

Université Mohamed Khider – Biskra
Faculté des Sciences et de la technologie
Département : Chimie Industrielle



جامعة محمد خيضر بسكرة
كلية العلوم و التكنولوجيا
قسم : الكيمياء الصناعية

Mémoire présentée en vue de l'obtention
du diplôme de Master en : Génie des Procédés

Option : Génie Chimique

**Etude de l'activités antibactérienne des huiles
essentielles de *Rosmarinus officinalis* L.**

Présenté par :
BELKHIRI FATIMA ZOHRA

Devant le jury composé de :

Président : M^{eme} RAHALI HANAN

Encadreur : M^{eme} ADJAL FATIMA

Examineur : M^{eme} ADAIKA KALTHOUM

Promotion Juin 2015

Remerciements

*A*vant tout nous remercions Dieu « ALLAH » le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce travail .

Je remercie mon encadreur "**ADJAL FATIMA**" maitre assistante à l'université de Biskra qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail.

Je remercie tous les équipes de laboratoire de chimie industrielle pour leur aide précieuse.

Une partie de notre travail est réalisé à laboratoire de faculté des sciences de la vie et de la nature de université de biskra , Je remercie Responsable de la faculté monsieur **Moussi Abd elhamid** et tous les membres de l'équipe de ces laboratoires pour leur accueil, leur sympathie ainsi que leurs idées constructives

Je remercie les membres de jury, chacun a son nom, d'accepter de juger notre travail.

Enfin je veux dire merci à tous les enseignants du département de chimie l'université de Biskra pour l'aide pendant ma formation d'étude.

A tous personnes qu'est aidé de proche ou loin.



DEDICACE

Je dédie ce modeste travail :

*Aux deux être le plus chers au monde, qui ont souffert nuit et jour
pour nous couvrir de leur amour, mes parents.*

*A mon père "**Mohamed**" pour son patient avec moi et son encouragement.*

*A ma source de bonheur, la prunelle de mes yeux, ma mère "**Sakhria**".*

Que le bon ALLAH vous garde en bonne santé.

Je dédie aussi ce modeste travail :

*A mes sœurs : **Soumia .Randa .Salma . Hibat errahman .***

*A mes très chers frères : **Sid Ali .Rayan***

A mes grand-pères et mes grand-mères

A mes ancles et mes tantes

*Ainsi que pour toutes mes amies surtout mon très chère "**RADJA**" qui
m'a accompagné toutes ces circonstances amour terme et de
dévotion leur aidée et encouragée pendant cette Période de thèse.*

A toute promotion génie chimique 2015.

A tous ceux que j'aime et que je respecte.

FATIMA ZOHRRA

Sommaire

LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES ABREVIATIONS	
INTRODUCTION GENERALE	01
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles	
I.1. Historique des HE	03
I.2. Définition	03
I.3.Répartition et localisation	04
I.3.1. Répartition	04
II.3.2- Localisation	04
I.4 - Fonctions biologiques des huiles essentielles.....	05
I.5 -Activité biologique	05
I.6 - Composition Chimique des Huiles Essentielles.....	07
I.6.1.Les composés terpéniques.....	07
I.6.1.1. Les monoterpènes	07
I.6.1.2. Les sesquiterpènes.....	08
I.6.2. Les composés aromatiques	09
I.6.3. Les composés d'origines diverses	09
I.6.4.Notion de chémotype.....	09
I.7. Rôle des huiles essentielles	10
I.7.1.Rôle physiologique.....	10
I.7.2. Rôle thérapeutique	10
I.8. Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles.....	11
I.9 . Méthodes et équipements d'extraction.....	11
I.9.1. Hydrodistillation.....	12
I.9.2 . Entraînement à la vapeur d'eau.....	13
I.9.3. Hydrodiffusion.....	14
I.9.4. Extraction par du CO2 supercritique	15

I.9.5. Extraction assistée par micro-onde	15
I.9.6 . L'expression à froid.....	16
I.9.7. L'extraction par solvants volatils	16
I.10. Facteur influençant la composition chimique d'HE.....	17
I.11 . Domaine d'application des huiles essentielles	18
I. 11. 1. En alimentation	18
I.11.2. En cosmétologie	18
I. 11. 3. En thérapeutique	18
I.12. Toxicité des huiles essentielles	19
I.13. Précautions d'emploi	19
I.14.Conservation des huiles essentielles	20

Chapitre II : présentation d'espèce étudié

II.1.Définition	21
II.2.Origine du nom	21
II.3. Description botanique.....	22
II.4.Classification	22
II.5.Habitat.....	22
II.6.Principes actifs	23
II.7.Utilisation	23
I.8.Propriétés du Romarin	23
Activité antibactérienne	23
Activité antifongique	24
Activité antivirale	24
Activité ovicide	24
Activité anti-oxydante	25
Effet anti-cancérogène	25
Effet anti-acétylcholinestérase	25
Effet hypoglycémiant	25
Effet anti-hépatotoxique	25
II.9.Composition biochimique du Romarin	26

Chapitre III : Matériel et Méthodes

III.1.Matériels utilisés.....	27
III.1.1.Matériel végétal	27

III.1.2.Matériel au laboratoire.....	27
III.1.3.Produits utilisés.....	28
III.1.4 .Matériel biologique	28
Staphylococcus aureus ATCC29213.....	29
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	29
Escherichia coli ATCC 25922	29
III.2.Méthode expérimentale.....	29
III.2.1.Les tests chimiques.....	29
III.2.1.1 Test des saponosides.....	30
III.2.1.2. Test des flavonoïdes	30
III.2.1.3.Test des stérols et terpène.....	30
III 2.1.4.Test des Tanins.....	30
III 2.1.5.test des cardénolides.....	30
III.3.Les huiles essentielles	31
III.3.1.Procédé d'extraction	31
III.3.2.Plan d'extraction.....	31
III.3.3.Calcul du rendement	32
III.3.4.Calcul de la densité.....	32
III.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne d'HE.....	33
III.4.1.Méthode de diffusion sur disque (l'aromatogramme.....	33
III.4.2.Ré-isolément des souches bactériennes.....	34
III.4.3.Préparation du milieu de culture	34
III.4.4.Préparation de l'inoculum	35
III.4.5.L'ensemencement.....	36
III.4.6.préparation des dilutions de l'HE.....	36
III.4.7. préparation des disque.....	37
III.4.8. Application des disques.....	37
III.4.9.Lecture de l'aromatogramme.....	37

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1.Caractéristiques organoleptiques	39
IV-2 Caractéristiques organoleptiques des H.E de R. officinalis L.....	39
IV.3.Résultats des tests chimique	40
IV.4. Discussion	40

IV.4.1.Les caractéristiques physico-chimiques des HE de <i>R. officinalis</i> L.....	40
IV.4.2.Résultats du test du pouvoir l'activité antibactérienne.....	40
IV.4.2.1. Résultats de l'aromatogramme.....	40
CONCLUSION GENERALE	44
Références bibliographiques.....	45

Liste des tableaux

Tableau I. 01: Classement et activité biologique de molécules aromatiques selon leur fonction chimique.....	06
Tableau III.01 : les appareils de laboratoire utilisés.....	27
Tableau IV.1 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus Officinalis.l</i>	39
Tableau IV.2 :Résultats des testes chimiques.....	40
Tableau IV.3 : Les caractéristiques physico-chimiques d'HE de <i>R.officinalis.L</i>	40
Tableau IV.4 : résultats de l'aromatogramme(diamètres des zones d'inhibition en cm de chaque dilution, DMSO et l'ATB).....	42

Listes des figure

Figure I. 1 : Exemples de quelques monoterpènes.....	08
Figure I.2 : Exemples de quelques sesquiterpènes.....	08
Figure I.3 : Exemples de composés aromatiques.....	09
Figure I.4: Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle.....	12
Figure I.5 : montage d'hydrodistillation.....	13
Figure I.6 : montage d'entraînement à la vapeur d'eau.....	14
Figure I.7 : montage d'hydrodiffusion	14
Figure I.8 : montage d'extraction par le CO ₂ supercritique.....	15
Figure I.9 : montage d'extraction assistée par micro-onde.....	16
Figure I.10: appareil de Soxhlet et appareil de Lickens-Nickerson.....	17
Figure II.1 : <i>Rosmarinus officinalis</i> Biskra.....	21
Figure II.2 : Aspects morphologiques du Romarin.....	22
Figure III.1: Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'HE.....	31
Figure III.2: Huile essentiel de <i>Rosmarinus officinalis</i> .l.....	31
Figur III.3: Les étapes d'extraction d'huile essentielle.....	32
Figure III.4: Méthode de diffusion sur disque.....	34
Figure III.5: Ré-isolément des souches	34
Figure III.6 : Ecoulement du milieu de culture.....	35
Figure III.7: inoculum de différent souche bactériennes.....	35
Figure III.8: Ensemencement bactérien.....	36

Figure III.9: Préparation des dilutions.....	36
Figure III.10 : L'application des disques.....	37
Figure III.11 : Aromatogramme.....	38
Figure IV.1 : H.E de <i>R. officinalis.L</i> obtenue par hydrodistillation.....	39
Figure IV.2: Les zones d'inhibition de l'huile essentielle testée(<i>E.coli</i>).....	41
Figure IV.3: Les zones d'inhibition de l'HE testée(<i>Staphylococcus aureus</i>).....	41
Figure IV.4: Les zones d'inhibition de l'HE testée(<i>pseudomonas</i>).....	41
Figure IV.5 : Histogramme présent les zones d'inhibition pour toutes les souches bactéries.....	42

Liste des abréviations

AFNOR: Association Française de Normalisation

HIV : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VMHD: Vacuum Microwave Hydrodistillation

HE: Huile Essentielle

EtOH : éthanol.

GST: Glutathion S-transférase

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ATCC: American Type Culture Collection

% : Pourcentage

°C : degré celcius

Mg : milligramme

cm : centimètre

µl: microlitre

DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate

GPP : Géranyl- pyrophosphate

GGPP : Géranylgéranyl - pyrophosphate

IPP : Isopentényl-pyrophosphate

S. aureus : Staphylococcus aureus

E.coli: Escherichia coli

P. aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa

Introduction générale

Un grand nombre des plantes, aromatiques, médicinales, des plantes épicées et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes ,qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme l'antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales folklorique. Ces plantes représentent une nouvelle source des composés actifs. [1]

Le romarin (*Rosmarinus Officinalis* L.) fait l'objet des récentes recherches dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires. C'est une herbe aromatique de la famille des Labiées, appréciée pour ses propriétés aromatiques, anti-oxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, emménagogues et anti-tumorales, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle[2].

Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude des molécules antimicrobiennes comme les caroténoïdes et les polyphénols.

En effet, les métabolites secondaires font et reste l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche des nouveaux constituants naturels tels les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles. [1]

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines des composés, principalement terpéniques. Les terpènes, molécules construites à partir d'entités isopréniques, constituent une famille très diversifiée, tant au niveau structural qu'au niveau fonctionnel. Dans les huiles essentielles, on rencontre généralement des mono et des sesquiterpènes (possédant respectivement 10 et 15 atomes de carbone) et plus rarement des diterpènes (20 atomes de carbone) ainsi que des composés linéaires non terpéniques et des phénylpropanoïdes. [3]

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antimicrobienne d'un produit pharmaceutique à base de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Notre étude sera répartie en quatre chapitres, initiés par une recherche bibliographique ou nous apportons dans le premier chapitre une généralité sur les huiles essentielles, leur compositions, activités biologiques et pharmacologiques ainsi que sur les méthodes d'extraction des huiles essentielles.

Dans le second chapitre nous effectuerons une présentation botanique de la famille lamiacées et l'espèce *Rosmarinus officinalis*, sa localisation géographique dans le monde, et son utilisation.

Le troisième chapitre présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir:

- les tests chimique;
- l'extraction des huiles essentiels de *Rosmarinus officinalis*.
- test de sensibilités, des bactéries et des levures vis-à-vis de nos huile essentielle.

Le quatrième chapitre abordera les différents résultats et leurs discussions.
enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

I.1. Historique des HE :

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation, etc.

