

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université « Dr. Moulay Tahar » de Saida**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**  
**Laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie Et Valorisation biologique des Plantes**



**Mémoire présenté en vue de l'obtention**  
**Du diplôme de Master en : Biologie**  
**Option: Biochimie**

**Présenté Par :**

**Mlle : DJEBBOURI Asmaa**

**Mlle : ZOUAIA Hakima**

**Contribution à l'étude des activités biologiques de l'extrait aqueux, extrait méthanolique et de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis***

**Soutenu devant le jury composé de :**

<b>M.HACHEM Kadda</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Saida</b>	<b>Président</b>
<b>M. ADLI Djallal Eddine Houari</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Saida</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. HALLA Nouredine</b>	<b>MAA</b>	<b>Université de Saida</b>	<b>Promoteur</b>

**Année universitaire 2018-2019**

## **REMERCIEMENT**

*Nous tenons tout d'abord à remercier "Dieu le tout puissant" pour la volonté, la santé et la patience qui nous a donné durant toutes les années d'études et d'avoir guider nos pats vers la vie du savoir.*

*Nous remercions tous les enseignants, administratifs du département de Biologie.*

*Nous remercions l'ensemble du personnel du laboratoire de biochimie et microbiologie de l'université docteur Tahar Moulay de SAIDA.*

*Nos sincère remerciement s'adressent aussi à notre encadreur Monsieur HALLA Noureddine et ceci pour la confiance, les conseils que vous nous avez accordés tout le long de ce travail. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité et votre patience.*

*Nous tenons à remercier Monsieur HACHEM Kadda et Monsieur ADLI Djallal Eddine Houari, les membres de jury de L'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner ce travail.*

*Pour n'oublier aucune personne, je formule mes sincères remerciements a tous ceux qui d'une façon ou d'une autre auront contribué à la réalisation de ce travail et tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pendant toutes les années d'études.*

**Dédicace :**

*Au nom de Dieu clément et miséricordieux*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes chers parents pour leurs soutiens patiences et leurs sacrifices  
durant mes études et durant ce travail.*

*A tous mes enseignants pour leur bienveillance et pour leur  
contribution à ma solide étude.*

*A ma famille et mes amis pour leurs conseils et leurs encouragements*

*A mon binôme HAKIMA avec qui j'ai partagé les bons et les durs  
moments.*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce  
travail qu'ils trouvent ici la traduction de ma gratitude et de ma  
reconnaissance.*

*ASMAA*

**Dédicace :**

*Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de mes efforts  
A ceux que j'aime le plus au monde mes très chers parents,  
Leurs sacrifices et leurs encouragements toute ma vie, je ne saurais  
jamais comment exprimer mes sentiments pour avoir veillé sur mon  
éducation, jamais je ne peux les remercier assez de m'avoir donné le  
meilleur.*

*A mes sœurs et mes frères  
A mon binôme ASMAA avec qui j'ai partagé les bons et les durs  
moments.*

*A toute ma famille et à tout ce qui me connais-je-vous aime.*

**HAKIMA**

## Résumé :

Ce travail s'intéresse à la valorisation d'une plante médicinale poussant à l'état spontané dans la région de Saida, il s'agit de *Rosmarinus officinalis*, par l'étude de l'activité antimicrobienne, pouvoir antioxydant et le mécanisme d'action antibactérien de ses extraits (aqueux et méthanolique) et de ses huiles essentielles. L'extraction a été effectuée par macération (extrait méthanolique), infusion (extrait aqueux) et hydrodistillation (huile essentielle). Après, des tests phytochimiques ont été réalisés pour déterminer les différentes familles des métabolites secondaires. L'activité antioxydante a été révélée par deux méthodes (piégeage du DPPH et réduction du fer). Ensuite, nous avons évalué l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des disques et la méthode de microdilution sur microplaque, ainsi que le mécanisme d'action sur *Bacillus cereus*. L'extrait méthanolique a présenté le rendement le plus élevé (17.30%). Les résultats obtenus ont révélé la présence des tanins, des saponines, des alcaloïdes, des terpénoïdes, les anthocyanes et les quinones dans l'extrait aqueux et méthanolique. L'activité anti-oxydante a montré que l'extrait méthanolique est le plus puissant par rapport les autre par une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 13.989 mg/ml. L'activité antimicrobienne a été étudiée vis-à-vis de six souches bactériennes et trois souches fongiques. L'activité antibactérienne de l'huile essentielle était la meilleure comparativement à celle des deux extraits avec une zone d'inhibition maximale de 25 mm vis-à-vis *Bacillus cereus*. En outre, l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a exercé une activité antifongique vis-à-vis *Candidas albicans* avec un diamètre d'inhibition de 16 mm. La raison pour laquelle nous avons sélectionné l'étude du mécanisme d'action de l'huile essentielle vis-à-vis choisi *Bacillus cereus* dont son effet sur la viabilité cellulaire et la tolérance au sel a montré une réduction du taux de la population bactérienne.

**Mots clés :** *Rosmarinus officinalis*, phytochimie, extrait méthanolique, antimicrobien, antioxydante, mécanisme d'action.

## Liste des figures:

<b>Figure 01</b> : Photo de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. Djebel Antar à Naama.....	07
<b>Figure 02</b> : quelques structures chimiques des composants de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	09
<b>Figure 03</b> : Composés impliqués dans les activités antibactériennes des huiles essentielles.....	21
<b>Figure 04</b> : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne. .....	22
<b>Figure 05</b> : Photo représente la plante du Romarin. ....	27
<b>Figure 06</b> : Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'huile essentielle...	29
<b>Figure 07</b> : Les souches bactériennes en gélose nutritive.....	31
<b>Figure 08</b> : les levures en milieu sabouraud.....	31
<b>Figure 09</b> : Préparation d'une culture jeune.....	32
<b>Figure 10</b> : ajustement de l'inoculum.....	32
<b>Figure 11</b> : Préparation des solutions des huiles essentielles.....	33
<b>Figure 12</b> : l'écoulement des boites de pétri.....	33
<b>Figure 13</b> : l'ensemencement de la suspension bactérienne.....	33
<b>Figure 14</b> : Disposition des disques.....	34
<b>Figure 15</b> : Remplissage de la microplaque.....	36
<b>Figure 16</b> : Milieu de culture Neutraliseur.....	38
<b>Figure 17</b> : Milieu GN-NaCl.....	38
<b>Figure 18</b> : Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH●...	39
<b>Figure 19</b> : Activité antibactérienne d'huile essentielle de romarin.....	45
<b>Figure 20</b> : Activité antifongique ( <i>Candida albicans</i> ) d'huile essentielle de romarin.....	46

<b>Figure 21</b> : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH <sup>·</sup> en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique.....	52
<b>Figure 22</b> : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH <sup>·</sup> en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	53
<b>Figure 23</b> : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH <sup>·</sup> en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	53
<b>Figure 24</b> : Activité antioxydante de BHA par le test de la réduction du fer.....	55
<b>Figure 25</b> : Activité antioxydante de l'extrait aqueux de <i>Rosmarinus officinalis</i> par le test de la réduction du fer.....	55
<b>Figure 26</b> : Activité antioxydante de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> par le test de la réduction du fer.....	56
<b>Figure 27</b> : Nombre de colonies de <i>Bacillus cereus</i> durant 20 minutes d'incubation traitée avec la CMI de l'huile essentielle de romarin et non traitée (témoin).....	57
<b>Figure 28</b> : Nombre de colonies de <i>Bacillus cereus</i> traitée avec différentes concentrations de l'huile essentielle de romarin et non traitée (témoin).....	57

## Liste des Tableaux :

<b>Tableau 01</b> représente les différents composés chimiques de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	08
<b>Tableau02</b> : Activités biologiques de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	13
<b>Tableau 03</b> : Les différents microorganismes utilisés.....	28
<b>Tableau 04</b> : représente les déférentes rendements des extraits et huile essentielle de romarin.....	42
<b>Tableau 05</b> : représente les résultats du criblage phytochimique des extraits du <i>Rosmarinus Officinalis</i> .....	43
<b>Tableau 06</b> : Diamètres d'inhibition des différentes souches testées par l'HE par la méthode de diffusion des disques .....	47
<b>Tableau 07</b> : Diamètres des zones d'inhibition obtenus par l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	48
<b>Tableau 08</b> : Diamètres des zones d'inhibition obtenus par l'extrait aqueux de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	49
<b>Tableau 09</b> : Concentrations minimales inhibitrices.....	51
<b>Tableau 10</b> : Les CMI et CMB des extraits méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	51

## Liste des abréviations :

ATP: Adénosine Triphosphate

BHA :butylhydroxyanisole

BHT :le butylhydroxytoluène

cm :centimetre

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO: DiMethyl SulfOxyde

DPPH :2,2-diphényl-1picrylhydrazyl

DZI: Diamètre de Zone D'inhibition

EA: Extrait Aqueux

EM: Extrait Méthanolique

g: Gramme

HE, Huiles essentielles.

kg :killogramme

m :mètre

mg: Milligramme

min: Minute

ml: Millilitre

PAM: Plantes Aromatiques et Médicinales

µg: Microgramme

µL: Microlitre

## Sommaire :

Remerciement	10
Dédicace	10
Résumé	10
Liste des figures	10
Liste des tableaux	10
Liste des abréviations	10
Introduction	01

### I. Synthèse bibliographie

#### CHAPITRE 01 : Généralité sur la plante étudiée (*Rosmarinus Officinalis*)

1.Définition	05
2.Origine du nom	05
3.Habitat	06
4.Indentification botanique	06
5.Discription botanique	06
6.principes actifs	07
7. Composition chimique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	08
8.Propriété du <i>Rosmarinus Officinalis</i>	10
8.1.Propriété médicinale	10
8.2.Propriété pharmacologique	10
9. Effet secondaires et contre indication	10

## **CHAPITRE 2 : Les activités Biologiques de la plante de *Rosmarinus Officinalis***

1. Activité antimicrobienne du RO.....	13
1.1.Activité antibactérienne .....	14
1.2.Activité antifongique.....	14
1.3.Activité antivirale.....	14
2.Activité antioxydant du RO.....	15
3.Autres Activités :	
3.1Activité anti spasmodique .....	15
3.2. Activité anti-inflammatoire.....	15
3.3.Activité antidiabetique.....	15
3.4.cytotoxicité et activité antitumorale .....	16
3.5.Activité pharmacologique.....	16

## **CHAPITRE 3 : mécanismes d'action des métabolites secondaire**

1. Mécanisme d'action antimicrobienne des extraits .....	18
2. Mécanisme d'action antimicrobienne des huiles essentielles .....	20.
2.1. Mécanisme antibactérien .....	22
2.2. Mécanisme antifongique .....	23
2.3. Mécanisme antivirale .....	24

## II. PARTIE EXPERIMENTALE :

### CHAPITRE 04 : Matériel ET Méthode

1. Matériel.....	27
1.1. Matériel végétal .....	27
1.2. Microorganismes.....	27
2. Méthodes.....	28
2.1. Préparation des extraits.....	28
2.1.1. Huiles essentielles .....	28
2.1.2. Extrait aqueux .....	29
2.1.3. Extrait méthanolique .....	29
2.2. Tests phytochimiques.....	30
a. Tannins .....	30
b. Flavonoïdes .....	30
c. Anthocyanes .....	30
d. Coumarines .....	30
e. Alcaloïdes .....	31
f. Stérols et triterpènes .....	31
2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne .....	31
2.3.1. Méthode de diffusion des disques.....	31
<i>a. Préparation d'inoculum .....</i>	<i>32</i>
<i>b. Préparation des solutions des huiles essentielles .....</i>	<i>33</i>
2.3.2. Méthode des micro-dilutions sur milieu liquide.....	35
<i>a. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide.....</i>	<i>35</i>
<i>b. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) .....</i>	<i>36</i>
<i>c. détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) .....</i>	<i>36</i>

2.4. Etude de l'effet antibactérien.....	37
2.4.1. Conditions expérimentales générales.....	37
2.4.2. Tests de la viabilité cellulaire .....	37
2.4.3. Tolérance au sel .....	38
2.5. Evaluation de l'activité antioxydante.....	38
2.5.1. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1picrylhydrazyl) .....	38
2.5.2. Capacité antioxydant totale .....	40
2.5.3. Pouvoir réducteur du fer .....	40
<b>CHAPITRE 05 : Résultat et Discussion</b>	
1.Détermination et calcul des rendements du RO.....	42
2. Criblage phytochimique .....	43
3. Evaluation de l'activité antimicrobienne de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	44
3.1. Méthode de diffusion des disques .....	44
3.1.1. Huile essentielle .....	45
3.1.2. Extraits méthanoliques et aqueux .....	48
3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide.....	50
3.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielle.....	50
3.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des deux extraits .....	51
4.Évaluation de l'activité antioxydant .....	52
4.1.Piègeage du radical DPPH .....	52
4.2.Réduction du fer : FRAP (ferric reducing antioxydant power) .....	54
5.Étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle du RO.....	56
Conclusion .....	60

Références bibliographiques .....	63
Annexes.....	76

# **Introduction**

Depuis des milliers d'années, l'être humain a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études. Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plantes riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies **(Farnsworth et al., 1986)**.

La contamination et l'infection microbienne est un risque pour la santé en raison de la résistance de certains microorganismes aux antibiotiques conventionnels et aux conservateurs synthétiques utilisés dans l'industrie. La recherche d'une meilleure connaissance de l'activité antimicrobienne des plantes dans les secteurs pharmaceutique et alimentaire a suscité l'intérêt d'évaluer les propriétés du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) dans le domaine phytothérapeutique **(Castaño et al., 2010) ;(Ramos, 2014)**.

*Rosmarinus officinalis* revêt une importance considérable en raison de sa grande valeur médicinale et aromatique. Les herbes de romarin ont été largement utilisées dans la médecine traditionnelle et les cosmétiques. Ils sont également utilisés comme aromatisants dans les aliments **(Pintore, 2002)**.

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de cette plantes en principaux composés bioactifs et à déterminer leurs propriétés biologiques. Pour cela notre étude englobe deux aspects, dont le premier est consacré à une évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits et d'huile essentielle de cette plante. Le second aspect est basé sur le mécanisme d'action antibactérienne à base d'huile essentielle vis-à-vis des bactéries pathogènes responsables de nombreuses infections et maladies.

# **Synthèse Bibliographique**

***Chapitre I : Généralités sur la plante  
étudiée : Rosmarinus officinalis***

### **1. Définition:**

Le Romarin (*Rosmarinus officinalis*) est une plante médicinale 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 (Boullard, 2001). Le romarin aime les terrains calcaires et s'accommode très bien à des contrées arides et rocailleuses. On le reconnaît aisément, toute l'année. Ce sont les feuilles, les sommités fleuries, qu'on aura pris le soin de sécher, qui sont souvent utilisées en phytothérapie. Le romarin a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire (Gianmario et al., 2007).

### **2. Origine du nom et historique:**

Le romarin (*R. Officinalis*) est une plante méditerranéenne dont le terme est dérivé du grec "rhops and myrinos" qui signifie "arbuste marin" pour sa croissance près des côtes et aussi "arbuste aromatique" et son nom spécifique a été attribué à un usage médicinal (Muñoz, 2002).

L'épithète "Officinalis" s'applique à de nombreuses espèces utilisées dans les pharmacies et pour les plantes considérées comme médicinales (de Sousa, 2006). Le romarin étant connu depuis l'Égypte ancienne, il est dit que les pharaons égyptiens utilisaient le romarin dans leurs rites. Des traces de la plante ont été retrouvées dans leurs tombes (Avila, 2013).

