100 µl de méthanol.

Expression des résultats

L'activité antioxydante : est exprimée comme le pourcentage d'inhibition, calculé en utilisant l'équation suivante :

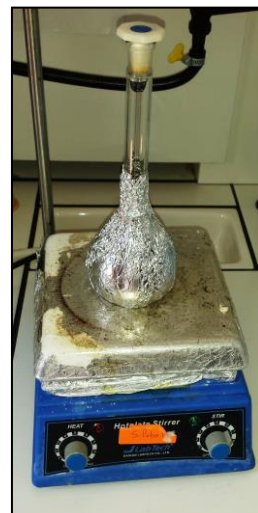
Activité Antioxydante (%) = [1-(A échantillon/A control négatif)] x 100	
A contrôle	l'absorbance du control négatif
A échantillon	l'absorbance de l'huile essentielle

La concentration inhibitrice (IC₅₀): Elle est calculée à partir du graphe de l'activité antioxydante (en %) en fonction des concentrations testées. Une faible valeur d'IC₅₀ indique une forte capacité de l'extrait à agir comme piègeur du DPPH.

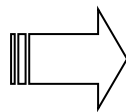
L'indice de l'activité antioxydante (AAI) : est calculé selon l'équation suivante :

AAI = concentration finale de DPPH (µg/ml) / IC50 (µg/ml).	
AAI < 0.5	→ faible activité antioxydante
1 > AAI > 0.5	→ activité antioxydante modérée
2 > AAI > 1	→ forte activité antioxydante
AAI > 2	→ très forte activité antioxydante

Préparation de DPPH



Réaction de DPPH avec les dilutions de l'HE, déposé 30 min à l'obscurité



Lecture de la densité optique à 517 nm



Figure 19: Galerie de photos résumant le test de piégeage du radical libre DPPH

3.2.5.2. Mesure de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de romarin

3.2.5.2.1. Activité antibactérienne

Souches bactériennes testées

Le test est effectué sur un total de 06 souches bactériennes présentant un risque pathogène du niveau 2 sur une échelle de 4, dont 03 souches de références ATCC et 03 autres d'origine clinique, fournies aimablement par les collections du laboratoire de microbiologie (équipes du Dr. Mechai et Dr. Azizi respectivement).

Tableau 5 : les souches bactériennes utilisées dans l'étude de l'activité antibactérienne de l'HE

Bactéries	Gram	Famille	Origine
<i>Escherichia coli</i>	-	Enterobacteriaceae	ATCC 25922
<i>Escherichia coli</i>	-	Enterobacteriaceae	Clinique
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Pseudomonadaceae	ATCC 27853
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Pseudomonadaceae	Clinique
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Staphylococcaceae	ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Staphylococcaceae	Clinique

Conservation des souches

Les souches bactériennes sont entretenues par repiquage sur la gélose nutritive (GN). Incubées pendant 24 h à 37 °C, elles sont conservées à 5 °C dans des tubes contenant de la gélose nutritive incliné.

Préparation de l'inoculum

La suspension bactérienne est préparée à partir des cultures pures : à l'aide d'une anse de platine on racle 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques. On décharge l'anse dans 05 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% NaCl, après homogénéise la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex.

Etude de la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis l'HE de romarin

La technique utilisée est celle de la diffusion sur disque en milieu gélosé ou encore méthode des disques (Dayal et Purohit, 1971), inspirée de celle des antibiogrammes (Tharib *et al.*, 1983). Généraliser pour les huiles essentielles et autres types d'extraits, l'aromatogramme est

devenue une méthode d'évaluation qualitative *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles (Gulluce *et al.*, 2007).

Notre huile essentielle est testée sur les souches bactériennes préalablement sélectionnées, d'une part à l'état brut (pour la méthode des disques) et d'autre part à l'état dilué (pour la détermination de CMI et CMB). Pour obtenir des résultats fiables, il faut travailler dans des conditions standardisées car plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats: la densité de l'inoculum, la température et le temps d'incubation, la concentration du produit à tester, la composition du milieu de culture ainsi que l'épaisseur de la gélose (Guerin-Fauble et Carret, 1999).

Mode opératoire

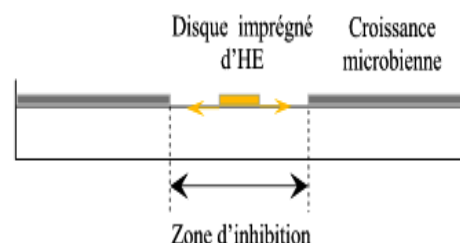
□ **Ensemencement** : Dans des boîtes de Pétri, le milieu de culture gélosé MH est coulé aseptiquement à raison de 20 ml par boîte. Après la solidification, un écouvillon stérile imbibé avec la suspension bactérienne fraîchement préparée est étalé à la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum. On laisse sécher les boîtes pendant 15 à 20 min.

□ **Application des disques** : Des disques de papier Whatman N°1 stérilisés de 6 mm de Ø sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile puis imprégnés d'un volume de 10 µl d'huile essentielle. Un autre disque sec est déposé comme contrôle négatif.

□ **Incubation** : toutes les boîtes pétries sont incubées inversées à l'obscurité dans une étuve à une température de 37 °C pendant 24 heures.

□ Expression des résultats

Après la période d'incubation, l'effet de l'agent antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure du diamètre de la zone claire autour du disque en millimètres (zone d'inhibition où les microorganismes testés n'ont pas poussés).



En fonction du diamètre d'inhibition on peut classer les souches étudiées en souches sensibles ou résistantes

Etape 1	Le repiquage
----------------	---------------------



Etape 2	L'inoculum	Etape3	Ensemencement
----------------	-------------------	---------------	----------------------



Etape 4	L'aromatogramme
----------------	------------------------



Figure 20: Galerie de photos résumant les étapes de l'aromatogramme

Détermination des valeurs de CMI par la méthode de dilution par gélose

Principe

Cette technique a été effectuée par Baron et Bruckner 1984. Elle consiste à disperser de façon homogène l'agent antimicrobien en concentration variable dans le milieu de culture. Une fois définies, les bactéries sont appliquées sur sa surface. Les boîtes sont incubées pendant 24 h ou plus et la croissance des bactéries sur le mélange (extrait / agar) est marquée soit présente ou absente.

La CMI est alors définie comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien qui inhibe complètement la croissance dans des conditions d'incubation appropriées (**Wilkinson, 2006; Balouiri et al., 2016**).

Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les huiles essentielles qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture gélosés ou liquides. Ce problème est résolu en partie par l'utilisation d'émulsions d'huiles essentielles dans des solutions de détergents comme le Tween 20 et le Tween 80 (**Allegrini et al., 1973**) ou de solvant comme l'éthanol et le DMSO (**Drugeon et al., 1990**).

Mode opératoire

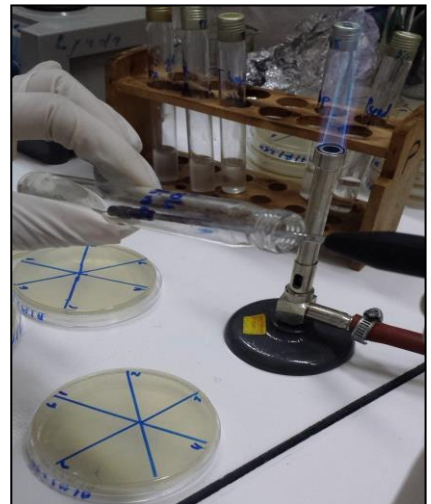
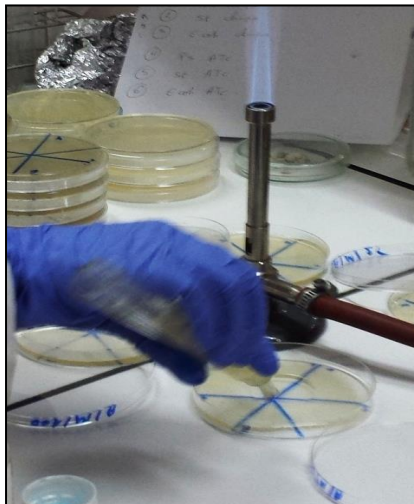
- Diluer notre HE à des concentrations variables (25, 50, 100 et 250 µl dans 500 µL de DMSO).
- Chacune des dilutions est incorporée avec 19.5 ml de milieu Muller Hinton maintenu en surfusion. Les concentrations finales de l'HE dans le MH sont respectivement (2.5, 5, 10, 25 µl/ml).
- Après homogénéisation, le mélange est réparti dans des boîtes de pétri, une fois solidifié et à l'aide d'une anse de platine en étale par strie l'inoculum bactérien utilisé préalablement. L'opération est incubée 24 h à 37 °C.