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation avec l'ère arabe de la civilisation, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques.

Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice GATTEFOSSE a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches[4].

I.2. DÉFINITION

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydro distillation, par pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Elles sont très utilisées dans l'industrie des produits cosmétiques, pharmaceutiques et agro-alimentaire. Les huiles essentielles se retrouvent dans des glandes minuscules situées dans différentes parties de la plante aromatique : les feuilles, les fleurs, les fruits, les graines, l'écorce et pour certaines plantes dans les racines. Plus de 2000 espèces de plante sont riches en huiles essentielles ; elles sont réparties sur 60 familles dont les principaux sont: Lauraceae, Labiatea, Umbelliferae, Rutaceae, Compositae, Myrtaceae et les Pinaceae [5].

Selon la norme AFNOR NF donner une définition plus précise des huiles essentielles ; ces dernières sont des produits obtenus à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques[6].

On rencontre les huiles essentielles dans divers familles botaniques elles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et forment dans le cytoplasme de cellules spécialisées[7].

I.3.1. Répartition

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal et surtout chez les végétaux supérieurs, il y a 17500 espèces aromatiques.

Les familles botaniques capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont réparties dans un nombre limité des familles, Exemple : Myrtaceae (Girofle), Lauraceae (laurier), Rutaceae (citron), Lamiaceae (Menthe), Apiaceae (Coriandre), Zingiberaceae(Gingembre)..... etc.

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes de la plante, par exemples : dans les sommités fleuries (Menthe, Lavande) les feuilles (Eucalyptus, Laurier) les rhizomes (Gingembre) les fruits (agrumes, badiane, anis), les racines (Vétiver), les graines (Muscades), bien que cela soit moins habituel dans des écorces (Cannelier) [8].

I.3.2. Localisation

Elles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante. Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules ou se rassemblent sous formes de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles [9].

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence des structures histologique spécialisés, souvent localisée sur ou à proximité de la surface de la plante qui sont: cellules à huiles essentielles de Lauraceae, les poils sécréteurs des laminaceaes, poches sécrétrices des Myrtaceaes, des Rutaceaes, et les Laminaceaes , et les canaux sécréteurs qui existent dans des nombreuses familles. Il est intéressant de remarquer que les organes d'une même espèce peuvent renfermer des huiles essentielles de composition différente selon la localisation dans la plante[7].

I.4 . Fonctions biologiques des huiles essentielles

Bien que de nombreuses hypothèses aient été avancées pour expliquer les raisons de la synthèse de l'essence par la plante, nul ne sait avec exactitude pourquoi la plante fabrique son essence. Mais ce qui est probable c'est que le rôle des huiles essentielles au niveau du matériel végétal est intimement lié à leur situation[10].

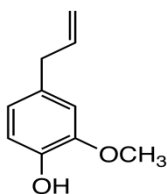
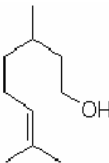
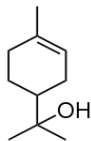
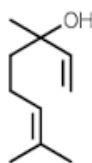
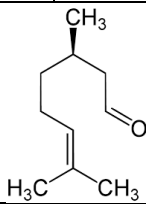
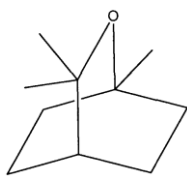
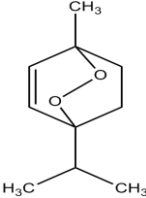
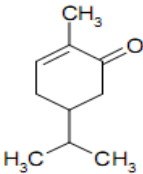
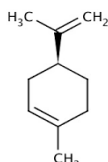
Les spécialistes considèrent les huiles essentielles comme des sources de signaux chimiques permettant à la plante de contrôler ou réguler son environnement. Par exemple, ces huiles confèrent un rôle défensif contre les champignons et microorganismes et attractif vis-à-vis des insectes pollinisateurs. Un feuillage renfermant une teneur élevée en essences végétales (Ex : laurier) le protège contre les herbivores. Le rôle des huiles essentielles au niveau des racines, des écorces et du bois confère à la plante un effet antiseptique vis-à-vis des parasites telluriques[11].

I.5. Activité biologique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont employées pour leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums [12].

Activité antimicrobienne et antiparasitaire : les terpénoïdes ont des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires. En 1977 a été signalé que 60% des dérivés des huiles essentielles examinés jusqu'au 1999 sont inhibiteurs de mycètes tandis que 30% inhibent les bactéries. Le triterpénoïde, l'acide bétulinique est de juste un de plusieurs terpénoïdes qui ont montrés une action inhibitrice envers HIV. Le mécanisme de l'action des terpènes n'est pas entièrement compris mais on pense qu'il s'agit de la rupture de la membrane par les composés lipophiles [13].

Tableau I .01: Classement et activité biologique de molécules aromatiques selon leur fonction chimique[14].

Composés aromatiques	Exemples			Propriétés
Phénols C ₆ H ₆ O	 Eugénol (C ₁₀ H ₁₂ O ₂)			Stimulantes, Toniques AntiseptiquesBactéricides Fongicides, Anti-virale, Antiparasitaires Irritantes
Alcools Terpéniques	 Citronellol (C ₁₀ H ₂₀ O)	 Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O)	 linalol (C ₁₀ H ₁₈ O)	Anti-inflammatoires, Antiseptiques,Bactéricides, Fongicides, Anti-virale, Neurotoniques Ils agissent en dénaturant les protéines, comme agents dedéshydratation
Aldéhydes Terpéniques	 Citronellal (C ₁₀ H ₁₈ O)			Antifongiques, Sporicidas, Toxicité liée à la présence du groupe aldéhyde Insecticide
Ether-oxides, péroxyde	 Cinéole (C ₁₀ H ₁₈ O)	 Ascaridole (C ₁₀ H ₁₆ O ₂)		Antibactériens, Antifongiques, Insecticides L'ascaridole est fortement réactif et toxique (par la liaison –O-O-)
Cétones	 Carvone (C ₁₀ H ₁₄ O ₂)			Calmantes, Antivirales, Antifongiques Neurotoxiques Anti- épileptique
Hydrocarbures aliphatiques, sesquiterpènes	 Limonene (C ₁₀ H ₁₆)			Fongistatique, Bactériostatique, Insecticides, Nematicide, Herbicide

I.6 . Composition Chimique des Huiles Essentielles

Dans les plantes, les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Elles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines[15].

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane[16].

I.6.1.Les composés terpéniques

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ce sont des composants majeurs de la résine et de l'essence de térébenthine produite à partir de résine. Les terpènes se rencontrent également chez les Métazoaires (phéromones et hormones sesquiterpéniques des Hexapodes, diterpènes d'organismes aquatiques (Cnidaires, Eponges).

Les terpènes ne sont pas formés à partir de l'isoprène C_5H_8 bien qu'ils aient pour formule de base des multiples de celle-ci, c'est-à-dire $(C_5H_8)_n$. Ils sont formés à partir d'IPP qui réagit avec une molécule starter : DMAPP, GPP, GGPP, etc. En revanche, l'isoprène est facilement obtenu par dégradation des terpènes. On peut considérer l'isoprène comme l'un des éléments de construction préférés de la Nature[17].

I.6.1.1. Les monoterpènes :

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%)[18].

Ils comportent deux unités isoprène (C_5H_8), selon le mode de couplage « tête-queue ». Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales.

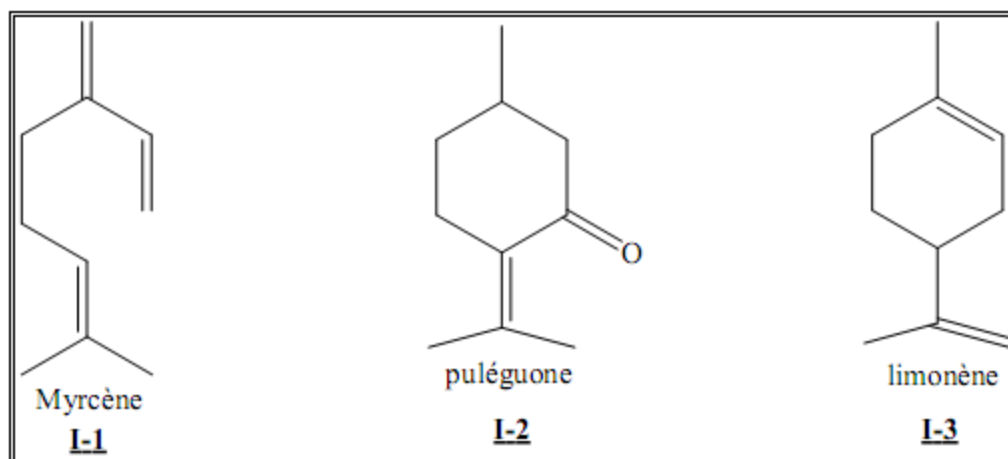


Figure I.1 : Exemples de quelques monoterpènes

I.6.1.2. Les sesquiterpènes

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature.

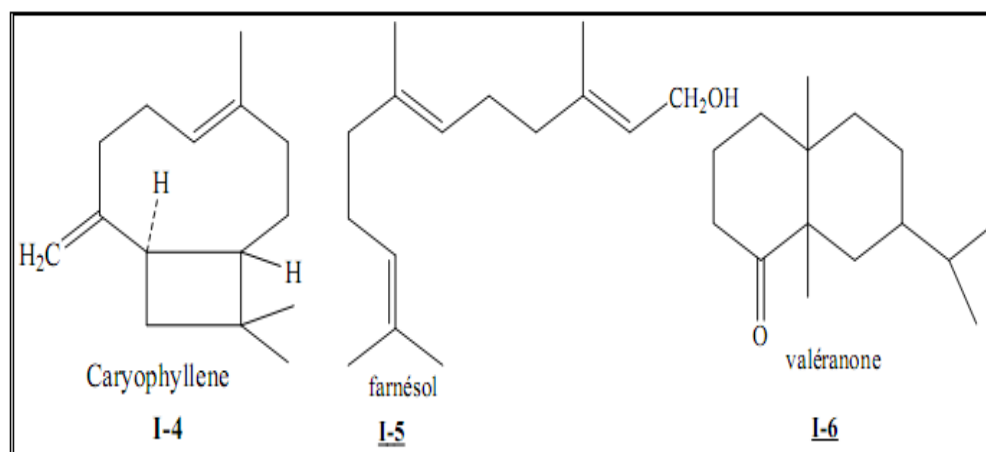


Figure I.2 : Exemples de quelques sesquiterpènes

I.6.2. Les composés aromatiques

Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Figure I.3) [16].

Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'Apiaceae (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, de la vanille, de la cannelle, du basilic, de l'estragon, etc [19].

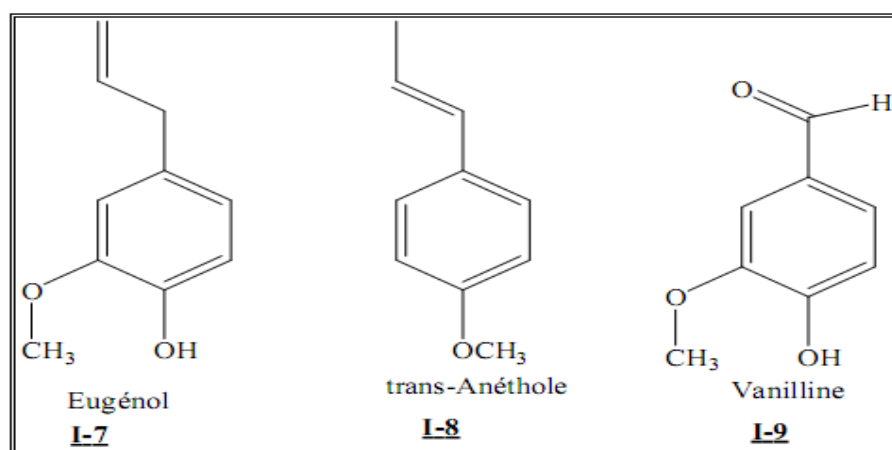


Figure I.3 : Exemples de composés aromatiques

I.6.3. Les composés d'origines diverses

Ce sont des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles entraînaibles par la vapeur d'eau. Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras, de terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares. Enfin, il n'est pas rare de trouver dans les concrètes des produits de masses moléculaires plus importantes nonentraînables à la vapeur d'eau, mais extractibles par les solvants homologues des phénylpropanes, diterpènes, etc.... [20].