Les apothicaires utilisaient du romarin dans un grand nombre de préparations, mais à l'heure actuelle, seule l'huile essentielle est incluse dans les pharmacopées. Ce dernier a été obtenu pour la première fois vers 1330 par Ramón Llull et depuis lors, elle est utilisée en parfumerie. Au XVI<sup>e</sup> siècle, la reine Elisabeth de Hongrie l'utilisa pour traiter les rhumatismes dont elle souffrait en devenant "l'eau de la reine de Hongrie", l'un des plus célèbres remèdes de la cour de Louis XIV (Gonzales, 2013).

Pour les Romains, comme les Grecs, Les érudits grecs avaient l'habitude de porter une guirlande d'herbe sur la tête afin de préserver leur mémoire pendant les examens. Le romarin représentait une herbe sacrée, il était utilisé comme amulette lors des mariages, symbole de la fidélité entre amis et pour éloigner le mauvais œil ou briser l'envie, utilisé à l'époque médiévale pour purifier des chambres pour les malades (de Sousa, 2013).

### **3. Habitat:**

L'espèce *Rosmarinus officinalis*, connue sous le nom commun de romarin, est originaire du sud de l'Europe, en France et en Afrique du nord, en Asie du sud-ouest et dans d'autres variétés au sud et à l'est de la péninsule ibérique. L'Espagne, l'ex-Yougoslavie et la Tunisie étant les principaux pays producteurs. Cependant, le romarin est actuellement distribué dans d'autres parties du monde, notamment en Amérique latine, notamment dans des pays tels que l'Équateur (dans la zone andine) et le Pérou[(Estrada, 2010) ; (Vivancos, 2014)]. Elle est cultivée dans des climats tempérés pour ses qualités aromatiques et médicinales introduit en Amérique sous un climat tempéré et sec tels que les sols tropicaux, subtropicaux, humides et arides, secs, légers, plutôt sableux, très perméables, bien drainés, calcaires ou pauvres, mais ce qui est observé c'est qu'il n'est pas adapté pour compacter des sols argileux à des hauteurs variables (Fonnegraet al., 2006).

### **4. Identification botanique :**

Règne : plantes

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Lamiales (labiales)

Famille : Lamiaceae

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *Rosmarinus officinalis* L. (Quezelet al., 1963).

### **5. Description botanique:**

Le romarin est un arbuste aromatique, atteignant 1,5 à 2 m de hauteur, ses tiges sont épaisses et carrées ligneuses et ramifiées. Les feuilles sont opposées, petites et minces linéaires coriaces de forme tubulaire à l'arôme fort et agréable atteignant 3 cm de long sur 3 mm de large, la partie supérieure est vert foncé et le revers grisâtre ou blanchâtre, elles sont douces quand elles sont fraîches et sèches, elles s'effondrent, leurs branches sont densément couvertes de feuilles[(Muñoz et al., 2002) ; (Gonzales, 2013)].



**Figure 01** : Photo de *Rosmarinus officinalis* L. Djebel Antar à Naama (Makhloufi, 2009).

## **6. Principes actifs :**

Les substances actives sont les substances produites par la plante qui interviennent dans l'activité médicinale de celle-ci. Dans le romarin, il a été décrit que la plupart des ingrédients actifs sont extraits de leurs feuilles et que l'essentiel est représenté par l'huile essentielle. Cependant **Rodríguez et al. (2012)** ont également identifié d'autres composés, tels que les terpénoïdes, les flavonoïdes et les acides phénoliques, qui jouent un rôle dans les propriétés pharmacologiques de la plante, décrits ci-dessous, dont la quantité de composants peut varier en fonction des conditions du sol, de la situation géographique de la plante et du climat de culture (**Ávila, 2011**).

Cette plante a suscité de l'intérêt pour ce qui a été la source d'étude de nombreuses enquêtes, compte tenu de ses propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Ces attributs sont dus à la teneur élevée en composés polyphénoliques, qui peuvent agir de différentes manières, parmi lesquels la recherche des radicaux libres, qui commencent par des réactions d'oxydation et se poursuivent avec l'inactivation des ions métalliques (**Monroy, 2009**).

Il convient de noter que le romarin est remarquable pour son efficacité par rapport aux antioxydants tels que le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT), en inhibant l'oxydation de la viande (**UNC, 2008**).

L'extrait de romarin en tant qu'antioxydant, identifié par E392, a une utilisation autorisée de 150 mg/kg dans la viande, lorsque la teneur en matière grasse est supérieure à 10%. Dans le cas de contenir un pourcentage non supérieur à 10, l'utilisation de 15 milligrammes par kilogramme est établie(RUE, 2013).

**7. Composition chimique de *Rosmarinusofficinalis* :**

Le **tableau 01** représente les différents composés chimiques de *Rosmarinusofficinalis*

**Tableau 01** : représente composition chimique de *Rosmarinusofficinalis* [(Muñoz, 2002) ;(Ardila, 2009)]

<b>Groupes</b>	<b>Composés chimiques</b>	<b>Partie de la plante</b>
Acides phénoliques	(caféique, chlorogénique, labiale, néoclorogénicorosmarínico), choline, taraxastérol, lupéol, campestérol, tanins.	Feuilles
Flavonoïdes	(dérivés du lutéol et de l'épigénol) ; apigénine,diosmétine, diosmine,hispiduline, lutéoline, cirsimarine, néopritine, sinensétine, cupafoline.	feuilles, fleurs, tiges
Diterpènes	(acide carnosique, carnosol, rosmanol, rosmadial)	
Acides triterpéniques	(acide ursolique) 2 à 4%	
Triterpéniques	(alpha et bêta-amyrine, betulósido)	feuilles
Huile essentielle	1,2 à 2% 1,8-cinéol (30-40%), camphre (15-25%), bornéol (16-20%), acétate de bornyle (jusqu'à 7%), a-pinène (25%) %) ainsi que le bêta-pinène, le linalol, le camphène, le subinène, le myrcène, le $\alpha$ -phellandrène, le $\alpha$ -tirpène, le limonène, le p-cymène, le terpinolène, le thymène, le copalène, le terpinène-4ol, le terpinéol, le terpinéol, le caryophyllène, le méthyl chavicol, thymol	fleurs, tiges et feuilles
Minirales	Potassium , magnésium ,zenc , cuivre	feuilles, fleurs et tiges

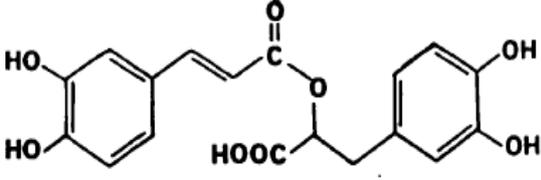
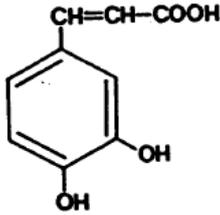
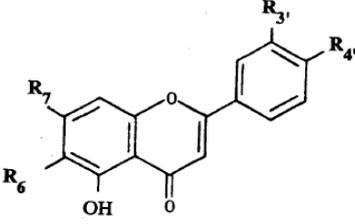
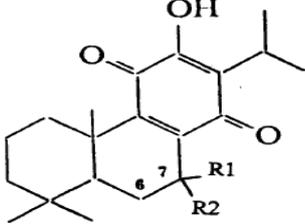
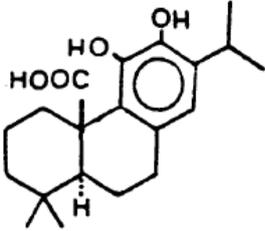
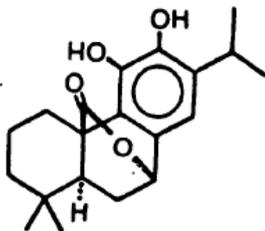
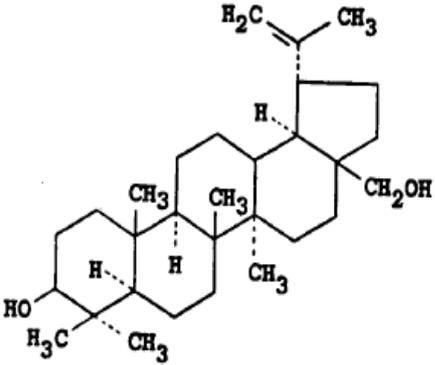
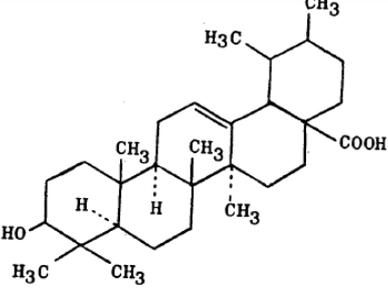
	
Acide rosmarinique	Acide caféique
Les acides phénols de <i>Rosmarinus officinalis</i>	
	
Les flavonoïdes	Les terpènes
	
ACIDE CARNOSOLIQUE	CARNOSOL (ou PICROSALVINE)
Structure chimique des di terpènes	
	
FIGURE 13 : Structure chimique de la bétuline	ACIDE URSOLIQUE
Structure chimique des tri terpènes	

Figure 02 : quelques structures chimiques des composants de *Rosmarinus officinalis* [(Hegnaijer, 1966) ; (Bezangerbeauquesneet al., 1980) ; (Rieskornet al., 1970)].

## **8. Propriétés de *Rosmarinus officinalis*:**

### **8.1. Propriétés médicinales :**

Dans ses utilisations médicinales, il a été rapporté comme antispasmodique, utilisé par voie orale en infusion, pulvérisé et topique (**Fonnegra et al., 2006**). Les composants chimiques de cette plante ont été largement étudiés depuis des décennies et comprennent des flavonoïdes tels que le carnosol, l'acide carnosique et rosmarinique et les huiles volatiles [(**Okamura et al., 1994**) ;(**Angelini et al., 2003**)].

Plusieurs propriétés médicinales ont été attribuées au romarin, dont la plupart ont été prouvées par des études *in vivo* sur des animaux ou *in vitro*. Il est généralement reconnu que le romarin présente une action, antiseptique, fongistatique, emménagogue, cholérétique stimulant du système nerveux central, anti-inflammatoire, cicatrisant, analgésique. Traiter le diabète et les parasites intestinaux (**Nolkemper et al., 2006**) ainsi que des propriétés, cholagogue, antispasmodiques et antigodanotropes (**Musa, 2008**),

En médecine traditionnelle, le romarin aide à la digestion, traite les céphalées et les migraines, les blanchêtes, les coliques, améliore les fonctions hépatiques et biliaires en cas de troubles digestifs. Il est utilisé en usage externe pour soigner les rhumatismes et les troubles circulatoires (**Teuscher, 2005**), il soigne les affections oculaires (**Bnouham et al., 2002**) et est utilisé comme, cholagogue, vulnéraire et diurétique (**Koubissi, 2002**).

### **8.2. Propriétés pharmacologiques :**

Les activités pharmacologiques qui lui sont attribuées sont liées à l'activité de l'huile essentielle et de ses composés phénoliques antioxydants responsables, entre autres, de l'activité microbienne, antimutagène et anti-inflammatoire. (**García, 2014**) L'huile essentielle a une activité sur le *Candida albicans* (**Martínez, 2015**)

## **9. Effets secondaires et contre-indications :**

En ce qui concerne l'utilisation des huiles essentielles, des concentrations élevées peuvent être toxiques pour le système nerveux central et provoquer des convulsions, des maux de tête, des spasmes musculaires, une gastro-entérite, une irritation de l'endothélium rénal; à fortes doses, il peut être neurotoxique (convulsif) et avorter. En utilisation topique il est, raison pour rubéfiant laquelle il faut éviter le contact avec les muqueuses et les zones de la peau altérées.

Il est recommandé de ne pas administrer l'huile essentielle pendant la grossesse, la période de lactation, chez les jeunes enfants, les patients atteints de gastrite, d'ulcères gastroduodénaux, de syndrome du côlon irritable, de colite ulcéreuse, de maladie de foie, d'épilepsie, de Parkinson ou d'autres maladies neurologiques (**Muñoz et al., 2002**). Pour cette raison, son utilisation n'est pas recommandée pendant des périodes prolongées ou à des doses supérieures à celles recommandées, et des précautions particulières doivent être prises chez les enfants. Sur le plan topique, l'essence de romarin peut provoquer une dermatite et un érythème chez les personnes hypersensibles (**Hemeroteca, 2008**).

***Chapitre II:***  
***Activités biologiques de Rosmarinus***  
***officinalis***

En tant que plante aromatique et médicinale, *Rosmarinus officinalis* est attribuée diverses activités biologiques telles que: antimicrobienne, antioxydante, antivirale, antiparasitaire, anti-inflammatoire, avec un grand intérêt pour les humains dans le secteur alimentaire, cosmétiques et produits pharmaceutiques [(Figueiredo et al., 2008) ; (Miguel, 2010) ;(Zuzarte et al., 2011) ; (Gonçalves et al., 2012) ;(Kim et Yun, 2013)].

**Tableau 02 : Activités biologiques de *Rosmarinus officinalis* (Martha, 2017)**

<b>Effet</b>	<b>Forme d'utilisation</b>	<b>Référence</b>
Activité antibactérienne	Huile essentielle	<b>Rozman et Jerzek (2009)</b>
	Extrait d'éthanol et d'eau	<b>Barni et al. (2009)</b>
Activité antivirale	Extrait hydroalcoolique	<b>Nolkemper et al. (2008)</b>
Activité antiparasitaire	Huile essentielle	<b>Abe et al. (2002)</b>
Activité antioxydante	Extrait d'eau	<b>Genena et al. (2008)</b>
Activité dans le système nerveux central	Extrait d'eau et Extrait hydroalcoolique.	<b>Tsuji et al. (2008)</b>
Action anti-inflammatoire	Huile essentielle	<b>Asada (1999)</b>
Action diurétique	Extrait d'eau	<b>Martinez et al. (2004)</b>
Propriétés au niveau cellulaire	Extrait hydroalcoolique et d'eau	<b>Bustineji et Issa (2010)</b>
La contraception	Extrait de feuille	<b>Gonzalez-Trujano et al. (2006)</b>
Prévention cardiovasculaire	Huile essentielle	<b>Lslamcevic (2007)</b>
Effet dermoprotecteur	feuilles de romarin	<b>Fuchs et al. (2005)</b>
Action dans le système gastro-intestinal (réduction de la lésion ulcéreuse)	Extrait hydroalcoolique	<b>Correa et al. (2000)</b>

### **1. Activité antimicrobienne :**

L'activité antifongique et antibactérienne est associée à l'huile essentielle de romarin. Des tests *in vitro* ont déterminé la sensibilité de bactéries telles que *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, des bactéries d'intérêt alimentaire, ainsi que de bactéries telles que *Clostridium perfringens*, qui ont montré une inhibition contre les extraits de romarin (**Ardila**

et al., 2009). La sensibilité de la bactérie *Salmonella typhi* à un extrait aqueux de romarin a également été mentionnée [(Hentz et Santin, 2007) ; (de Sousa et Conceição, 2007)].

### **1.1. Activité antibactérienne :**

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a présenté une activité contre les bactéries de la cavité orale et contre les bactéries du tractus gastro-intestinal [(Loyola, 2006) ; (Salvador Cañigüeral, 2003)].

L'extrait de feuille de *R. officinalis* affecte la membrane cellulaire des bactéries, l'activité cytotoxique affecte directement la phase mitotique des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Pour mettre en évidence *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* et *S. aureus*, ces microorganismes sont sensibles aux composants de l'extrait de romarin, dans l'extrait duquel prédominent l'acide caféique, l'acide rosmarinique, le carnosol, l'acide carnosolique et les flavonoïdes (Del Baño, 2005).

