



République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعرييرج
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi - B.B.A -

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Départements des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité: Microbiologie Appliquée

Intitulé

**Contribution à l'étude de l'activité
antioxydante et antibactérienne du
Rosmarinus officinalis L.**

Présenté par:

Le: 30/09/2020

M^{lle} BACHENE Lynda

M^{lle} BENATTIA Fouzia

Devant le jury :

Président: M^{me} ZERROUG Amina

MAA(Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A)

Encadrant: MBENSOUILAH Taqiyeddine

MCB (Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A)

Examineur: M^{me} NASRI Meriem

MCB (Univ Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A)

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Mon Dieu

"Gloire à Toi ! Nous n'avons de savoir que ce que Tu nous a appris"

*Louange à Dieu, notre créateur
de nos avoir donné les forces, la volonté et le courage
afin d'accomplir ce travail modeste.*

*Nous adressons le grand remerciement à notre encadreur
BENSOUILAH Taqiyeddinequi a proposé le thème de ce mémoire,
pour ses conseils et ses directives du début à la fin de ce travail.*

*Merci aux membres du jury, M^me A. ZERROUG et M^{me} M. NASRI d'avoir
accepté de juger ce travail.*

*Finalement, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude
à tout ceux qui ont participe a réaliser ce mémoire.*

Dédicace

Je dédie ce mémoire à

L'homme le plus cher du monde, mon père rahimahou Allah

La femme la plus chère au monde, ma mère

Mes frères et mes sœurs

L'âme sœur Meriem

Mes amis à l'université

Lynda

Dédicace

*A mes parents, de toujours croire en moi et pour
ce que vous faites au quotidien pour moi.*

A mon fils «Acil»

A ma sœur « Yasmina »avec son mari et sa fille «Farah» et mes

Frères «Oussama et Wassim»

A mon cher mari: Billel

A ma seconde famille: Belarbi

*A tous de m'apporter chacun à votre manière
quelque chose dans ma vie.*

Fouzia

Résumé

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.

Le rendement des extraits et des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. varié de 10 à 25 ml/kg (soit: 1 à 2,5 %). En ce qui concerne les résultats de l'analyse par HPLC et GC-MS les principaux constituants sont l'acide rosemarique, le carnosol, le gémfibrozil, et l'acide carnosique. L'activité antioxydante a été évaluée par le biais de 3 méthodes (ABTS, FRAP et DPPH). Les résultats du test ABTS ont démontré que l'extrait du romarin a un pourcentage d'inhibition de $274 \pm 1,4$ umol Eq Trolox. Les résultats du test DPPH ont démontré que l'extrait du romarin a un pourcentage d'inhibition égal à 95,66 % avec un $IC_{50}=17,87$ ug/ml.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été étudiée vis-à-vis plusieurs souches bactériennes par la méthode de diffusion sur milieu solide. Cette dernière montre que les extraits et l'huile essentielle de romarin exerce une activité antibactérienne remarquable et que les bactéries Gram positives sont plus sensibles à l'action des extraits et l'huile que les bactéries Gram négatives.

Mots clés: *Rosmarinus officinalis* L., extraits, huiles essentielles, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

Plants have been used since ancient times by humans to treat various diseases. These plants have the advantage of being made up of a range of potential compounds, various chemical structures with many biological activities. Currently, the development of bacterial resistance to antibiotics and the toxicity of synthetic antioxidants has led researchers to draw from the plant world and particularly from aromatic and medicinal plants for their

The yield of extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. varied from 10 to 25 ml/kg (IE: 1 to 2,5 %). Regarding the results of the analysis by HPLC and GC-MS are dominated by rosmarique acid, carnosol, gemfi broziland l'acide carnosic acid.

Antioxidant activity was evaluated using 3 methods (ABTS, FRAP and DPPH). The results of the ABTS test showed that rosemary extract had an inhibition percentage of 274 1.4 umol Eq Trolox. The results of the DPPH test showed that rosemary extract has an inhibition percentage equal to 95.66% with an IC₅₀=17.87 ug/ml.

The antimicrobial activity of essential oils has been studied with regard to several bacterial and fungal strains by the solid medium diffusion method. The latter shows that extracts and essential oil of rosemary exerts a remarkable antibacterial activity to that of fungal and that Gram positive bacteria are more sensitive to the action of extracts and oils than Gram negative bacteria.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L., methanolic extract, essential oils, activity antioxidant, antimicrobial activity.

المخلص

استخدم الإنسان النباتات منذ العصور القديمة لعلاج الأمراض المختلفة. تتميز هذه النباتات بكونها تتكون من مجموعة من المركبات المحتملة ، من هياكل كيميائية مختلفة مع العديد من الأنشطة البيولوجية. في الوقت الحالي ، أدى تطوير المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية وسمية مضادات الأكسدة الاصطناعية إلى قيام الباحثين بالاعتماد على عالم النبات وخاصة النباتات العطرية والطبية لغناها بمضادات الأكسدة الطبيعية مثل البوليفينول.

تراوحت محصول مستخلصات وزيت نبات الروزمارينوس أوفيسيناليس L. من 10 إلى 25 مل / كجم (أي من 1 إلى 2.5٪) وفيما يتعلق بالفحص الكيميائي لمادة البوليفينول ، فإن العمل يشير إلى وجود مركبات الفلافونويد، العفص، السابونوزيدات، مع عدم وجود قلويدات في مستخلصات إكليل الجبل. بينما يهيمن الكاتشين والكافور على نتائج التحليل بواسطة HPLC و GC-MS.

تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة باستخدام 3 طرق (ABTS و FRAP و DPPH). أظهرت نتائج اختبار ABTS أن مستخلص إكليل الجبل يحتوي على نسبة تثبيط تبلغ 1.4 ± 274 أومول مكافئ ترولوكس. أظهرت نتائج اختبار DPPH أن مستخلص إكليل الجبل له نسبة تثبيط بنسبة 95.66٪ مع تركيز $IC_{50} = 17.87$ ميكروغرام/مل.

تمت دراسة النشاط المضاد للميكروبات للزيوت الأساسية ضد العديد من السلالات البكتيرية والفطرية بطريقة الانتشار المتوسطة الصلبة. يوضح هذا الأخير أن مستخلصات إكليل الجبل والزيوت الأساسية تمارس نشاطاً مضاداً للبكتيريا بشكل ملحوظ مقارنة بالفطريات وأن البكتيريا موجبة الجرام أكثر حساسية لعمل المستخلصات والزيوت من البكتيريا سالبة الجرام.

الكلمات المفتاحية: *Rosmarinus officinalis L.*، مستخلص ميثانولي، زيوت عطرية، نشاط مضادات الأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
---------------------------	---

Chapitre I: Généralités sur la plante

I.1. Description.....	2
I.2. Habitat.....	2
I.3. Classification.....	3
I.4. Composition.....	3
I.5. Usage thérapeutique.....	4
I.6. Indication usuelles.....	5

Chapitre II: Métabolites secondaires

II.1. Les polyphénols.....	6
II.2. Classification des polyphénols.....	6
II.2.1. Les acides phénols.....	7
II.2.1.1. Définition.....	7
II.2.1.2. Propriétés chimique et distribution.....	7
II.2.1.3. Classification.....	8
II.2.1.4. Propriétés biologiques.....	8
II.2.2. Flavonoïdes.....	9
II.2.2.1. Définition.....	9
II.2.2.2. Propriétés chimique et distribution.....	9
II.2.2.3. Classification.....	9
II.2.2.4. Propriétés biologiques.....	10
• Les anthocyanes.....	11
II.2.3. Les coumarines.....	11
II.2.3.1. Définition.....	11
II.2.3.2. Propriétés chimique et distribution.....	12

II.2.3.3.	Propriétés biologiques.....	12
II.2.4.	Les quinones.....	12
II.2.4.1.	Définition.....	12
II.2.4.2.	Propriétés chimique et distribution.....	13
II.2.4.3.	Classification.....	13
II.2.4.4.	Propriétés biologiques.....	13
II.2.5.	Les tanins.....	13
II.2.5.1.	Définition.....	13
II.2.5.2.	Propriétés chimique et distribution.....	14
II.2.5.3.	Classification.....	14
II.2.5.4.	Propriétés biologiques.....	15
II.2.6.	Les saponines.....	15
II.2.6.1.	Définition.....	15
II.2.6.2.	Propriétés chimique et distribution.....	15
II.2.6.3.	Classification.....	15
II.2.6.4.	Propriété biologiques.....	16
II.2.7.	Les alcaloïdes.....	16
II.2.7.1.	Définition.....	16
II.2.7.2.	Propriétés chimique et distribution.....	16
II.2.7.3.	Classification.....	17
II.2.7.4.	Propriétés biologiques.....	18

Chapitre III: Méthodes

1.	Préparation des extraits.....	19
1.1.	Macération aqueuse.....	19
1.2.	Extraction par les solvants.....	19
1.3.	Détermination du rendement d'extraction.....	19
2.	Les techniques d'extraction des huiles essentielles.....	20
2.1.	Entraînement à la vapeur d'eau.....	20
2.2.	Hydrodistillation.....	20
2.3.	Calcul du rendement.....	20
3.	Caractérisation des extraits.....	21
3.1.	L'Analyse par HPLC des composés phénoliques.....	21
3.2.	CG-SM des huiles essentielles.....	21
4.	Activité antioxydante.....	21

4.1.	Test au DPPH.....	21
4.1.1.	Expression des résultats.....	22
4.2.	Teste de la réduction du fer (FRAP).....	22
4.3.	Test de la capacité antioxydant en équivalent Trolox ou (ABTS).....	23
5.	Activité antimicrobienne.....	23
5.1.	Activité antibactérienne.....	23
5.1.1.	Les souches utilisées.....	23
5.1.2.	Evaluation de l'activité antibactérienne.....	23
5.2.3.	Méthode des disques par diffusion.....	24

Chapitre IV: Résultats et discussion

1.	Rendements de l'extraction des polyphénols.....	25
2.	Rendements en huile essentielle.....	25
3.	Caractérisation des extraits.....	26
3.1.	Analyse par HPLC.....	26
3.2.	CG-SM des huiles essentielles.....	27
4.	Activité antioxydante.....	28
4.1.	Test au DPPH.....	28
4.2.	Test d'ABTS.....	29
4.3.	Test au FRAP.....	29
5.	L'activité antimicrobienne.....	29
5.1.	L'activité antibactérienne.....	30
Conclusion.....		31

Résumé

Liste des abréviations

%: Pourcentage

AAR: Activité antiradicalaire

ABTS: L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

ADN: Acide désoxyribonucléique

AINS: Anti-inflammatoires non stéroïdiens

AIS: Anti-inflammatoires stéroïdiens

CG-SM: Couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse

CMB: Concentrations minimales bactéricides

CMI: Concentrations minimales inhibitrices

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DO: Densité optique

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EtOH: Extrait d'éthanol

FeCl₃: Chlorure de fer

FRAP: Teste de la réduction du fer

g: Gramme

h: Heures

HCL: Chlorhydrique

HPLC: Chromatographie en phase liquide à haute performance

IC₅₀: Quantité de substance d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la quantité de DPPH initialement présente