I.6.4. Notion de chémotype

le chémotype d'une HE est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'HE. C'est l'élément qui permet de distinguer des HEs extraites d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les HEs pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Ce polymorphisme chimique existe chez

certaines espèces : *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*. Il est important de noter que les HEs à chémotype différent présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables [14].

I.7. Rôle des huiles essentielles

I.7.1. Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu [21]. Il y a beaucoup de spéculation au sujet du " rôle " d'huiles essentielles des plantes.

Certainement plusieurs effets apparents " utiles " ont été décrits: réduction de la compétition des autres espèces de plante (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines, et protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides, et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux [22].

Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, conservent l'humidité des plantes dans les climats désertiques [23].

I.7.2. Rôle thérapeutique :

Les huiles essentielles, reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques, agissant sur la personne dans sa globalité [24-25].

Les huiles essentielles possèdent des propriétés thérapeutiques variées :

- ❖ Remédient aux problèmes respiratoires.
- ❖ Diminuent la tension nerveuse [26].
- ❖ Améliorent la circulation sanguine.
- ❖ Aident le corps à traiter les impuretés.
- ❖ Soulagent la nervosité et les douleurs rhumatismales.

Il semble que les huiles essentielles extraites de certaines aromatiques ont un rôle important dans notre vie soit physiologique ou bien thérapeutique, sans oublier le rôle

biologique de ces huiles (inhibiteurs des germinations et protecteurs les plantes des prédateurs insectes, champignons [27].

I.8 . Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène, Les principales caractéristiques sont : [20].

- Liquides à température ambiante. N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- Volatiles et très rarement colorées.
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse
- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau.
- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques
- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'humidité [28].

I.9. Méthodes et équipements d'extraction

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales.

En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ...), de la nature des composés (par exemple, les l'huile essentielles, huiles lourdes....). Le rendement en huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées ; Les principales méthodes d'extraction sont :

- Hydrodistillation
- Entraînement à la vapeur d'eau

- Hydrodiffusion
- Extraction par du CO₂ supercritique
- Extraction assistée par micro-onde
- L'expression à froid
- L'extraction par solvants volatils

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origine végétale restent identiques quelque soit le type d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation comme cela est explicité dans la figure I.4 [29].

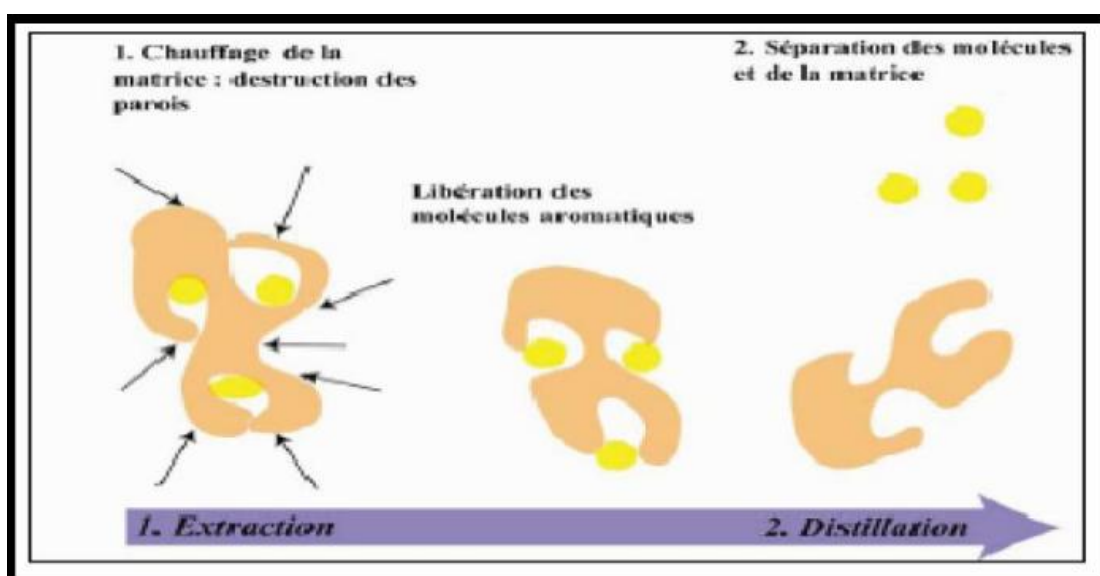


Figure I.4 : Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle [29] .

I.9.1 . Hydrodistillation

Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger (figure I.5).

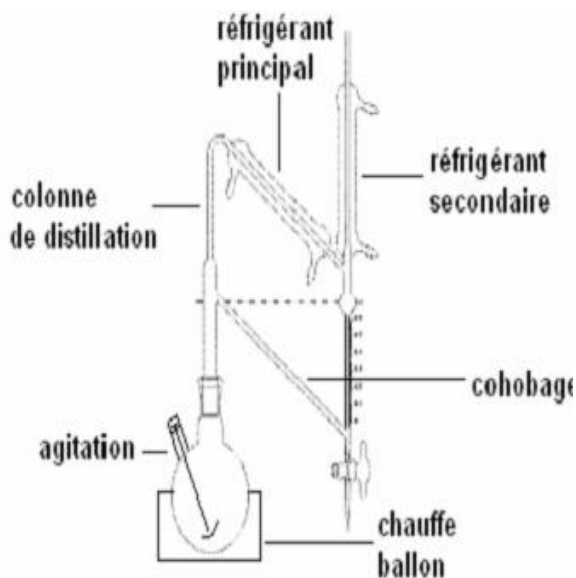
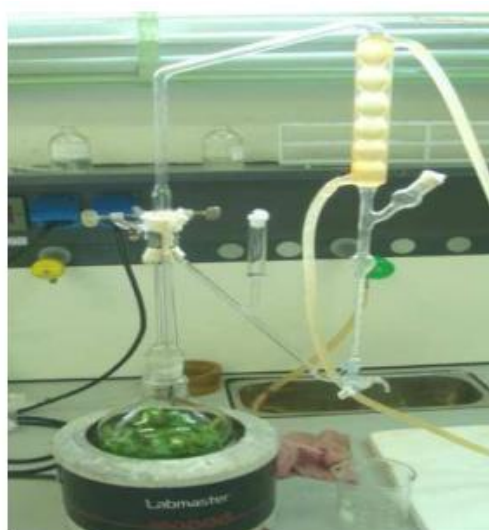


Figure I.5 : montage d'hydrodistillation

Les eaux aromatiques ainsi prélevées sont ensuite recyclées dans l'hydrodistillateur afin de maintenir le rapport plante/eau à son niveau initial.

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extract.

I.9.2. 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 de l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile.

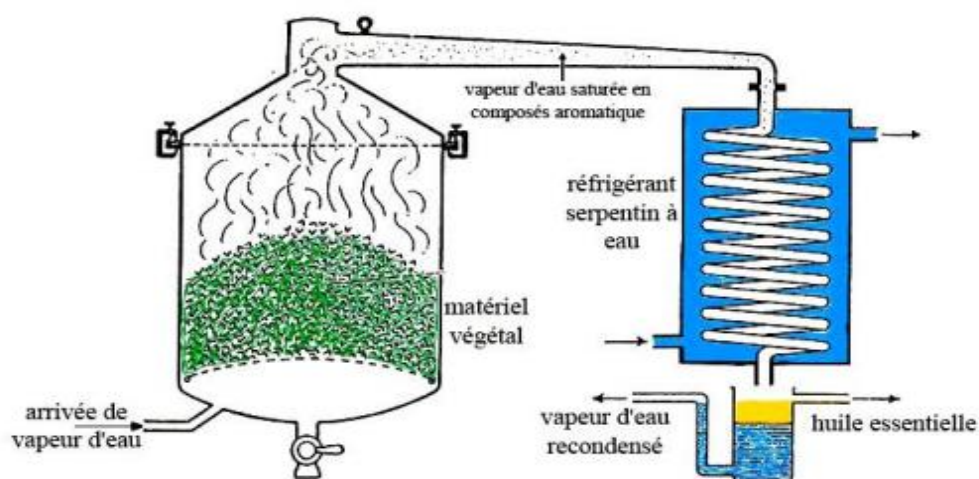


Figure I.6 : montage d'entraînement à la vapeur d'eau

I.9.3. Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur (Figure I.7). Cette technique relativement récente et particulière. Elle exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale.

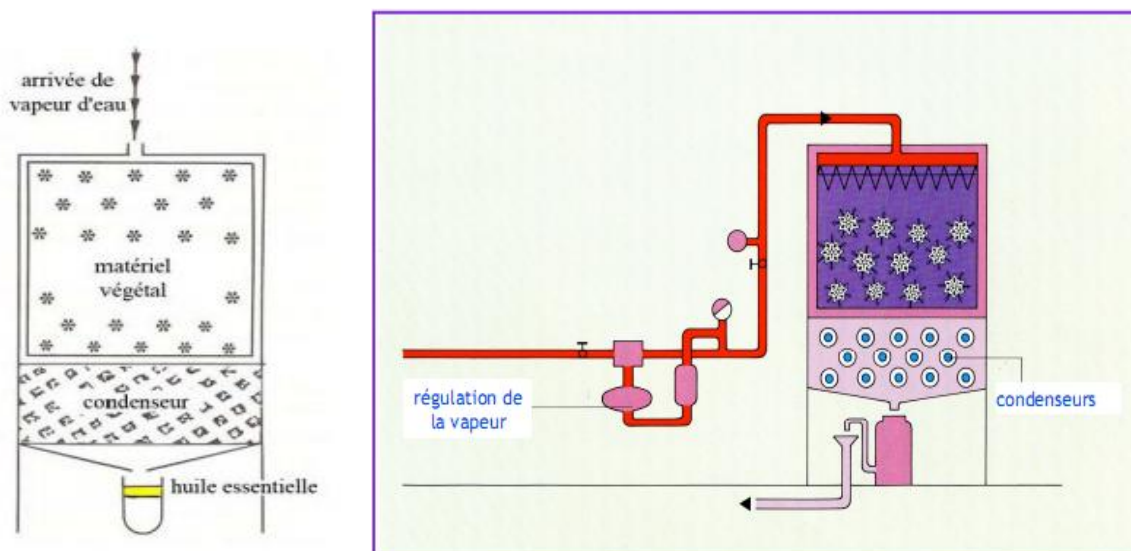


Figure I.7 : montage d'hydrodiffusion

L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils, et de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus,

l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur.

I.9.4. Extraction par du CO₂ supercritique :

La technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone à l'état super-critique. Grâce à cette propriété, le dioxyde de carbone permet l'extraction dans le domaine liquide (supercritique) et la séparation dans le domaine gazeux. Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant (Figure I.8).

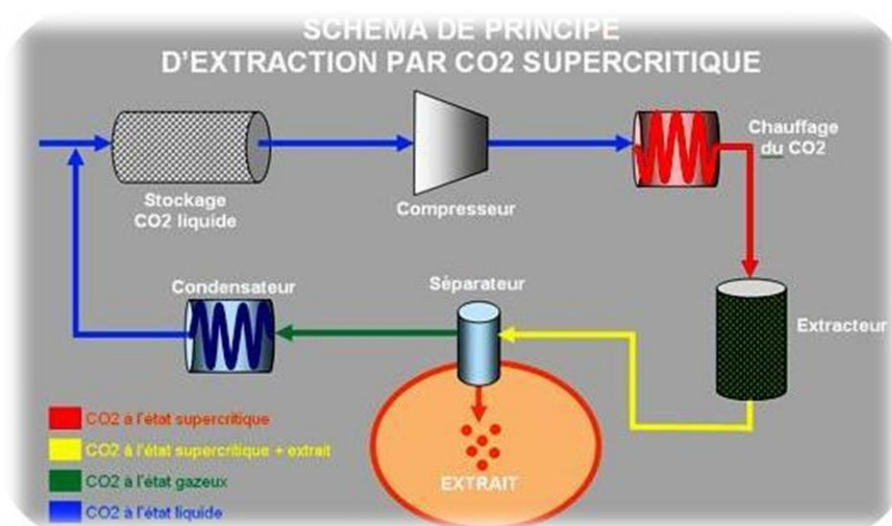


Figure I.8 : montage d'extraction par le CO₂ supercritique

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. Cette technique est utilisable pour les essences difficilement distillables[30].