### **1.2. Activité antifongique :**

La propriété antifongique du romarin est attribuée à la présence de composants majeurs, tels que les composés terpéniques, tels que les sesquiterpènes et les sesquiterpénoïdes (Dentone et Morales, 2017). L'extrait glycolique de *R. officinalis* a montré des effets fongicides et antifongiques sur des souches cliniques de *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis* isolées de la cavité buccale de patients ayant utilisé des antibiotiques prolongés (Costa et al., 2009).

### **1.3. Activité antivirale :**

L'acide carnosolique inhibe l'activité enzymatique du virus VIH-1 (Muñoz, 2002). Des études in vitro sur cellules ont montré que l'extrait aqueux de *R. officinalis* présentait une activité antivirale élevée contre l'herpès simplex de type 1, type 2 et une souche résistante à l'acyclovir. L'extrait affecte le HSV avant adsorption mais n'a aucun effet sur la réplication du virus intracellulaire. Par conséquent, les extraits exercent leur effet antiviral sur le HSV libre et offrent la possibilité d'utiliser une application topique thérapeutique contre les infections herpétiques récurrentes (Nolkemper et al., 2006).

## **2. Activité antioxydants :**

L'activité antioxydante du romarin est connue depuis environ 30 années (Nassu et al., 2003). En raison de ses propriétés anti-oxydantes, le romarin est largement accepté en tant qu'une des épices qui a l'activité antioxydante la plus élevée (Wang et al., 2008). Des tests in vitro ont montré que des composés tels que le rosmanol, le carnosol et l'acide carnosolique ont un effet antioxydant (de Souza, 2008).

## **3. Autres Activités :**

### **3.1. Activité antispasmodique :**

Dans les voies biliaires et l'intestin grêle, l'huile essentielle de romarin est attribuée aux effets antispasmodiques, qui ont été démontrés par des études expérimentales chez des animaux tels que les lapins et les cobayes lors de l'administration de noradrénaline; ainsi, lors de l'administration d'extrait aqueux à des souris (ESCOP, 1997).

### **3.2. Activité anti-inflammatoire :**

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (Inouye, 2007).

L'acide rosmarinique inhibe le mécanisme des réactions inflammatoires dépendant du complément, réduit l'œdème induit chez le rat et inhibe l'anaphylaxie cutanée passive. L'extrait de «romarin», appliqué localement chez la souris, inhibe l'inflammation de la peau et l'hyperplasie provoquée par des composés chimiques (Muñoz, 2002).

### **3.3. Activités antidiabétique :**

Les limitations des agents pharmacologiques actuellement disponibles pour contrôler la glycémie ont stimulé les recherches sur des agents antidiabétiques avec différents mécanismes d'action (Reddy et al., 2000).

Il existe des rapports scientifiques sur l'effet antidiabétique de l'extrait de romarin qui démontrent que l'infusion de la plante a un effet hypoglycémiant (Erenmemis et al., 1997).

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*), est largement utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement d'hyperglycémie et pour sa haute activité antioxydante. Les actions possibles de

l'extrait éthanolique de *Rosmarinus officinalis* sur le métabolisme du glucose et sur son activité antioxydante chez les lapins ont été évaluées (**Bakirel et al., 2008**).

### **3.4. Cytotoxicité et activité antitumorale :**

Il a été identifié que l'extrait d'éthanol de romarin présente une action antitumorale. Des études menées sur des cultures cellulaires augmentent la sensibilité des cellules tumorales aux médicaments chimiothérapeutiques établis. Des études in vivo ont également été rapportées, selon lesquelles l'application topique d'extrait de romarin chez la souris réduit la formation et la propagation de tumeurs (**Plouzek et al ., 1999**).

### **3.5. Activités pharmacologique :**

Certains tests pharmacologiques ont également montré que l'huile essentielle, certains extraits et certains de leurs composants isolés relâchent les muscles lisses trachéaux, intestinaux et vasculaires de plusieurs animaux (**López, 2008**).

Le mucilage a un effet émollient, antiallergique, expectorant et réduit l'absorption intestinale des glucides et des lipides. Les glycosides iroïdes ont une action anti-inflammatoire, les tanins donnent une activité astringente et leurs graines ont une action laxative (**Alonso, 2004**). Ses feuilles sont stimulantes, aromatisantes et condimentaires en extraits médicinaux pour les problèmes de foie, la lithiase biliaire, la cholécystite, les fleurs et leurs fruits contiennent une odeur aromatique caractéristique, avec une saveur aromatique épicée, canforace et amère qui se mélange bien avec la rue la gale, avec la lavande et l'origan dans des bains stimulants; avec la banane plantain comme cicatrice et avec l'absinthe comme digestif (**Ingrid, 1993**).

***Chapitres III : Mécanismes d'action  
des métabolites secondaires***

Les plantes aromatiques et médicinales constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés médicales des plantes médicinales dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques (**Benjaliet al.,1986**).

Les effets curatifs de certaines plantes sont bien connus. Or, ce n'est que récemment que les éléments actifs à l'origine des actions thérapeutiques des plantes ont été isolés et étudiés. Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme (**Iserin et al., 2007**).

### **1. Mécanisme d'action antimicrobienne des extraits :**

L'activité biologique de l'extrait de plante peut varier d'une inhibition complète ou partielle de la croissance microbienne à une action bactéricide ou fongicide (**Garro et al., 2006**). Les métabolites secondaires qui sont impliqués aux mécanismes d'action des extraits sont les suivants :

**Tanins:** correspond à un composé amer qui est produit par la plante dans le but est l'autoprotection de l'environnement extérieur. Ce composé présente la caractéristique de l'astringence du romarin (**Rodríguez, 2012**). Il est mentionné que son action thérapeutique antimicrobienne, sa stimulation phagocytaire et son activité antitumorale sont liées à sa capacité à inactiver les adhésines, ainsi que les enzymes et les protéines de transport des bactéries (**Cowan, 1999**).

**Flavonoïdes:** ce sont des pigments végétaux non azotés qui participent à la réponse adaptative et protectrice de la plante contre les rayons ultraviolets, en plus d'attirer les pollinisateurs (**Rodríguez, 2012**). Son activité antimicrobienne est probablement liée à la formation de complexes avec des protéines solubles, extracellulaires et avec des cellules de la paroi bactérienne, qui la détruisent, le tout en réponse à une infection microbienne (**Cowan, 1999**).

**Triterpènes:** ce sont des composés lipophiles dont les principaux sont: l'acide ursolique et l'acide oléique; alcools triterpéniques tels que l'alpha et la bêta-amyrine(**Muñoz, 2002**). Leur action antimicrobienne est liée à la capacité de décomposer la membrane cellulaire d'une bactérie (**Rodríguez, 2012**).

Les mécanismes impliqués dans l'action antimicrobienne des extraits sont encore loin d'être totalement élucidés. Etant donné le grand nombre de composants présents dans un extrait, il

est évident que l'activité antibactérienne ne peut être due à un seul mécanisme d'action spécifique mais plutôt à divers mécanismes (**Burt, 2004**).

Les mécanismes les plus élucidés sont : la dégradation de la paroi cellulaire, endommagement de la membrane plasmique, altération des protéines, perte du contenu cellulaire (ions et métabolites), coagulation des constituants du cytoplasme et l'inhibition de la force proton motrice. Plusieurs études montrent que la membrane des cellules bactériennes est la cible primaire des composés aromatiques bioactifs. On assiste ainsi à une augmentation de la fluidité membranaire et la fuite des potassiums et des protons menant à la diminution du gradient de pH à travers la membrane plasmique et la variation du potentiel membranaire [(**Carson et al., 2002**); (**Hada et al., 2003**); (**Inoue et al., 2004**)]. D'autres constituants cytoplasmiques comme l'adénosine triphosphate passent dans le milieu extracellulaire [(**Hayouni et al., 2008**); (**Ultee et al., 2002**)].

La membrane plasmique bactérienne est la barrière de perméabilité sélective qui protège le cytoplasme de l'environnement extracellulaire. Elle constitue également le siège de nombreuses fonctions vitales telles que la respiration. L'énergie requise pour les processus cellulaires est générée par la force proton motrice (gradient d'ions hydrogène) qui est établie par un gradient de protons à travers la membrane plasmique. Pendant le métabolisme, les cellules transportent les protons à l'extérieur de la membrane plasmique, ce qui crée un excès d'ions hydrogène et une charge positive à l'extérieur de la membrane. La différence de concentration et de charges électriques entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule produit la force proton motrice qui constitue le potentiel de proton (ou gradient de pH) et le potentiel électrique (ou potentiel membranaire). Les protons ne peuvent pas diffuser à travers la membrane plasmique. Leur retour vers l'intérieur de la cellule bactérienne à travers l'ATP synthétase libère de l'énergie requise pour la production de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate (**Jormakka et al., 2003**).

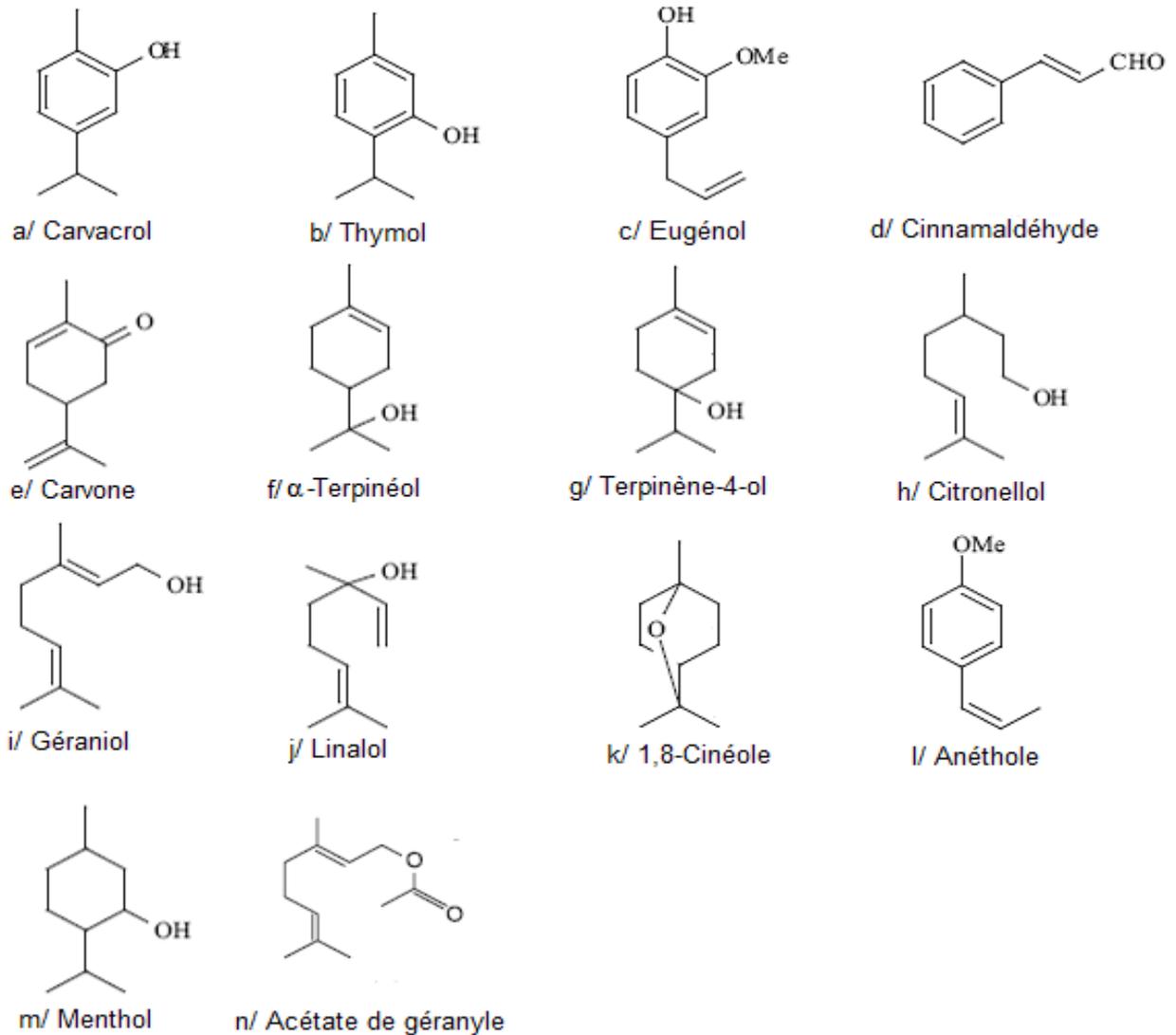
La perte du caractère différentiel de la perméabilité de la membrane cytoplasmique est fréquemment identifiée comme étant la cause de la mort cellulaire. Toutefois, certains auteurs voient que la perte des fonctions de la membrane explique seulement en partie l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (**Walsh et al., 2003**).

## **2. Mécanisme d'action antimicrobienne des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles sont des composés volatils, huileux, et odorants du métabolisme secondaire d'une plante aromatique [(Guy, 1997) ; (Iserin et al., 2007)], constitués d'un grand nombre de substances terpéniques synthétisées par les plantes et extraites à partir du matériel végétal à l'aide de procédés physiques comme la distillation à l'eau (hydrodistillation) ou à la vapeur d'eau (entraînement à la vapeur d'eau) ou par expression du péricarpe de certains citrus, suivis de décantation ou centrifugation (Mossaddak, 1995).

C'est l'un des principes actifs de *Rosmarinus officinalis*, responsable de la majeure partie de l'action médicinale de la plante. Il est obtenu à partir de feuilles, de fleurs et de tiges. Il fait partie du groupe des terpénoïdes et il a été décrit que son action thérapeutique antiseptique et antimicrobienne réside dans ses composants, notamment alpha pipénone, camphre, 1,8 cinéol ou eucalyptol, limonène, la verbénone, le camphène et le bornéol. L'action antimicrobienne de l'huile de romarin a été démontrée contre des bactéries telles que *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Ardila et al., 2009). Ainsi que des champignons, des virus et des protozoaires (Rodríguez, 2012).

L'HE peut contenir approximativement 300 molécules ; cependant, la plupart des huiles comportent 20 à 60 molécules [(Langenheim., 1994) ; (Dung et al., 2008)]. Les composés trouvés dans les HE appartiennent à des classes chimiques variées (Figure 03). Les composés terpéniques sont prédominants, mais les phénylpropanoïdes et les autres composés (composés nitriques et sulfuriques) se retrouvent avec des fréquences plus faibles et en proportion similaire (Friedrich, 1976). Elles peuvent aussi contenir des composés azotés et sulfuriques [(Weidenhamer et al., 1993) ; (Griffin et al., 1999)].