Détermination de la nature de l'activité antibactérienne (bactéricide/bactériostatique)

Le rapport CMB/CMI nous permet de déterminer la nature de l'activité antibactérienne de notre HE. La CMB représente la plus faible concentration d'HE inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 05 jours d'incubation à 37°C (**Mayachiew et Devahastin, 2008**).

Lorsque le rapport est supérieur à 4, l'HE a un pouvoir bactériostatique, soit bactéricide quand est alors inférieur ou égal à 4 (**Canillac et Mourey, 2011**).

Etape 1	Préparation de milieu de culture
----------------	---



Etape 2	Ensemencement des souches bactériennes, conservation et résultat
----------------	---

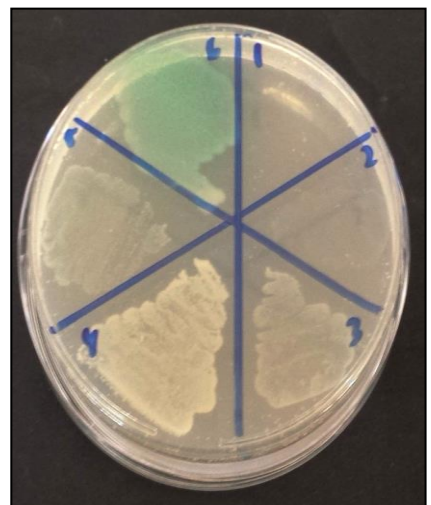
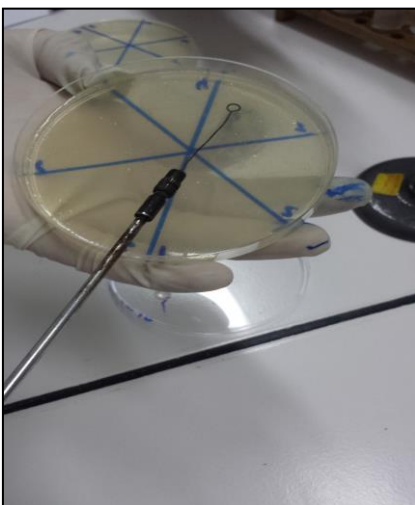


Figure 21: Galerie de photos résumant les étapes de la dilution par gélose

3.2.5.2.2. Activité antifongique

Souche fongique

L'*Aspergillus niger*, l'aspergille noir, est un champignon filamenteux ascomycète de l'ordre des Eurotiales. C'est une des espèces les plus communes du genre *Aspergillus* qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et légumes. La souche nous a été fournie par Dr. Belhadj du laboratoire de microbiologie (Université Larbi Tebessi).

Milieux de culture et inoculum

La souche a été d'abord recueillie sur gélose sabouraud pendant une semaine, puis un repiquage d'un disque mycélien de la culture pure précédente, au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA: milieu pour la conservation et l'étude de la sensibilité des champignons vis-à-vis notre huile essentielle. La boîte sera incubée à 28 °C pendant 5 à 7 jours.

Technique de dilution en milieu solide

Principe : La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antifongique (HE) dans un milieu gélosé à des concentrations variables, suivie de l'ensemencement d'un inoculum fongique défini à la surface de la gélose dans le but de déterminer le taux d'inhibition (**El Kalamouni, 2010**).

Mode opératoire : L'activité antifongique de huile essentielle est testée contre *l'aspergillus niger* par la technique de contact direct (**Singh et al., 2008**).

- L'huile essentielle est préparée par dilution de 10, 20, 30, 40 et 50 µl dans 500 µl de DMSO.
- Des concentrations finales de 1, 2, 3, 4, et 5 µl/ml de l'huile essentielle est obtenue par addition de 0.5 ml de solutions préalablement préparées dans un tube contenant 9.5 ml du milieu PDA à une température comprise entre 45 et 50°C.
- Après homogénéisation à l'aide d'un vortex, le contenu des tubes est coulé dans des boîtes de Pétri. On laisse sécher les boîtes pendant 15 à 20 min.
- Une boîte de Pétri contenant 10 ml de milieu PDA sans huile essentielle est utilisée comme contrôle négatif.

Inoculation

Un disque mycélien de 5 mm de diamètre, coupé de la périphérie de la pré-culture de 5 jours, est inoculé de manière aseptique dans le centre de chaque boîte de Pétri.

Incubation

Toutes les boîtes de Pétri sont scellées puis incubées à 28 °C pendant 9 jours.

Expression des résultats

L'efficacité du traitement est évaluée quotidiennement pendant neuf jours en mesurant la moyenne des deux diamètres perpendiculaires de chaque colonie.

□ **Le pourcentage d'inhibition** de la croissance par rapport au témoin, est calculé au 9^{ème} jour, en utilisant la formule suivante (**Albuquerque *et al.*, 2006**).

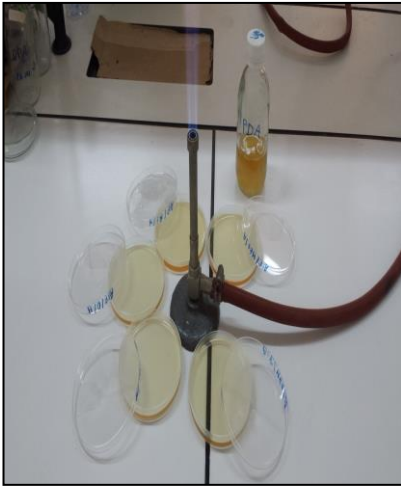
$$\% \text{ d'inhibition mycélienne} = [(dc - dt) / dc] \times 100$$

dc : le diamètre de la croissance mycélienne du contrôle négatif

dt : le diamètre de la croissance mycélienne en présence du traitement à l'huile essentielle

□ **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)** : la plus faible concentration en huile essentielle qui a complètement inhibé la croissance du champignon après neuf jours d'incubation est considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Etape 1	Le repiquage
----------------	---------------------



Etape 2	Inoculation d'un disque mycélien sur PDA contenant des concentrations différentes de l'huile essentielle
----------------	---



Figure 22: Galerie de photos résumant l'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle

Chapitre 4

Résultats et Discussion

4. Résultats et discussion

4.1. Caractéristiques organoleptiques et propriétés physico-chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

L'extraction par hydro-distillation réalisée sur un échantillon de 600g de Romarin nous a fournis une huile essentielle liquide limpide à température ambiante, très aromatique avec une odeur caractéristique champêtre et de couleur jaune claire.

Tableau 06 : Caractéristiques physico-chimique de l'huile essentielle extraite à partir de *Rosmarinus officinalis*

Propriétés	Valeurs obtenues	Norme (Leplat, 2017)
Rendement (%)	0.83	0.5-2
pH	6	5-6
densité (g/cm ³)	0.9	0.895-0.920
Indice de réfraction	1.47	1.464 – 1.473

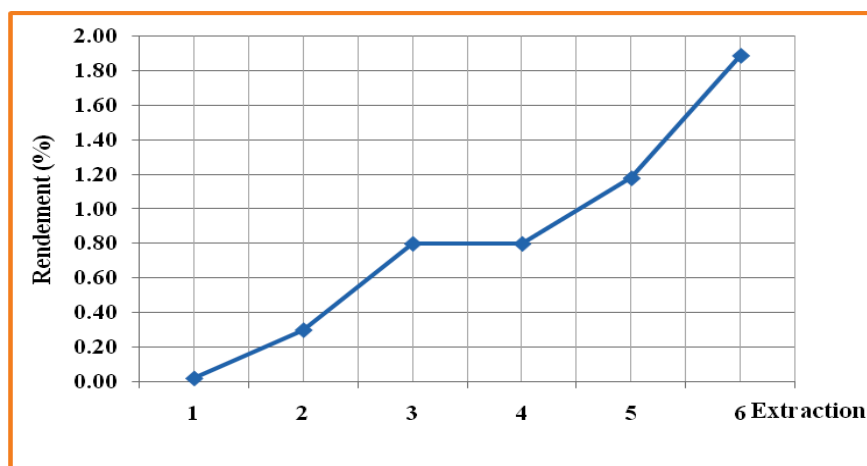


Figure 23 : Rendement en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* obtenue par hydro-distillation

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) étaient autre fois les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle, mais comme ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises. La densité relative et l'indice de réfraction sont des paramètres d'identification qualitative très important permettant d'évaluer la pureté des huiles essentielles (Hellal, 2011). Les résultats obtenus indiquent que les caractéristiques organoleptiques et les propriétés physicochimiques de l'échantillon analysé oscillent dans des intervalles comparables aux normes, témoignant ainsi la bonne qualité de notre huile essentielle (Belkhiri ; AFNOR).