I.9.5. Extraction assistée par micro-onde :

Le procédé d'extraction par micro-ondes appelée Vacuum Microwave Hydro distillation (VMHD). Cette technique d'extraction a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques. Le procédé consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale broyée en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le

méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les microondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires. L'ensemble est chauffé sans jamais atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupées par des étapes de refroidissement (Figure I.9).

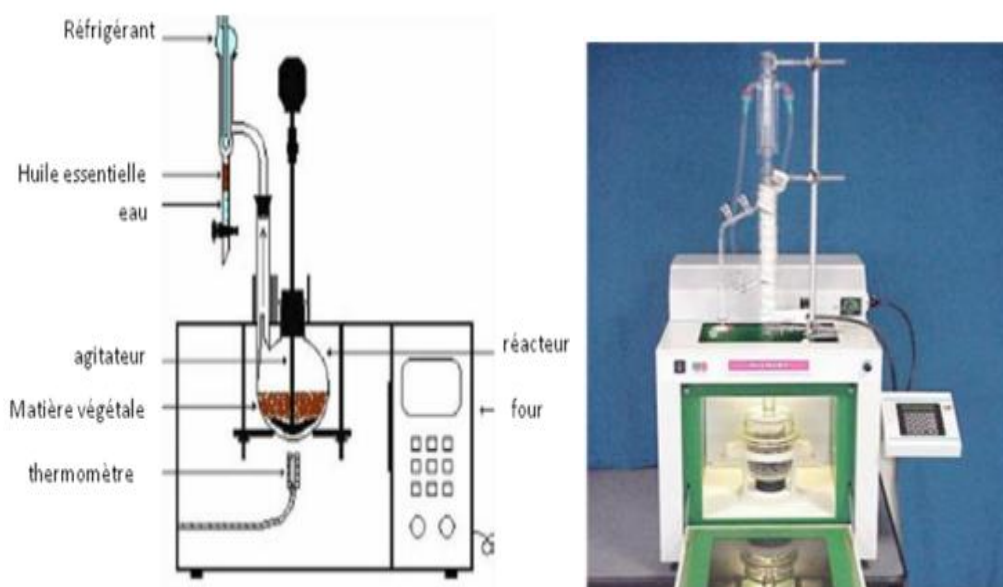


Figure I.9 : montage d'extraction assistée par micro-onde

L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation et d'obtenir un bon rendement d'extraît[31].

I.9.6. L'expression à froid

Le procédé d'extraction par expression à froid est assurément le plus simple mais aussi le plus limité. Il est réservé à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes des hespéridés ou encore d'agrumes qui ont une très grande importance pour l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cependant ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices. L'essence libérée est recueillie par un courant d'eau et reçoit tout le produit habituel de l'entraînement à la vapeur d'eau, d'où la dénomination d'huile essentielle[32].

I.9.7. L'extraction par solvants volatils

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant

va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone[33]. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet ou un appareil de Lickens-Nickerson (Figure I.10).

Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres substances[34].

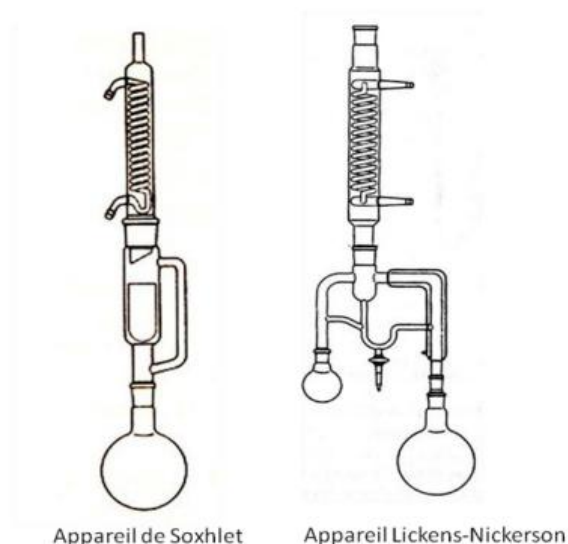


Figure I.10:appareil de Soxhlet et appareil de Lickens-Nickerson.

I.10. Facteur influençant la composition chimique d'HE

Il existe beaucoup de facteur externe pouvant influencer la composition chimique de l'HE: la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition chimique du sol, la partie de la plante utilisée, le cycle végétatif de la plante, la méthode utilisée pour l'extraction, sont d'autant de facteurs susceptibles d'exercer les modifications chimiques .

outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en HE par exemple: les citrus ont une teneur importante en HE lorsque la température est

élevée.les fleurs de chrysanthemum caronarum sont riches en HE sous l'effet de fertilisants[22].

I.11 . Domaine d'application des huiles essentielles :

I. 11. 1. En alimentation

Les huiles essentielles jouent un rôle capital dans l'aromatisation des aliments. En effet, elles donnent la flaveur aux condiments (poivre, gingembre) et aux aromatisants (menthe, anis, oranger, thym, laurier).

A faible dose, certaines substances ont un effet favorable sur la digestion, ce qui explique leur utilisation en liquoristerie (essence d'anis ou de badiane).

Les huiles essentielles entrent donc, pour leurs diverses propriétés, dans la composition des arômes employés de manière fréquente aujourd'hui dans tous les produits alimentaires comme les plats cuisinés ou prêts à l'emploi[22].

I.11.2. En cosmétologie

Beaucoup d'huiles essentielles ont des propriétés intéressantes dans le domaine de la cosmétologie. C'est le cas par exemple :

- du basilic et du romarin à propriétés tonifiantes ;
- du romarin et du thym qui ont des propriétés antipelliculaires ;
- de la rose et de la lavande qui stimulent la régénération des cellules dermiques.

Actuellement, on préfère utiliser des produits naturels qui sont censés ne pas avoir d'effets secondaires graves par rapport aux produits de synthèse. En effet, il ne faut pas oublier que « naturel » ne signifie pas non toxique. .

I. 11. 3. En thérapeutique

Les huiles essentielles ont depuis longtemps été employées pour leurs effets thérapeutiques. Elles sont utilisées en particulier en raison de leurs vertus antibactériennes,

telles l'action antiseptique des voies respiratoires des essences d'eucalyptus ou de niaouli. Elles sont administrées par massages, inhalations, vaporisation ou dans le bain [35] .

I.12. Toxicité des huiles essentielles

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées [14].

Cependant quelques informations sur certaines toxicités sont décrites par la littérature :

En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL50 supérieures à 5g/kg. En ce qui concerne la lavande la toxicité est faible autour des 5g/kg (donnée observée chez l'animal) [19]. Chez l'homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, les plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'huiles essentielles.

Certains auteurs (Franchomme et al., 1990 ; Mailhebiau, 1994) se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent [36-37] .

Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxique selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (la toxicité du thym est augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour la lavande[38].

I.13. Précautions d'emploi :

Les huiles essentielles doivent être prises à bon escient et à doses adaptées afin d'éviter de dommageables effets secondaires.

- ✓ Il ne faut jamais injecter d'huiles essentielles par voie intramusculaire ou veineuse.
- ✓ Certaines huiles essentielles pures sont agressives pour la peau, comme l'huile essentielle de thym vulgaire. Il faudra donc les diluer dans une huile végétale (amande douce, olive...).
- ✓ Il faut se laver les mains après toute application cutanée.

- ✓ Il ne faut jamais appliquer d'huile essentielle pure sur les yeux, le nez, le conduit auditif, les muqueuses ano-génitales.
- ✓ Il ne faut pas mettre sur la peau des huiles essentielles avant toute exposition au soleil.
- ✓ Il est interdit de faire des aérosols d'huiles essentielles aux patients allergiques et asthmatiques sans contrôle médical,
- ✓ Il faut faire attention aux interactions avec les traitements des patients. Les huiles essentielles peuvent interagir avec un médicament. Par exemple, l'huile essentielle d'ail stimule la thyroïde alors que celle de fenouil diminue son activité.
- ✓ Il faut éviter d'utiliser l'huile essentielle de *Mentha piperata* sur une zone trop étendue du corps car elle peut provoquer des convulsions, un effet vasoconstricteur et anesthésiant. Elle est fortement contre-indiquée chez la femme enceinte, et chez le nourrisson jusqu'aux enfants âgés de moins de sept ans.
- ✓ Il faut éviter de laisser les flacons à la portée des enfants[39-40].

I.14.Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles de bonne qualité peuvent se conserver plusieurs années sous certaines conditions, jusque cinq ans pour les H.E.C.T par exemple. Seules les essences de Citrus se gardent un peu moins longtemps (trois ans).

Les huiles essentielles sont volatiles, il ne faut donc pas oublier de bien fermer les flacons. Il est préférable de les conserver dans un flacon en aluminium ou en verre teinté (brun, vert, ou bleu) et de les garder à l'abri de la lumière à une température ambiante jusqu'à vingt degrés[41].

Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles (norme AFNOR NF T 75-001, 1996) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des HE [6].

II.1.Définition

Le Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) est une plante des coteaux arides garrigues et lieux rocheux de la région méditerranéenne et même un peu plus au Sud jusqu'aux confins sahariens depuis l'antiquité, il est employé pour améliorer et stimuler la mémoire encore aujourd'hui en Grèce, les étudiants en font brûler dans leurs chambres en période d'examens [42].



Figure II.1 : *Rosmarinus officinalis* L. (Biskra)

II.2.Origine du nom :

- **Nom commun :** Romarin
- **Autre nom :** herbes aux couronnes, herbes aux troubadours, encensier, arbre de marine ,rose de mere, rose de marine,roumaniou, roumarine .
- **Nom scientifique :** *Rosmarinus officinalis* L. , le mot romarin (*Rosmarinus*) dérive du latin «Ros» rosée ;«Marinus» : marin ou de marine et en anglophones: rosmery[43].
- **Appellations régionales en algérie :** en plus souvent
 - Région de l'Est :Eklil
 - Région de l'Ouest : Helhal
 - Région du Centre :Yazir [44].

II.3. Description botanique

Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées, peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur, il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril – mai. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches *Rosmarinus officinalis* L. albiflorus). Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base. Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tetrakène (de couleur brune) [43].

II.4. Classification

Règne : plantes

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Lamiales (labiales)

Famille : Lamiaceae

Genre : *Rosmarinus*

Espèce: *Rosmarinus officinalis*.L[45].



Figure II.2 : Aspects morphologiques du Romarin[45].

II.5. Habitat

Originaire des régions méditerranéennes, 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, les branches récoltées pendant l'été sont séchées à l'air et à l'ombre[46].

II.6.Principes actifs :

Les principaux constituants du romarin responsables des différentes propriétés sont :

- Les acides phénoliques : acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique.
- Les flavonoïdes : genkwanine, cirsimaritrine [47], ériocitrine, hespérédine, diosmine, lutéoline [48], apigénine [49].

II.7.Utilisation

Le Romarin est souvent cultivé pour son huile essentielle. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique.

Il est considérée utile pour contrôler l'érosion du sol[50].

L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires [51].

I.8.Propriétés du Romarin

- **Activité antibactérienne**

Les effets des extraits aqueux et méthanoliques du Romarin, sur la croissance du *Streptococcus sobrinus* et sur l'activité extracellulaire de l'enzyme glucosyltransferase ont été étudiés par les résultats ont suggéré que les extraits du Romarin peuvent empêcher la lésion de la carie en inhibant la croissance du *Streptococcus sobrinus* et peuvent aussi éliminer les plaques dentaires par suppression de l'activité de la glucosyl transférase [52].

Afin de chercher de nouveaux antibiotiques et des agents antimicrobiens, une autre étude a été élaborée par examiner les effets antimicrobiens des extraits des

composés isolés de certaines plantes, sur l'ensemble de 29 bactéries et levures avec pertinence dermatologiques.