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

m: Mètre

Mg: Magnésium

MH: Mueller-Hinton

min: Minute

ml: Millilitre

Na₂(SO₄)₂:Sulfate de sodium anhydre

nm: Nanomètre

ORL: Oto-rhino-laryngologie

SARM:*Staphylococcus aureus* résistants au méticilline

T (°C): Température en degré Celsius

UFC: unité formant colonie

UV/vis: Ultraviolet-visible

P_a: Poids de la plante traitée

P_b: Poids de l'huile extraite

R: Rendement

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	<i>Rosmarinus officinalis</i>	2
02	Classification des polyphénols.	7
03	les structures chimiques des sous-groupes des flavonoïdes.	10
04	Structure de base des coumarines.	12
05	Structures de base des para-quinones et des ortho-quinones.	12
06	Structures chimiques typiques des tanins.	14
07	Type d'alcaloïdes et leur précurseur acide aminé.	17
08	Analyse HPLC des extraits des feuilles du romarin par différents solvants (eau, méthanol et acétone). Pic:(1) acide rosemarique; (2) carnosol; (3) gemfibrozil; (4)acide carnosique.	27

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Rendement en HE de romarin selon deux méthodes d'extraction (Wollinger et <i>al.</i> ,2016).	26

Introduction

Introduction

Depuis longtemps l'homme reconnaît et utilise les plantes pour se nourrir et pour traiter diverses maladies. Les vertus thérapeutiques des plantes ont été expérimentées depuis lors et leurs précieuses caractéristiques se sont transmises oralement de génération en génération. Les remèdes de bonne réputation ont prévalu malgré le développement de la médecine moderne qui est venue marginaliser le recours aux techniques médicales naturelles (Makhloufi, 2010). Selon Athamena (2009), connaître une plante ayant des vertus médicinales suppose pouvoir décrire sa morphologie et son anatomie, connaître son origine et son mode d'action, apprécier l'incidence de ceux-ci sur sa qualité, analyser sa composition chimique et les facteurs qui peuvent la faire varier, connaître la structure et les propriétés des principes actifs aussi bien que leur activité pharmacologique, savoir apprécier la qualité par des éléments objectifs et mettre en œuvre des méthodes pour la contrôler et enfin d'appréhender tous les problèmes liés à l'utilisation des plantes et des produits qui sont issus: indication, contre-indication, effets secondaires, interactions médicamenteuses.

Rosmarinus officinalis est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. Les extraits des huiles essentielles de cette plante sont largement utilisés, dans la médecine traditionnelle, depuis des siècles contre une multitude de maux. Aujourd'hui, le romarin est entrédans la médecine moderne.

Chapitre I

Généralité sur la plante

Chapitre I: Généralité sur la plante

I.1. Description



Figure 01: *Rosmarinus officinalis*.

Plante très connue, Le romarin est un arbrisseau vivace qui appartient à la famille des Labiées, scientifiquement, on le connaît sous le nom de *Rosmarinus officinalis*, C'est un arbuste à feuilles persistantes pouvant atteindre 2m de haut, à nombreux Rameaux dressés ou quelquefois prostrés. Il se caractérise par des fleurs qui prennent différents tons, compris entre le bleu pâle et le violet (figure 01). Le romarin est originaire du bassin méditerranéen (Hoefler, 1994).

Depuis l'Antiquité, il est employé pour améliorer et stimuler la mémoire. Le romarin est en effet considéré comme une plante tonique, revigorante, stimulante: autant de vertus que reflète sa saveur aromatique bien particulière (Iserin,2001).

I.2. Habitat

Le romarin pousse spontanément dans le sud de l'Europe. On le cultive dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps. Il apprécie les climats chauds,modérément secs.

En Algérie on trouve le romarin dans toute les communes, Garrigues, forêts claires etavec une floraison annuelle (Beloued, 2001).

Chapitre I: Généralité sur la plante

I.3. Classification

- Embranchement: Spermaphytes
- Sous-embranchement: Angiospermes
- Classe: Dicotylédones
- Sous-classe: Gamopétales
- Ordre: Tubi florales
- Sous-ordre: Lamiales
- Famille: lamiacées
- Genre: *Rosmarinus*
- Espèce: *Rosmarinus officinalis*(Hoefer,1994).

I.4. Composition

Le romarin est riche en principes actifs. Il contient des flavonoïdes, des acides phénols, notamment l'acide rosmarinique (2 à 3 %).

Les feuilles de romarin contiennent de la résine, de tanin, une substance amère et environ 1,50% d'une essence spéciale à odeur aromatique, saveur chaude et camphrée, de cinéole et de camphre ordinaire. Perrot a découvert la présence de poils sécréteurs de deux sortes dans le limbe de la feuille de romarin. Les sécrétions sont les produits du métabolisme végétal quicomprennent les huiles essentielles, les gommes et les mucilages, les tanins, les alcaloïdes, lesnectars, etc. D'autre part, Spiro et Chen rapportent que l'huile essentielle de romarin estcontenue dans des glandes épidermiques appelées trichomes, divisées essentiellement en deuxtypes principaux (peltaste et capitatae glands). Le premier type serait le site de stockagele plusimportant de l'huile essentielle de romarin. Il faut rappeler que la libération de l'huile n'est possible que si un facteur externe intervient(Zermane,2010).

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

- Huile essentielle: 1,8 cinéole, δ -pinène, camphre;
- Acides phénols: acides caféique, rosmarinique et chlorogénique;
- Diterpènes phénoliques: acide carnosoliqueetcarnosol;
- Tanins;
- Triterpènes et stéroïdes: acides oléanoliquesetursoliques;

Chapitre I: Généralité sur la plante

- Flavonoïdes glucosides de flavones simples (Brunton,1999).

I.5. Usage thérapeutique

Le romarin est composé de puissantes huiles essentielles qui lui confèrent des propriétés: digestive, stimulante, détoxiquant, diurétique, expectorante, anti-inflammatoire, antispasmodique, antinévralgique, tonique. Le romarin est recommandé aux convalescents, aux surmenés, aux dépressifs, de même qu'aux personnes sujettes aux palpitations, aux migraines, aux angoisses et aux insomnies (Zhiri et Baudoux,2006).

Il est également bienfaisant dans les cas de digestion difficile due à l'atonie des organes digestifs, qu'il tonifie tout en augmentant la sécrétion de la bile et en favorisant son évacuation.

On l'utilise également en fumigation, dans les cas d'asthme. En usage externe, on utilisera une préparation de romarin cuite dans du vin et appliquée en cataplasme sur les gonflements douloureux des entorses, sur les contusions ou les rhumatismes articulaires et on soignera les aphtes et l'amygdalite avec des bains de bouche d'une décoction de feuilles. Pour soulager les rhumatismes, on prendra un bain auquel on ajoutera une décoction de feuilles de romarin (Blanc,2010).

Le romarin a été utilisé il y a des milliers d'années pour conserver les viandes. Cette plante contient des substances chimiques très antioxydantes, tel que l'acide carnosique (1,5 et 2,5%) et de carnosol (0,3-0,4%). L'acide carnosique est également utilisée par la glande thyroïde pour produire les hormones thyroïdiennes.

Le romarin contient des composés qui préviennent la baisse de l'acétylcholine qui survient lors de la maladie d'Alzheimer. Il améliore également la circulation sanguine dans le cerveau (Kabouche,2005). Il aurait également une action contre le cancer. Lors d'étude de laboratoire, le romarin a démontré la capacité d'inhiber, chez l'humain, l'aflatoxine, un cancérigène que l'on retrouve sur de nombreux produits alimentaires destinés à l'homme ou aux animaux. Les huiles essentielles du romarin stimulent la production d'enzymes protectrices par le foie (Jhonson,1999).

Chapitre I: Généralité sur la plante

I.6. Indication usuelles

Elle est prescrite dans le soin des troubles digestifs liés à une insuffisance de la fonction biliaire: dyspepsie, crampes, ballonnements, constipation. Il peut être utilisé dans les infections bronchiques et ORL (grippe, bronchite...) et il est recommandé en cas de grande fatigue. En usage externe, il apaise les douleurs rhumatismales et inflammatoires (Cazau-beyret, 2013).

Chapitre II
Métabolites secondaires

Chapitre II: Métabolites secondaires

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. Ils possèdent des métabolites dits «secondaires» par opposition aux métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides. Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, dont plus de 200000 molécules ont été identifiées et classés selon leur appartenance chimique en composés phénoliques, alcaloïdes et terpénoïdes (Saidi, 2019).

II.1. Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production (Labioud, 2016) mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des différents domaines (Saidi, 2019). Ils sont synthétisés par les plantes, présents dans les vacuoles des tissus végétaux et contribuent à la qualité organoleptique et nutritionnelle des aliments qui en contiennent (Zemmouri, 2015). Comme la plupart des métabolites secondaires, les polyphénols sont synthétisés par les plantes afin d'accomplir certaines fonctions. Ils sont généralement impliqués dans:

- La défense contre les rayonnements ultraviolets;
- La défense contre l'agression par les pathogènes, les parasites et les prédateurs;
- La production des arômes et parfums et la contribution dans la pigmentation;
- La protection des cultures contre la peste et la germination des graines avant la récolte (Bravo, 1998; Dai et Mumper, 2010).

II.2. Classification des polyphénols

Les composés phénoliques représentent une grande famille dont la structure de base est le phénol, un cycle carbonique hydroxylé (Richard, 2012), sont divisés en plusieurs catégories: les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables (Bouchouka, 2016).

Une classification de ces substances a été proposée par Harbone (1980) (Figure 02). On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le

Chapitre II: Métabolites secondaires

nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base (Laouini, 2014).

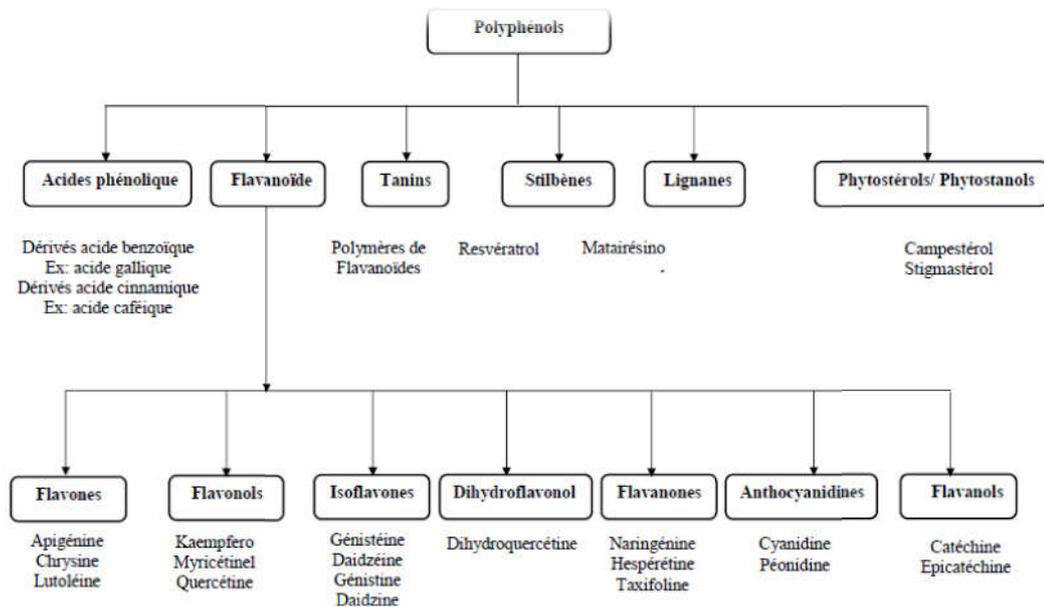


Figure 02: Classification des polyphénols.