Le rendement moyen en huile essentielle, calculé en fonction de la matière végétale sèche, a fourni un taux d'environ 0.83%. Cette valeur est conforme avec les normes AFNOR comprise entre 0.5 à 2% mais reste relativement inférieure à celui obtenu par **Makhloufi, 2013** (1.8%). **Atik Bekkara et al. (2007)** ont mentionné des rendements en HE des feuilles et fleurs du romarin cultivé et sauvage allant de 0.6% et 0.8 % respectivement. **Djeddi et al. (2007)** ont évalué une teneur en huile essentielle de parties aériennes fraîches récolté au stade de la floraison dans une zone à climat subhumide de 0,82 %. Cette différence est peut être attribuée à plusieurs facteurs citons parmi lesquels les conditions climatiques et environnementales, la situation géographique, la période de la cueillette, la durée de séchage et le procédé d'extraction (**Silano et Delbò, 2008 ; Marzoukia et al., 2009 ; Jamshidi et al., 2009 ; Bousbia et al., 2009 ; Aprotosoiaie et al., 2010 ; Olle et Bender, 2010 ; Zaouali et al., 2010 ; Ojeda-Sana et al., 2013**). D'après (**Lagunez Rivera, 2006**) l'hydrolat contient toujours des gouttelettes que nous n'avons pas pu les récupérer ce qui peut fausserait le rendement.

4.2. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de *R. officinalis*

La composition de nombreuses huiles essentielles a été décrite dans la littérature, et est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM), malheureusement, pour des raisons technique, on a pu réaliser une CPG/FID uniquement. Pour chacun des composants, les indices de rétention sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane. L'ensemble des résultats est indiqués dans le tableau 07

Tableau 07: Composition de l'huile essentielle de romarin obtenue par hydro-distillation

N°	TR (min)	IR	Constituant
1	8.750	1026	Cinéole <1 ,8>
2	20.920	1132	Linalool
3	21.540	1141	Camphre
4	25.840	1301	Terpenyl acétate
5	29.033	1241	Carvacol, méthyl ether
6	30.180	1263	Geranial
7	30.570	1268	Thujanol acétate
8	31.140	1276	Cadinene ether 5trans
9	32.290	1393	Phenyl ethyl isobutanoate
10	33.620	1312	Verbanol acétate
11	33.677	1313	Bisabolodien 4ol

Nous constatons que notre échantillon est riche en monoterpènes, sesquiterpènes avec la présence de groupement chimique différents (**Ether**= Cinéole ; **Alcool** = Linalool, Thujanol ; **Aldéhyde** = Géraniol ; **phénol** = Carvacrol ; **Cétone**= Camphre..).

Plusieurs études récentes ont montré que la variabilité de la composition et du rendement en huile essentielle de romarin est due à des facteurs intrinsèques (génétique, sous-espèces et âge de la plantation) ou à des facteurs extrinsèques comme le climat et les conditions de culture (origine géographique) ou à la méthode d'extraction (**Delaquis et al., 2002 ; Gonny et al., 2004 ; Burt, 2004**).

Différentes espèces de romarin existent dans le monde : *R. officinalis*, *R. erivocaly*, *R. laxiflorus* et *R. lavandulaceus* ; Cependant, *R. officinalis* est l'espèce la plus répandue dans le bassin méditerranéen. **Varela et al. (2009)**, ont étudié 87 populations spontanées de *R. officinalis* collectées en Espagne et les ont classées en prenant en considération la composition chimique de leurs huiles essentielles. Parmi tous les échantillons, trente-huit (38) d'entre eux ont une teneur élevée en 1,8 cinéole (> 24%); six populations ont présenté un rapport 1,8 Cinéole / linalol élevé ; trois échantillons ont une teneur élevée en linalol, et seulement deux échantillons présentent des teneurs élevées en verbénone ($\approx 5\%$).

Par ailleurs, **Boutabia et al. (2016)**, montrent dans leurs études effectuées sur le romarin prélevé de la région de Hammamet Tébessa que le 1,8 cinéole est le chémotype majoritaire, confirmant ainsi nos résultats.

Cependant, la composition chimique de l'huile essentielle de *R. officinalis* de la région de Tlemcen montre quelques différences par rapport à certains travaux. Dans la région de Bibans (Alger), le composé majoritaire est le 1,8-cinéole (52.4%), suivi du camphre (12.6%) (**Boutekdjiret et al., 1998**), alors qu'un autre échantillon montre une grande variabilité quantitative en fonction de l'état de la plante (1,8-cinéole = 41.7-16.0%, camphre = 26.0-9.3%, α -pinène = 16.9-2.5%) (**Boutekdjiret et al., 1999**). Un échantillon provenant de Bordj-Bou-Arreidj ne contient que 7,5% de cinéole à côté du camphre (12,1%), du bornéol (10,1%), de l' α -terpinéol (9,5%) et surtout du (E)- β -caryophyllène (13,9%) (**Benhabiles et Aït-Amar, 2001**).

Comparativement, les romarins marocains présentent une teneur importante de l'un des trois composés α -pinène (37,0-40,0%, Rabat), cinéole (58,7-63,7%, El Ateuf), camphre (41,7-53,8%, Taforhalt) (**Elamrani et al., 2000**). Le romarin de Tunisie est également riche en cinéole (40,1-55,1%) et contient aussi les monoterpènes habituels (**Lawrence, 1997**). Par contre, en Egypte, on trouve deux compositions, l'une dominée classiquement par le camphre, l' α -pinène et le cinéole, l'autre riche en verbénone et en camphre (**Soliman et al., 1994**).

4.3. Evaluation de l'activité antioxydante, teste de piégeage du radical libre DPPH

Le dommage oxydatif peut avoir des effets indésirables sur les aliments tels que la production d'odeurs et de saveurs rances qui peuvent réduire la durée de vie, la qualité nutritionnelle et la sécurité des produits alimentaires. Afin de réduire le risque de détérioration par oxydation, des antioxydants synthétiques sont ajoutés à de nombreux produits alimentaires. Cependant, en raison de problèmes de sécurité et de la demande des consommateurs, il existe un intérêt considérable pour le remplacement des antioxydants synthétiques par des alternatives à base de végétaux (herbes et épices notamment). Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales (Yanishlieva *et al.*, 2006).

L'activité antiradicalaire a été estimée spectrophotométriquement en suivant la réduction de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH qui s'accompagne par le passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm. A des fins comparatives un antioxydant standard a été utilisé : le BHT. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes exponentielles illustrées dans la figure 24.