L'extrait obtenu par le dioxyde de carbone (CO₂) supercritique du Romarin, a présenté un large spectre antimicrobien. La croissance de 28 sur 29 germes a été empêchée par cet extrait d'acide carnosique [53].

- **Activité antifongique**

La biosynthèse de l'aflatoxine a été inhibée totalement par l'huile essentielle du Romarin à une concentration de 450 ppm. Selon les résultats indiqués, le potentiel de cette huile essentielle en tant que préservatif naturel contre l'*Aspergillus parasiticus* [54].

En utilisant la technique standard de diffusion sur gélose, ont évalué l'activité biologique de 11 huiles essentielles y compris celle du Romarin, les résultats ont montré que de ces huiles ont une activité inhibitrice modérée sur les cinq levures (*Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*) examinées [55].

- **Activité antivirale**

L'évaluation de l'activité antivirale de l'extrait commercial du Romarin a indiqué qu'il y a une inhibition de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) à la concentration très basses. Cependant, le carnosol a montré une activité (anti-HIV) à une concentration modérée qui n'était pas cytotoxique [56].

- **Activité ovicide**

L'huile essentielle du Romarin s'est avérée un agent ovicide contre trois espèces de moustique (*Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*) [57].

Cette huile présente une activité répulsive contre les moustiques (*Aedes aegypti*) [58].

- **Activité anti-oxydante**

L'activité anti-oxydante du Romarin est connue depuis environ 30 années [59].

En raison de ses propriétés anti-oxydantes, le Romarin est largement accepté en tant qu'épice dont l'activité anti-oxydante la plus élevée [60].

Plusieurs auteurs ont étudié l'utilisation des extraits du Romarin comme antioxydant pour conserver les produits à base de viande [59- 61-62-63]

- **Effet anti-cancérogène**

Grace à certains composants (Carnosol, Rosmaridiphénol, Rosmanol et l'acide rosmarinique), le Romarin est considéré comme une thérapie contre le cancer [45].

- **Effet anti-acétylcholinestérase**

Des extraits aqueux et méthanoliques de 11 plantes utilisés dans la médecine traditionnelles chinoise pour l'amélioration de la mémoire ont été examinées pour évaluer leurs activités inhibitrices d'acétylcholinestérase en utilisant la méthode colorimétrique d'Ellman. L'extrait méthanolique du Romarin a montré une inhibition modérée (17%) de l'enzyme à une concentration de 0.1% [64].

- **Effet hypoglycémiant**

Les observations après l'administration orale de différentes doses de l'extrait éthanolique du Romarin à 3 groupes de lapins (lapins ayant une glycémie normale, lapins ayant une hyperglycémie provoquée par l'administration orale du glucose, lapins diabétiques d'alloxane) ont clairement montré que cet extrait exerce une activité hypoglycémiante remarquable à une dose de 200 mg /kg [65].

- **Effet anti-hépatotoxique**

De nombreuses études ont été réalisées pour étudier l'effet anti hépatotoxique du Romarin, le travail a été concentré pour l'évaluation de l'efficacité de l'extrait méthanolique du Romarin pour normaliser certains paramètres histologiques et biochimiques du foie, après l'ingestion d'une hépatotoxine le

tétrachlorure de carbone(CCl_4). les résultats ont indiqué que cet extrait a empêché la peroxydation lipidique, (l'information ,lanécrose, normalisé les taux de la bilirubini ,laglycogène et l'activité du l'alanine aminotransférase) et enfin il augmenté l'activité du glutathion-S-transférase (GST) [66].

II.9.Composition biochimique du Romarin

L'huile essentielle du Romarin (1 à 2% dans la plante) contient : de l'a – pinène (7 à 80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 35%), de l'eucalyptol (1 à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène. En plus de l'huile essentielle on trouve dans le Romarin: 2 à 4 % de dérivés triterpéniques tels que : l'acide

ursolique , l'acide oléanolique ,l'acétate de germanicol ; des lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide canosolique, romanol,romadial,des acides phénolique, des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque, des acides gras organiques : l'acide citrique, glycolique, et glycérique, des stérols, de la choline , du mucilage [8],et de la résine[67].

III.1. Matériels utilisés

III.1.1. Matériel végétal

Il est constitué de la plante *Rosmarinus officinalis* L. qu'est collectée au niveau de l'université Mohamed Khider Biskra.

La partie sur laquelle nous avons basé notre travail est la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* L. (feuilles).

III.1.2. Matériel au laboratoire

Les matériels utilisés sont les suivants :

- bec bunsen
- les tubes à essai et les boîtes de pétrie
- les flacons
- Papier Whatman (Ø=6mm)
- Ecouvillon

✓ Les appareils :

Plusieurs appareils utilisés pour étudier l'activité antibactérienne de *Rosmarinus officinalis* L. le tableau suivant résume ces appareils.

Tableau III.01 : les appareils de laboratoire utilisés

Matériel	Utilisation
Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger	Extraction des HEs
Agitateur plaque chauffante	Préparation du milieu de culture
Réfrigérateur	Conservation des échantillons
Autoclave	Stériliser les matériels et les milieux de culture
Etuve réglée à 37°C	Incubation des souches bactériennes
Micropipette (500 µl)	Préparation de microvolumes

✓ Réactifs :

les antibiotiques : Gentamicine, utilisés comme témoin (+) pour les activités antibactériennes d'HE

III.1.3. Produits utilisés

- Méthanol($\text{CH}_3\text{-OH}$).
- Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{-OH}$).
- Sulfate de sodium(Na_2SO_4).
- Chlorure du ferre (FeCL_3).
- Ether diéthylique($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$).
- Chloroforme(CHCL_3).
- Acide acétique(CH_3COOH).
- Acide sulfurique(H_2SO_4).
- Hydroxyde d'ammonium(NH_4OH)
- Chlorure d'hydrogène(HCL)
- Chlorure de sodium (NaCl)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO)

✓ **Milieu utilisés :**

On utilis deux milieux de culture :

- **Gelose nutritive** : utilise pour l'obtention du souches jeunes
- **Milieu mueller Hinton** : utilisé à l'etude antibactérienne de l'HE

III.1.4 .Matériel biologique

Les souches utilisées dans les tests font parties des microorganismes, qui sont des pathogènes et des contaminants. Le support microbien est composé d'Escherichia coli, Staphylococcus aureus et Pseudomonas aeruginosa qui ont été isolées des produits pathologiques provenant de laboratoire de bactériologie de l'hôpital « hakim saadan » de Biskra.

- Escherichia coli (ATCC25922)
- Pseudomonas aenuginosa (ATCC27853)
- Staphylococcus aureus (ATCC25923)

- **Staphylococcus aureus ATCC25923**

Les staphylocoques sont des cocci à gram positif qui tendent à se grouper en amas [68] , irrégulier à la façon d'une grappe de raisin . Staphylococcus aureus est un germe aérobic - anaérobic facultatif [69], doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales, possède une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de staphylocoques. La bactérie est très répandue chez l'homme et dans de nombreuses espèces animales. Chez l'homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses et des zones cutanées humides. Il développe rapidement des résistances aux antibiotiques et les souches hospitalières ne sont souvent sensibles qu'aux glycopeptides[68].

- **Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853**

Le genre pseudomonas est fait de bacilles mobiles aérobies stricts, se cultive facilement sur les milieux usuels. Pseudomonas aeruginosa (ou bacille pyocyanique) se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ses colonies [68]. C'est une bactérie ubiquiste qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et des divers animaux. Considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales .

- **Escherichia coli ATCC 25922**

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. Escherichia coli est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers [68].

III.2.Méthode expérimentale

III.2.1.Les tests chimiques

Ce sont des techniques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques.

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tannins), les saponosides, les stéroïdes, les coumarines, les stérols, les terpènes...etc.

III.2.1.1 Test des saponosides

2 g de poudre de la plante est mélangé à 80 ml d'eau distillée puis porter à l'ébullition pendant 5 minutes. On filtre, l'extrait est ensuite refroidi et agité vigoureusement pendant 2 minutes. La formation d'une mousse plus ou moins importante indique la présence de saponosides [70,71].

III.2.1.2. Test des flavonoïdes

10g de plante, mise en poudre, est pesé puis mélangé à 150 ml d'une solution HCl (1%). Ce mélange est macéré durant 24 h, après filtration on ajoute NH_4OH au 10 ml du filtrat jusqu'à la basicité. L'apparition d'une couleur jaune claire implique la présence des flavonoïdes [70,71].

III.2.1.3. Test des stérols et terpènes

5g de plante, mise en poudre, a été mis dans 20 ml de chloroforme et filtrer, ajouté au filtrat 1ml d' H_2SO_4 avec précaution sur les parois du tube. Le point de rencontre entre les deux phases donne une couleur verte qui indique la présence des stérols insaturés et terpènes [70,71].

III.2.1.4. Test des Tanins

10g de plante, mise en poudre, on extrait par l'alcool éthylique 50%, puis on filtre, on ajoute au filtrat quelques gouttes FeCl_3 (1%). En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre [70,71].

III.2.1.5. test des cardénolides

prendre 1 g du produit sec, macérer dans 20ml d'eau distillée puis filtrer, prélever 10ml du filtrat. Ce lui-ci est ensuite extraite avec un mélange de 10ml CHCl_3 , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:1), évaporer la phase organique, dissoudre le résidu dans 3ml d'acide acétique glaciale, ajouter quelques gouttes de FeCl_3 suivi de 1ml d' H_2SO_4 . La présence de la couleur verte bleus dans la phase acide indique la présence des cardénolides.

III.3.Les huiles essentielles

III.3.1.Procédé d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydro distillation en utilisant l'appareil de clévenger (figure III.1).

500g de plante sèche(romarin) est introduite dans un ampoule de 2L au-dessus d'une ballon imprégné de l'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile ; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité. Les huiles essentielles récupérées dans de petits flacons opaques et stockée à 4°C.



Figure III.1: Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'huile essentielle.

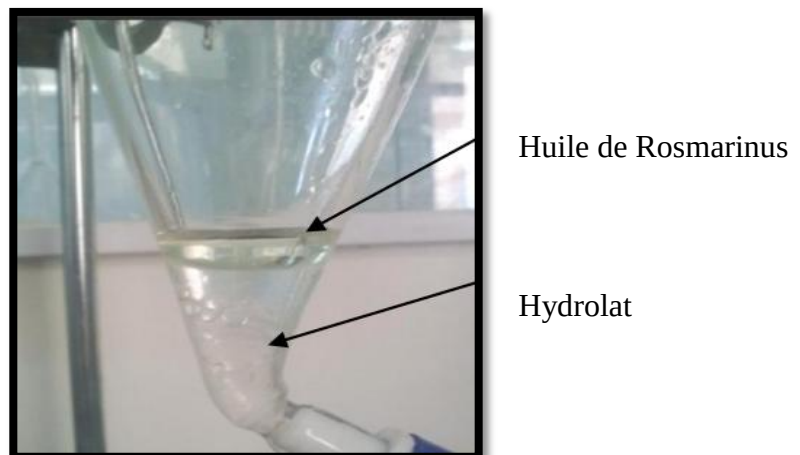


Figure III.2: Huile essentiel de *Rosmarinus officinalis* L.