II.2.1. Les acides phénols

II.2.1.1. Définition

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïques et cinnamiques. Certains auteurs sont cependant plus restrictifs: ils n'utilisent le terme d'acide phénol que pour les dérivés en C₆_C₁ et incluent les dérivés cinnamiques dans le groupe, plus large des phénylpropanoïdes (Bruneton, 2009).

II.2.1.2. Propriétés chimique et distribution

Ce sont des composés instables, leur extraction est à conduire sur le produit frais par de l'alcool ou une solution hydro-alcoolique (Richard, 2012). Les acides phénoliques sont des substances photochimiques, solubles en majorité dans les solvants organiques polaires pour les phénols, dans les hydrogénocarbonates pour les acides phénols et dans l'eau pour les formes hétérosides (Hamadache, 2011).

Chapitre II: Métabolites secondaires

Ces molécules semblent n'être majoritairement présentes que chez les gamopétales, en particulier chez les lamiales, les oléales et dans une moindre mesure, chez les astérales (Bruneton, 2009).

II.2.1.3. Classification

Les acides phénols sont universellement rencontrés chez les plantes. Deux sous-groupes peuvent être distingués:

1. Acides hydroxybenzoïques

Présents dans peu de végétaux de l'alimentation courante, ils sont peu étudiés. Dérivés de l'acide benzoïque, leur diversité structurale est due aux hydroxylations et/ou méthoxylations du noyau aromatique en diverses positions (Tomas-Barberan et Clifford, 2000) dont les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique (Laouini, 2014).

2. Acides hydroxycinnamiques

Sont rarement présents sous forme libre et sont retrouvés essentiellement sous une forme conjuguée. Il s'agit de dérivés glycosylés ou d'esters avec les acides quinique, tartrique ou shikimique. Très répandus dans le règne végétal, le composé le plus courant est l'acide caféique, l'acide férulique est également répandu dans les aliments (Tomas-Barberan et Clifford, 2000).

II.2.1.4. Propriétés biologiques

Le rôle physiologique et/ou écologique des acides-phénols est très mal connu. Leur intérêt thérapeutique potentiel est très limité (Abedini, 2013). Les phénols sont surtout des antiseptiques (arbutoside de la busserole), des antalgiques (dérivés salicylés de la reine des prés et du saule) et des anti-inflammatoires. Les acides phénoliques (comme l'acide rosmarinique), sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales (Deschepper, 2017).

Par ailleurs, plusieurs composés acides phénoliques sont antibactériens et antifongiques, en particulier à l'égard des organismes phytopathogènes. Les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages (Bruneton, 2009).

Chapitre II: Métabolites secondaires

II.2.2. Flavonoïdes

II.2.2.1. Définition

Le terme flavonoïde signifie jaune en latin (= flavus en latin), il désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum *et al.*, 2006). Ces composés sont présents chez les plantes supérieures et chez les plantes inférieures y compris les algues (Chaouche, 2015).

II.2.2.2. Propriétés chimique et distribution

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquitaires des plantes (Abedini, 2013) qui ont une structure de base commune composée de deux cycles aromatiques reliés par trois carbones (soit un squelette de base de 15 atomes de carbone) (Cabanel, 2013). Ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Attou, 2011). Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigments (Abedini, 2013).

Ce sont des hétérosides majoritairement hydrosolubles et solubles dans les alcools (méthanol), même si quelques-uns ont une hydro solubilité faible mais insolubles dans les solvants organiques, ils ont une très haute solubilité en milieu alcalin donnant généralement une coloration jaune qui disparaît par l'addition d'acides (chaouche, 2015). L'extraction des hétérosides se fait par l'alcool ou l'acétone (Richard, 2012).

II.2.2.3. Classification

Les composés peuvent être répartis en différentes classes de flavonoïdes en fonction du nombre, de la position, de la nature et de la conformation des substituants sur les deux cycles aromatiques et la chaîne intermédiaire, les structures chimiques des sous-groupes des flavonoïdes sont montrées dans la figure 03 (Bruneton, 2009).

Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes identifiées, les principales sont: les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanones, les flavanes et les anthocyanines quelques unes sont représentées (Hamadache, 2011).

Selon la nomenclature de l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), on peut classer les flavonoïdes en trois groupes, qui contiennent tous une fonction

Chapitre II: Métabolites secondaires

cétonique: les flavonoïdes (quercétine, rutineles), iso flavonoïdes, les néo flavonoïdes (Cabanel, 2013).

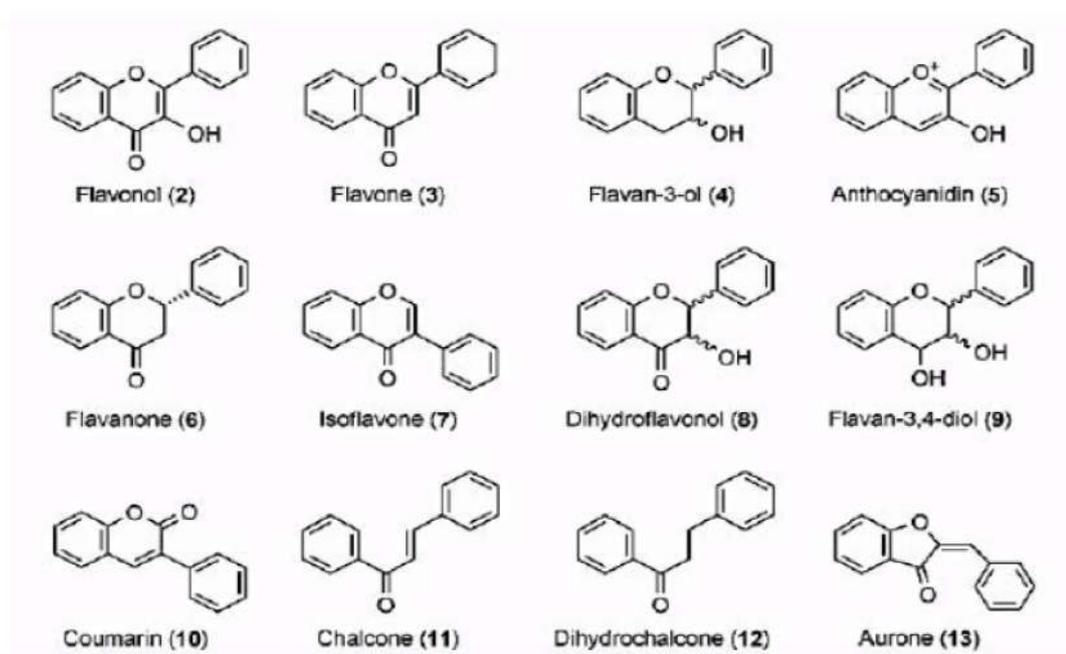


Figure 03: Les structures chimiques des sous-groupes des flavonoïdes (Crozier et al., 2009).

II.2.2.4. Propriétés biologiques

La principale propriété biologique reconnue des flavonoïdes est d'être «veino-actifs» (veinotrope, vitaminique) c'est-à-dire qu'ils permettent de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance (Bruneton, 2009). Par ailleurs, on attribue aux flavonoïdes de potentielles activités biologiques telles qu'anti-inflammatoires, antiallergiques, hépato protectrices, antimicrobiennes, antioxydantes et anti-cancérigènes (Abedini, 2013).

Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs in vitro de l'ADN gyrase (Touami, 2016), certains auraient une activité anti-tumorale in vitro, mais leur efficacité clinique est rarement démontrée (Richard, 2012). Des études épidémiologiques ont montré que la consommation de quantités élevées de flavonoïdes peut avoir un effet protecteur contre la maladie de parkinson, cet effet semblerait être plus perceptible chez les hommes (Gao et al., 2012).

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes, ce sont des molécules antifongiques et

Chapitre II: Métabolites secondaires

antibactériennes(Abedini, 2013). Deux rôles sont assurés principalement par les flavonoïdes; la protection des plantes des rayons solaires UV et la coloration (Jager et Sabi, 2011).

- **Les anthocyanes**

Les anthocyanes sont présents chez presque toutes les angiospermes. Constituent le groupe de pigments solubles dans l'eau et les alcools, insolubles dans les solvants organiques apolaires et instables en milieu neutre ou alcalin, qui confèrent leurs couleurs aux fruits et aux légumes (Richard, 2012; Zemmouri, 2015)

Les anthocyanes sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines qui sont responsables de la coloration vive, allant du rouge au violet en passant par le bleu, des fruits et des pigments floraux. Ils sont dissous dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs et des fruits auxquels ils donnent ces couleurs. Les anthocyanines changent de couleur en fonction de leur pH (El gharra, 2009).

Les anthocyanes ont des actions sur le système cardiovasculaire, des propriétés anti-œdémateuses, antioxydantes in vitro et sont utilisés pour leurs actions sur la circulation en ophtalmologie (Richard, 2012).

II.2.3. Les coumarines

II.2.3.1. Définition

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels et donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché (Kholkhal, 2014).

II.2.3.2. Propriétés chimiques et distribution

Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Sont des substances phénoliques dérivés de la benzoalphyrone (figure 04) (Cowan, 1999; Richard, 2012).

A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Les familles les plus riches en coumarines sont: les Légumineuses, Rutacées, Apiécées et Thymeleacées. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et peuvent également se trouver dans le règne animal et chez certains microorganismes (Kholkhal, 2014).

Chapitre II: Métabolites secondaires

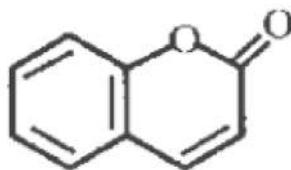


Figure 04: Structure de base des coumarines (Cowan, 1999).

II.2.3.3. Propriétés biologiques

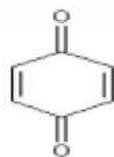
Les coumarines possèdent des propriétés physiologiques et antimicrobiennes, elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Aidoud et Sammoudi, 2016).

Ces molécules peuvent avoir une activité sur le système cardiovasculaire, anti-cédémateuse et immunostimulante et a probablement une activité cytotoxique (Richard, 2012).