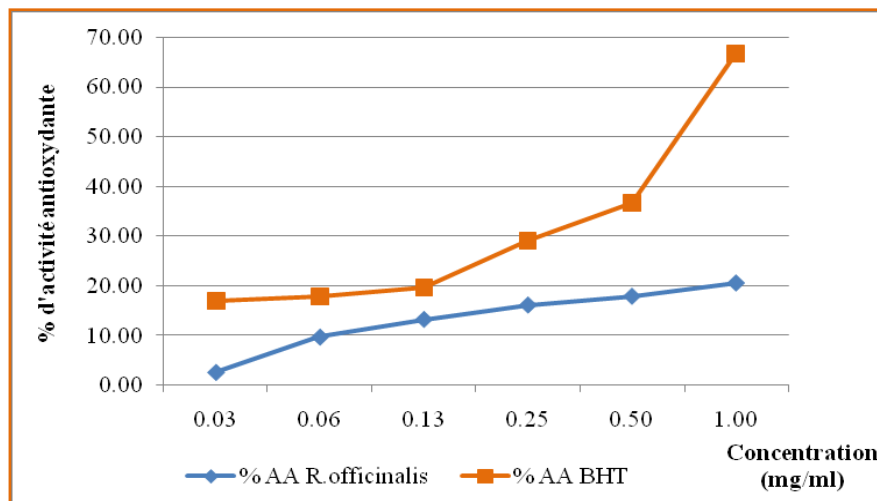


Figure 24: Pourcentage d'inhibition de l'HE et BHT

On constate que l'huile essentielle exerce une activité inhibitrice modeste et reste significativement inférieure ($P = 0.03$) par rapport au BHT.

A partir de ces courbes nous pouvons déterminer la valeur de l' IC_{50} , qui est défini comme la concentration de substrat qui cause une perte de 50% de l'activité DPPH, plus cette valeur est petite, l'extrait possède une bonne activité antioxydante. Les résultats sont rapportés dans le tableau 08

Tableau 08: Résultats IC₅₀ de l'huile essentielle «*Rosmarinus officinalis*» et le BHT

Extrait	IC ₅₀ (mg/ml)
Huile essentielle	27.12 ± 0.08
Antioxydant standard	0.6152 ± 0.14

Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa solubilité, simplicité de l'analyse et sensibilité à détecter les composants actifs à des basses concentrations (**Bozin et al., 2008**). L'intensité de cette couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu fournisseur de protons (**Maisuthiasakul et al., 2007**).

Les résultats montrent que le pourcentage d'inhibition est fortement dépendant des concentrations en substrat, et ce pour l'huile essentielle ainsi que le BHT. Plus précisément, l'augmentation en concentration de l'échantillon provoque l'élévation de pourcentage d'inhibition du radical libre et par conséquent l'augmentation de l'activité antiradicalaire. La capacité antioxydante d'une huile essentielle est largement dépendante des constituants phénoliques (**Nieto et al., 2011**). De nombreuses épreuves ont été rapportées dans la littérature pour expliquer la relation structure-activité de certains composés naturels (**Es-Safi et al., 2006**). Il a été proposé que l'activité antioxydante est en relation avec le nombre et la position des groupements hydroxyles sur le noyau des flavonoïdes (**Es-Safi et al., 2006 ; Sawa et al., 2009**).

Hussain et al. (2010) montrent que l'IC₅₀ d'HE du romarin est de 20.9µg/ml (0.02mg/ml) c'est une très forte capacité antiradicalaire par rapport à notre résultat, on note que cette HE est extraite des feuilles de romarin cultivé au Pakistan et récolté pendant l'hiver; cette différence peut être due à un facteur géographique et climatique (**Hernandez et al., 2009**).

Le profil d'activité antiradicalaire obtenue révèle que notre huile essentielle est moins efficace et inférieur à celui de l'antioxydant standard, avec des valeurs d'IC₅₀ égale à 27.12 et un indice d'activité inférieur à 0,5.

4.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Dans la mesure où les huiles essentielles vont être soumises aux essais biologiques, l'utilisation d'un solvant approprié est primordiale. Effectivement, la toxicité du solvant vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques peut être critique. Même à l'état de trace le solvant ne devrait pas entraver la procédure du test biologique. Une attention particulière devrait

également être accordée aux interactions possibles entre le solvant et les solutés, car le solvant peut réagir avec certains composés de l'huile essentielle et causer la décomposition, la déshydratation ou l'isomérisation de ces composés (Yrjönen, 2004).

Dans cette étude, notre choix s'est porté sur le diméthylsulfoxyde (DMSO), fréquemment utilisé dans les études en microbiologie. Il a subi un test préliminaire dans le but de connaître leur effet vis-à-vis l'huile essentielle et les souches microbiennes testées. Il s'est avéré sans danger pour les microorganismes et n'interfererait donc pas dans la lecture des résultats et en plus il n'a engendré aucune cristallisation ou décomposition de HE.

4.4.1. Activité antifongique

L'interprétation des résultats est basée sur la mesure de la poussé fongique. Cette lecture est effectuée par comparaison avec une boîte témoin réalisée dans les mêmes conditions que les boîtes à tester.

La figure 25 démontre la croissance mycélienne (mesure journalière du diamètre (mm)) en fonction de la concentration en HE et la période d'incubation.

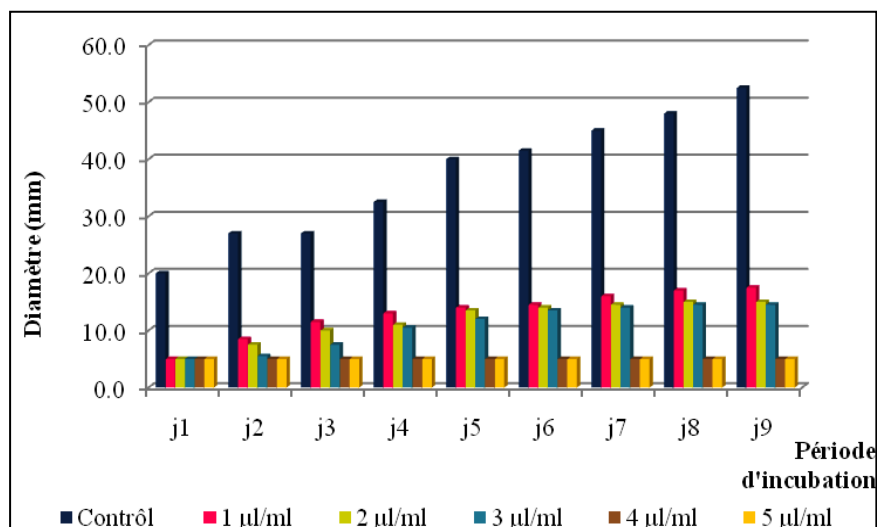


Figure 25: Effet de l'huile essentielle sur la croissance de *Aspergillus niger*

L'analyse des résultats montrent une croissance mycélienne considérable en fonction du temps d'incubation dans la boîte témoin. En revanche, la croissance est réduite considérablement voir inhibé à partir de la concentration 04 µl/ml en HE. Ces résultats corroborent les travaux de (khia et al., 2014).

Pour mieux appréhender l'effet antifongique de l'huile essentielle de *R. officinalis*, un tableau des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne en fonction des concentrations a été réalisé.

Tableau 09 : Pourcentage d'inhibition mycélienne

Concentration ($\mu\text{l/ml}$)	Pourcentage d'inhibition mycélienne (%)
1	66.66
2	71.42
3	72.38
4	100.0
5	100.0

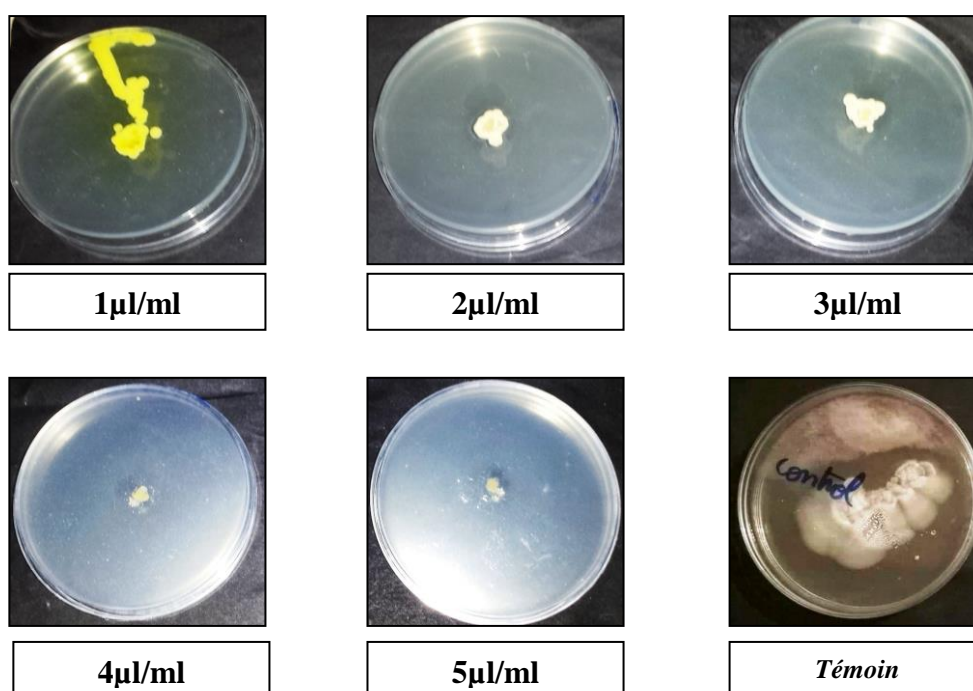


Figure 26 : Galerie de photos présentant les résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *R. officinalis* L.