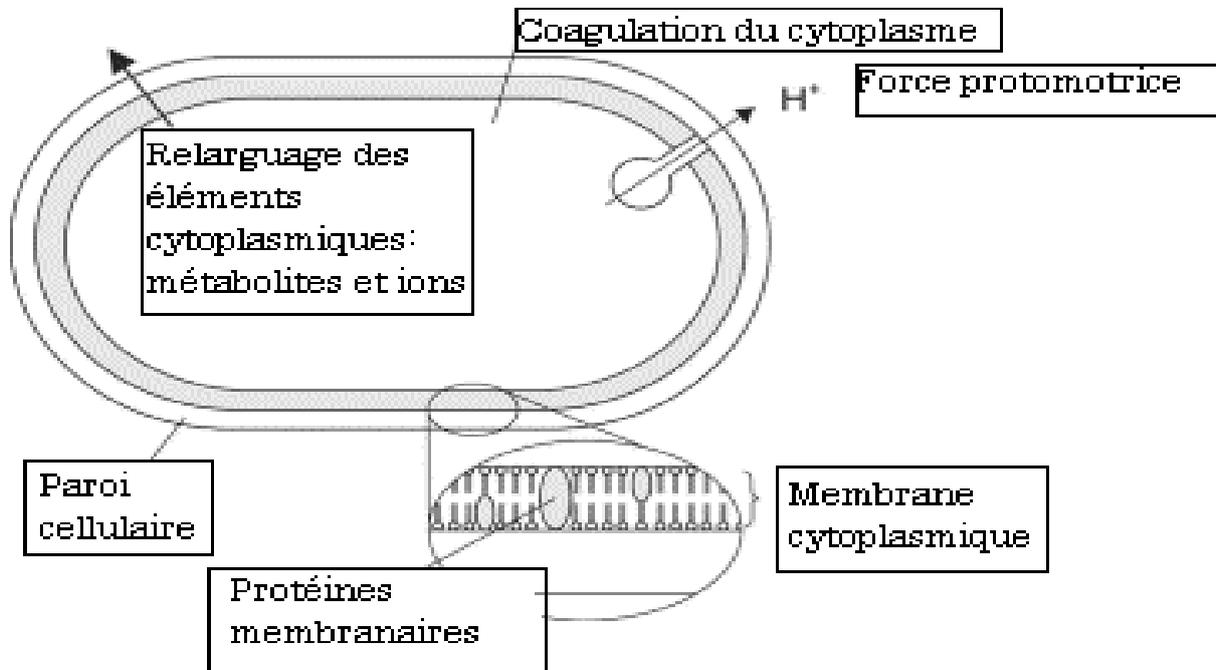
**Figure03:** Composés impliqués dans les activités antibactériennes des huiles essentielles  
(Kalemba et al., 2003)

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites des plantes aromatiques a été largement décrite in vitro ainsi que les activités antispasmodique, diurétique ou expectorante (Hans,2007), anti-oxydante et anti-inflammatoire et elles présentent également un fort pouvoir antifongique [(Chami, 2005) ; (Giordani et al., 2006)]et peuvent agir en tant qu'agents phytoprotecteurs. Il est reconnu depuis longtemps que certaines huiles essentielles ont des propriétés antimicrobiennes , qui ont été examinées dans le passé. Outre les propriétés antibactériennes. Les huiles essentielles ont également des propriétés insecticides," antiparasitaires "et antifongiques[(Billerbeck, 2007) ; (Juhás, 2009)].

## 2.1. Mécanisme antibactérien :

Les huiles essentielles ont des propriétés bactéricides (Martinez, 2009). Elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanalisales (Pellecuer et al., 1980) ou au niveau de la microflore vaginale (Viollon et al., 1994) et d'origine fongique contre les dermatophytes (Chaumont et al., 1989).

Le mécanisme d'action n'a pas fait l'objet d'une étude approfondie. Compte tenu du grand nombre de groupes de composés chimiques présents dans les huiles essentielles, il est fort probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme spécifique, mais qu'il existe plusieurs cibles dans la cellule (Burt, 2004).



**Figure 04:** Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne. (Burt, 2004).

Les composants des huiles essentielles peuvent agir sur les protéines membranaires. Ils sont capables de s'accumuler dans la couche lipidique et interférer avec l'interaction lipide-protéine. De plus, une interaction directe entre les composés lipophiles et la partie hydrophane de la protéine peut avoir lieu (Juven et al., 1994). Ces interactions ont pour conséquence l'altération de l'activité des enzymes qui régulent la production de l'énergie [(Lambert et al., 2002); (Ultee et al., 2002)] et la synthèse des composants structuraux (Burt, 2004).

Les huiles essentielles ont un pouvoir antimicrobien suffisant qui est dû à trois caractéristiques:

- Caractère hydrophile ou hydrophobe: il altère et pénètre dans la structure lipidique de la paroi cellulaire, entraînant la dénaturation et la mort ;
- Les composants chimiques: ils peuvent agir en tant qu'agents interférant avec la translocation des protons et la phosphorylation de l'ATP ;
- Type de microorganisme auquel il doit s'attaquer: Les bactéries à Gram négatif ont une sensibilité plus élevée que les bactéries à Gram positif in vitro (**Reyes,2012**).

Plusieurs études indiquent une activité antibactérienne de certaines espèces contre le développement de différents agents pathogènes, (**Crsitina, 2001**).

## **2.2.Mécanisme antifongique :**

L'huile essentielle, peuvent être traité les infections mycosiques d'origine fongique contre les dermatophytes(**Chaumont et al., 1989**). L'usage des huiles essentielles en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables. L'activité antifongique des huiles essentielles des plantes aromatiques a été donc confirmée par de nombreux auteurs(**Bourrel, 1995**).

L'action antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (**Mann et al.,2000**). En effet, les composés terpéniques des huiles essentielles et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures (**Giordani et al.,2006** ).

Le mécanisme d'action des huiles essentielles sur la flore fongique se fait par des modifications morphologiques des hyphes (**Bergkvist, 2007**) ou une perturbation directe de la membrane cellulaire fongique (**Cavanagh,2007**).

### **2.3. Mécanisme antivirale :**

Les études *in vitro* qui ont été menées jusqu'à présent indiquent que de nombreuses huiles essentielles possèdent des propriétés antivirales, mais elles ne touchent que les virus enveloppés et seulement quand ils sont à l'état libre, c'est-à-dire avant que le virus se fixe et pénètre la cellule hôte par exemple (Schnitzler *et al.*, 2008).

# **Partie expérimentale**

# *Matériel et méthodes*

Ce travail a été effectué au laboratoire de Biotoxicologie, Pharmacognosie et Valorisation Biologiques des Plantes (LBPVBP) et le laboratoire pédagogique au département de biologie à la faculté des sciences de l'université Dr. Moulay Tahar de Saida.

## **1. Matériel :**

### **1.1. Matériel végétal :**

Les parties aériennes de *Rosmarinus officinalis* ont été collectées en novembre 2018 de la région de SAIDA. Caractérisée par un climat semi-aride, La matière végétale recueillie, a été séchée à température ambiante et l'abri de lumière, à l'ombre jusqu'à la stabilisation de son poids (**Figure 05**) (AFNOR, 1986).



**Figure 05:** Photo représente la plante du Romarin.

### **1.2. Microorganismes**

Six bactéries et trois levures ont été l'objet de l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique (**Tableau 03**). La conservation des souches bactériennes se fait dans des tubes de gélose nutritive inclinée et candidas dans des tubes de sabouroud gélosé inclinée à une température de 4°C.

**Bactéries :** Dans les tubes à essai stériles contenant 5ml de milieu BN ajouter les gouttes de bactéries dans chaque tube, après garder les tubes en incubation à 37 C° pendant 24h. Les six souches bactériennes conservées sontensemencées dans des boîtes de Pétri contenant 15ml de gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24h, afin de stimuler leur croissance (**CLSI-M7-A7, 2006**).

**Levures :** Dans les tubes à essai stériles contenant 5ml de milieu SB ajouter les gouttes de levures dans chaque tube, après garder les tubes en incubation à 25 C° pendant 24h. Les levures sont ensemencées par la méthode des stries sur milieu Sabouraud en boîtes de Pétri. Ces dernières sont incubées à 25°C pendant 48h (CLSI-M27-A2, 2002).

**Tableau 03 :** Les différents microorganismes utilisés.

	<b>Microorganisme</b>	<b>Référence</b>	
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>ATCC 25923</b>	Gram +
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<b>ATCC 19115</b>	Gram+
	<i>Bacillus cereus</i>	<b>ATCC 6633</b>	Gram+
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<b>ATCC 13311</b>	Gram -
	<i>Escherichia coli</i>	<b>ATCC 25933</b>	Gram-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>ATCC 27853</b>	Gram-
Levures	<i>Candida albicans</i>	<b>ATCC 26790</b>	
	<i>Candida albicans</i>	<b>IP444</b>	
	<i>Candida albicans</i>	<b>ATCC 10231</b>	

## 2. Méthodes :

### 2.1. Préparation des extraits

#### 2.1.1. Huiles essentielles :

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydro distillation (**figure 06**) (**Clevenger, 1928**). 80g des parties aériennes séchées de la plante a été ajouté à 800 ml de l'eau distillé pendant 2 heures et 30 minutes à la température de 100°C. Les vapeurs chargées d'huile, en traversant un réfrigérant se condensent et versent dans une ampoule à décanter à 20°C (**Amarti et al., 2008**).



**Figure 06 :** Montage d'hydrodistillation employé pour l'extraction de l'huile essentielle.

### **2.1.2. Extrait aqueux :**

L'extrait aqueux a été préparé par infusion. Nous avons effectué un broyage de la partie aérienne de la plante étudiée à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène. Cinquante grammes de poudre ont été portés à ébullition pendant 20 minutes dans 1000 ml d'eau distillée puis filtrés. Ce filtrat a ensuite été séché jusqu'à poids constant du résidu. (dans l'étuve) (Loubaki, 1999) ; (Sqalli et al., 2001) ; (Kassi et al., 2008)].

### **2.1.3. Extrait méthanolique :**

Les feuilles sélectionnées ont été lavées à l'eau distillée et séchées à l'ombre pendant 2 jours. Ensuite, la matière végétale était broyée jusqu'à obtention d'une poudre fine. La macération est utilisée pour préparer l'extrait méthanolique. En effet, on a fait macérer 30 g de poudre fine avec 300 ml de méthanol à 100% pendant une semaine, puis au reflux pendant deux heures. Plus tard, il a été filtré puis concentré par évaporation pour obtenir l'extrait méthanolique de romarin sec à partir duquel les concentrations étudiées ont été obtenues (rotavap)(Lock, 1994).

## **2.2. Tests phytochimiques:**

Dans le cadre de la recherche de ces molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale, il est préférable de déterminer leurs compositions chimiques par une étude phytochimique afin de détecter les classes des composés existants dans les différents organes des plantes. Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilité, sur des réactions de coloration et de précipitation ainsi que sur des examens en lumière ultra violette (**Kholkhal, 2014**), différentes classes recherchées :

### **a. Tannins :**

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1ml de l'extrait, 2ml d'eau distillé et 2 à 3 gouttes de solution de  $\text{FeCl}_3$  diluée (1 %). L'apparition d'une coloration bleu-noire caractérise la présence des tannins galliques, verte ou bleu-verte celle des tannins catéchiques (**Trease et Evans, 1987**).

### **b. Saponines: Indice de mousse :**

Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire respectivement 1, 2, 3,...,10ml de la solution à analyser. Ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Agiter chaque tube dans le sens de la longueur du tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. Laisser reposer 15 min et mesurer l'hauteur de la mousse produite dans chaque tube.

L'indice de mousse (**I**) est calculée par la formule suivante :  $I = 1000 / N$

**N** est le numéro du tube où la hauteur de mousse est égale à 1 cm.

### **c. Anthocyanes :**

Un volume de 2ml d'infusé aqueux est additionné à 2ml de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes [(**Debray et al., 1971**) ; (**Paris et al., 1969**)].

### **d. Coumarines :**

Une masse de 1g de poudre végétale est placée dans un tube en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué et sont portés

à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous ultra-violet (**Rizk, 1982**).

**e. Alcaloïdes :**

Nous avons procédé à une macération de 24 heures de 2g de poudre végétale mélangés à 50 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué au demi et à de l'eau distillée. Nous avons filtré le mélange et rincé à l'eau de manière à obtenir 50 ml de filtrat. Ensuite nous avons pris deux tubes à essai dans lesquels nous avons introduit 1ml du macéra. Nous avons ajouté dans le tube n° 1, 5 gouttes de réactif de Mayer et dans le tube n° 2, 5 gouttes de réactif de Wagner. La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 min indique la présence d'alcaloïdes (**Paris et al., 1969**).

**f. Stérols et triterpènes :**

Evaporer à sec 10 ml de la solution à analyser, dissoudre le résidu dans 5 ml d'anhydride acétique puis 5 ml de chloroforme. A l'aide d'une pipette ajouter 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré au fond du tube sans agiter. Laisser reposer 30 minutes. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et triterpènes. (**Trease et Evans, 1987**).

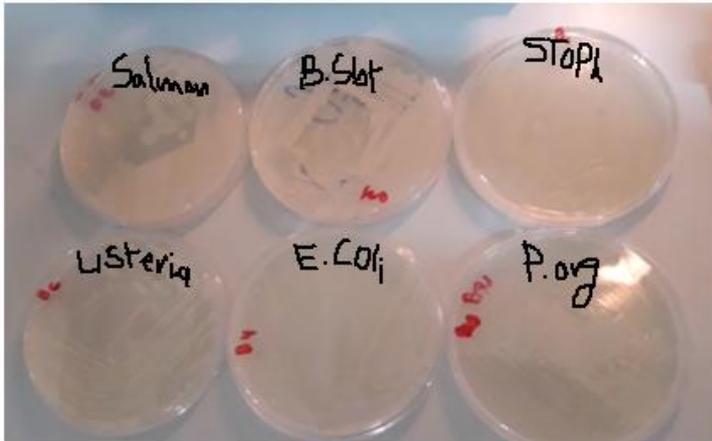
**g. Quinones :**

Les substances quinoniques sont recherchées par le réactif de Bornstraëgen. 2 mL de chaque extrait est évaporé à sec. Le résidu est trituré dans 5 mL d'acide chlorhydrique 37% au 1/5. Le triturât est versé dans un tube à essai et porté ensuite au bain-marie pendant 30 min. Après refroidissement, il est extrait par 20 mL de chloroforme. L'ammoniaque diluée 2 fois (0,5 mL) est ajouté à la solution chloroformique. Une coloration rouge ou violette confirme la présence de quinones.

**2.3. Evaluation de l'activité antimicrobienne :**

**2.3.1. Méthode de diffusion des disques :**

L'activité antibactérienne est évaluée par la méthode de diffusion des disques qui permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis-à-vis de l'huile essentielle et les extraits préparés (**Figure 07 et 08**).



**Figure 07 :** Les souches bactériennes en gélose nutritive

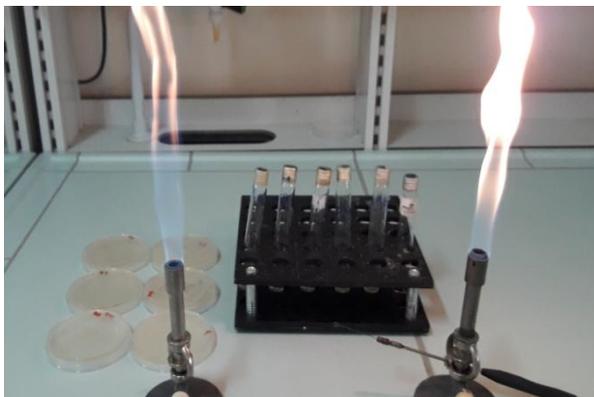


**Figure 08 :** les levures en milieu sabouraud

**a. Préparation d'inoculum :**

**Pour les bactéries :** l'obtention de l'inoculum pour les bactéries s'effectue comme suit : à partir d'une préculture jeune sur gélose nutritive, nous avons prélevé quelques colonies que nous avons resuspendu dans 5ml de bouillon nutritif. L'inoculum est ajusté à  $10^8$  cellules/ml (une DO de 0,08 à 0,1) par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm. La concentration cellulaire finale, fixée à  $10^6$  cellules/ml, est obtenue par dilution de l'inoculum initial à 1/100<sup>ème</sup> dans de l'eau physiologique (0,9% de NaCl) (CLSI-M44-A 2004) .