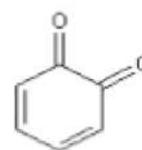
II.2.4. Les quinones

II.2.4.1. Définition

Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou orange, responsables de la réaction de brunissement dans les fruits et végétaux coupés ou lésés. Les quinones possèdent deux fonctions cétones correspondant à l'oxydation des composés aromatiques (figure 05) et caractérisés par un motif 1,4-dicéto-cyclohexa-2,5-diénique (para-quinone) ou éventuellement, par un motif 1,2-dicéto-cyclo-hexa-3,5-diénique (ortho-quinone) (Chenni, 2010; Kholkhal, 2014).



1,4 benzoquinone (*para*-quinone)



1,2 benzoquinone (*ortho*-quinone)

Figure 05: Structures de base des para-quinones et des ortho-quinones (Bruneton, 1999).

Chapitre II: Métabolites secondaires

II.2.4.2. Propriétés chimiques et distribution

Sont ubiquitaires, on les trouve dans les végétaux, les champignons, les bactéries et les algues à l'état libre ou combiné (sous forme d'hétérosides) (Faskens et *al.*, 1993), aussi les animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K, qui est impliquée dans la coagulation du sang (Kholkhal, 2014).

Les quinones sont caractérisées par la réaction de Bornstager effectuée soit directement sur la matière végétale, soit après extraction au chloroforme. Une coloration rose en milieu ammoniacal se développe révélant la présence de dérivés quinoniques (Chenni, 2010).

II.2.4.3. Classification

Différents groupes de quinones ont été identifiés dont les benzoquinones, les naphthoquinones, les anthraquinones, les anthracyclinones et les naphthodianthrone (Chenni, 2010).

II.2.4.4. Propriétés biologiques

Les quinones utilisées dans les colorants, dans les médicaments et dans les fongicides, possèdent généralement des propriétés antimicrobiennes (antifongiques) et anti-dermatophytiques. Leurs principales cibles dans la cellule microbienne sont les adhésines, les polypeptides et les enzymes membranaires (Saidi, 2019).

II.2.5. Les tanins

II.2.5.1. Définition

Les tanins sont des métabolites d'origine végétale et non azotée qu'on trouve dans de nombreux végétaux à un degré plus ou moins élevé. Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les insectes ou le bétail, ils sont caractérisés par une saveur astringente (Laouini, 2014).

II.2.5.2. Propriétés chimiques et distribution

Sont trouvés dans toute les parties de la plante: l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Bouchouka, 2016), ayant la propriété de précipiter les protéines à partir de solutions aqueuses (forment un complexe avec les macromolécules) (Richard, 2012).

Chapitre II: Métabolites secondaires

II.2.5.3. Classification

Les tanins sont classifiés en deux groupes selon leur structure chimique et par leur origine biogénétique: les tanins hydrolysables et les tanins condensés, plus répandus dans le règne végétal. Ils peuvent être des dimères (figure 06), des oligomères et des polymères de catéchine (Zemmouri, 2016).

- Les tanins condensés (pro-anthocyanidines): qui se différencient fondamentalement des tanins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Ils ne sont hydrolysés ni par les acides, ni par les tannases mais en présence d'acides forts ou d'agents d'oxydation, ils se transforment en substances rouges (Kholkhal, 2014).
- Tanins hydrolysables: ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique (Cowan, 1999).

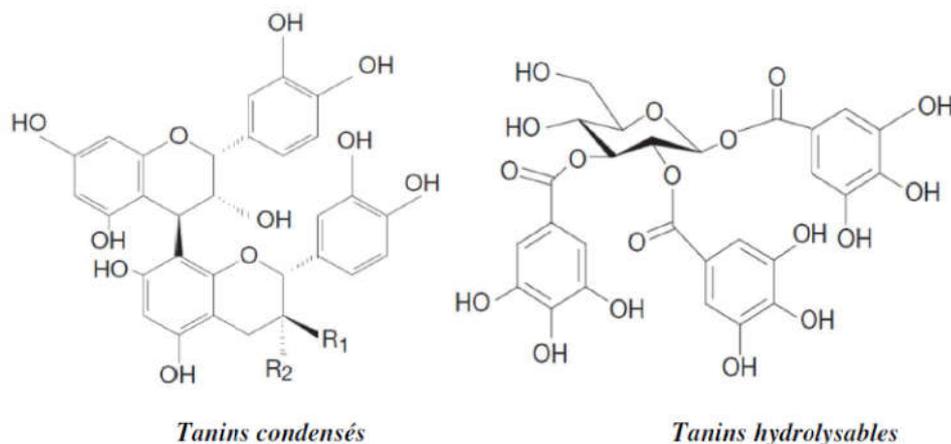


Figure 06: Structures chimiques typiques des tanins (Achat, 2013).

II.2.5.4. Propriétés biologiques

Les tanins permettent d'imperméabiliser la peau, notamment par vasoconstriction, et ont donc une possible application dans la cicatrisation, notamment lors de blessures superficielles ou brûlures par limitation de pertes en fluides. On leur confère aussi des propriétés anti-diarrhéique, antibactérienne et antifongique, d'où une application empirique dans les dermatoses. De même, ils ont un potentiel antioxydant, inhibiteur enzymatique, anti tumoral et antiviral (Richard, 2012).

Chapitre II: Métabolites secondaires

II.2.6. Les saponines

II.2.6.1. Définition

Le nom saponine dérive du mot latin «sapo», qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau (Vincken et *al.*, 2007). Les saponines appelées aussi saponosides sont une classe spécifique de métabolites secondaires (Sparg et *al.*, 2004).

II.2.6.2. Propriétés chimiques et distribution

Elles sont des constituants de nombreuses plantes médicinales. La présence de saponines a été signalée dans plus de 100 familles de plantes et dans quelques sources marines, peuvent exister dans différentes parties des plantes (Missaoui, 2018).

Sont des hétérosides de poids moléculaire élevé Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires explique leur comportement moussant en solution aqueuse. Comme définition, on dirait qu'une saponine est un glycoside de stéroïde ou de triterpène (Laouini, 2014).

II.2.6.3. Classification

Fondamentalement, on distingue les saponines stéroïques et les saponines triterpéniques dérivant tous deux bio synthétiquement de l'oxyde de squalène (Laouini, 2014). Les saponines stéroïdes (stéroïdiques) se trouvent principalement dans les monocotylédones (comme les agavaceae, les dioscoréacées et les liliacées) tandis que les saponines triterpènes sont les plus abondantes et se trouvent principalement dans les angiospermes dicotylédones (légumineuses, araliaceae, caryophyllaceae) (Güçlü-Üstündağ et Mazza, 2007).

II.2.6.4. Propriétés biologiques

Les saponosides isolés à partir des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle, possèdent plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques (Sparg et *al.*, 2004). Les saponines agissent comme une barrière chimique contre les agents pathogènes et les herbivores. Les saponines se trouvent dans les tissus végétaux qui sont les plus vulnérables aux attaques fongiques, bactériennes et des insectes (Cheok et *al.*, 2014).

Les saponosides manifestent des propriétés hémolytiques (abaissent la tension superficielle de liquide et augmentent la perméabilité des parois et détruisent les hématies), antimicrobiennes, antifongiques, anti-inflammatoires, antalgiques et anti-œdémateuses. Ils

Chapitre II: Métabolites secondaires

sont particulièrement toxiques pour les animaux. Les saponosides ont une toxicité assez faible par voie orale mais nettement plus marquée lorsqu'ils sont administrés par voie parentale (Laouini, 2014).

II.2.7. Les alcaloïdes

II.2.7.1. Définition

Les alcaloïdes sont des substances naturelles réagissant comme des bases, dont l'atome d'azote est compris dans un système hétérocyclique, figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine et renferme des molécules ayant des réactions communes à certains types de réactifs (Richard, 1987).

II.2.7.2. Propriétés chimiques et distribution

On les trouve dans plusieurs familles des plantes, en tant que des métabolites secondaires, principalement chez les plantes à fleurs (Badiaga, 2011). Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon l'espèce de la plante, ils s'accumulent uniquement dans les écorces, dans les racines, dans les feuilles ou dans les fruits (Muniz, 2006).

Les alcaloïdes peuvent être extraits à partir de leurs sources naturelles par traitement avec des acides (habituellement acide chlorhydrique ou sulfurique, bien que des acides organiques. La plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool et ont un goût amer et certains sont fortement toxiques (Bruneton, 2009).

II.2.7.3. Classification

L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Une façon raisonnable est alors de classer les alcaloïdes en groupes, selon leur précurseur biosynthétique quelque types sont décrits dans la figure 07 ci-dessous (Muniz, 2006). On distingue trois classes d'alcaloïdes:

- Les alcaloïdes vrais, qui représentent de plus grand nombre d'alcaloïdes, sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activité biologique importante. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique, dont les précurseurs sont des acides aminés;

Chapitre II: Métabolites secondaires

- Les pseudo-alcaloïdes qui sont des métabolites présentant les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ne sont pas dérivés d'un acide-aminé (terpéniques);
- Les proto-alcaloïdes qui sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique; ils ont un caractère basique et sont élaborés in vivo à partir d'acides aminés, solubles dans l'eau et ils sont souvent appelés amines biologiques (Badiaga, 2011; Richard, 2012).

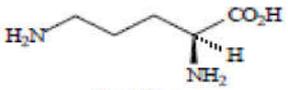
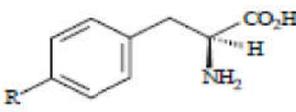
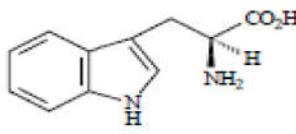
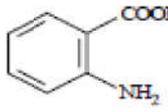
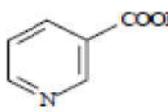
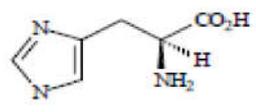
Acide aminé	Type d'alcaloïde
 <p>Ornithine</p>	Pyrrolidines, pyrrolizidines, tropanes
 <p>Lysine</p>	Pipéridines, quinolizidines, indolizidines
 <p>R = H, Phénylalanine R = OH, Tyrosine</p>	Alcaloïdes du type éphédrine, isoquinoléines
 <p>Tryptophane</p>	Indoles
 <p>Acide anthranilique</p>	Quinoléines, quinazolines, acridines
 <p>Acide nicotinique</p>	Pyridines
 <p>Histidine</p>	Imidazoles
Via aminations	Alcaloïdes terpéniques et stéroïdiens

Figure 07: Type d'alcaloïdes et leur précurseur acide aminé (Muniz, 2006).

Chapitre II: Métabolites secondaires

II.2.7.4. Propriétés biologiques

Les alcaloïdes représentent le groupe de substance d'intérêt thérapeutique le plus important en termes de nombre, de diversité structurale et de l'éventail de leurs activités pharmacologiques (Rakotonanahary, 2012). Certains sont des médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérées, sont utilisés comme anti-cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (Iserin, 2001).