Les agents antifongiques synthétiques sont appliqués à grande échelle pour empêcher la croissance mycélienne. Ces produits chimiques sont également connus pour posséder des propriétés cancérogènes, tératogéniques, oncogènes et génotoxiques (Nagendra *et al.*, 2010). La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières : la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote (Chami, 2005) et d'autre part, les molécules antifongiques elles-mêmes qui peuvent engendrer des résistances (Prasad et Kapoor, 2004 ; Nagendra *et al.*, 2010). Les huiles essentielles peuvent être utiles en tant qu'agents antifongiques parce qu'elles affectent plusieurs cibles simultanément et il n'y a aucun rapport

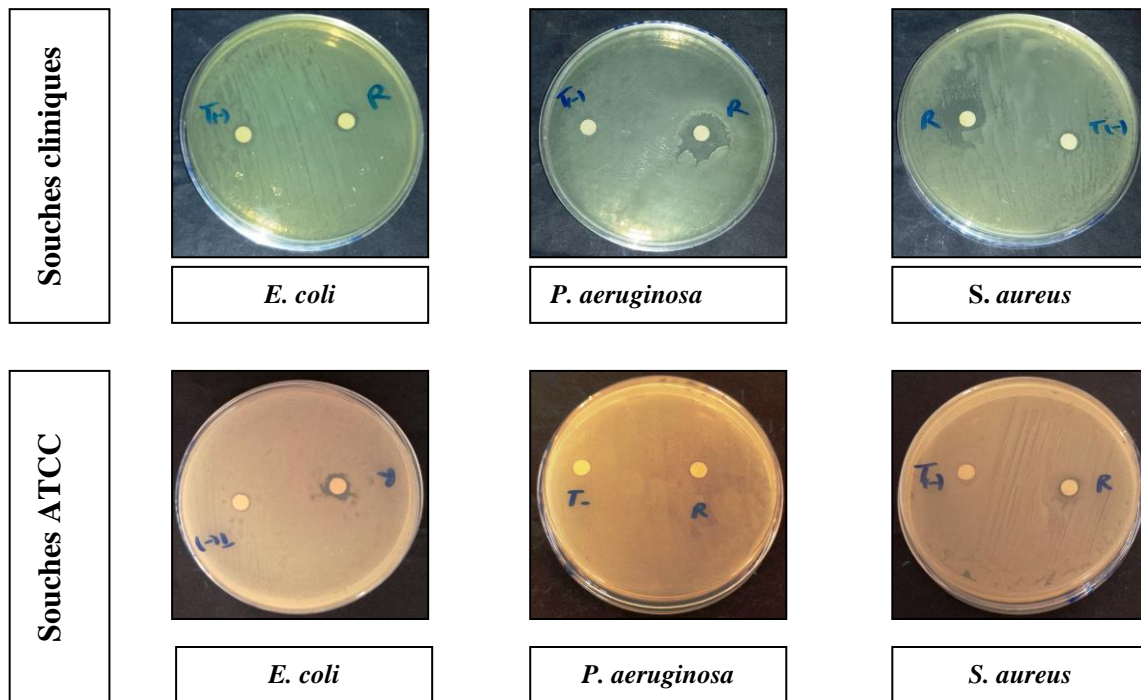


Figure 27: Galerie de photos présentant les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *R. officinalis* L.

A l'issue des résultats obtenus dans le tableau 11 il ressort que les bactéries examinées sont sensibles à l'huile pure. Par contre, ces germes ont une sensibilité relative vis-à-vis des dilutions préparées.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) ont été réalisées par la méthode de dilution sur gélose afin de préciser le caractère bactériostatique ou bactéricide de l'huile essentielle sélectionnée.

Tableau 11: Détermination de la CMI de l'huile essentielle de *R. officinalis* L. sur les souches testées.

N	Bactérie	G	origine	2.5 µl/ml	5 µl/ml	10 µl/ml	25 µl/ml	CMB µl/ml	CMB/ CMI
1	<i>P.aeruginosa</i>	-	Clin	+	-	-	-	5	1
2	<i>S. aureus</i>	+	Clin	++	+	-	-	10	1
3	<i>Ecoli</i>	-	Clin	++	+	+	-	25	1
4	<i>Ecoli</i>	-	ATCC	+++	+++	+++	++	> à 25	ND
5	<i>S. aureus</i>	+	ATCC	++	++	+	-	25	1
6	<i>P.aeruginosa</i>	-	ATCC	+++	+++	+++	++	> à 25	ND

ND : non définit

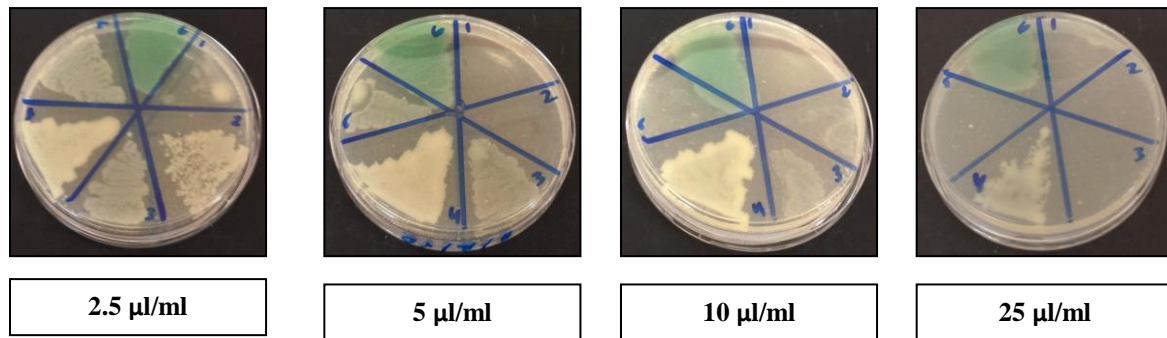


Figure 28: Test de détermination de la CMI et de la CMB de l'huile essentielle sur les souches bactériennes testées

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. Ce rapport s'est égale à 1 (<4) sur au moins quatre des souches étudiées, notre huile essentielle semble exercer une action bactéricide sur les bactéries testées.

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1955). Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (**Burt, 2004**). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (**Burt, 2004**). Il existe cependant quelques exceptions. La bactérie reconnue comme la moins sensible à leurs effets reste néanmoins la bactérie Gram négative *P. aeruginosa* (**Dorman et Deans, 2000**), cela permet de confirmer les résultats obtenu.

La structure chimique des constituants des huiles essentielles influence directement leur activité. Les groupements fonctionnels, comme les acétates, contribuent à accroître l'activité des molécules antibactériennes contre un grand nombre de bactéries Gram positives et Gram négatives (**Dorman et Deans, 2000**). Notre huile essentielle contient effectivement le terpinyl d'acétate. Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels (**Kalemba et Kunicka, 2003**) notre huile s'est avérée riche en thujopsene, bisabolodien-4ol et sesquisabinene hydrate.