III.3.2. Plan d'extraction

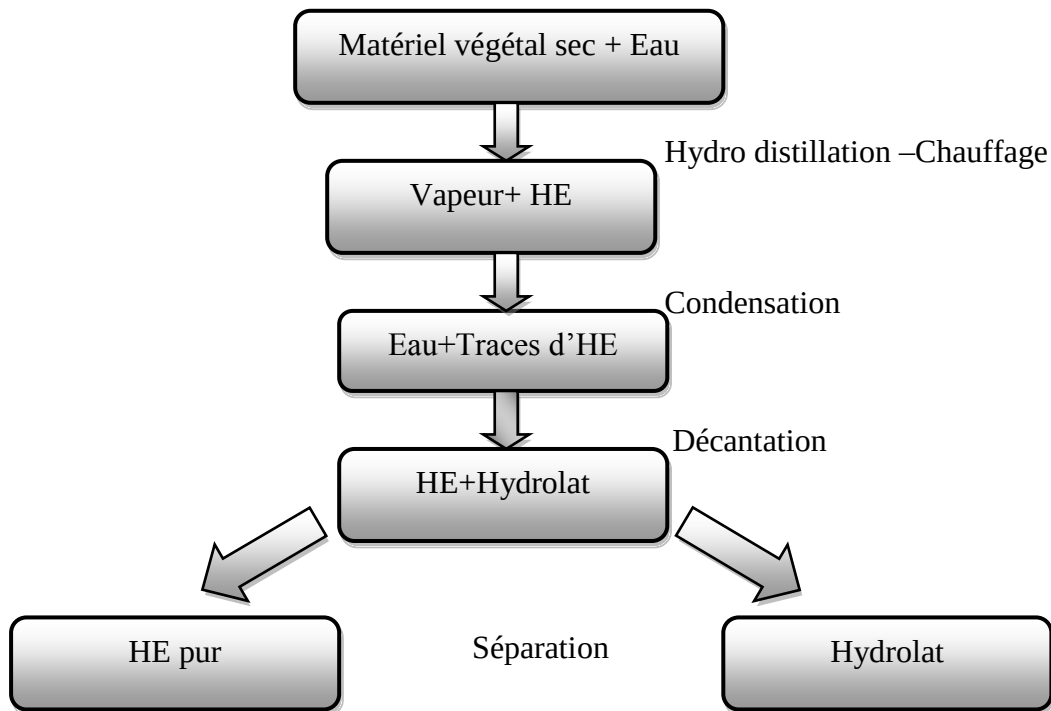


Figure III.3 : Les étapes d'extraction d'huile essentielle

III.3.3. Calcul du rendement

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

$$\text{RHE (\%)} = \frac{M'}{M} \times 100$$

RHE : Rendement en huile essentielle en %.

M' : Masse d'huile essentielle en gramme.

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme [6].

III.3.4. Calcul de la densité

Elle constitue un point de repère important car sa valeur permet d'avoir une idée sur la composition chimique de l'HE. La densité est donnée par l'expression suivante :

$$d = m_2 - m_0 / m_1 - m_0$$

m₀: la masse du flacon vide.

m₁: la masse du flacon rempli d'eau distillée.

m₂: la masse du flacon rempli d'HE [6].

III.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne de l'HE

Pour mettre en évidence l'activité antibactérienne de *Rosmarinus officinalis* L., nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disques, la méthode de dilution vis-à-vis trois souches bactériennes ; trois souches de référence ATCC *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922 .

III.4.1. Méthode de diffusion sur disque (l'aromatogramme)

La méthode de diffusion a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne. Une suspension bactérienne de 18 à 24 heures de chaque souche antibactérienne est préparée avec l'eau physiologique (NaCl).

Des boîtes de Pétri contenant la gélose de Mueller Hinton sont inoculées. A la surface de chaque boîte on dépose six disques de papier filtre (Whatman n° 5) stériles de 6 mm de diamètre imbibés par 10 µl de différentes concentrations d'huile essentielle supplémentée de DMSO (HE, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et DMSO). L'ensemble est incubé pendant 24 heures à 37°C. Cette méthode est dite l'**aromatogramme**.

La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole avec des disques standard de 10 µg. Cette méthode est dite l'**antibiogramme**.

Après 24 heures d'incubation, une zone ou un halo clair est présent autour du disque si l'huile essentielle inhibe le développement microbien.

Dans la technique de diffusion il y a une compétition entre la croissance de la bactérie et la diffusion du produit à tester [72] .

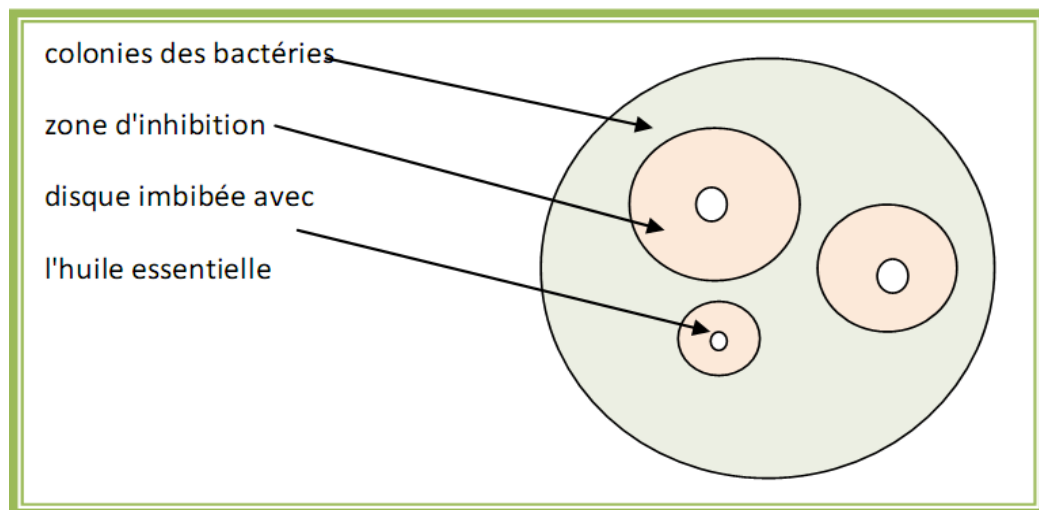


Figure III.4: Méthode de diffusion sur disque

III.4.2.Ré-isollement des souches bactériennes

On a fait un prélèvement des souches bactériennes qui sont testés par anse et ensemencés selon la méthode de stries sur une boîte de Pétri coulée par gélose nutritive puis incubé 18 à 24 heures à 37 °C, pour l'obtention des souches pures et jeunes.

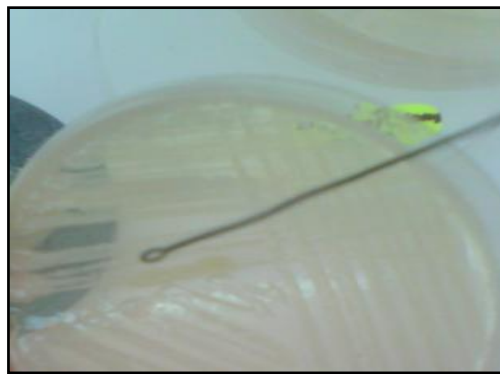


Figure III.5: Ré-isollement des souches

III.4.3.Préparation du milieu de culture

La gélose milieu Mueller –Hinton .est préparée en dissolvant 39g de poudre de gélose dans un 500 ml d'eau distillé dans un erlene placées sur un agitateur plaque-chauffante.la gélose dissolue est versée dans des flacons puis stérilisées dans l'autoclave à 120C° pendant 20mn, et en fin conservée dans le réfrigérateur à 4°C avant utilisation milieu Mueller –Hinton .est fondu dans un bain marie à 95C° et coulée en boîte de pétrie

sur une épaisseur de 3 mm (environ 10 ml par boîte), les géloses sont pré-séchées avant l'emploi.

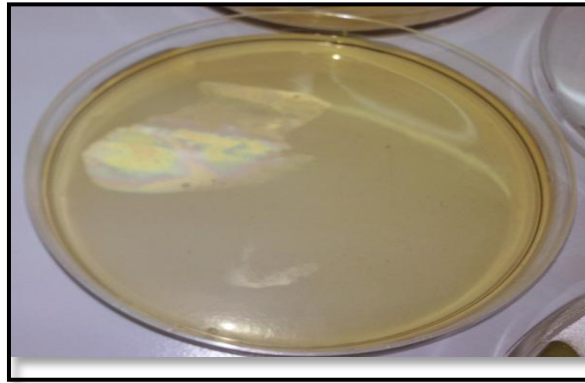


Figure III.6 : Ecoulement du milieu de culture.

III.4.4. Préparation de l'inoculum

A partir des boîtes contenant les germes pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) à partir des pré-cultures congelées, on racle 3 colonies à l'aide d'une pipette pasteur, puis on la décharge dans un tube de l'eau physiologique stérile.

On dépose une goutte de suspension bactérienne, préparée sur la gélose coulée dans un boîte de pétrie, puis on l'ensemence à l'aide de pipette pasteur.

les boîtes préparées sont incubées à 37°C pendant 18 à 24h



Figure III.7: Inoculum de différentes souches bactériennes.

III.4.5.L'ensemencement

Cette opération se fait après la préparation de l'inoculum ,avec un écouvillon on prend des colonies bactérienne et on met dans 2ml d'eau physiologique, on trempe l'écouvillon stérile dans la suspension bactérienne. Puis on flotte l'écouvillon sur la totalité de la surface de MH, en haut et bas ,en strie serrées, un étalement uniforme en nappe.



Figure III.8 : Ensemencement bactérien

III.4.6.Préparation des dilutions de l'HE

On prépare 4 tubes en verre stériles($1/2, 1/4, 1/8, 1/16$) ;le premier contient 500 μ l de DMSO et 500 μ l de diluant (DMSO) .On ajoute dans le deuxième tube($1/4$) 500 μ l du premier tube($1/2$) et 500 μ l DMSO , agiter bien. On répète le procédé jusqu'on terminé, Comme le montre le Tableau 18.

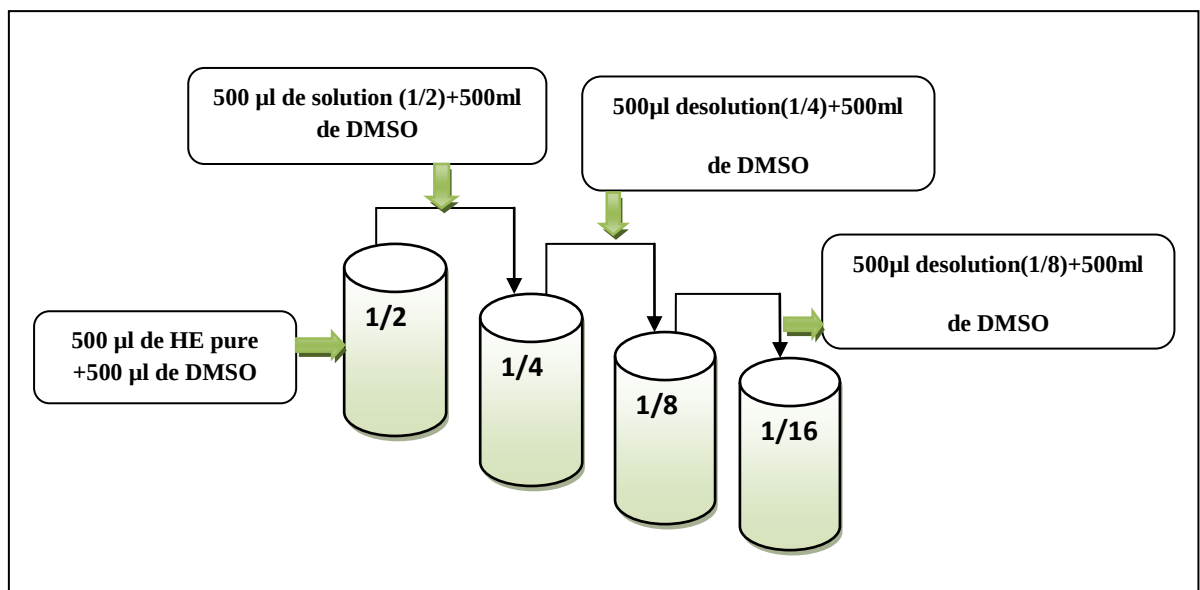


Figure III.9 : Préparation des dilutions

III.4.7. Préparation des disque

On a coupé le papier de whatman en disque de 6mm, ces disque doivent posséder un contour régulier pour donner une zone d'inhibition que l'on peut mesurer facilement .Ces disque sont stérilisés dans un autoclave pendant 20minutes à 120°C.

III.4.8. Application des disques

On utilise une pince pour mettre 7 disques dans le boite, à l'aide d'une micropipette on imbibe chaque disque par 10 μ l d'extrait : les quatre disques contient les dilution (1/2,1/4,1/8,1/16) et le cinquième disque pour l'huile pure, et le sixième pour DMSO ,et le dernier contient 10 μ l de ATB.