Chapitre III
Matériel et méthodes

Chapitre III: Méthodes

1. Préparation des extraits

1.1. Macération aqueuse

Une prise d'essai de 10g de poudre de chaque plante a été introduite dans un ballon contenant 100mL d'eau distillée. L'ensemble a été maintenu sous agitation magnétique pendant 24 heures à la température ambiante. Après filtration, le filtrat a été concentré à l'évaporateur rotatif sous vide à 50°C, l'extrait a été ensuite mis à l'étuve à 46°C pendant 24 heures. Les poudres obtenues ont été pesées puis conservées dans un flacon stérile hermétiquement fermé (Bohui et *al.*, 2018).

1.2. Extraction par les solvants

La plus part des chercheurs ont utilisées la macération par des solvants organiques, les plus fréquents sont; méthanol, éthanol, chloroforme et l'acétone(Bohui et *al.*, 2018).

La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale à extraire. L'extraction est effectuée sous agitation continue et à une température ambiante, pendant 4 à 5 heures. Après filtration sur un papier Wattman contenant du sulfate de sodium anhydre Na₂(SO₄)₂, le matériel végétal est encore extrait par le même solvant et la même façon, les filtrats sont additionnés et concentrés à sec par un évaporateur rotatif (Labioud, 2016).

L'extraction permet d'obtenir des extraits organiques bruts: extrait d'éthanol (EtOH), extrait de méthanol, et l'extrait d'acétone qui seront récupérés dans des flacons en verre puis conservés à 4° C jusqu'à utilisation (Mamadou, 2003).

1.3. Détermination du rendement d'extraction

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant le transfert du filtrat à évaporer)(Bohui et *al.*, 2018).

$$\text{Rendement (\%)} = ((\text{Masse d'extrait sec}) \times 100) / (\text{Masse de la matière végétale}).$$

Chapitre III: Méthodes

2. Les techniques d'extraction des huiles essentielles

2.1. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (Labioud, 2015).

L'un des principaux intérêts de cette méthode par rapport à l'hydrodistillation est la préservation de la qualité de l'essence. En effet, dans le cas présent, la plante ne macère pas dans l'eau, ce qui limite les phénomènes d'hydrolyse mais également de solubilisation de certains composés hydrosolubles (comme les phénols) qui sont donc mieux extraits (Deschepper, 2017).

2.2. Hydrodistillation

Elle est de loin le procédé le plus répandu, car il convient à la majorité des plantes c'est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle (Labioud, 2016). Le principe général de l'hydrodistillation est le suivant: On chauffe dans un alambic jusqu'à ébullition une suspension d'une matière première végétale dans l'eau de sorte que la vapeur d'eau entraîne les substances volatiles de la plante. Cette vapeur est récupérée et condensée. L'huile essentielle constituée de ces différentes substances volatiles se sépare par gravité de l'eau à laquelle elle n'est pas miscible (Deschepper, 2017).

2.3. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante traitée. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante (Feknous et *al.*, 2014):

$$R\% = P_b/P_a \times 100$$

R%: Rendement de l'huile en (%), P_a: Poids de l'huile en (g), P_b: Poids de la plante en (g).

Chapitre III: Méthodes

3. Caractérisation des extraits

3.1. L'Analyse par HPLC des composés phénoliques

La chromatographie en phase liquide à haute performance (l'abréviation anglaise HPLC - High Performance Liquid Chromatography est plus fréquemment utilisée) est une technique de séparation analytique basée sur l'hydrophobicité des molécules ou d'un mélange de composés (Abedini,2013).

3.2. CG-SM des huiles essentielles

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (Paolini, 2005).

Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée; les différents fragments obtenus, chargés positivement, constituent le spectre de masse de cette molécule. Ce qui rend le couplage de la CG et SM très efficace pour l'analyse des mélanges complexes qui contiennent des fois plus que trois cents produits est la possibilité de compiler les spectres des produits séparés dans la mémoire d'un ordinateur et de les comparer individuellement avec des spectres de référence disponibles dans la mémoire de l'ordinateur (Bouhajib, 1992; Labiod, 2016).

4. Activité antioxydante

Beaucoup de tests sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits. La plupart de ces tests sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Les tests les plus fréquemment utilisées sont le DPPH, FRAP et ABTS(Saidi, 2019).

4.1. Test au DPPH

Cette méthode est basée sur la capacité des antioxydants à réduire le radical libre 2,2-diphényl-1-pycriol-hydrazyl, soit par un mécanisme de libération d'un atome d'hydrogène du groupement hydroxyle, soit par libération d'un électron. Le radical a un maximum

Chapitre III: Méthodes

d'absorption mesurable par spectrophotométrie à 515nm et sa neutralisation par un antioxydant peut-être facilement suivie par spectrophotométrie UV/vis (Saidi, 2019).

4.1.1. Expression des résultats

- Calcul des pourcentages d'inhibition par la formule suivante(Kholkhal, 2014):

$$I\% = [(AC-AT)/AC] * 100$$

AC: Absorbance du contrôle; AT: Absorbance du test effectué.

- **Calcul des IC₅₀**

L'IC₅₀ représente la quantité de substance d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la quantité de DPPH initialement présente. Elle est exprimée en µg/ml d'extrait végétal. L'IC₅₀ (%) est obtenue par l'équation de la droite moyenne du pourcentage de DPPH résiduel en fonction de la concentration en antioxydant. La plus forte activité antiradicalaire correspond à la fraction qui possède l'IC₅₀ la plus faible.

La courbe % DO_{échantillon} = f (É_{échantillon}) est tracée et la projection du point correspondant à 50 % de la DO échantillon sur l'axe des abscisses permet de calculer l'IC₅₀ en µg/ml d'extrait (Zemmouri, 2015).

- **Calcul de l'activité antiradicalaire (Scavenging activity)**

Nous pouvons déduire l'activité antiradicalaire de nos extraits en calculant l'inverse des valeurs des IC₅₀ trouvées.

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

L'activité antiradicalaire est comparée à celle de l'acide ascorbique et le BHA (Kholkhal, 2014).

4.2. Teste de la réduction du fer (FRAP)

Le pouvoir de réduction ferrique déterminé en utilisant un dosage de FRAP 1996. La méthode FRAP développée par Benzie et Strain (1996) et considéré comme un test direct et rapide est utilisé pour mesurer le pouvoir des antioxydants non enzymatiques (Laouini, 2014; Bounihi, 2015).

Chapitre III: Méthodes

4.3. Test de la capacité antioxydant en équivalent Trolox ou (ABTS)

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS⁺ de coloration vert bleu en le transformant en ABTS incolore. Le radical préformé ABTS⁺ est généré en présence des ions persulfates (Bouchouka, 2016).

En présence d'un antioxydant, le passage du radical ABTS⁺ à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de la coloration vert bleu intense qui peut être suivie par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 734 nm. Ce test est simple, opérationnel, reproductible, et peut être utilisé dans différents milieux(Bouchouka, 2016).

5. Activité antimicrobienne

5.1. Activité antibactérienne

5.1.1. Les souches utilisées

(*E.coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Aspergillus niger*, *Penicillium jensinii*, *Penicillium purpurogenum*) (Makhloufi, 2010).

5.1.2. Méthode des disques par diffusion

Les disques ont été confectionnés à partir du papier filtre (Whatman n° 5), à raison de 6mm de diamètre. Pour éviter tous risques de contamination aux germes exogènes au cours de l'expérimentation les disques ont été stérilisés à 120°C pendant 15 minutes dans un autoclave.

Une colonie de chaque espèce bactérienne prélevée du milieu gélosé spécifique après activation a été ensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif; ce mélange constitue l'inoculum microbien. Des prises de volume de 1 ml de cette dernière solution ont été étalées séparément en surface de plusieurs boîtes de Pétri contenant le milieu MH.

Trois disques imbibés pendant 5 minutes dans chaque extrait obtenu selon le solvant utilisé sont ensuite déposés successivement à la surface de chaque boîte de Pétri contenant le milieu gélosé Mueller Hinton ensemencé par les germes. La lecture des diamètres d'inhibition est effectuée après incubation des boîtes de Pétri à 37°C pendant 24 heures à l'aide d'un pied à colis (Bouchouka, 2016).

Chapitre V

Résultats et discussion

Chapitre V: Résultats et discussion

1. Rendements de l'extraction des polyphénols

Selon Do et *al.*, (2014), le rendement en polyphénols extraites par les solvants organiques montre que le meilleur taux d'extraction est enregistré avec le méthanol (26,06 %) suivie de l'éthanol (17,03%). le plus faible rendement est obtenu avec l'acétone (12,33%).

Les résultats obtenus par d'autres chercheurs confirment que le méthanol est le solvant organique qui permet d'avoir des taux de rendement les plus élevés. En effet, Mounyr(2011), a obtenu un rendement de 15,8% avec le méthanol, ce taux est très proches à celle rapporté parHoepler (1994) qui a réalisé l'extraction méthanolique, il a obtenu un rendement de 15,1%. Pour la macération aqueuse, les résultats de Fadili et *al.*,(2015), montrent que le rendement est de 2,25%. Par contre, le rendement obtenu par Hoepler est plus fort (16,2%).

La technique d'extraction ainsi que le type du solvant utilisé affectent le taux de rendement obtenu. Hayouni et *al.*, (2007) ont montré que la macération aqueuse donne des rendements plus importants que celle avec les solvants organiques. Toutefois, le rendement d'extraction dépend de plusieurs autres facteurs y compris la durée d'extraction, la matière végétale brute, la quantité du solvant d'extraction, la température et le pH. La variation de ces facteurs donne naissance à une altération différentielle de la distribution des composés entre les deux phases solide et liquide (Hayouni et *al.*, 2007).

2. Rendements en huile essentielle

La distillation à la vapeur et l'hydrodistillation sont utilisées pour la récupération de l'huile essentielle. Ces processus ont déjà été largement appliquée pour l'obtention de l'huile essentielle à partir des feuilles de romarin (Wollinger et *al.*,2016). Le Tableau I présente les rendements en HE de romarin «*Rosmarinus officinalis L.*» obtenue respectivement soit par l'hydrodistillation, soit par l'entraînement à la vapeur d'eau.

Les résultats de Wollinger et *al.*, (2016), montrent que le rendement d'extraction maximal de l'HE obtenu par distillation à la vapeur est de 2,5% (p/p), alors que l'hydrodistillation ne fournit que 1,8% (p/p) du poidsinitial. Ces valeurs sont supérieures à ceux rapportés par Genena (2008), où le rendement maximal par distillation à la vapeur était d'environ 1,2% et par hydrodistillation 0,44%. De plus, la composition en HE extraite par hydrodistillation, est influencée parla quantité en eau mise dans le ballon de distillation, car certains composés sont peu solubles dans l'eau (Williams et Lusunzi,1994).

Chapitre V: Résultats et discussion

Tableau I: Rendement en HE de romarin selon deux méthodes d'extraction (Wollinger et al., 2016).