Plusieurs auteurs ont rapporté que certains composés présents dans les extraits du romarin possèdent des propriétés antibactériennes (**Georgantelis et al., 2007**). **Yesil-Celiktas et al. (2007)** ont testé l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques du romarin, rassemblé de trois différentes régions et pendant quatre intervalles de l'année. Leurs résultats ont indiqué que les bactéries testées étaient sensibles aux huiles essentielles, partiellement aux extraits méthanoliques et que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles diffèrent selon les variations régionales et saisonnières.

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (**Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004**). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires.

La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (**Sikkema et al., 1994**). Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires (**Carson et al., 2002 ; Ultee et al., 2002**) et un blocage de la phosphorylation oxydative qui représente la source de la vie respiratoire (**Rhayour, 2002**). Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire.

Conclusion

Conclusion

Les plantes sont utilisées depuis l'antiquité par l'homme pour traiter divers maladies. Ces végétaux ont l'avantage d'être constitués d'un éventail de composés potentiels, de structures chimiques variées ayant de nombreuses activités biologiques. Actuellement, le développement de la résistance bactérienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement dans les plantes aromatiques et médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels comme polyphénols.

Parmi une multitude de choix, nous avons choisi d'étudier le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), qui a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique et agro-alimentaire. Ce travail entre dans le cadre générale de la valorisation des plantes médicinales, son objectif vise à déterminer ces propriétés biologiques.

L'huile essentielle de romarin, recueilli de seraidi à Annaba, a été extraite par hydrodistillation, le rendement obtenu est de l'ordre de 0,83%. L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode de réduction du radical DPPH témoignant une activité modérée de notre huile essentielle par apport au BHT utilisé comme antioxydant de référence. Le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle a été testé sur sept germes microbiens soit, six souches bactériennes dont trois sont de référence et trois autres sont clinique (*Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*), et un champignon (*Aspergillus niger*). Notre huile s'est avérée bactéricide et antifongique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 1995.

Adersen A., Gauguin B., Gudiksen L., Jäger AK. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal Ethnopharmacol* 2006 ; 104:418-422.

Association française de normalisation (AFNOR). Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1) – Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2. Volumes 1 et 2). Mars 2000.

AFNORNF T 75-006, huile essentielle. Association française de normalisation. Paris. pp559-563.

Ait Mbarek L., Ait Mouse H., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A., Ziyad A. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz. Journal of Medecin and Biological Research* 2007 ; 40 : 839-847.

Albuquerque CC., Camara TR., Marian RDR., Willadino L., Marcelino C., Ulisses C. Antimicrobial action of the essential oi of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2006 ; 49: 527–35

Allegrini J., Bouchberg MS., Maillols H. Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et application en microbiologie. *Société de Pharmacie de Montpellier* 1973 ; 33: 73-86.

Ames BM. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radical and degenerative diseases. *Science* 1983 ; 221: 1256–1263.

Anton R., Lobstein A. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments, et huiles essentielles. Paris et Cachan : Tec&Doc, 2005, 522p.

Aprotosoae AC., Spac AD., Hancianu M., Miron A., Tanasescu VF., Dorneanu V., Stanescu U. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill). *Farmacla* 2010 ; 58 (1) : 46-54.

Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris, 1995.

Astani A., Reichling J., Schnitzler P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytotherapy Research* 2010 ; 24(5): 673-679.

Astani A., Reichling J., Schnitzler P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2009 ; 2011 :1-8

Atik bekkara F., Bousmaha L., Taleb Bendiab SA., Boti JB., Casanova J. Composition chimique de L'huile essentielle de Romarins officinalis L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & santé* 2007 ; 7 :6-11.

B

Baba Aïssa F. Les plantes médicinales en Algérie. Bouchène et Ad. Diwan éd. Alger. 1991 : 181 p.

Babar Ali, Naser Ali Al-Wabel, Saiba Shams, Aftab Ahamad, Shah Alam Khan, Firoz Anwar. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2015 ; 5(8): 601–611.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils. *Food Chemical Toxicology* 2008 ; 46: 446–475.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology* 2008 ; 46 : 446-475.

Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2016 ; 6 : 71-79.

Baser KHC., Buchbauer G. Handbook of essential oil: Science, Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis, USA 2010.

Belkhiri FZ. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *R.officinalis L.* Mémoire de Master en Génie des Procédés : Université Mohamed Khider – Biskra, 2015.

Benazzouz MA. Les huiles essentielles, importance et potentialités : Mise à jour bibliographique des dernières recherches sur leurs emplois et toxicité et analyse de la composition des huiles essentielles de quinze plantes des plus consommées au Maroc, 2011, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Mohammed V/ Faculté de Médecine et de Pharmacie -Rabat-, Rabat, 196p.

Benhabiles NEH., Aït-Amar H. Comparative study of Algeria's Rosmarinus eriocalys and R officinalis. *Perfumer & Flavorist* 2001 ; 26 (5) : 40-48.

Benjilali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaili-alaoui M., Ayadi A. Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie* 1986 ; 20 : 155-167.

Bicchi C., Liberto E., Matteodo M., Sgorbini B., Mondello L., d'Acompara Zellner B., Costa R., Rubiolo P. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour Fragrance Journal* 2008 ; 23 : 382-391.

Botineau M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris 2010, 1021-1043.

Bousbia N. Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de doctorat en chimie ; université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique ; 2011.

Bousbia N., Abert M., Ferhat M., Petitcolas E., Meklati B., Chemat F., Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry* 2009 ; 114 :355-362.

Boutabia L., Telailia S., Bouguetof I., Guenadil F., Chefrou A. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 2016 ; 85 : 174 - 189.

Boutekedjiret C., Belabbes R., Bentahar F., Bessière JM. Study of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil and composition as a function of the plant life cycle. *Journal of essential oil research* 1999 ;11 : 238-240.

Boutekedjiret C., Bentahar F., Belabbes R., Bessière JM. The essential oils from *Rosmarinus officinalis* L. in Algeria. *Journal of essential oil research* 1998 ; 10 : 680-682.

Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L.) essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007 ; 55:7879–7885.

Bozin B., Mimica-Dukic N., Bogavac M., Suvajdzic LJ., Simin N., Samojlik I., Couladis M. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Bekker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* scheele essential oils. *Molecules* 2008 ;13(9):2058-2068.

Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 1995; 28: 25-30.

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4^{ème} éd. Tec & Doc, Lavoisier, Paris 2009.

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^{ème} éd. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris 1999.

Buchanan BB., Gruissem W., Jones RL. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists: Rockville maryland, USA 2000: 1367p.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 2004 ; 94 : 223-253.

C

Cakir A., Kordali S., Zengin H., Izumi S., Hirata T. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour and Fragrance Journal* 2004 ; 19 (1) : 62-68.

Calabrese V., Scapagnini G., Catalano C., Dinotta F., Geraci D., Morganti P. Biochemical studies of a natural antioxidant isolated from rosemary and its application in cosmetic dermatology. *International journal of tissue reactions* 2000 ; 22: 5–13.

Canillac N., Mourey A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* 2001 ; 18(3) : 261-268.

Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002 ; 46: 1914-1920.

Chaintreau A., Joulain D., Marin C., Schmidt CO., Vey M. Quantification of fragrance compounds suspected to cause skin reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003 ;51 ; 398-403.

Chami F. Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires in vivo application dans la prophylaxie et le traitement de la Candidose Vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc 2005, 266p

Cheung S., Tai J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology Reports* 2007 ; 17: 1525-1531.

Chevallier A. Larousse des plantes médicinales: Identification, préparation, soins - 500 plantes décrites - 1000 photographies. Larousse paris 2017, 336p.

Cosentino S., Tuberoso CI., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 1999 ; 29(2): 103-105.

D

Dastmalchi K., Damien Dorman HJ., Oinonen PP., Darwis Y., Laakso I., Hiltunen R. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *Food Science and technology LWT* 2008 ; 41 (3) : 391-400.

Dayal B., Purohit RM. Screening of some Indian essential oils for their antifungal activity. *flavour of india*. 1971 ; 2: 484-485.

Delaquis PJ., Stanich K., Girard B., Mazza G. Antimicrobial Activity of Individual and Mixed Fractions of Dill , Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential Oils. *International Journal of Food Microbiology* 2002 ; 74 : 101-109.