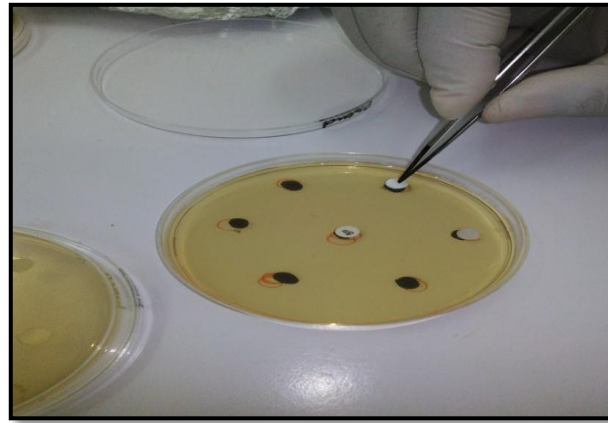


Figure III.10 : L'application des disques.

III.4.9.Lecture de l'aromatogramme

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibitions de la croissance microbienne autour des disques contenant l'extrait à tester.

Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibitions et peut être symbolisés par des croix. La souche ayant un diamètre :

- $D < 0.8\text{cm}$: Souches résistante (-).
- $0.99\text{cm} \leq D \leq 1.4\text{cm}$: Souches sensible (+).
- $1.5\text{cm} \leq D \leq 1.9\text{cm}$: Souches très sensible (++) .
- $D > 2\text{ mm}$: Souches extrêmes sensible (+++)[73]

Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibitions à l'extérieur de la boite fermée.

Le Classement des bactéries se fait dans l'une des catégories : sensible ou résistante[73].

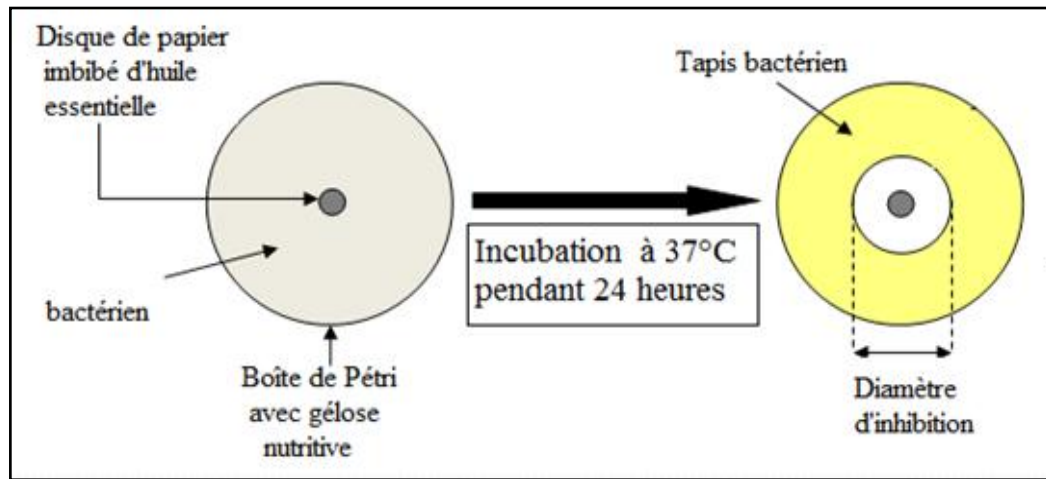


Figure III.11 : Aromatogramme[72]

Remarque : Les essais sont répétés trois fois.

IV.1.Caractéristiques organoleptiques

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. est extraies par technique de hydrodistillation, il est liquide mobile, d'une coloration jaune clair et à odeur camphrée, les resultats obtenus sont représentés dans le tableau 02.

Tableau IV.01 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis* L.

	Aspect	Couleur	Odeur
L'AFNOR	Liquide mobile, limpide	Presque incolore à jaune pâle	Caractéristique fraîche, plus ou moins camphrée selon l'origine
Huile essentielle	Liquide mobile	Jaune clair	Camphrée

Notre huile essentielle est obtenus par hydrodistilation est la méthode normé pour l'extraction d'une huile essentielle [74] . les paramètres organoleptiques de notre huile essentielle sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR [6].

IV-2 Caractéristiques organoleptiques des H.E de *Rrosmarinus officinalis* L.

L'HE de *Rosmarinus officinalis* L. est limpide, jaune clair avec une odeur caractéristique fraîche (Figure IV.1).



Figure IV.1 : HE de *Rosmarinus officinalis* L. obtenue par hydrodistillation.

IV.3. Résultats des tests du tests chimique

Tous les résultats obtenus après les tests chimique sont présentés dans le (tableau 04)

Tableau IV.2 :Résultats des testes chimiques

Principe actif	Résultats obtenu de Romarin
Huile essentiel	+
Flavonoides	+
Tanins	+
Cardénolides	-
Saponosides	+
Stéroles saturés et terpène	+

IV.4. Discussion :

IV.4.1.Les caractéristiques physico-chimiques des HE de *R. officinalis* L.

Les caractéristiques physico-chimiques des HE de *R. officinalis* L. sont résumés dans le tableau 05 :

Tableau IV.3 : Les caractéristiques physico-chimiques des HE de *R. officinalis* L.

Propriétés	valeur pratique	Référence
Rendement (%)	0.54%	0.5-2 %
Densité (g/cm)	0.912	0.905-0.921

Le rendement 0.54%est conforme avec les normes AFNOR.(0,5-2), Cela peut être due aux différents facteurs qui rentrent en jeu, parmi eux on cite la nature du sol, la période de la récolte, la durée de séchage, le mode d'extraction. La densité est faible puisque il contient plus des monoterpènes[28].

IV.4.2.Résultats du test du pouvoir l'activité antibactérienne

IV.4.2.1. Résultats de l'aromatogramme

L' activité antibactérienne d'huile essentielle de l'huile essentielle de *R.officinalis*.L est évaluée sur trois germes pathogènes d'origine hospitalière(Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas) après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C.

Cette activité est évaluée par la méthode d'aromatogramme, le pouvoir antibactérien de cette huile essentielle est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition en (cm) à l'aide d'une règle.



Figure IV.2: Les zones d'inhibition de l'huile essentielle testée(E.coli).



Figure IV.3: Les zones d'inhibition de l'huile essentielle testée(Staphylococcus aureus)



Figure IV.4: Les zones d'inhibition de l'huile essentielle testée(pseudomonas)

Toutes les résultats de l'aromatogramme(diamètres des zones d'inhibition en cm de chaque dilution, DMSO et l'ATB) sont donnés dans le (Tableau IV.4)

Tableau IV.4 : Résultats de l'aromatogramme(diamètres des zones d'inhibition en cm de chaque dilution, DMSO et l'ATB)

Produits testés Souches bactériennes	ATB	Témoin DMSO	HE PURE	HE (1/2)	HE (1/4)	HE (1/8)	HE (1/16)
Escherichia coli	1.5	-	-	0.7	0.7	0.8	0.8
	1.6	-	-	1.1	0.8	1.1	0.8
	1.6	-	-	0.7	0.9	0.8	0.8
Moyenne	1.566	-	-	0.83	0.8	0.9	0.8
Staphylococcus aureus	2.2	-	-	1.1	0.9	1.1	0.8
	2	-	-	-	1.5	0.8	-
	2.4	-	-	-	0.7	1.1	-
Moyenne	2.2	-	-	0.36	1.03	1	0.26
Pseudomonas	1.7	-	-	0.6	0.7	0.8	1
	1.8	-	-	-	0.7	-	0.7
	1.5	-	-	-	-	-	0.8
Moyenne	1.66	-	-	0.2	0.466	0.266	0.83

Notes: (-) : pas d'inhibition, **DMSO:** témoin, **ATB:** antibiotique, **HE:** huile essentielle

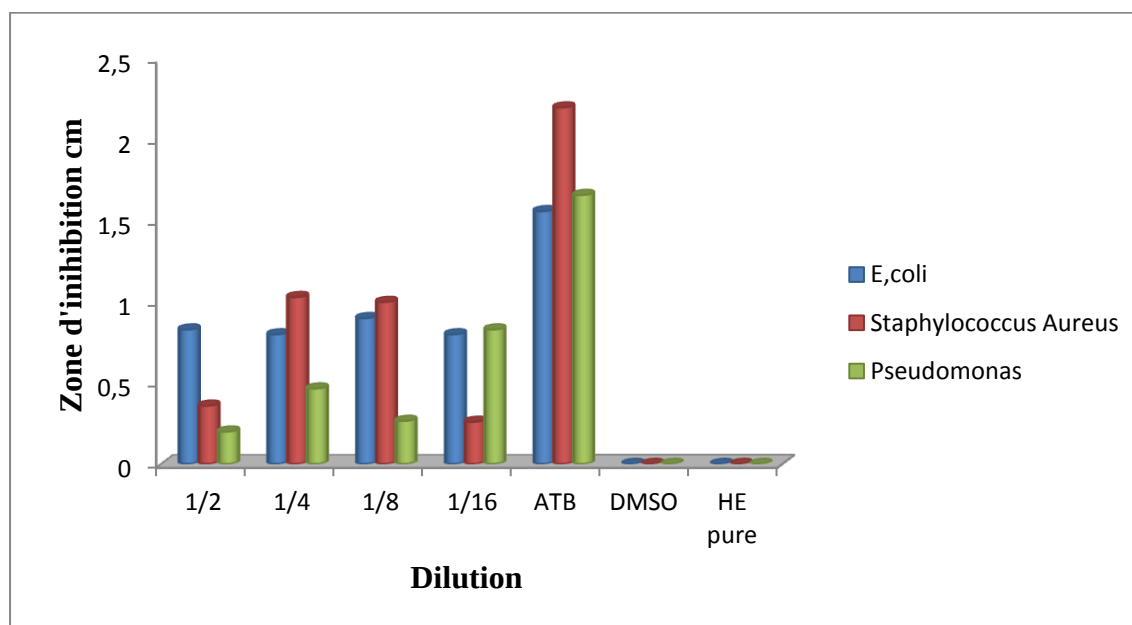


Figure IV.5 : Histogramme présent les zones d'inhibition pour toutes les souches bactéries

A partir des résultats des diamètres des zones d'inhibition dans le (Tableau IV.4) et (Figure IV.5). On remarque que l'extrait de Romarin possède une activité antibactérienne différente contre *E.coli* par et *staphylococcus aureus* et le *pseudomonas aeruginosa*, donc la souche *E.coli* et le *staphylococcus aureus* sont des souches sensibles à l'huile essentielle. enfin le *pseudomonas aeruginosa* résistante.

On remarque aussi le diamètre de zone d'inhibition des antibiotiques utilisées est plus grande que celui des zones d'inhibitions des dilutions d'HE, l'HE pur et de DMSO.

Le DMSO n'a aucune activité antibactérienne, donc une zone d'inhibition autour de disque imbibé par DMSO, est totalement absente. C'est le même pour l'HE pur

Conclusion générale

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Le présent travail est consacré à la détermination du rendement, de la composition chimique et des propriétés antibactérienne de l'huile essentielle extraite de la plante *Rosmarinus officinalis* L. récoltée dans la région de Biskra (Algérie).

Rosmarinus officinalis L. présente un intérêt direct. L'analyse de leur contenu chimique nous a permis, de caractériser la présence des différentes familles de composés: flavonoides, saponosides, tanins, stérols, stéroïdes.

La valeur du rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* était de 0.54%. Cette valeur est identique avec celles obtenus chez d'autres études de la même espèce

Les huiles essentielles de romarin ont été analysées selon la méthode standard AFNOR afin de déterminer les constantes physiques habituelles définissant l'huile essentielle extraite par hydrodistillation : densité relative, l'indice de réfraction, indice d'acide.

les résultats obtenues montre que la valeurs de la densité relative est égale à 0.912 g/cm

La comparaison de cette valeur à ceux de la norme AFNOR relative à l'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) a montré clairement que les huiles essentielles issues de la méthode d'extraction hydrodistillation est conformes à la norme AFNOR

De même que l'activité biologique de l'huile du Romarin donné un pouvoir antibactérien très important surtout sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

A la base de résultats trouvés on peut prédire que nos huiles essentielles peuvent servir comme base de lutte biologique.