**Pour les levures :** Concernant les levures, l'inoculum est ajusté par numération des cellules viables sur cellule de Malassez pour avoir une concentration cellulaire de  $10^6$  à  $5 \times 10^6$  cellules/ml préparée dans l'eau physiologique (0,9% de NaCl) (CLSI-M44-A 2004) (Figure 09 et 10).



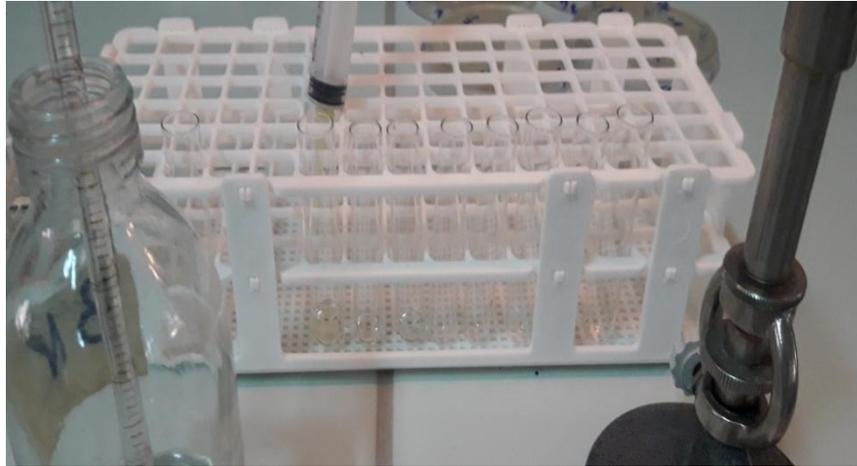
**Figure 09 :** Préparation d'une culture jeune



**Figure 10:** ajustement de l'inoculum

**b. Préparation des solutions des huiles essentielles :**

Après ensemencement des germes, huit dilutions H.E (concentrée, 1/2 et 1/4) sont préparées par le du DMSO qui est inerte sur l'activité bactérienne.



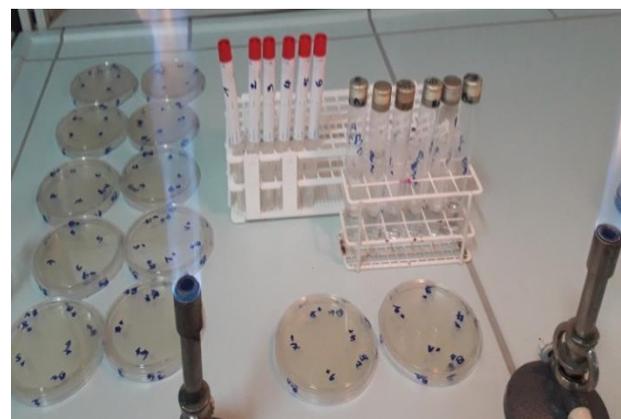
**Figure 11 :** Préparation des solutions des huiles essentielles

**d. Procédure :**

**Pour les bactéries :** La méthode de diffusion des disques consiste à utiliser des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé le Muller Hinton, déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en papier filtre (Whatman n° 5), de 6mm de diamètre ont été préparés. 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, préalablement imprégnés de quantités connues d'huile essentielle (10µl), ont été ensuite déposés à la surface de chaque boîte de Petri contenant le milieu gélosé Muller Hinton (Prescott et al., 2003) ; (Wilkinson, 2006) (Figure 12 et 13).

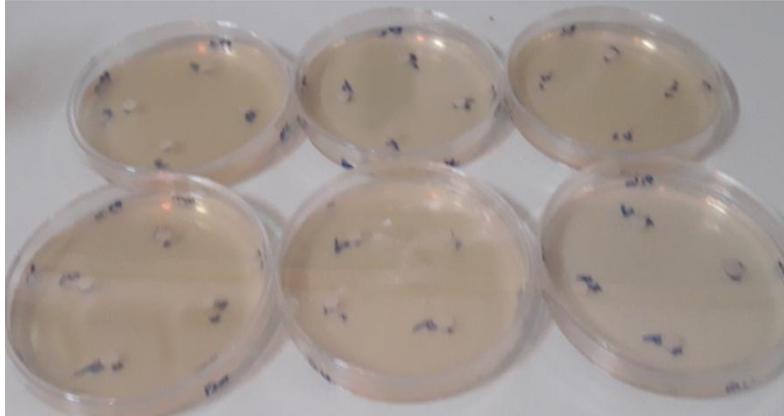


**Figure 12 :** l'écoulement des boîtes de pétri



**Figure 13 :** l'ensemencement de la suspension

bactérienne



**Figure 14 :** Disposition des disques

**Pour les levures :** Les boîtes de Pétri contenant de la gélose sabouraud sontensemencées aseptiquement par écouvillonnage. Ensuite elles sont séchées à proximité de la flamme (15 min). Des disques de 6 mm de diamètre préparés à base de papier filtre (Whatman No.1), puis stérilisés par autoclavage sont imprégnés par la solution de nos conservateurs à tester puis placés sur la gélose préalablementensemencée avec la levure à tester. Les disques sont préparés en extemporané [(Abirami et Venugopal, 2005) ; (Nejjah et al., 2006)].

Les boîtes sont laissées pendant 15 minutes à la température ambiante avant d'être mises à incuber dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures (bactéries) ou 35°C pendant 20 à 24 heures (levures). Après l'incubation, une zone ou un halo clair apparaît.

La lecture des diamètres d'inhibition a été effectuée après incubation des boîtes de Petri à 37°C pendant 24, 48 et 72 heures (Guignar, 1998).

Selon Barros et al. (2007), l'activité antimicrobienne est exprimée en zones d'inhibition comme suit :

- ✓ Diamètres inférieurs à 7 mm : aucune activité antimicrobienne (–)
- ✓ Diamètres de 7 à 9,9 mm : activité antimicrobienne faible (+)
- ✓ Diamètres de 10 à 11,9 mm : activité antimicrobienne modeste (++)
- ✓ Diamètres de 12 à 15 mm : activité antimicrobienne élevée (+++)

✓ Diamètres supérieurs à 15 mm : activité antimicrobienne forte (+ + + +)

[(CLSI-M44-A 2004) ; (Espinell-Ingroff et Cantón, 2007) ; (Abirami et Venugopal, 2005) ; (Nejjah et al., 2006)].

### **2.3.2. Méthode des micro-dilutions sur milieu liquide:**

L'activité antibactérienne des huiles essentielles et des deux extraits a été évaluée par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

#### ***a. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide:***

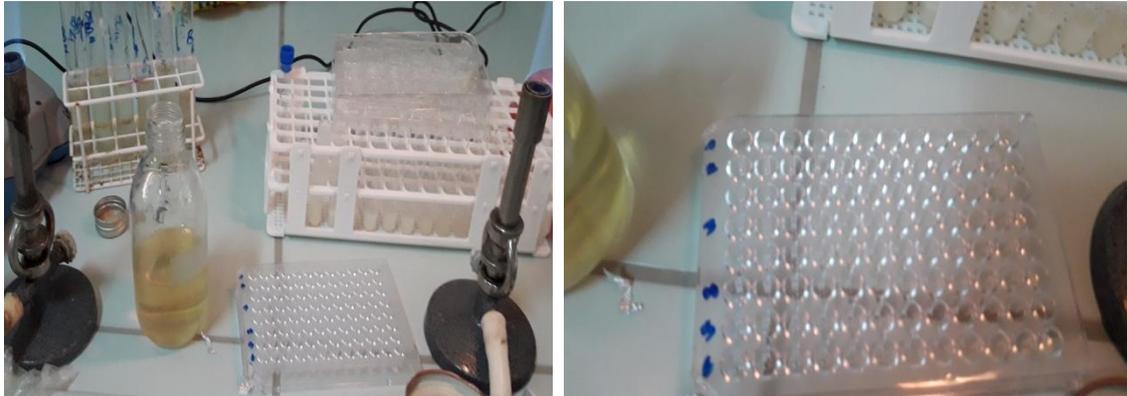
La technique utilisée a été décrite par CLSI en 2006. Elle est basée sur la capacité des microorganismes à produire une croissance visible à l'œil nu au sein d'une série de dilutions de la substance antimicrobienne (CLSI-M7-A7, 2006). Cette méthode est réservée uniquement pour les bactéries aérobies non exigeantes.

Le Bouillon Mueller Hinton (MH) (pH de 7,2 à 7,4) est largement utilisé comme milieu standard pour la micro-dilution en plaque. Ce bouillon est considéré comme milieu de référence. A partir d'une préculture bactérienne en milieu solide (gélose nutritive) de 24 h à 37°C, nous avons prélevé quelques colonies à l'aide d'une anse de platine que nous avons resuspendues dans du bouillon nutritif. Elles sont ensuite placées dans une étuve à 37°C jusqu'à l'obtention d'une concentration cellulaire de  $10^8$  cellules/ml (une DO de 0.08 à 0.1,  $\lambda = 625\text{nm}$ ). Une dilution au  $1/100^{\text{ème}}$  est effectuée pour avoir un inoculum final de  $10^6$  cellules/ml.

Pour chaque ligne de la microplaque, nous avons déposés 50µl de l'inoculum dans les 12 puits à l'exception du puits N°12 qui servira de puits de contrôle de contamination qui contient seulement le milieu de culture comme témoin positif (100 µl). Bouillon Mueller-Hinton (MHB).

Nous avons ensuite ajouté 50 µl de la solution de l'huile essentielle dans les 12 puits à l'exception du puits N°11 et puits N°12. Le puits N°11 servira de témoin négatif (croissance sans HE). Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI).



**Figure 15** : Remplissage de la microplaque

***b. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) :***

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibactérien qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en huile essentielle strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 10 µl de chaque puits (ne présentant pas de croissance) va être transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h.

Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de celle de la CMB renferme un nombre de colonies inférieur à 3 (**Prescott et al., 1995**).

***c. détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) :***

La CMF est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique qui tue 99,9% de la concentration cellulaire. Pour la détermination de la concentration minimale fongicide, nous avons utilisé la méthode décrite par (**Canton et al., 2003**). Cette méthode est en accord avec les exigences de la CLSI « Clinical and Laboratory Standards Institute » (**Espinelngroff et Canton, 2007**).

Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 35°C), les deux puits contenant les concentrations de substances antifongiques strictement supérieures à la CMI vont servir

pour la détermination de la CMF. Pour ce faire, 10 µl de chaque puits vont être transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu sabouraud gélose. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 35 °C pendant 48 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMF renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (Majoros et al., 2005).

## **2.4. Etude de l'effet antibactérien:**

### **2.4.1. Conditions expérimentales générales:**

Les concentrations des huiles essentielles utilisées ont été choisies selon les CMI précédemment déterminées. La gamme de ces concentrations est de : (1/2 CMI=0,48 mg/ml), (CMI=0,97) et (2xCMI=1,94) et (4xCMI=3,88). La solution tampon utilisée pour ces tests est la solution tampon phosphate (PBS).

La suspension bactérienne (la phase exponentielle de croissance) a été préparée par inoculation de cinq colonies d'une culture jeune de bactéries dans 50 ml de Mueller-Hinton bouillon. Ensuite, elle a été incubée à 37°C pendant 4-5 h sous agitation. Après l'incubation, les bactéries ont été séparées au milieu de culture par centrifugation à 5000 tr/min durant 20 min à 4°C, ensuite le culot bactérien est lavé deux fois par la solution PBS (pH 7.4) (De Barros et al., 2009).

### **2.4.2. Tests de la viabilité cellulaire :**

Les tests de la viabilité cellulaire ont été réalisés par un comptage des cellules viables sur milieu solide. Pour cela, Des volumes de 500 µl des concentrations finales C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> ont été prélevés, dilués en série dans l'eau peptonée stérile (0.1 g 100 ml<sup>-1</sup>) et puis versés sur des boîtes coulées par un neutraliseur stérile, suivie d'ensemencement par inondation (De Barros et al., 2009). Après 24 h d'incubation à 37°C, les colonies ont été comptées et le nombre de cellules viables rapporté comme unités formant des colonies (UFC) par ml et les résultats ont été exprimés en Log d'UFC/ ml. Des tubes de contrôle sans HE ont été testés de la même façon.

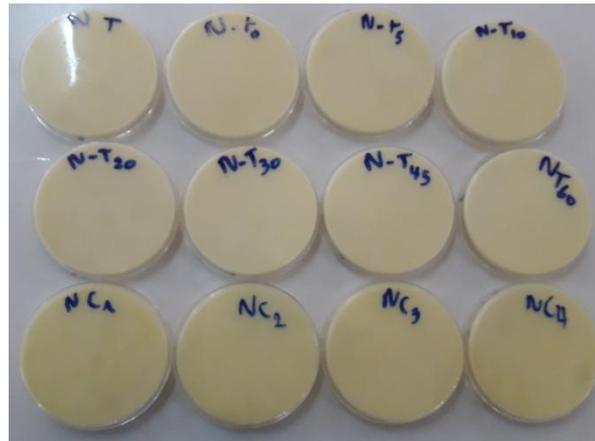


Figure 16 : Milieu de culture Neutraliseur

### 2.4.3. Tolérance au sel :

Une quantité de 100  $\mu$ l de cultures ont été diluée dans de l'eau peptonée stérile et ont été étalée sur GN-NaCl (Carson et al., 2002). Les tubes de contrôle sans huile essentielle ont été testés de la même façon. Après 24 h d'incubation, le nombre d'UFC/ml sur chaque boîte GN-NaCl ont été comparés à ceux obtenus pour l'essai de contrôle, et les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules capables de former des colonies.

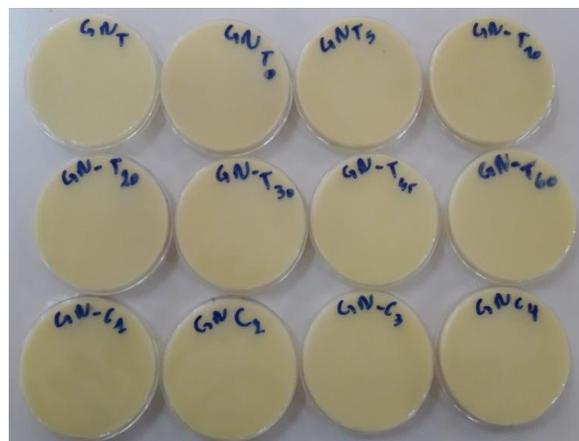


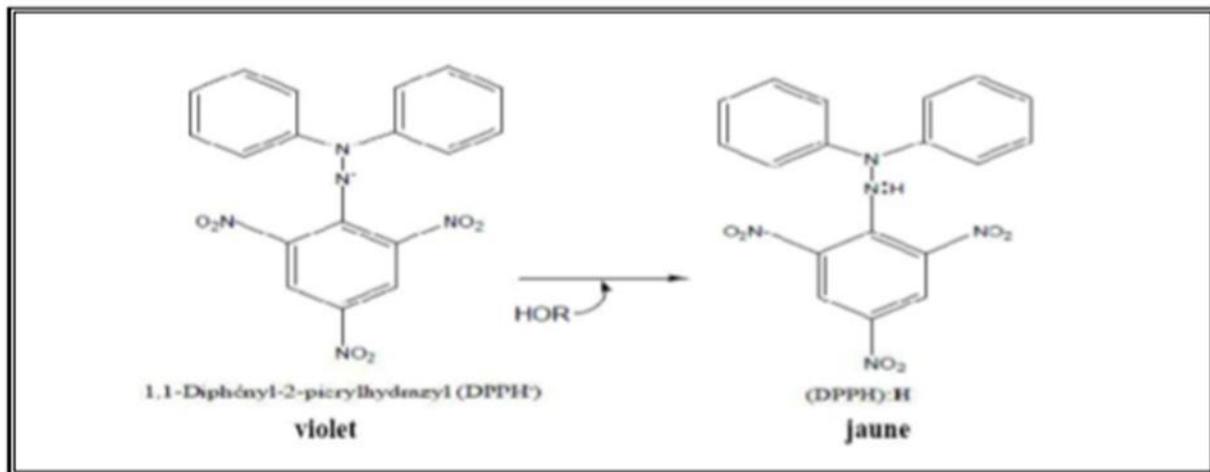
Figure 17 : Milieu GN-NaCl

## 2.5. Evaluation de l'activité antioxydante:

### 2.5.1. Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) :

Le DPPH• est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de

l'analyse, à température ambiante, le radical DPPH•<sup>•</sup> présente, en solution alcoolique, une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance donneuse de protons (figure ). Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm (Masuda et al., 1999).