Méthode d'extraction	Rendement %			
	Alexander et al., (2016)	Boutabia et al.,	Baghloul (2007)	BRUNETON (1999)
Hydrodistillation	1.8%	1.91%	1.69%	(1 à 2.5%)
Entraînement à la vapeur d'eau	2.5%	/	/	(1 à 2.5%)

Dans l'étude de Boutabia et al.,(2016) l'opération d'extraction des HE du romarin récolté au mois de mars dans trois sites de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie) a permis d'avoir des rendements allant de 1,16% à 2,29% par l'hydrodistillation durant une heure, à une température de 100°C. Cependant, la moyenne des rendements obtenus (1,91%) est supérieure à celle trouvée par Baghloul (2007) à partir d'un échantillon récolté au mois de Juin dans la même région, soit un rendement de 1,69%. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que pendant la période de floraison les principes actifs sont synthétisés et stockés dans les feuilles et les sommités fleuries (Boutekedjiret et al., 1999).

Plusieurs autres facteurs pourraient influencer le taux de rendement comme le stade de croissance, les conditions pédoclimatique, le séchage...

3. Caractérisation des extraits

3.1. Analyse par HPLC

Les différents extraits ont été analysés par les chercheurs afin de comparer leurs profils chromatographiques et d'obtenir une information sur la composition de ces extraits en polyphénols en comparaison avec les différents standards.

Les résultats de l'analyse par HPLC réalisés par Athamena (2008) montrent la présence de la catéchine et de la rutine dans les extraits de méthanol du romarin, de plus l'absence de la quercétine dans l'ensemble des extraits. De même, Justesen et al.,(2001) ont révélé l'absence de la quercétine dans les extraits méthanoliques du romarin.

Chapitre V: Résultats et discussion

Wollinger et *al.*, (2016) ont rapporté que les principaux antioxydants présents dans les extraits du romarin sont l'acide rosemarique, le carnosol, le gemfibrozil et l'acide carnosique (Figure 08). Ils ont montré que l'extrait aqueux a une faible rétention polaire, alors que l'acétone extrait des substances moins polaires avec des temps de rétention plus élevés et l'extrait de méthanol près d'une combinaison des deux. Les autres antioxydants présents dans les extraits sont le rosmanol et le méthyl carnosate.

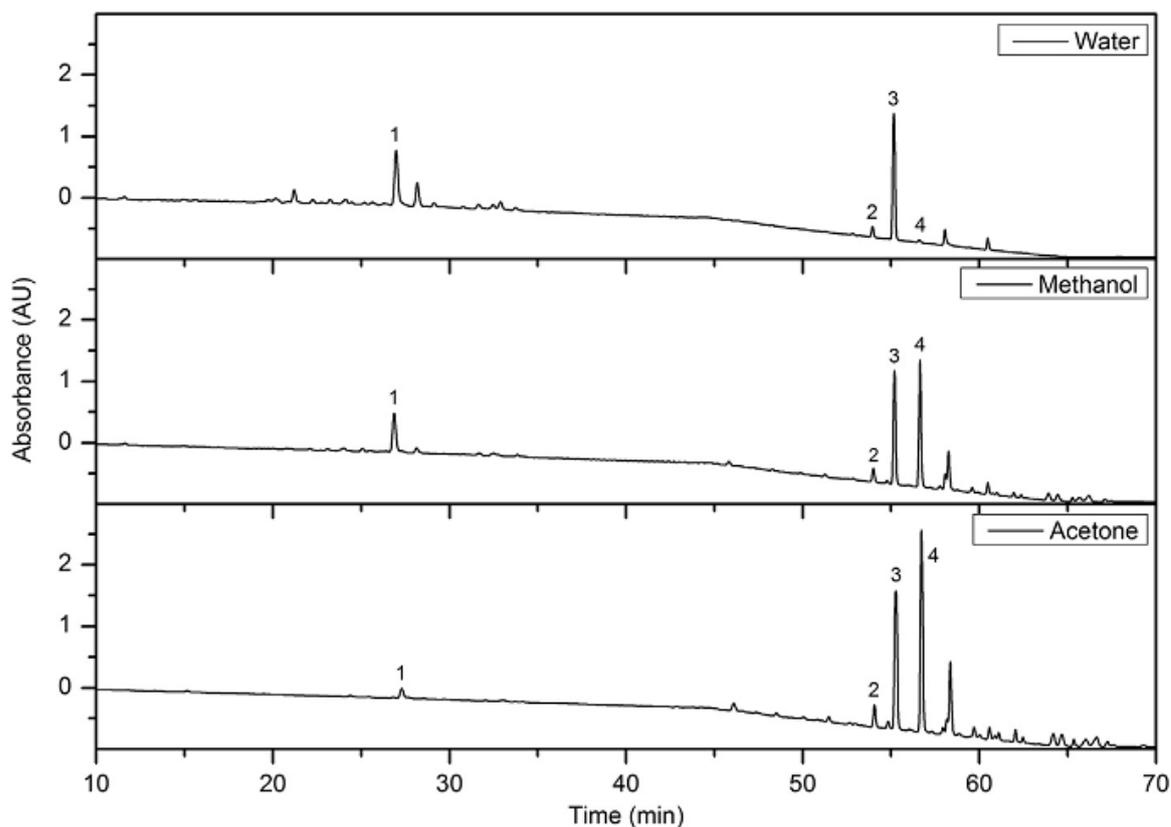


Figure 08: Analyse HPLC des extraits des feuilles du romarin par différents solvants (eau, méthanol et acétone). Pic:(1) acide rosemarique; (2) carnosol; (3) gemfibrozil; (4) acide carnosique (Wollinger et *al.*, 2016).

3.2. CG-SM des huiles essentielles

Les huiles essentielles obtenues n'ont pas la même composition, il existe une différence relativement importante. Les résultats obtenus par l'analyse chromatographique (CPG/SM) du romarin de la région de Hammamet rapporté par Boutabia et *al.*, (2016) indiquent que l'huile essentielle de l'échantillon de Draa Hammam contient 20 composants chimiques. Par ailleurs, la composition montre nettement que le 1,8 cinéole est le chénotype majoritaire des huiles essentielles.

Chapitre V: Résultats et discussion

L'étude menée par Boutekedjiret et *al.*, (1998) indique que les huiles essentielles du romarin des Biban de la région de Bordj Bou Arreridj, sont dominées par un chémotype spécifique qu'est le 1,8 cinéole. Ce qui concorde avec les résultats de Boutabia et *al.*, (2016).

D'après Fahim et *al.*, (1999) les résultats obtenus par l'analyse chromatographique (CPG/SM) du *Rosemarinus officinalis* L. indiquent que l'HE contient trente-neuf composants volatils quantifiés, dont seulement dix composants ne sont pas identifiés. L'acétate de bornyle était le principal composant (20,9%) tandis que le B-pinène était le mineur (0,1%). La présence de méthyle eugénol (5,46%) dans l'HE est rapportée pour la première fois par ces chercheurs. Ces résultats sont en accord avec ceux de Join et *al.*, (1991), qui ont rapporté une concentration de 25,2% pour l'acétate de bornyle.

Les composants identifiés étaient classés en sept classes chimiques principales; monoterpènes (3,4%), phénols (4,1%), sesquiterpènes (9%), éthers monoterpénoïdes (10,9%), cétones monoterpénoïdes (18,67%), alcools monoterpénoïdes (23,8%) et les monoterpénoïdes esters (24,8%).

4. Activité antioxydante

La détermination de l'activité antioxydante (capacité ou potentiel) des divers échantillons biologiques est généralement basée sur l'inhibition d'une réaction particulière en présence d'un antioxydant (Bousbia, 2011).

4.1. Test au DPPH

Les activités de piégeage des radicaux DPPH sont présentées dans termes des valeurs IC_{50} qui signifient la concentration d'antioxydant, ou d'extrait, nécessaire pour diminuer (de 50%) la concentration initiale du substrat, est un paramètre largement utilisé pour mesurer l'efficacité antiradicalaire (Genena, 2008).

La valeur de $CI_{50} = 15,73 \mu\text{g}/\text{mL}$ a été déterminée pour l'extrait d'éthanol (Genena, 2008). Les résultats de l'activité antiradicalaire des extraits du romarin réalisés par Athamena (2008) sont en accord avec ceux obtenus par Almela et *al.*, (2006) et Makhloufi (2010) qui est de $IC_{50} = 86 \mu\text{g}/\text{mL}$ pour l'HE de romarin.

Chapitre V: Résultats et discussion

Le potentiel antioxydant des extraits est plus élevé que celui des HE (Makhloufi, 2010).

4.2. Test d'ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS, l'absorbance est mesurée à 734 nm.

Le taux estimé de l'activité antiradicalaire pour l'extrait éthanolique du romarin rapporté par Wojdyło et *al.*,(2007) est de $CI_{50} = 38,7 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$. Dorman et *al.* (2003) ont trouvé une activité antiradicalaire de $14,1 \pm 3,8 \mu\text{g/ml}$. En outre, Tawala et *al.*,(2007) ont rapporté que l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique est de $274 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$.

4.3. Test au FRAP

Dorman et *al.*,(2004), noter que tous les extraits possédaient la capacité de réduire le fer (III) et le faisaient en de manière linéaire en fonction de la concentration dans la gamme de concentrations utilisée dans leur étude, et sont donc capable de donner des électrons. Cette propriété suggère que les extraits peuvent agir comme des terminateurs de chaîne de radicaux libres, transformant espèces radicalaires réactives en produits non radicaux plus stables. Les extraits aqueux ont été évalués pour leur capacité à concurrencer ferrozine pour les ions fer (II) en solution libre. Les extraits aqueux ont démontré une capacité à chélater les ions fer (II) de manière dose-dépendante (Dorman et *al.*, 2004).

Les facteurs qui pourraient expliquer la différence entre les résultats obtenus par les chercheurs sont la qualité de la plante, son origine géographique, les conditions climatiques, la date de récolte et la durée de stockage (Cavero et *al.*, 2005).

5. L'activité antimicrobienne

5.1. L'activité antibactérienne

D'après les résultats de Genena et *al.*,(2008), les extraits de romarin ont un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries à Gram négatives. Pour les bactéries à Gram positives, les extraits sont devenus plus efficaces avec l'augmentation du temps d'extraction pour *S. aureus*, et le contraire a été observé pour *B. cereus*. Weckesser et *al.* (2007), indique que les extraits de romarin présente principalement une activité contre les bactéries à Gram positives (*S. aureus* et *B. cereus*).

Chapitre V: Résultats et discussion

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) (Guesmi et Boudabous, 2006 ; Bouzouita et *al.*, 2008;Abdullah Ijaz et *al.*, 2010); Chao et *al.* (2000), ont expliqué que les bactéries à Gram négatifs sont dotées d'une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et une assise externe constituée de lipopolysaccharides et de protéines. Cette structure peut empêcher la prise d'huiles ou protéger la couche peptidoglycane vis-à-vis des huiles. La membrane externe de lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatifs constitue une barrière d'imperméabilité aux substances hydrophobes. Pour les bactéries à Gram positifs, la couche peptidoglycane se situe à l'extérieur, permettant ainsi à ces bactéries d'être plus disponibles à entrer en contact avec les huiles.