Djeddi S., Bouchenah N., Settari I., Skaltsa HD. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds* 2007 ; 43(4): 487-490.

Dorman HJD., Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 2000 ; 88: 308-316.

Drugeon HB., Le Gallou F., Caillon J. Méthodes d'étude de l'activité bactéricide. In: Courvalin P., Drugeon H., Flandrois J.P. & Goldstein F. Bactéricidie, Aspects théoriques et thérapeutiques. Ed. Maloine, Paris, 1990.

E

El Kalamouni C. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat, Toulouse, France 2010.

Elamrani A., Zsira S., Benjilali B., Berrada M. A study of Moroccan Rosemary oils. *Journal of essential oil research* 2000 ; 12 : 487-495.

Es-Safi NE., Kollmann A., Khlifi S., Ducrot PH. Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum L.* structure-activity relationship. *LWT* 2006 ; 40: 1246-1252.

Essawi T., Srour M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2000 ; 70: 343–349.

F

Figueredo G., Cabassu P., Chalchat JC., Pasquier B. Studies of Mediterranean oregano populations. VIII– chemical composition of essential oils of oreganos of various origins. *Flavour and Fragrance Journal* 2006 ; 21: 134-139.

Fontenelle ROS., Morais SM., Brito EHS., Kerntopf MR., Brilhante RSN., Cordeiro RA., Tome AR., Queiroz MGR., Nascimento NRF., Sidrim JJC., Rocha MFG. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides Cham.* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007 ;59 :934-940.

France-Ida J. Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. Info-essences, *Bulletin sur les huiles essentielles* 1996 ; 3: 5-6.

Franchomme P., Pénoël D. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur, Limoges 1990 : P445.

G

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

Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G., Georgakis S A. Effect of Rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science* 2007 ; 76(1) : 172-181.

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

Gonny M, Bradesi P et Casanova J. Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota L.* using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavour and Fragrance Journal* 2004 ; 19: 424–433.

González-Trujano ME, Peña EI, Martínez AL, Moreno J, Guevara-Fefer P, Déciga-Campos M, López-Muñoz FJ. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis L.* using three different experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 2007 ; 111:476-482.

Guba R. Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential. *International Journal of Aromatherapy* 2001 ; 11: 76-83.

Gudzić B., Djoković D., Vajs V., Palic R., Stojanović G. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum maculatum Crantz.* *Flavour and Fragrance Journal* 2002 ; 17 (5) :392-394.

Guerin-Fauble V., Carret G. L'antibiogramme, principes, méthodologies, intérêts et limites. Journées nationales GTV-INRA, Nantes, France 1999, 5-12p.

Gulluce M., Şahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia L. ssp. longifolia*. *Food Chemistry* 2007 ; 103: 1449-1456.

H

Haloui M., Louedec L., Michel Jb. Lyoussi B. Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. *Journal of Ethnopharmacology* 2000 ; 71: 465 – 472.

Heinrich M., Kufer J., Leonti M., Pardo-de-Santayana M. Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. *Journal of Ethnopharmacology* 2006 ; 107: 157-160

Hellal Z. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Applications sur la sardine (*Sardina pilchardus*), Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 2011.

Hernandez E., Ponce-Alquicira E., Flores j., Legarreta G. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) and oregano (*Origanum vulgare L.*) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science* 2009 ; 81 : 410-417.

Hossain MA., Ismail Z., Rahman A., Kang SC. Chemical composition and antifungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Industrial Crops And Products* 2008 ; 2(7) : 328-334.

Hussain AI., Anwar F., Ali Shahid S., Mahboob S., Nigam PS. *Rosmarinus Officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *brazilian journal of microbiology* 2010 ; 41 :1070-1078.

J

Jamshidi R., Afzali Z., Afzali D. Chemical Composition of Hydrodistillation Essential Oil of Rosemary in Different Origins in Iran and Comparison with Other Countries. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 2009 ; 5 (1) :78-81.

Jean-Baptiste N., Guibourt G. Histoire naturelle des drogues simples, ou cours d'histoire naturelle professé à l'École de pharmacie de Paris, 5^{ème} édition. J-B Baillière (libraire de l'académie nationale de médecine). France 1849, 608p.

Joulain D., König WA. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, Ed. E.B.-Verlag, Hambourg, 1998.

K

Kalemba D., Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 2003 ; 10 : 813-829.

Kazazi H., Rezaei K., Ghotb-Sharif SJ., Emam-Djomeh Z., Yamini Y. Supercritical fluid extraction of flavors and fragrances from (*Hyssopus officinalis L.*) cultivated in Iran. *Food Chemistry* 2007 ; 105 : 805–811.

Khia A., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Aberchane M., Quaboul B., Chaouch A., Amusant N., Charrouf Z. Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. du Maroc. *Phytothérapie* 2014 ; 12:341-347.

König WA., Hochmuth DH., Joulain D. Terpenoids and related constituents of essential oils, University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany, 2001.

Kováts E. Gas Chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, in *Advances in Chromatography* 1965 ; 7 : 229-247.

L

Lagunez Rivera L. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffent par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat N 2360. Institut National polytechnique de Toulouse 2006, 64p.

Lardry JM., Haberkorn V. Les Huiles Essentielles : principes d'utilisation. *Kinesitherapy Reviews* 2007 ; 61: 18-23.

Lawrence B.M. In: **Rosemary Oil in essential oils.** Allured Publishing Corporation, Carol Stream. 1976-77, 34; 1979-80, 50; 1981-87, 60, 115, 179; 1988-91, 49, 136; 1992-94, 6.

Lawrence BM. Progress in essential oils, Rosemary Oil. *Perfumer & Flavorist* 1997 : 22 (5), 71.

Leplat M. Le Romarin, *Rosmarinus officinalis* L., une Lamiacée médicinale de la garrigue provençale. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de pharmacie de Marseille 2017, 230p.

Luque de Castro MD., Jiménez CMM., Fernández P. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends in Analytical Chemistry* 1999 ; 18(11): 708-716.

M

Maisuthiasakul P., Pasuk S., Ritthiruangdej P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food composition and analysis* 2007 ; 21: 229-240.

Makhloufi A. 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. Thèse de doctorat en Microbiologie et sécurité sanitaire des aliments. Université Aboubaker Belkaid 2013, 166p.

Marzoukia H., Elaissib A., khaldic A., Bouzidd S., Falconerie D., Marongiu B., Pirasa A., Porcedda S. Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L.essential oil from Tunisia. *The Open Natural products Journal* 2009 ;2 : 86-91.

Mayachiew P., Devahastin S. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology* 2008 ; 41 :1153-1159.

McVicar J. La passion des herbes : aromatiques, culinaires, médicinales, cosmétiques et comment les cultiver. 3e ed. revue et augmentée. Guy Saint Jean ed., Québec 2010, 304p.

Miguel MG. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A Short Review. *Molecules* 2010 ; 15: 9252-9287.

Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 2004 ; 26(2) : 211-219.

Müller-Riebau FJ., Berger BM., Yegen O., Cakir C. Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1997 ; 45: 4821–4825.

N

Nagendra PMN., Shankara BS., Sreenivasa MY. Antifungal activity of essential oils against *Phomopsis azadirachtae*- the causative agent of die-back disease of neem. *Journal of Agricultural Technology* 2010 ; 6 (1): 127-133.

Naggar M., Iharchine K. Pour une approche d'aménagement et de gestion durable des territoires à romarin dans la région de l'Oriental (Maroc). *Forêt méditerranéenne* 2016 ; 37(1) : 63-70.

Nieto G., Huvaere K., Skibsted LH. Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system. *European Food Research and Technology* 2011 ; 233 : 11-18.

O

Ojeda-Sana A M., van Baren C M., Elechosa AM., Juárez MA., Moreno S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control* 2013 ; 3 : 189-195.

Olle M., Bender I. The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research* 2010 ; 8(3) : 687-696.

Ouraini D., Agoumil A., Ismaïli-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y., Alaoui M., Bellabas MA. Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus satureioides* et de *Mentha pulegium L.*, comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytothérapie* 2007 ; 1 : 6-14.

P

Paré J. Procédé assisté par micro-ondes. Info-essences, *Bulletin sur les huiles essentielles* 1997 ; 4: 4.