**Figure 18 :** Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH•

Pour la mesure de l'activité, une prise d'essai de 1 ml d'extrait à différentes concentrations est mise en présence de 250 µl d'une solution de DPPH<sup>•</sup> (2ml méthanol). Le mélange est placé pendant 30 mn à l'obscurité pour réagir et l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin négatif (sans extrait).

L'antioxydant de synthèse utilisé est le BHT. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule.

$$PI = (D.O \text{ témoin} - DO \text{ extrait} / DO \text{ témoin}) \times 100$$

**PI:** Pourcentage d'inhibition.

**D.Otémoin :** Absorbance du témoin.

**D.O extrait :** Absorbance de l'extrait.

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI50). Une faible valeur de CI50 correspondant à une grande efficacité de l'extrait.

### **2.5.2. Capacité antioxydant totale :**

Ce test est basé sur la réduction du molybdène ( $\text{Mo}^{6+}$ ) en molybdène ( $\text{Mo}^{5+}$ ) par l'extrait de plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/ $\text{Mo}^{5+}$  de couleur verte (Prieto et al., 1999).

Une prise de 0.1 ml d'extrait convenablement dilué est combinée dans un tube avec 1ml de solution composée d'acide sulfurique (0.6 N), de phosphate de sodium ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 28 mM) et de molybdate d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 4 mM). Les tubes sont incubés à 95°C pendant 90 mn. Après un repos de 6 minutes à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait. Comme pour les polyphénols totaux, l'activité antioxydante totale est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG.g-1 MS).

### **2.5.3. Pouvoir réducteur du fer :**

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydo-réduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer. Le ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  fournit des ions Ferriques ( $\text{Fe}^{3+}$ ) qui seront réduits en Ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par les antioxydants présents dans l'extrait végétal. Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par (Oyaizu, 1986). Cette méthode consiste à mélanger 1 ml de l'extrait à différentes concentrations avec 2,5 ml de tampon phosphate 0.2 M à pH 6.6 et 2.5 ml d'une solution de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1% (m/v). Le mélange obtenu est incubé pendant 20 minutes à 50°C, puis 2.5 ml d'acide trichloracétique ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ) à 10% sont ajoutés pour arrêter la réaction. Le mélange est centrifugé à 650 g pendant 10 mn à température ambiante et 2.5 ml du surnageant sont additionnés de 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ) à 0.1%. La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm contre un blanc où l'extrait est remplacé par le tampon d'extraction. Les résultats permettent de calculer la concentration efficace ( $\text{EC}_{50}$ ), concentration de l'extrait correspondant à une absorbance égale à 0.5, obtenue par l'interprétation de la courbe de régression linéaire ou logarithmique. L'activité de l'extrait est enfin comparée à celle des antioxydants de synthèse (témoins positifs), butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA).

# **Résultats et discussion**

### 1. Détermination et calcul des rendements du RO:

Selon la norme (AFNOR., 1986), 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 :

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

**RHE** : Rendement en huile essentielle en %

**M'** : Masse d'huile essentielle en gramme.

**M** : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme.

Pour l'extrait On a déterminé le rendement (Rdt) des plantes en extrait sec en calculant le rapport suivant:

$$\text{Rdt \%} = [\text{P1}-\text{P2}/\text{P3}] \times 100$$

**P1**: Poids du ballon après évaporation.

**P2**: Poids du ballon vide.

**P3**: Poids de la matière végétale sèche de départ.

Les différents rendements obtenus sont enregistrés dans **le tableau 04**.

**Tableau 04** : représente les déférentes rendements des extraits et huile essentielle de romarin

substances bioactives	Rendements des extraits (%)
Extrait aqueux	15.5%
Extrait méthanoliques	17,30%
Huile essentielle	1%

Les rendements de *Rosmarinus officinalis* obtenue dans la région de SAIDA sont conformes aux normes d'AFNOR pour les huiles essentielles de romarin qui est de l'ordre de 1%. Cette valeur n'est pas en accord avec celle obtenue par **Alnamer (2014)** (0,256%), **Makhloufi (2018)** (1,8%), **Soliman et al. (1994)** (0,14% -0,40%) et **Abdoune (2013)** (1,60%).

Le rendement des extraits méthanoliques et aqueux de *Rosmarinus officinalis* sont de l'ordre de 17.30% et 15.5% respectivement. L'extrait méthanolique final de *Rosmarinus officinalis* est une poudre vert foncé avec pourcentage du poids sec de 21,8 %, Mais, l'extrait aqueux final brut est obtenu sous forme de poudre jaune grasseuse avec un pourcentage du poids sec de 15,7 %. D'un autre côté, les résultats obtenus des rendements des extraits alcooliques bruts et aqueux de *R. Officinalis* sont inférieurs à ceux obtenus par (**Kamal et al.,2015**) (respectivement de l'ordre de 13,6%, 2,25% ).

## 2. Criblage phytochimique :

Les analyses phytochimiques qualitatives réalisées sur les deux extraits obtenus à partir des feuilles de *Rosmarinus officinalis* ont montré les résultats regroupés dans le **tableau 05**.

**Tableau 05:** représente les résultats du criblage phytochimique des extraits du *Rosmarinus Officinalis*

Groupe chimique		Extrait aqueux	Extrait méthanolique
<b>Tanins</b>	Cathéchiques	+++	+++
	Galliques	-	-
<b>Anthocyane</b>		+++	+
<b>Alcaloïdes</b>	Dragendorff	+++	+++
	Mayer	++	-
	Wagner	++	+++
<b>Coumarine</b>		-	+
<b>Stérols et triterpènes</b>		+++	+++
<b>Saponines</b>		++	-
<b>Quinone</b>		+++	+++

(+) : Présence faible (++) : Présence moyenne (+++) : Présence forte

(-) : Absence.

Les tests phytochimiques nous ont permis de mettre en évidence différents métabolites secondaires présents dans les feuilles de *Rosmarinus officinalis* par des réactions de coloration, de précipitation et des observations sous lumière ultra-violette. Les résultats obtenus ont révélé la présence des tanins (Cathéchiqes), des saponines, des alcaloïdes, des terpénoïdes, les anthocyanes, les quinones dans les deux extraits bruts. Tandis que les coumarines ne sont présentes que dans l'extrait brut aqueux et saponine ne sont présentes que dans l'extrait méthanolique.

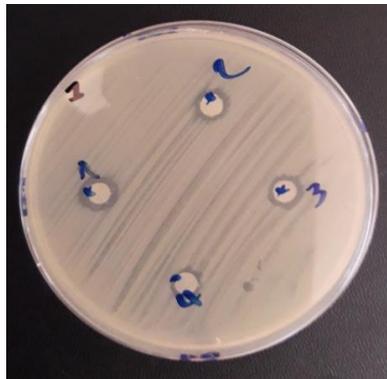
Selon **Pomagualli (2018)**, les métabolites secondaires présents dans l'extrait alcoolique de *Rosmarinus officinalis* ont révélé une présence modérée des terpènes, des tanins présentant une intense coloration verte, enfin une faible intensité de réaction aux alcaloïdes (test positif seulement par le réactif de Dragendorff et Wagner). Un résultat négatif est observé pour les composés suivants : quinine, coumarines catéchines, sucres réducteurs, anthocyanidines.

D'un autre côté, les résultats des tests de caractérisation phytochimique pour les deux extraits (méthanolique et aqueux) ont permis de mettre en évidence la présence, des tanins, des stérols et triterpènes, des saponosides, des anthraquinones libres, et des catéchols. Mais il a été observé l'absence des alcaloïdes, des composés réducteurs et des coumarines. D'un autre côté les mucilages ont été présents dans *Rosmarinus officinalis* (**Kamal et al .,2015**).

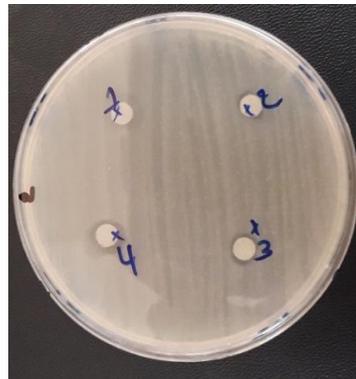
### **3. Evaluation de l'activité antimicrobienne de *Rosmarinus officinalis* :**

#### **3.1. Méthode de diffusion des disques :**

**3.1.1. Huile essentielle :** les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont montrés dans **les figures 19 et 20**, ainsi les dimensions des diamètres sont enregistrées dans **le tableau 06**.



*Staphylococcus aureus*



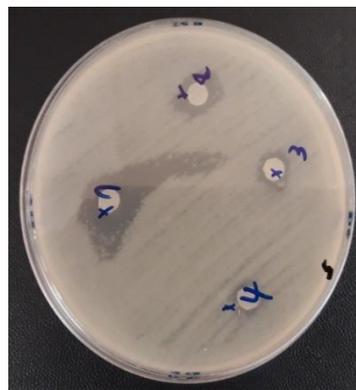
*Pseudomonas aeruginosa*



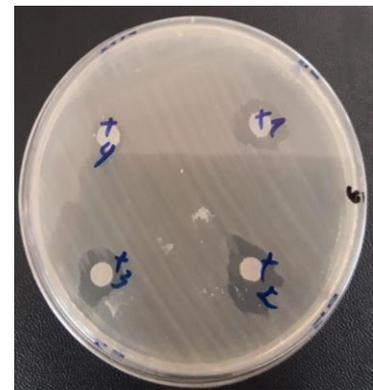
*Bacillus cereus*



*Escherichia coli*



*Salmonella Typhimorium*



*Listeria monocytogenes*

**Figure 19 :** Activité antibactérienne d'huile essentielle de romarin

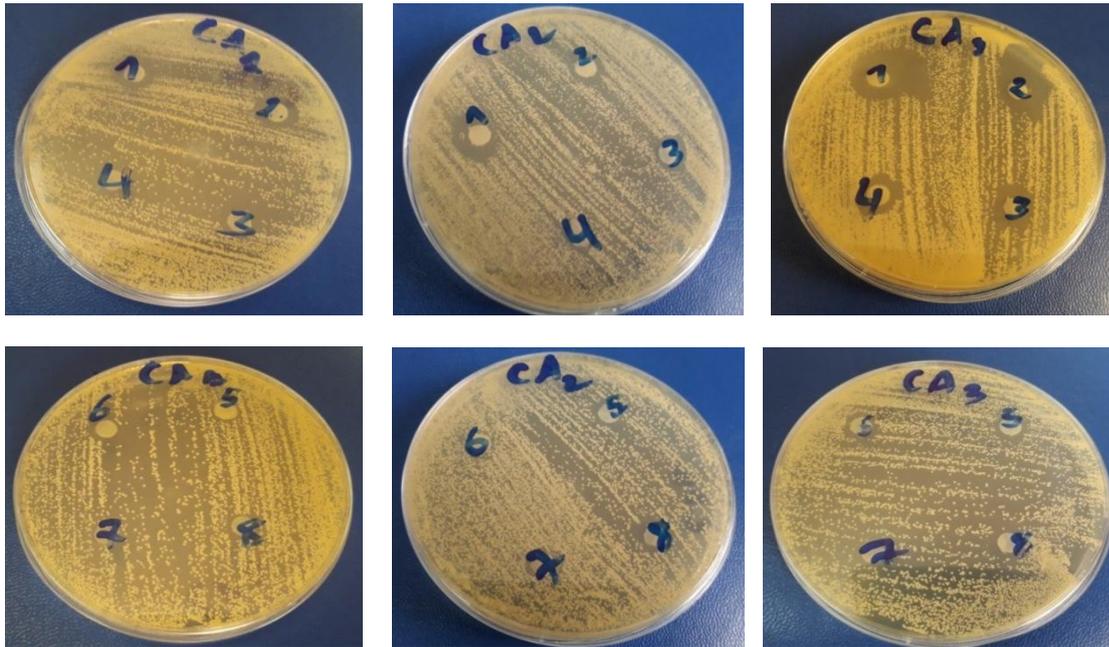


Figure 20 : Activité antifongique (*Candida albicans*) d'huile essentielle de romarin.

**Tableau 06** : Diamètres d'inhibition des différentes souches testées par l'HE par la méthode de diffusion des disques

Les Souches	Les dilutions d'HE mg/ml							
	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95
	Zone d'inhibition (mm)							
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	9,5	9	8,5	7,5	7	6	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	8	7,5	7	6,5	6	6	6
<i>Bacillus cereus</i>	25	20	13	12	11	10	10	9
<i>Escherichia coli</i>	12	10	9	8	8	7	7	6
<i>Salmonella Typhimorium</i>	15	13	12	11	9	7	6	6
<i>Listeria monocytogenes</i>	14	12	11	9	9	6,5	6	6
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	11	10	16	7	7	6	6	6
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	13	12	11	10	9	7	6	6
<i>Candida albicans</i> IP 444	16	14	12	9	8	7	7	6

Les résultats obtenus par la méthode de diffusion des disques ont montrés que l'huile essentielle du romarin possède une activité antibactérienne contre les micro-organismes sélectionnés dans le cadre du protocole entrepris. Seulement, il faudrait mentionner que la sensibilité des souches testées varie selon les dilutions. *Bacillus cereus* et *salmonella typhimorium* et *Listeria monocytogenes* ont été les bactéries les plus sensibles aux HE du *Rosmarinus officinalis* par des zone d'inhibition de l'ordre de 25mm, 15mm, 14mm, respectivement. En revanche, l'efficacité d'huile contre *Escherichia coli* (12mm) n'a pas été affectée par cette condition. Par ailleurs, le germe *Staphylococcus aureus* représente toujours une résistance aux cinquièmes dilutions. La souche *Pseudomonas aeruginosa* (sensible) représente une sensibilité dans la sixième dilution. Des études antérieures sur l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* révèlent une activité antimicrobienne et indiquent une similitude avec les résultats obtenus dans le présent travail [(Moreira et al., 2005) ; (Santoyo et al., 2005)]. La susceptibilité des bactéries est en effet indépendante à la catégorisation du gram (Dorman et al., 2000). La sensibilité des micro-organismes peut varier selon le germe testé car une huile essentielle peut être bactéricide vis-à-vis de certaines souches, bactériostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet (Hermal, 1993).

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle testée du romarin, présente des activités inhibitrices sur la croissance des levures testées (*Candida albicans*) à des concentrations allant de 15,62 mg/ml, et une zone inhibition maximale de 16mm par une concentration de 250 mg/ml.