Makhloufi (2010) remarque que l'HE de *R. officinalis* L. exerce une activité très importante, Cet effet est représenté par une activité contre *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *E. coli* et *P. aeruginosa*. Makhloufi (2010) trouve que l'extrait méthanolique du romarin, à un effet plus élevé sur *E. coli* qui est traduit par un diamètre de 34 mm avec une concentration de 500mg/ml. Un diamètre de 16,5 mm obtenue avec *P. aeruginosa* et *B. cereus* par la même concentration. Par contre Celiktas et *al.*, (2005) ont trouvés que l'extrait méthanolique exerce une faible activité sur les souches testées.

L'effet le plus élevé obtenu par l'extrait aqueux de romarin avec une concentration de 500 mg/l est exprimé par un diamètre de 19 mm pour *E. faecalis*, autant que l'effet le plus bas est obtenu avec *S. aureus* dont le diamètre est de 7,5. Par comparaison, on peut constater que l'extrait méthanolique est plus actif que celle de l'extrait aqueux. (Makhloufi, 2010).

Conclusion

Conclusion

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine et cosmétologie. C'est en grande partie du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

C'est dans ce contexte que les chercheurs mènent des études qui visent la caractérisation phytochimique des extraits des plantes médicinales. De nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés bioactifs du romarin.

- En ce qui concerne la composition chimique, les travaux indiquent la présence des flavonoïdes, des tanins, les mucilages, des stérols et triterpènes, des saponosides, des anthraquinones libres, hétérosides cardiotoniques et des catéchols.
- Les résultats de l'analyse par HPLC montrent la présence de l'acide rosmarique, le carnosol, le gemfibrozil, l'acide carnosique, la catéchine et de la rutine dans les extraits de méthanol du romarin, et l'absence de la quercétine.
- Pour l'activité antioxydante des extraits de romarin, les résultats obtenus révèlent que l'HE a un effet antiradicalaire. L'extrait méthanolique du romarin montre l'activité antiradicalaire la plus élevée.
- L'activité antimicrobienne a été évaluée sur plusieurs souches bactériennes, les résultats obtenus ont montré que: les extraits du romarin ont une activité antibactérienne contre un nombre de bactéries telle que *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *E. coli* et *P. aeruginosa*.

References

- **ABDULLAH IJAZ. H; FAROOG. A; CHATHA. S.A; JABBAR. A; MAHBOOB. S, POONAM. S.N., 2010.** *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Journal of microbiology*, **41**, 1070-1078.
- **ABEDINI. A., 2013.** Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse du grade de Docteur en Science des médicaments. Université Lille 2, droit et santé - France. pp 44-89.
- **ACHAT. S., 2013.** Polyphénols de l'alimentation: extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques. Thèse en Co-tutelle de du grade de Docteur en Science Biologique, Option Sciences Alimentaires. Collaboration interuniversitaire, Université Abderrahmane Mira – Béjaia et Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. p 25.
- **AIDOUD. A, SAMMOUDI. R., 2016.** Plantes médicinales anti rhumatismales du Sahara Algérien. Mémoire de Master en Sciences Biologiques, Option Immunologie approfondie. Université 8 Mai 1945 - Guelma. p 9.
- **ALMELA. C; CLEMENTO. M.J; VELEZ. D; MONTORO. R., 2006.** Total arsenic, inorganic arsenic, lead and cadmium contents in edible seaweed sold in Spain. *Journal of Food and Chemical Toxicology*, **44** (11), 1901-1914.
- **AL-SEREITI. M.R; ABU-AMER. M.R; SEN. P., 1999.** Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*, **37**, 124-130.
- **ATHAMENA. S., 2009.** Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. Mémoire Magister en Biochimie Appliquée. Université El Hadj lakhdar-Batna, pp 56-88.
- **ATTOU. A., 2011.** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Rutachalepensis*(fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire de Magister en biologie, Option Produits naturels: activité biologique et synthèse. Université Abou bekr Belkaid - Tlemcen, pp 11-14.
- **BADIAGA. M., 2011.** Etude ethnobotanique, phytochimique et l'activité biologique de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse du grade de Docteur en Chimie Organique. Collaboration interuniversitaire; Université de Bamako et Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand - Mali. pp 20-26.

- **BAGHLOUL. F., 2007.** Caractérisation chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle du Romarin. Mémoire Magister en Biochimie Appliquée. Univ. Badji Mokhtar-Annaba, p 62.
- **BELOUED. A., 2011.** Plantes médicinales d'Alger. Edition Réimprimée. California. ISBN: 978-99610030-46, p 203.
- **BENBRINIS. S., 2012.** Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus*. Mémoire de Magistère en Biochimie, Option Biochimie et physiologie expérimentale. Université Ferhat Abbas - Sétif, pp 17-20.
- **BLANC. M., 2010.** Propriétés et usage médical des produits de la ruche. Thèse du grade de Docteur en Science pharmacie. Université de Limoges - France. pp 38-40.
- **BOHUI. P.S.G; ADIMA. A.A; NIAMKE. F.B; N'GUESSAN. J.G., 2018.** Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles des plantes médicinales. *Journal of Société Ouest--Africaine de Chimie*, **46**, 50-58.
- **BOUCHOUKA. E., 2016.** Extraction des polyphénols et étude de l'activité antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. Thèse de doctorat en Biochimie appliquée. Université Badji Mokhtar - Annaba, pp 20-24.
- **BOUHAJIB. M., 1992.** Analyse des glycosides de *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. Thèse du grade de Docteur en chimie. Université du Québec A Chicoutimi. p 42.
- **BOUTABIA. L; TELAILIA. S; BOUGUETOF. I; GUENADIL. F; CHEFROUR. A., 2016.** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Journal of Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, **85**, 174-189.
- **BOUTABIA. L; TELAILIA. S; BOUGUETOF. I; GUENADIL. F; CHEFROUR. A., 2016.** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Journal of Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, **85**, 174-189.
- **BOUTKEDJIRT. C; BELABBES. R; BENTAHAR. F; BESSIERE. M.J., 1998.** The Essential Oil from *Rosmarinus officinalis* L. in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, **10**, 680-682.
- **BOUTKEDJIRT. C; BELABBES. R; BENTAHAR. F; BESSIERE. M.J., 1999.** Study of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Yield and Composition as a Function of the Plant Life Cycle. *Journal of Essential Oil Research*, **11**, 238-240.
- **BOUTKEDJIRT. C; BUATOIS. B; BESSIERE. M.J., 2005.** Characterisation of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil of different areas of Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, **8** (1), 65-70.

- **BOUZOUITA. N; KACHOURI. F; BEN HALIMA. M; CHAABOUNI. M.M., 2008.** Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal of Société Chimique de Tunisie*, **10**, 119-125.
- **BRAVO. L., 1998.** Polyphénols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Journal of nutrition*, **56** (11), 317-333.
- **BRUNETON. J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^e Édition Tec and Doc. Paris. (Collection Lavoisier), ISBN: 978-2-7430-0315-9, 1120p.
- **BRUNETON. J., 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^e Édition Tec and Doc. Paris. (Collection Lavoisier), ISBN: 978-2-7430-1188-8, 1292p.
- **CABANEL. S., 2013.** *Houttuyniacordata* Thunberg Saururaceae. Thèse du grade de Docteur en Pharmacie. Université Toulouse III Paul Sabatier - France. pp 38-102.
- **CAVERO. S; JAIME. L; IBANEZ. E; SENORANS. F; REGLERO. G., 2005.** Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food prot*, **68** (4), 790-795.
- **CAZAU-BEYRET. N., 2013.** Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie. Thèse du grade de Docteur en pharmacie. Université Toulouse III Paul Sabatier - France. pp 112-127.
- **CELIK TAS. O.Y; BEDIR. E; VARDAR. S.F., 2005.** In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Chemistry*, **101**, 1457-1464.
- **CHAO. S.C; YOUNG. DG; OBERG. C.J., 2000.** Screening for activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Science of Essential oil research*, **12** (5), 639-649.
- **CHENNI. M., 2010.** Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale *Bryonia dioica* Jacq. Mémoire de Magistère en Chimie, Option Chimie moléculaire: analyse, modélisation, synthèse. Université d'Oran - Senia, pp 32-33.
- **CHEOK. C.Y; SALMAN. H.A; SULAIMAN. R., 2014.** Extraction and quantification of saponins. *Journal of Food Research International*, **59**, 16-40.
- **COWAN. M.M., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Journal of American Society for Microbiology*, **12** (4), 564-582.
- **CROZIER. A; JAGANATH. I.B; CLIFFORD. M.N., 2009.** Dietary phenolic: chemistry, bioavailability and effects on health. *Journal of Natural product reports*, **26** (8), 1001-1043.

- **DAI. J et MUMPER. R.J., 2010.** Plant phenolic: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Journal of molecules*, **15**, 7313-7352, ISSN: 1420-3049.
- **DESCHEPPER. R., 2017.** Variabilité de la composition des huiles essentielles et l'intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. Thèse du grade de Docteur en Pharmacie. Université d'Aix-Marseille - France. p 31.
- **DO. Q.D; ANGKAWIJAYA. A.E; LAN. P; HUYNH. L.H; SOETAREDJO. F. E; ISMADJI. S; JU. Y.H., 2014.** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, **1**, 1-7.
- **DORMAN. H.J.D; BACHMAYER. O; KOSAR. M; HILTUNEN. R., 2004.** Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 762-770.
- **EL GHARRAS. H., 2009.** Polyphénols: food sources, properties and applications. *Journal of Food Science and Technology*. **44**, 2512-2518.
- **FADILI. K; AMALICH. S; N'DEDIANHOVA. S.K; BOUACHRINE. M; MAHJOUBI. M; EL HILALI. M; ZAIR.T., 2015.** Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc: *Rosmarinus officinalis* et *Thymus Satureioides*. *Journal of Innovation and Scientific Research*, **17** (1), 24-33.
- **FAHIM. A.F; ESMAT. A.Y; FADEL. H.M; HASSAN. K.F.S., 1999.** Allied studies on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. *Journal of Food Science and Nutrition*, **50**, 413-427.
- **FEKNOUS. S; SAIDI. F; MOHAMED SAID. R., 2014.** Extraction, caractérisation et identification de quelque métabolites secondaires actifs de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Journal of Nature & Technology*, **1** (11), 7-13.
- **FESKENS. J.M; HERTOOG. G.L; HOLLMAN. C.H; KATAN. M.B; KROMHOUT. D., 1993.** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Journal of The Lancet*, **342**, 1007-1011.
- **GAO. X; CASSIDY. A; SCHWARZSCHILD. M.A; RIMM. E.B; ASCHIRIO. A., 2012.** Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Journal of neurology*, **78**, 1138-1145, ISSN: 0028-3878.
- **GENENA. A.K; HENSE. K; SMÂNIA JUNIOR. A; SOUZA. S.M., 2008.** Rosemary (*Rosmarinus officinalis*), a study of the composition, antioxidant and antimicrobial

activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Journal of Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*, **28** (2), 463-469.