Paris M., Hurabielle M. Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome 1: généralités, monographies. Ed. Masson, Paris 1981.

Pellerin P. Extraction par le CO₂ à l'état supercritique. *Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique* 2001 ; 94 : 51-62.

Pibiri MC. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. 2006. thèse de doctorat, EPFL, Lausanne, Suisse.

Ponce A., Fritz R., Del Valle C., Roura S. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology* 2003 ; 36 : 679-684.

Ponce AG., Roura SI., Del Valle CE., Moreira MR. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. *Postharvest Biology and Technology* 2008 ; 49: 294– 300.

Prasad R., Kapoor K. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *International Review of Cytology* 2004 ; 242: 215-248.

Praveen D., Sharmishtha P. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants Against Multi-drug Resistant Bacteria from Clinical Isolates. *Indian Journal of Pharmacology Sciences* 2012 ; 74(5): 443–450.

Prévosto B., Reque J., Ripert C., Gavinet J., Estève R., Lopez J.M., Guerra F. Semer les chênes méditerranéens (*Quercus ilex*, *Quercus pubescens*) : pourquoi, comment et avec quelle réussite ? *Forêt Méditerranéenne* 2015, 36 (1) : 3-16.

Q

Quezel P., Santa S. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, CNRS, Paris, 1963 : 600p.

R

Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 2008 ; 122 ; 135-9.

Rhayour K. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc 2002.

S

Sardans J., Rodà F., Peñuelas J. Effects of water and a nutrient pulse supply on *Rosmarinus officinalis* growth, nutrient content and flowering in the field. *Environmental and Experimental Botany* 2005 ; 53 : 1 – 11.

Sawa T., Nakao M., Akaike T., Ono L., Maeda H. Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the antitumor promoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999 ; 47: 397-402.

Scherer R., Godoy HT. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* 2009 ; 112: 654-658.

Shunying Z., Yang Y., Huaidong Y., Yue Y. and Guolin Z. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *Journal of Ethnopharmacology* 2005 ;96 :151-158.

Sikkema J., de Bont JAM., Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 1994 ; 269: 8022-8028.

Silano V., Delbó M. Assessment report on *Foeniculum vulgare* Miller. EMEA, European Medicines Agency. London (2008); 23p.

Singh P., Srivastava B., Kumar A., Kumar R., Dubey N.K. & Gupta R. Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2008 ; 88: 2421-2425.

Skoog DA., Holler FJ., Nieman TA. Principes d'analyse instrumentale. 1 éd. Ed. De Boeck Université, Bruxelles 2003.

Soliman FM., Kashoury EA., Fathy MM., Gonaïd MH. Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. from Egypt. *Flavour and Fragrance Journal* 1994 ; 9 : 29-33.

Su YC., Ho CL., Wang IC., Chang ST. Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalypts. *Taiwan Journal of Forest Science* 2006 ; 21 (1): 49-61.

T

Takao T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A., Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1994 ; 58(10): 1780-1783.

Teisseire PJ. Chimie des substances odorantes. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris 1991.

Tharib SM., Gnan SO., Veitch GBA. Antimicrobial activity of compounds from *Artemisia campestris*. *Journal of Food Protection* 1983 ; 46: 681-685.

Tongnuanchan P., Benjaku S. Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation, 2014, *Journal of Food Science* Vol. 79, Nr. 7

Tsai PJ., Tsai TH., Ho SC. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sodrinus* . *Food chemistry* 2007 ; 105 : 311–316

Tyler VE., Brady LR., Robbers JE. Pharmacognosy. Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 1976 : 171 p.

U

Ultee A., Bennik MH., Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 2002 ;68: 1561-1568.

V

Van Den Dool H., Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *Journal of Chromatography* 1963 ; 11 : 463-471.

Varela F., Navarrete P., Cristobal R., Fanlo M., Melereo R., Sotomayor J. A., Jordán M.J., Cabot P., Sanchez de Ron D., Calvo R. & Cases A. Variability in the chemical composition of wild *Rosmarinus officinalis* L. *Acta Horticulturae* 2009 ; 826: 167-174.

Ventura-Martínez R., Rivero-Osorno O., Gómez C., González-Trujano ME. Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. *Journal of Ethnopharmacology* 2011;137 : 1528–1532.

W

Wang W., Wu N., Zu YG., Fu YJ. Antioxydative activity of *Rosemarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food chemistry* 2008 ; 108: 1019-1022.

Weckesser S., Engel K., Simon-Haarhaus B., Wittmer A., Pelz K., Schempp CM. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. *Phytomedicine* 2007 ; 14(7-8):508-516.

Wilkinson JM. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. *Modern phytomedicine: turning medicinal plants into drugs* 2006 ; 157-171.

Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 2003 ; 64: 3-19.

Webographie

Web1:https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/118865/tab/taxo [31.05.2019].

Web2 :<http://tpehuilesessentiellesetsante.e-monsite.com> [12.04.2019].

Web3 :http://fr.labo-hevea.com/downloads/HE_fr.pdf [31.05.2019]

Web4 :https://fr.wikipedia.org/wiki/Liste_de_plantes_r%C3%A9pulsives [27.05.2019].

Web5 : https://satellites.pro/carte_de_1-Algerie#36.842537,7.477570,11 [01.05.2019]

Web6 : <https://fr.climate-data.org/afrique/algerie/annaba/seraidi-523643/> [01.05.2019]

Y

Yanishlieva NV., Marinova E., Pokorný J. Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2006 ; 108 : 776-793.

Yanishlieva NV., Marinova EM., Gordon MH., Raneva VG. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food and Chemistry* 1999 ; 64: 59-66.

Yen GC., Chen HY. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 2000 ; 43: 27-32.

Yesil Celiktas O., Hames Kocabas EE., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry* 2007 ; 100: 553-559.

Yesil-Celiktas O., Hames Kocabas EE., Bedir E., Verdar Sukan F., Ozek T., Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extract and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry* 2007 ; 100: 553-559.

Yrjönen T. Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. Academic dissertation, University of Helsinki, Finlande 2004, p19.

Z

Zabeirou., Hachimou. Étude comparative entre les Huiles essentielles de la Menthe Verte (*Mentha Spicata* L.) et de la Poivree (*Mentha Piperita* L.) dans la région d'Ouargla .Mémoire de DES Biochimie —Université de Kasdi Merbbah _Ouargla pl 6. 2005

Zaouli y., bouzaine t., Boussaid M. Essential oils composition in tow *Rosmarinus Officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities .*Food and chemical toxicology* 2010 ; 48 : 3144-3152.

Zivanovic S., Chi S., Draughon AF. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science* 2005 ; 70: 45-51.

Zygodlo JA., Juliani HR. Recent progress in medicinal plants. In: Majundar D.K., Govil JN., Singh VK., Shailaja MS., Gangal SV. *Phytochemistry and Pharmacology II*, Vol. 8. Studium Press, Houston, Texas 2003: 273-281.



Université Larbi Tébessi - Tébessa

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
 Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
 Université Larbi Tébessi - Tébessa
 Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie



Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
 (à Joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : H. AOUAM MOHAMMED TAHAR

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : Biologie appliquée

N° de carte d'étudiant : 14/34023600/2014

Année universitaire : 2018/2019

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Intitulé du mémoire : Evaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle extraite à partir du romarin

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

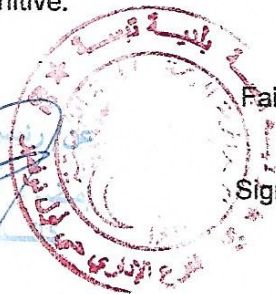
- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;

L'exclusion définitive.

2019 جويلية 07

Fait à Tébessa, le :

(Handwritten signature in blue ink)



Signature de l'étudiant(e) :

(Handwritten signature in blue ink)

Tébessa le 23/06/2019

Nom : Haouam

Prénom : Mohammed Tahar

Master en : Biochimie appliquée

Département : Biologie appliquée

Objet : Déclaration de correction mémoire

Je déclare que l'ensemble de remarques
soulevées par les membres de Jury ont été corrigées

Signature du président de Jury :

Dr. Guedri Kamilis :