D'autre part, la fraction volatile des huiles essentielles exerce une activité fongistatique ou fongicide sur la croissance des levures selon les différences de concentration. L'activité antifongique des huiles essentielles des plantes aromatiques a été donc confirmée par de nombreux auteurs [(Badillet *et al.*, 1975) ;(Bourrel *et al.*, 1995)].

### 3.1.2. Extraits méthanoliques et aqueux :

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus de l'extrait aqueux et méthanolique par la méthode de diffusion des disques vis-à-vis de différentes souches testées sont résumés dans les **tableaux 07 et 08**.

**Tableau 07** : Diamètres des zones d'inhibition obtenus par l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis*

Les souches	Les dilutions des extraits en mg/ml								
	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	3.90	Contrôle
	Zone d'inhibition (mm)								
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	10	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	9	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. thyphimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> IP 444	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-absence de la zone d'inhibition

**Tableau 08 :** Diamètres des zones d'inhibition obtenus par l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis*

Les souches	Les dilutions d'extrait aqueux de RO								
	750	375	187.5	93.75	46.875	23.43	11.718	5.859	Contrôle
	Croissance microbienne								
<i>E. coli</i>	7mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	10mm	8mm	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	9mm	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> IP 444	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- absence de zone d'inhibition.

Les zones d'inhibition obtenues par l'extrait méthanolique à une concentration de 500 mg/ml sur *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *Bacillus cereus* sont de l'ordre de 10, 9 , 6 mm, respectivement . Par contre, l'extrait aqueux a présenté une faible activité par rapport l'extrait mééthanolique à une concentration de 750mg/ml sur *E. coli* (7mm), *Bacillus cereus* (9mm) et *P. aeruginosa* (10mm) et aussi à la concentration de 375mg/ml avec un diamètre de 8mm (Tableau 08).

L'extrait méthanolique de *R. officinalis* a montré de bonnes activités par l'inhibition de la croissance d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* avec des diamètres de zone d'inhibition de l'ordre de de 19 et 20 mm, respectivement. Une très bonne activité a été remarquée vis-à-vis de la bactérie à Gram positif *S. aureus* avec un diamètre de zone d'inhibition de 24 mm. Le diamètre de zone d'inhibition de l'extrait méthanolique du romarin variait de 19 à 50 mm, tandis que celui de l'extrait aqueux variait de 12 à 30 mm à une concentration 200 à 1.56 mg/ml (Al namer, 2014).

D'autres études réalisées par **Farideh et al. (2014)**, sur l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis* à toutes les concentrations (5 à 40 mg/ml) a eu un effet inhibiteur sur *Listeria monocytogenes*. Cependant, à la concentration de 5 et 10 mg/ml, l'extrait n'a pas d'effet antimicrobien significatif sur *Bacillus cereus* et à la concentration de 5, 10, 15 et 20 mg/ml, il n'a pas d'effet antimicrobien significatif sur *Salmonella*.

En effet, il a été annoncé que l'extrait aqueux du romarin a une activité antibactérienne moyenne en inhibant la plupart des souches à une concentration de 40 µg/ml (**Abdel Massih et al., 2010**). Cette divergence des résultats peut être attribuée aux constituants de la plante prenant en considération le lieu et la période de récolte.

Parallèlement, l'extrait méthanolique de cette plante donne aussi des inhibitions sur les bactéries avec des concentrations de 1mg /ml pour *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus* et *L. monocytogenes* et de 0,5 mg/ml vis-à-vis d'*E. coli*. Par comparaison, on peut constater que l'extrait méthanolique est plus actif que celui de l'extrait aqueux. D'après ces résultats, on remarque que *R. officinalis* a des propriétés antimicrobiennes très appréciées et cela justifie son utilisation dans les traitements traditionnels comme un remède antimicrobien (**Makhloufi, 2004**).

Pour l'activité antifongique, aucune zone d'inhibition n'a été constatée autour des disques imprégnés de différents extraits. Afin de corroborer l'effet de l'extrait sur *C. albicans*, les mesures des halos d'inhibition de la solution mère à une concentration de 40 mg/ml ont montré une zone d'inhibition plus grande (21 mm, 10 mm). Les moyennes des diamètres des halos d'inhibition présentés lors de l'évaluation des différentes concentrations des extraits ont été comparées afin de déterminer le rapport activité-concentration. Avec cela, il était possible de démontrer une relation directement proportionnelle (**Yamid, 2016**).

### **3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide:**

#### **3.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'huile essentielles:**

Les résultats des différentes CMI obtenus par la méthode de micro dilution en bouillon sont consignés dans le **Tableau 09**.

**Tableau 09 :** Concentrations minimales inhibitrices

Souches bactériennes	Les dilutions d'HE mg/ml										CMI	
	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95	0,97	0,48		
	Croissance bactérienne											
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1,95
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	15,62
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0,97
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1,95
<i>Salmonella typhimorium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1,95
<i>listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1,95

-non croissance bacterienne

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les CMI varient de 0,97 mg/ml à 1,95 mg/ml pour toutes les souches bactériennes à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* qui a montré une CMI de l'ordre de 15,62 mg/ml. La souche la plus sensible était *Bacillus cereus* par une CMI de 0,97 mg/ml.

### 3.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des deux extraits :

**Tableau 10 :** Les CMI et CMB des extraits méthanolique de *Rosmarinus officinalis*.

Souches	CMI	CMB	CMB/CMI
<i>E. coli</i>	187.5	NI	ND
<i>P. aeruginosa</i>	375	375	1
<i>Bacillus cereus</i>	11.71	93.75	8.0059
<i>S. aureus</i>	2.92	5.85	2
<i>L. monocytogenes</i>	23.43	23.43	1
<i>S. typhimurium</i>	375	NI	ND
<i>Candida albicans ATCC 10231</i>	750	NI	ND
<i>Candida albicans ATCC 26790</i>	750	NI	ND
<i>Candida albicans IP 444</i>	750	NI	ND

ND: non déterminée

La plus faible concentration inhibitrice est de 2.92 mg/ml qu'a été estimée pour l'extrait méthanolique vis-à-vis *S. aureus*. Même concentration a été enregistrée pour les extraits l'extrait aqueux vis-à-vis de toutes les souches étudiées.

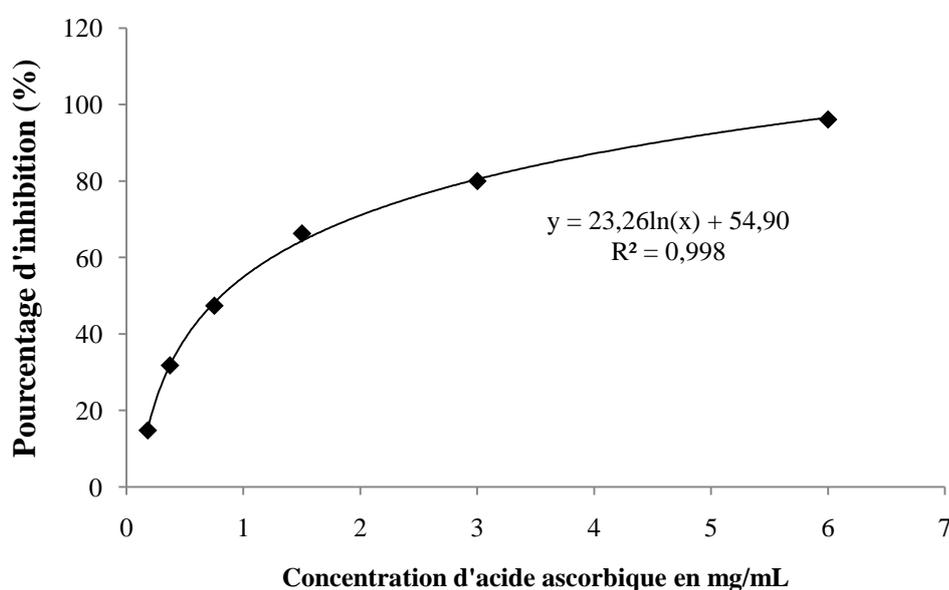
D'autres études réalisées ont montré que les CMI de l'extrait méthanolique du romarin sont comprises entre 1,56 et 6,25 mg/ml vis-à-vis *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, tandis que les CMI de l'extrait aqueux du romarin variaient de 3,13 à 6,25 mg/ml (Al namer., 2014).

En outre, les CMI obtenues de l'extrait méthanolique des souches *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E.coli* et *P. aeruginosa* étaient de l'ordre de 0.5, 0.833, 0.833, 0.5 et 0.666 mg/ml, respectivement. Cependant celles obtenues de l'extrait aqueux étaient de l'ordre de 2.33, 1.5, 1, 0.666 et 2.33 mg/ml, respectivement (Makhloufi., 2004).

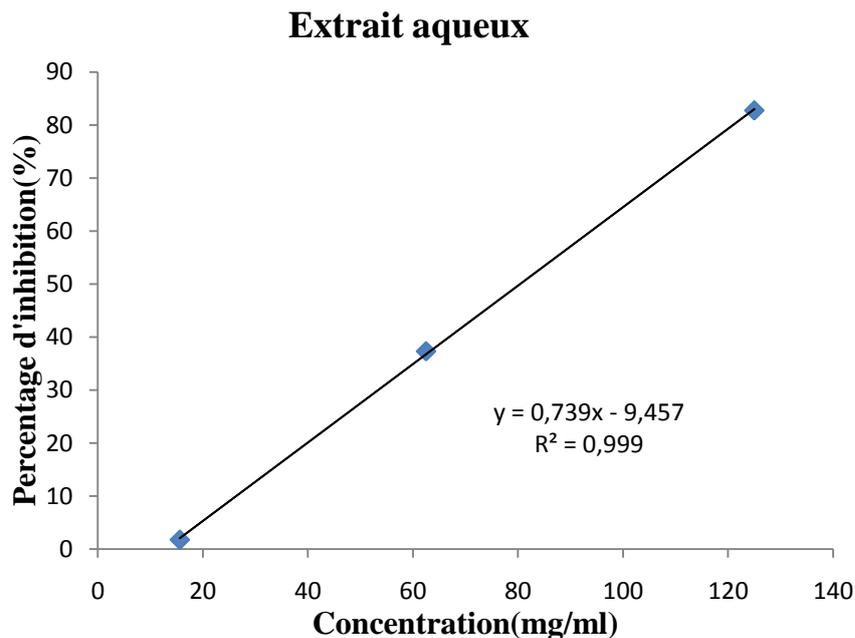
#### 4. Évaluation de l'activité antioxydante :

##### 4.1. Piègeage du radical DPPH :

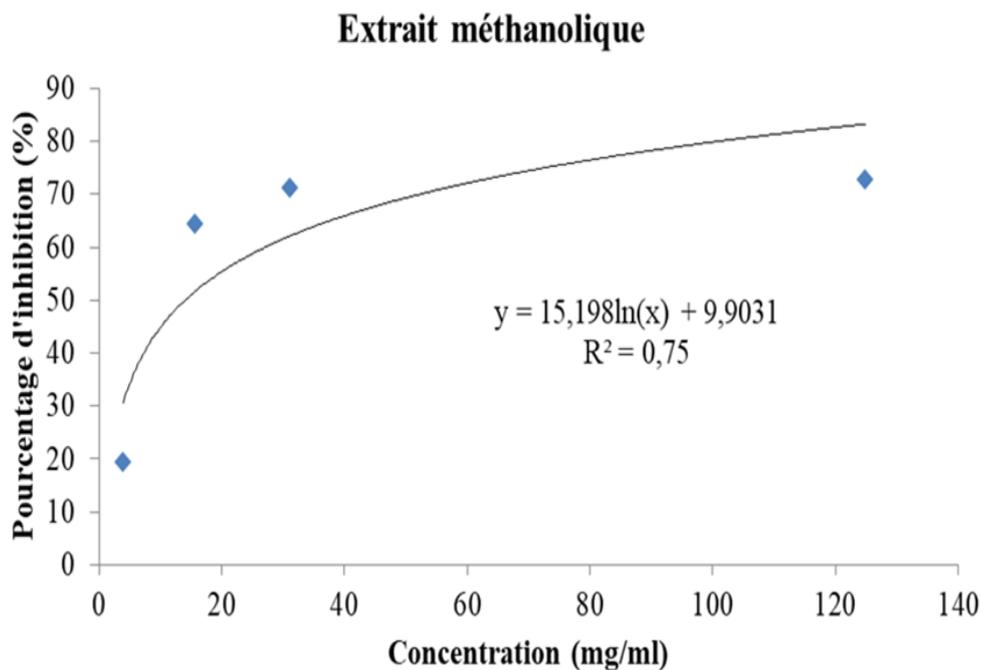
Les résultats de l'activité antioxydante évaluée par la méthode de piégeage du DPPH de l'acide ascorbique, extrait aqueux et extrait méthanolique sont présentés dans les figures 21, 22 et 23, respectivement.



**Figure 21** : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique



**Figure 22:** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH<sup>•</sup> en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis*



**Figure 23 :** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH<sup>•</sup> en fonction des différentes concentrations de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis*

Nous remarquons que le pourcentage d'inhibition s'augmente avec l'augmentation de la concentration de l'acide ascorbique et ainsi que les extraits.

Une valeur faible d'IC<sub>50</sub> indique que l'activité antioxydante est forte. Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique et aqueux de *Rosmarinus officinalis* présentent des activités antioxydantes par des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 13.989 mg/ml et 80.380 mg/ml, respectivement. L'activité antioxydante de l'acide ascorbique, utilisé comme antioxydant de référence, a enregistré une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 0.8298 mg/ml. Nous constatons aussi que l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* a présenté une activité plus élevée que celle de l'extrait aqueux.

Dans cette présente étude, nous notons qu'il existe une corrélation entre la concentration des polyphénols et l'activité antioxydante, ce qui confirme que les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. Ces résultats sont conformes à ceux de plusieurs auteurs qui ont rapporté une telle corrélation positive entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante [(Hua Li *et al.*, 2008) ; (Angelov *et al.*, 2008) ; (Makris *et al.*, 2007) ; (Berrin Bozan *et al.*, 2008)].

D'un autre côté, les résultats du pouvoir antioxydant des extraits des plantes de la même famille de la *Rosmarinus officinalis*, ont montré que le pourcentage d'inhibition des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* est supérieur à 90% à des concentrations de l'ordre de 4,624 et 5,0 mg/ml et avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 2.0740 et 1.8758 mg/ml, respectivement pour les extraits aqueux et les extraits méthanoliques (Nabila *et al.*, 2012).

#### **4.2. Réduction du fer : FRAP (ferric reducing antioxydant power) :**

Le teste du pouvoir réducteur met en évidence la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron, permettant ainsi de bien apprécier l'activité antioxydante de l'échantillon testé. Cette activité est basée sur la réduction du Fer (III) présent dans le complexe K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> en Fer (II). Les résultats sont illustrés dans les **figures 24, 25 et 26** pour le BHA (antioxydant témoin), extrait aqueux et extrait méthanolique.