- **GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ. Ö et MAZZA. G., 2007.** Saponins: Properties, applications and processing. *Journal of Taylor and Francis*, **47**, 231-258, ISSN: 1040-8398.
- **GUESMI. A; BOUDOUS. A., 2006.** Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles associées dans les produits de thalassothérapie. *Journal of Régions Arides*, **1**, 224-230.
- **GUINOISEAU. E., 2010.** Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Thèse du grade de Docteur en biochimie-biologie moléculaire. Université de Corse - France. p 78.
- **HAMADACHE. N., 2011.** Criblage des extraits phénoliques d'origine végétale doués d'activité antibactérienne: recherche des inhibiteurs naturels de β -lactameses. Mémoire de Magistère en Biologie, Option Biochimie appliquée aux substances végétales bioactives. Université Abderrahmane Mira - Béjaia (UAMB). pp 4-8.
- **HAYOUNI. E.A; ABEDRABBA. M; BOUIX. M; HAMDI. M., 2007.** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Journal of Food Chemistry*, **105**, 1126-1134.
- **HOEFLER. C., 1994.** Contribution à l'étude pharmacologique des extraits de *Rosmarinus officinalis* L., et notamment des jeunes pousses: activités cholérétiques, anti-hépatotoxiques, anti-inflammatoires et diurétiques. Thèse du grade de Docteur en Science pharmacognosie. Université de Metz - France. p 9.
- **ISERIN. P., 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales. 2^e Edition Larousse-VUEF. London. ISBN: 2-03-560252-1, p 16.
- **JÄGER. A.K et SAABY. L., 2011.** Flavonoids and the CNS. *Journal of molecules*, **16**, 1471-1485, ISSN: 1420-3049.
- **JHONSON. L., 1999.** Antioxydants et anticancéreux. *Journal of Biofutur*, **1999** (186), 14 17.
- **JOIN. M; BANERJI. R; NIJAM. S.K; SCHEFFER. J.J.G; CHATURVEDI. H.C., 1991.** In vitro production of essential oil from proliferating shoots of *Rosmarinus officinalis* Planta Medica. *Journal of Food Science and Nutrition*, **57**, 122-124.
- **JUSTESEN. U; KNUTHSEN. P., 2001.** Composition of flavonoids in fresh herbs and calculations of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Journal of Food Chemistry*, **73**, 245-250.

- **KABOUCHE. A., 2005.** Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae. Thèse de doctorat en chimie. Université Mentouri - Constantine, p 22.
- **KARUMI. Y; ONYEYLI. P.A; OGUGBUAJA. V.O., 2004.** Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *Journal of Medical Sciences*, 4 (3), 179-182.
- **KHOLKHAL. F., 2014.** Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp et coloratus et ssp euciliatus. Thèse de doctorat en biologie, Option Produits naturels, Aspects nutritionnels et Activités Biologiques. Université Abou bekr Belkaid - Tlemcen, pp 18-22.
- **LABIOD. R., 2016.** Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calaminthanepeta*: activité antibactérienne, antioxydante et activité fongicide. Thèse de doctorat en Biochimie, Option Biochimie appliquée. Université Badji Mokhtar - Annaba, pp 23-27.
- **LAIB. I., 2011.** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs. Mémoire de Magister en sciences alimentaire. Université Mentouri - Constantine, p 27.
- **LAOUINI. S., 2014.** Etude phytochimique et activité biologique d'extraits des feuilles de *Phoenix deactyliferal*. dans la région du sud d'Algérie (la région d'Oued Souf). Thèse de doctorat en Chimie Industrielle, Option Génie chimique. Université Mohamed Khider - Biskra, pp 39-92.
- **MAKHLOUFI. A., 2010.** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Béchar (*Matricaria pubescens* Desf et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de doctorat en Biologie, Option Microbiologie et sécurité sanitaire des aliments. Université Abou bekr Belkaid - Tlemcen, pp 6-130.
- **MAMADOU. A.O., 2005.** Etude phytochimique et de l'activité antipaludique in vivo et in vitro de *Momordica balsamina* Linn. (Cucurbitaceae). Thèse du grade de Docteur en pharmacie. Université de Bamako - Mali. pp 42-50.
- **MISSAOUI. R., 2018.** Extraction verte et caractérisation des molécules bioactives dans les coproduits de la production d'asperge (*Asparagus officinalis* L.). Mémoire du grade de Maitre de Science en Sciences et Technologie des aliments. Université Laval du Québec - Canada. p 25.
- **MOUNYR. B., 2011.** Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de trois extraits de Plantes Médicinales et Aromatiques cultivées dans le jardin de l'institut national des

plantes médicinales et aromatiques-Taounate. Mémoire Magister en Biotechnologie Microbienne. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, p 101.

- **MUNIZ. M.N., 2006.** Synthèse des alcaloïdes biologiquement actifs la (+) – anatoxine-a et la (±)- camptothécine. Thèse du grade de Docteur en Chimie. Université Joseph-Fourier, Grenoble I - France. pp 15-17.
- **PAOLINI. J., 2005.** Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux Asteraceae endémique de Corse: *Eupatorium cannabinum* subsp. *Corsicum* et *Doronicum corsicum*. Thèse du grade de Docteur en chimie organique et analytique. Université de Corse - France. p 9.
- **RAKOTONANAHARY. M., 2012.** *Peumus boldus* M. de la botanique à la thérapeutique: État de connaissances en 2012. Thèse du grade de Docteur en Pharmacie. Université Joseph-Fourier - France. p 19.
- **RICHARD. A., 2012.** Synthèse bibliographique de la phytothérapie et de l'aromathérapie appliquées à la dermatologie. Thèse du grade de Docteur Vétérinaire. Université Claude-Bernard, Lyon I - France. pp 22-31.
- **SAIDI. I., 2019.** Caractérisation et valorisation d'une plante de la famille des Fabaceae: *Gleditsia triacanthos* de la région de Sidi Bel Abbès: extraction des substances bioactives. Thèse de doctorat en Science biologique, Option Enzyme, Microorganismes et Bio-industries. Université Djillali Liabès – Sid Bel Abbés. pp 4-29.
- **SEYOUM. A; ASRES. K; EL-FIKY. F.K., 2006.** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Journal of nutrition*, **67**, 2058-2070.
- **SPARG. S.G; LIGHT. M.E; STADEN. V., 2004.** Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, **94**, 219-243.
- **TAWAHA. K; ALALI. F.Q; GHARAIBEH. M; MOHAMMAD. M; EL ELIMAT. T., 2007.** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Journal of Food Chemistry*, **104**, 1372-1378.
- **TOMAS. F.A et CLIFFORD. M.N., 2000.** Dietary hydroxybenzoic acid derivatives nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 1024-1032.
- **TOUAMI. O., 2016.** Etude des propriétés phytothérapeutique de la plante médicinale *Malva sylvestris*. Mémoire de Master en Sciences de la matière, Option Chimie organique et chimie des matériaux organiques. Université L'arbi Tébessi - Tébessa. p 8.
- **VINCKEN. J.P; HENG. L; GROOT. A; GRUPPEN. H., 2007.** Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Journal of phytochemistry*, **68**, 275-297.

- **WECHESSER. S; ENGEL .K, SIMON. H.B; WITTMER. A; PELZ. K; SCHEMPP. C.M., 2007.** Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Journal of Phytomedicine*, **14**, 508-516.
- **WILLIAMS. L.R; LUSUNZI. I., 1994.** Essential oil from *Melaleuca dissitiflora*: a potential source of high quality tea tree oil. *Journal of Industrial Crops and products*, **2**, 211-217.
- **WOJDILO. A; JAN. O; CZEMERYS. R., 2007.** Antioxidant activity and the phenolic compounds in 32 selected herbs. *Journal of Food Science and Nutrition*, **1**, 940-949.
- **WOLLINGER. A; PERRIN. E; CHAHBOUN. J; JEANNOT. V; TOURAUD. D, KUNZ. W., 2016.** Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *Journal of Comptes Rendus Chimie*, **1** (1), 1-12.
- **ZEMMOURI. H., 2015.** Etude des activités biologiques et effets comparatifs de *Borago Officinalis* et *Urtica dioica* sur l'inflammation bronchique dans un modèle d'asthme expérimental chez les rats de la souche wistar. Thèse de doctorat en Biochimie appliquée. Université Badji Mokhtar - Annaba, pp 23-26.
- **ZERMANE. A., 2010.** Etude de l'extraction supercritique application aux systèmes agroalimentaires. Thèse de doctorat en chimie industrielle, Option génie de procédés. Université Mentouri - Constantine, p 21.

Résumé

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.

Le rendement des extraits et des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. varié de 10 à 25 ml/kg (soit: 1 à 2,5 %). En ce qui concerne les résultats de l'analyse par HPLC et GC-MS les principaux constituants sont l'acide rosemarique, le carnosol, le gemfibrozil, et l'acide carnosique. L'activité antioxydante a été évaluée par les biais de 3 méthodes (ABTS, FRAP et DPPH). Les résultats du test ABTS ont démontré que l'extrait du romarin a un pourcentage d'inhibition de $274 \pm 1,4$ umol Eq Trolox. Les résultats du test DPPH ont démontré que l'extrait du romarin a un pourcentage d'inhibition égal à 95,66 % avec un $IC_{50}=17,87$ ug/ml.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été étudiée vis-à-vis plusieurs souches bactériennes par la méthode de diffusion sur milieu solide. Cette dernière montre que les extraits et l'huile essentielle de romarin exerce une activité antibactérienne remarquable et que les bactéries Gram positives sont plus sensibles à l'action des extraits et l'huile que les bactéries Gram négatives.

Mots clés: *Rosmarinus officinalis* L., extraits, huiles essentielles, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

Abstract

Plants have been used since ancient times by humans to treat various diseases. These plants have the advantage of being made up of a range of potential compounds, various chemical structures with many biological activities. Currently, the development of bacterial resistance to antibiotics and the toxicity of synthetic antioxidants has led researchers to draw from the plant world and particularly from aromatic and medicinal plants for their

The yield of extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. varied from 10 to 25 ml/kg (IE: 1 to 2,5 %). Regarding the results of the analysis by HPLC and GC-MS are dominated by rosemarique acid, carnosol, gemfi broziland l'acide carnosic acid. Antioxidant activity was evaluated using 3 methods (ABTS, FRAP and DPPH). The results of the ABTS test showed that rosemary extract had an inhibition percentage of 274 ± 1.4 umol Eq Trolox. The results of the DPPH test showed that rosemary extract has an inhibition percentage equal to 95.66% with an $IC_{50}=17.87$ ug/ml.

The antimicrobial activity of essential oils has been studied with regard to several bacterial and fungal strains by the solid medium diffusion method. The latter shows that extracts and essential oil of rosemary exerts a remarkable antibacterial activity to that of fungal and that Gram positive bacteria are more sensitive to the action of extracts and oils than Gram negative bacteria.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L., methanolic extract, essential oils, activity antioxidant, antimicrobial activity.