Références bibliographiques

- [1] : Hamidi Abdelrazeg ,these présenté pour obtenir le diplôme de magister en chimie organique ,.Université kasdi Merbah-Ourgla.promotion 2013.
- [2] :Atik bekkara, F., Bousmaha, L.,Taleb bendiab, S.A., Boti, J.B., Casanova J. Composition chimique de l'huile essentielle de Rosmarinus officinalis L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. Biologie & Santé. 7: 6-11,(2007).
- [3] :J.Paolini université de corse. (Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de corse .Discipline .Chimie organique et analytique.12-12-2005).
- [4]: C. Besombes, Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomecanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées, Thèse de doctorat, Université de la ROCHELLE, P 45, 2008
- [5]: Madjour Sassia , thèse de Master 2 en chimie pharmaceutique, Université M^{ed} Khider Biskra 2013-2014.
- [6]:AFNORNF T 75-006, huile essentielle. association française de normalisation. Paris. pp559-563.
- [7] : Degryse A.C., et al., Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé environnement -IGS-EHESP, 87p,2008.
- [8] : BELAKHDAR, J.La pharmacopée marocaine traditionnelle. Idis PRESS (Ed). Paris, p. 764 ,(1997).
- [9] : GONZALEZ-TRUJANO et al . Evaluation of antioceptive effet,(2007).
- [10] : RICHARD H. - Epices et aromates. Ed. dec et doc Lavoisier, collection science et techniques alimentaires, Paris, 339 p, 1992 .
- [11] : Richter, G. Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. Ed. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, 322-323, 1993.

[12] : Smallfield, Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crop & Food Research. Number 45, 4p,2001.

[13] : Cowan M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical biology Reviews. 12 (4), 564–582,(1999).

[14] : Pibiri M.C. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. thèse de Doctorat, Lausanne, Canada ,p:177(2006).

[15]: J. Bruneton Elément de phytochimie et pharmacognosie, Paris : Lavoisier - Tech. & doc, p584, 1987

[16] :V. A. Kurkin, Chem. Nat. Compd, 39,123(2003).

[17] : www.wikipedia.org/wiki

[18] : L.S. Padua, N. Bunyapraphatsara, R.H.M.J. Lemmens, Plant Resources of South-East Asia,p12 , (1999)

[19] : J. Bruneton. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, p915

[20] : BRUNETON J. (1999) Pharmacognosie : Phytochimie ; Plantes médicinales, 3ème éd. Lavoisier Paris : Technique et Documentation et Editions médicales internationales, 1120 p(1993) .

[21] : Rai M.K., Acharya D. et Wadegaonkar P. Plant derived-antimycotics: Potential of Asteraceous plants, In: Plant-derived antimycotics:Current Trends and Future prospects, Haworth press, N-York, London, Oxford. 165-185(2003).

[22] : Porter N. Essential oils and their production. Crop & Food Research. Number 39(2001).

[23] : Belaïche P Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome I. l'Aromathérapie. Ed. Maloine S.A. Paris. (1979).

- [24] :ORANGES, R, PASSET, G.TEULADE. (1973).Les plantes médicales à essences et chimiotaxonomie, 17ème journée de l'aromate lourd ,12 mai 1973.
- [25] :ABRASSART, J.L. Guide pratique d'aromathérapie : usages et biens faits des huiles essentielles des plantes .95-98.Ed .Masson (1992).
- [26]: LEMIRE, N. Gazette thérapeutes, 26-30, Ed. Atlas (2000).
- [27]: PONOEL, D.Urgences et soins intensifs en médecine aromatique intégrée.255
- [28]: ZABEIROU ; HACHIMOU .Étude comparative entre les Huiles essentielles de la Menthe Verte (*Mentha Spicta* L) et de la Poivree (*Mentha Piperita* L) dans la région d'Ouargla .Mémoire de DES Biochimie –Université de Kasdi Merbbah _Ouargla .p16(2005).
- [29]: MARIE ELISABETH LUCCHESI . Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles : p 17 ; 23, 52, (2005).
- [30]: M. C. Martini, M. Seiller, Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales Paris. Lavoisier, 563 (1999).
- [31]: Z.Wang, L. Li. T. Ding, X. Zhou, L. Wang, H. Zhang, L. Liu, Y. Li, Z. Liu, H. Wang, H. Zeng, H. He, J. Chrom. A, 1102 (2006).
- [32]: R. Anton. A. Lobstein. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522 (2005).
- [33]: N.S. Kim, D.S. Lee. J. Chrom. A. 31, 982 (2002)
- [34]: R. Hubert, Epices et aromates, Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris, 1992.
- [35]: JEAN BOTTON A: Pharmacognosie «Photochimie plante «médicinales 3eme éd TEC.DOC Paris. P484-p540(1999) .
- [36]: Franchomme P., Pénoel D. & Reverdy M.E.. Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique : matière, énergie, information.L'aromathérapie exactement. R.J. Editeur. Limoges.2,p :73-227 (1990)

- [37]: Maihebiau P . La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne. P : 635(1994).
- [38]: Inouye S .Laboratory evaluation of gaseous essential oils (part 1). International journal of Aromatherapy. 45.p :22-35 (2003).
- [39]: DAVIS, P. L'aromathérapie de A à Z Edition Vigot, 2006.
- [40]: BAUDOUX, D., Le formulaire d'aromathérapie pratique pour le prescripteur et le conseil pharmaceutique Edition Inspir (2007)
- [41]: RAYNAUD, J., Prescription et conseil en aromathérapie Editions Lavoisier. 16. PAOLA, S (2006)
- [42]: Boullard B. Dictionnaire des plantes médicinales du monde.Paris : Estem. P174(2001).
- [43] :<http://nature.jardin.free.fr/>
- [44]: MED-CHCLIST.Edition W.Greuter.H.M.Burdet-volume : 3;P2316(1986)
- [45]: QUEZEL P., SANTA S: Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, CNRS, Paris, (1963) : pp 600(1963).
- [46]: HENRICH, et al. Ethnobotany and Flavonoids-potent and versatile(2006).
- [47] : Ibañez E., Kubátová A., Señoráns F. J., Caverro S., Reglero G. et Hawthorne S. B.. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosmmary Plants. Journal of Agricultural and Food Chem., 51 (2): 375-382(2003).
- [48]: Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto K. ET Yaghi A. Flavonoids in Rosmarinus officinalis leaves. Phytochemistry, 37 (5): 1463-1466 (1994).
- [49]: Yang R. Y., Lin S. et Kuo G. Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species. Asia of pacific journal of clinical nutrition. 17 (S1): 275-279 (2008).
- [50]: HENRICH, et al. Ethnobotany and Flavonoids-potent and versatile (2006).

- [51]: Arnold, et al. Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. from Algeria and *R. officinalis* L. from other countries. *J. essent. Oil Res.* 9:167-175(1997).
- [52]: Tsai et al. . In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sodrinus*. *Food chem.* (in press) (2007).
- [53]: WECKESSER et al. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. *Phytomedicine.* (In press) (2007).
- [54]: RASOOLI et al (2008) ; Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, Grugliasco, v.122, p.135-139, 2008.
- [55]: SACCHETTI, et ses Collaborateurs : Growing in Argentina. *Bioresource Technology.* (In press) (2005).
- [56]: Aruoma OI, Spencer JPE, Rossi R, Aeschbach R, Khan A, Mahmood N, Munoz A, Murcia A, Butler J, Halliwell B: An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provencal herbs. *Food Chem Toxicol* 34:449–456(1996).
- [57]: Gui J et al : Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants(2007).
- [58]: PRAJAPATI et al. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technol.* 96: 1749-1757(2005).
- [59]: NASSU et al, Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. *Meat Science.* 63:43-49(2003).
- [60]: WANG et al. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chem.* 108:1019-1022(2008).
- [61]: BALENTINE et al. The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and during storage of ground beef. *Meat Science.* 73, p.413-421(2006) .

- [62]: FERNANDEZ-LOPEZ et al . Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. Meat science.p.69:371-380(2005).
- [63]: SEBROTYNEK et al. Comparison of natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. Meat science .69:289-296(2005).
- [64]: ADSERSEN et al . Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. J Ethnopharmacol. 104:418-422(2006).
- [65]: BAKIREL et al; In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan- diabetic rabbits. J Ethnopharmacol. 116:64-73(2008).
- [66]: MARIE et al. Flavour And Fragrance Journal Flavour Fragr. J.; 19: 134–138(2004)
- [67]: BELOUED, A: Plantes médicinales d'Algérie. 2^{ème} Edition .Office des publications(1998) .
- [68]: Nauciel, C. Bactériologie médicale. Masson (Ed).Paris, 276p(2000).
- [69]: Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. Bactériologie clinique. 3^{ème} édition Ellipses (Ed) Paris, 602 p(2000).
- [70]: K. Benzahi, Contribution à l'étude des flavonoïdes dans la Plante cynodonte Dactylon -L <<chindent>>, mémoires de Magister. Université de Ouargla ,P,15-17 2001.
- [71] : N. Chaouch, Etude des alcaloïdes dans le colocynthe *Colocynthis vulgaris* (L) Schrad (cucurbitacées) Région de Oued N'sa (Wilaya de ouargla). Mémoire de magister. Université de Ouargla, 44 (2001).
- [72] : Guinoiseau E. Molécules, antibactérienne issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, option : Biochimie- Biologie moléculaire, France. 50p (2010) .
- [73] Ponce A.G., Fritz R., del Valle C.E., Roura S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie, 36: 679–684,(2003).

[74] CAILLET S, LACROIX M. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de recherche en Sciences appliquées à l'alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier, université de Laval (Québec) (2007).

Résumé

Les huiles essentielles possèdent des activités antibactériennes importantes et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants. Ce qui nous a conduits à effectuer l'étude de l'activité antibactérienne d'huile essentielle de la plante *Rosmarinus officinalis* L.

L'extraction a été réalisée par hydrodistillation de type Clevenger. D'après les résultats obtenus on remarque que le rendement en HE est de l'ordre de 0.54% est conforme aux standards internationaux.

Les résultats des analyses physicochimiques de l'huile essentielle sont conformes aux normes (AFNOR).

Les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. présente un effet antimicrobien intéressant principalement contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Mots clés : HE, activité antimicrobienne, analyses physicochimiques, *Rosmarinus officinalis* L.

Abstract:

Essential oils have important antimicrobial activities and can replace with success antibiotics which show their inefficiency against resistant microorganisms. In this study we have tested the antimicrobial activities of *Rosmarinus* and study the propriety physicochemical of essential oil extract.

The extraction was carried out by distillation Clevenger's type apparatus. After result obtain we find that the revenue of essential oil is 0.54 % this value acceptable to norm.

The result of analyses physicochemical of essential oil adapt to norm (AFNOR).

The essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. has an effect against interest mainly *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Key Words : essential oil , antimicrobial activities, physicochemical analyses , *Rosmarinus*

ملخص

تمتلك الزيوت الأساسية لنباتة فعالية ضد بكتيريا مهمة وتستطيع ان تعوض بنجاح المضادات الحيوية التي أثبتت عدم نجاعتها ضد البكتيريا المقاومة , الشيء الذي حثنا على دراسة الفعالية ضد البكتيريا لنباتة الإكليل ودراسة الخصائص الفيزيوكيميائية للزيت المستخلص لاستخلاص الزيوت الأساسية , استعملنا التقطير بواسطة (Clevenger) النتائج المتحصل عليها تقدر بـ 0.54 % , ويعتبر هذا الأخير جد مقبول حسب المعايير المعمول بها.

التحاليل المطبقة على الزيوت الطيارة أعطت نتائج مطابقة للمعايير الدولية AFNOR.

الزيت الطيار للإكليل له تأثير فعال فعالية ضد البكتيريا *E.coli* و *Saphylococcus aureus*.

كلمات مفتاحية : الزيوت الأساسية , الفعالية ضد البكتيريا , التحاليل الفيزيوكيميائية , الإكليل.