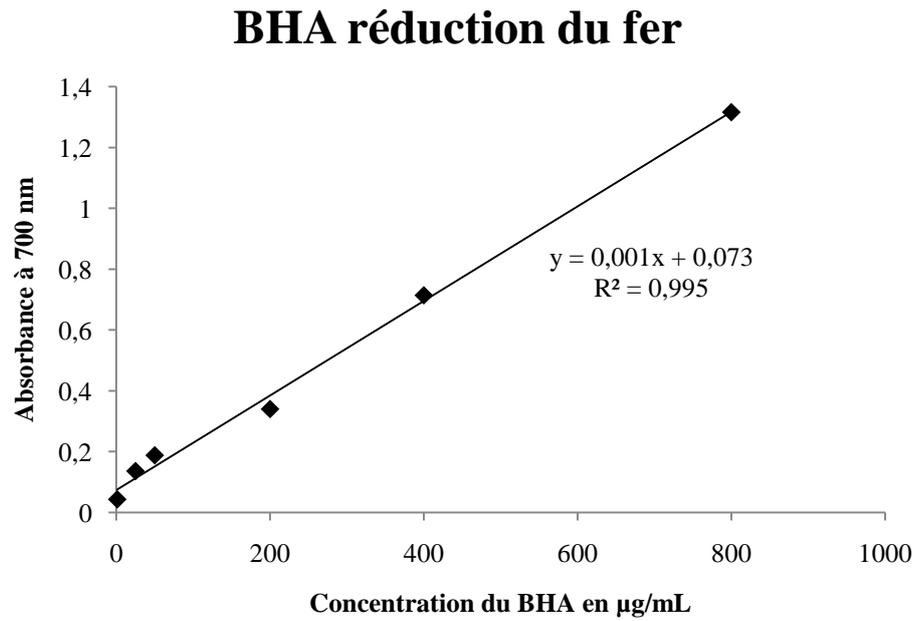


Figure 24 : Activité antioxydante de BHA par le test de la réduction du fer

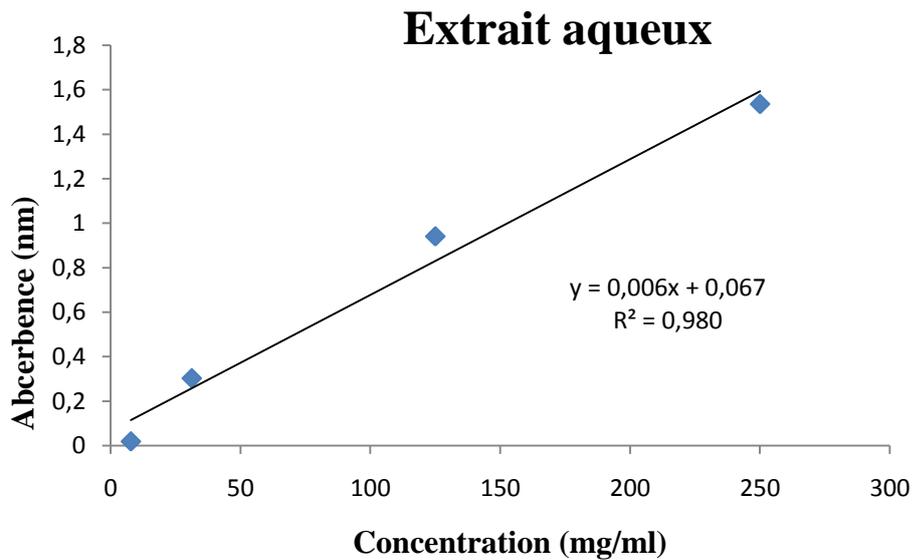
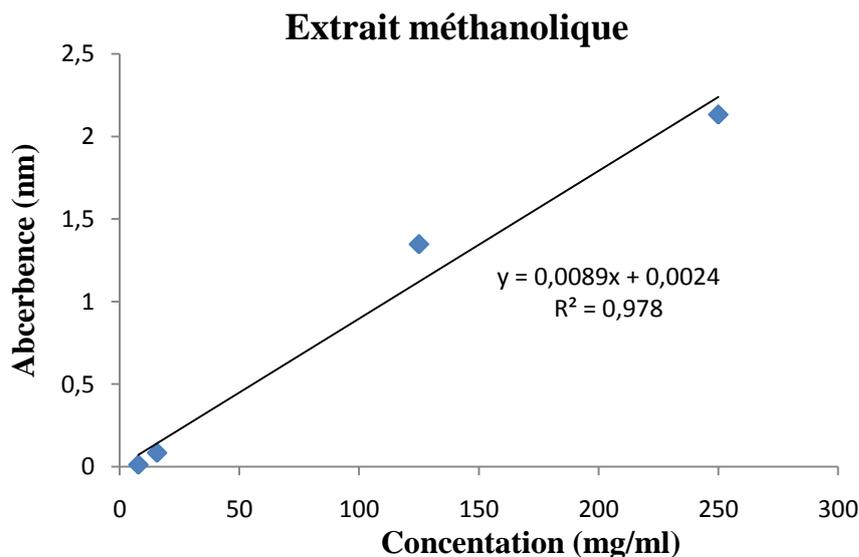


Figure 25 : Activité antioxydante de l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis* par le test de la réduction du fer



**Figure 26 :** Activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* par le test de la réduction du fer

Ces résultats présentent une meilleure activité antioxydante de l'extrait méthanolique que celle de l'extrait aqueux à la concentration de 50 et 75mg/ml, respectivement.

### 5. Étude de l'effet antibactérien:

Cette étude porte sur la caractérisation du mode d'action de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur une bactérie à Gram positif *Bacillus cereus* qui a été choisie comme modèle. Le choix de cette souche est basé sur les différents tests préliminaires de l'activité antimicrobienne (méthode de diffusion du disque et méthode de microdilution).

La croissance bactérienne de *Bacillus cereus* non exposée à l'huile essentielle est mesurée sur une période de 20 minutes. L'effet, généré par l'huile de romarin à la CMI sur *Bacillus cereus* est déterminé par mesure de la décroissance bactérienne au cours de la même période. Les résultats sont présentés dans la **figure 27**. Les courbes de la viabilité cellulaire obtenues à différentes concentrations en huile essentielle et la courbe de croissance de la population témoin sont présentées dans la **figure 28**.

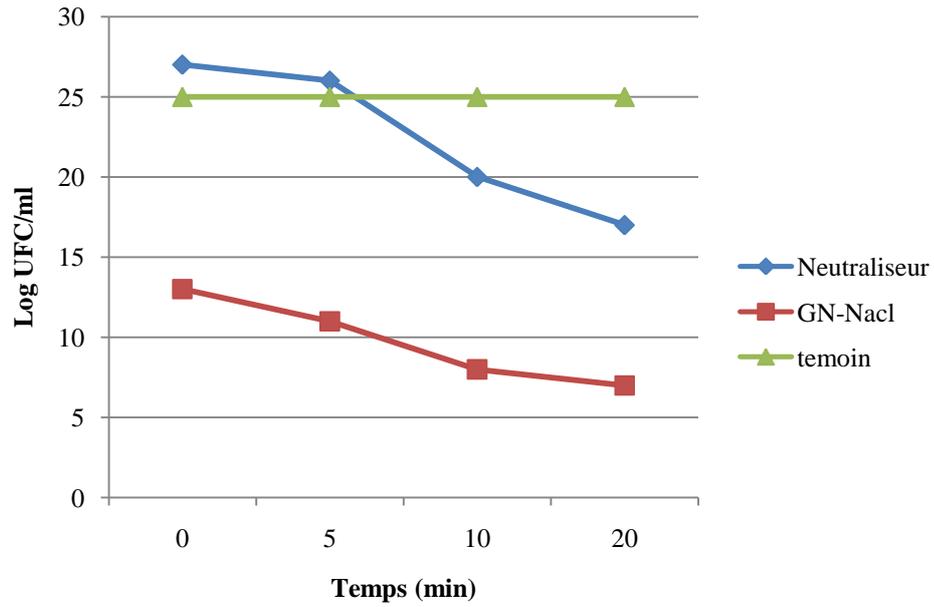


Figure 27 : Nombre de colonies de *Bacillus cereus* durant 20 minutes d'incubation traitée avec la CMI de l'huile essentielle de romarin et non traitée (témoin)

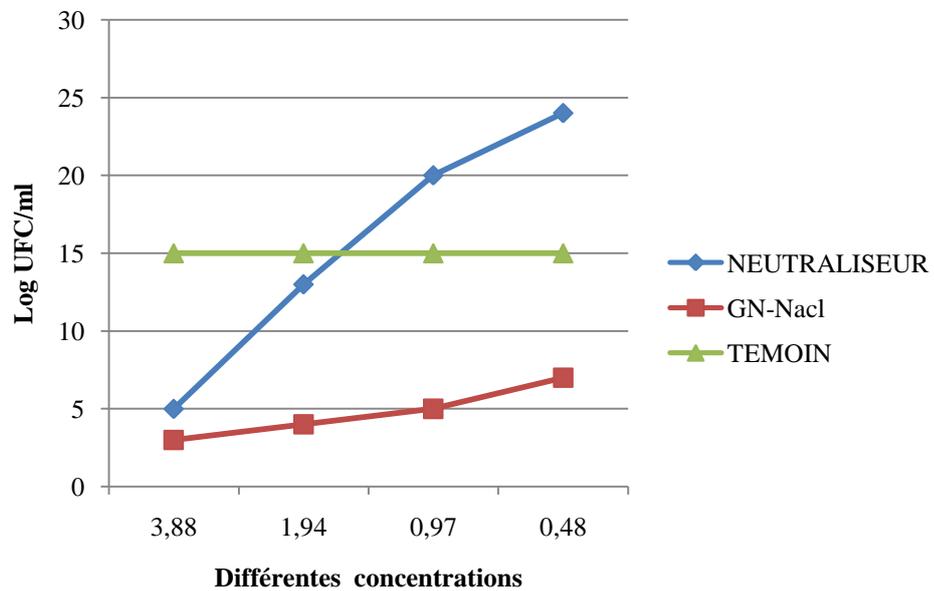


Figure 28 : Nombre de colonies de *Bacillus cereus* traitée avec différentes concentrations de l'huile essentielle de romarin et non traitée (témoin)

La population témoin présente une courbe de croissance de la phase stationnaire durant 24 heures.

L'action de l'huile essentielle de romarin utilisée à la CMI, est immédiate. Durant les dix premières minutes, la concentration bactérienne diminue et le seuil de détection est atteint au bout de 20 minutes. L'effet bactéricide de l'huile essentielle est dépendant du temps. A la CMI, l'huile de romarin réduit considérablement la viabilité cellulaire avec un effet létal elle induit une forte diminution de la croissance bactérienne et conduit à la mort cellulaire et obtenu au bout de une heure d'action de traitement.

L'action d'HE s'exerce sur un large spectre de bactéries, incluant les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. La structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif les rend toutefois plus sensibles à l'action des huiles essentielles (**Burt, 2004**). Avec des concentrations minimales bactéricides proches des concentrations minimales inhibitrices, l'huiles essentielle de *du romarin* inhibe la croissance de *Bacillus cereus* par une action de type bactéricide [(**Prescott et al., 2002**) ; (**Hammer et al.,1996**)].

L'activité antibactérienne d'huile essentielle ainsi que leur mode d'action est directement influencés par la nature et la proportion de leur constituant qui entre dans leur composition. Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée [(**Dormans et al, 2000**) ; (**Kalemba etal, 2003**)].

Les huiles essentielles, riches en alcools, possèdent généralement un fort pouvoir antibactérien. Les alcools sont d'ailleurs reconnus pour exercer un effet plutôt bactéricide que bactériostatique [(**Dormanet al., 2000**) ; (**Kalemba et al., 2003**)]. Certains agents antimicrobiens détruisent la membrane plasmique de manière irréversible conduisant ainsi à la mort cellulaire par un processus lytique [(**Denyer et al., 1991**) ; (**Hamouda et al., 2000**) ; (**Song et al., 2003**) ; (**Razzaghi et al., 2006**)].

Des études ont mentionné que le mécanisme d'action d'huile essentielle est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries. L'huile essentielle exerce son pouvoir antimicrobien par son interférence avec la bicouche lipidique de la bactérie grâce à sa propriété hydrophobe, ce qui entraîne: l'augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaire; l'acidification de l'intérieure de la bactérie, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure; la destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (**Caillet et al., 2007**).

Par ailleurs, la sélectivité d'huile essentielle envers certaines bactéries reste encore mal élucidée. Cette sélectivité est le résultat de la composition variée des fractions actives d'huile, qui présente souvent des actions synergiques (**Hammer et al., 1999**).

En général, le premier site d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes est la membrane plasmique. Ceci est directement lié à l'hydrophobicité des molécules qui entrent dans la composition des huiles essentielles. Cette propriété facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires et assure leur solubilisation dans la bicouche lipidique. Il s'ensuit une déstabilisation de la structure de la membrane plasmique et une modification de sa perméabilité aux ions, protons et autres constituants cellulaires [(**Sikkema et al., 1994**); (**Cox et al., 2000**) ; (**Ultee et al., 2002**) ; (**Carson et al., 2006**)]. En plus des altérations membranaires provoquées, ces molécules peuvent franchir la bicouche lipidique, pénétrer à l'intérieur des cellules et interagir avec des cibles intracytoplasmiques (**Cristani et al., 2007**). Compte tenu de la diversité moléculaire des huiles essentielles, il semble plus probable que leur activité antibactérienne résulte de l'association de plusieurs mécanismes, qui s'exercent sur différentes cibles cellulaires (**Burt., 2004**).

# **Conclusion**

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. L'objectif de notre travail consiste à faire une étude biologique des substances bioactives de *Rosmarinus officinalis* (huile essentielle, extrait aqueux et extrait méthanolique) récoltée dans la région de SAIDA en décembre 2018.

La valeur du rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* était de 1%. Le rendement des deux extraits aqueux et était de 15,50% et 17,30%, respectivement.

Au terme de cette étude et à travers les résultats obtenus il apparaît que l'activité biologique des extraits de *Rosmarinus officinalis* est caractérisée par un fort pouvoir antimicrobien vis-à-vis des souches bactériennes pathogènes.

Les résultats ont indiqué que l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* possède une bonne activité antimicrobienne contre les souches étudiées. Les niveaux de croissance obtenus par l'application des extraits montrent clairement que le nombre de germes diminue avec l'augmentation de la concentration d'extrait appliquée. L'aptitude des extraits de *R. officinalis* à inhiber la croissance bactérienne est tout à fait différente ; cela est marqué par l'activité puissante de l'extrait méthanolique par rapport à l'extrait aqueux.

L'activité antibactérienne a été également exprimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits de *Rosmarinus officinalis*.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du romarin a montré une efficacité contre les bactéries testées notamment : *Bacillus cereus*, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* par la méthode de diffusion en milieu solide. Ainsi, elle a une activité antifongique inhibant la croissance des levures notamment *Candida albicans*.

En raison de leur activité antimicrobienne, l'huile essentielle et les extraits du romarin possèdent un très bon potentiel antimicrobien et peuvent être utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour la production de nouveaux agents synthétiques dans le traitement des maladies infectieuses causées par les bactéries étudiées ou peut être suggérée comme agents naturels de conservation des aliments.

Le but de l'étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a été de caractériser le mode d'action de l'huile essentielle à activité antibactérienne et de rechercher les molécules impliquées dans cette activité. Tout d'abord, dans la phase de caractérisation,

nous avons ciblé notre étude sur une bactérie pathogène reconnue pour son impact clinique, sanitaire et économique *Bacillus cereus*. Le choix de cette souche a également été guidé par le fait que l'huile essentielle de romarin est généralement, plus active contre ce type de bactérie. Les molécules responsables de cette activité appartiennent à la classe des alcools terpéniques.

Egalement, le contenu de *R officinalis* en métabolites secondaires peut être le raison de l'effet antioxydant élevé de romarin. Le potentiel antioxydant de l'extrait méthanolique est plus élevé que celui de l'extrait aqueux. La présence de composés phénoliques (flavonoïdes, coumarines), alcaloïdes et des terpénoïdes seraient probablement à l'origine de cette activité de l'espèce.

# **Références bibliographiques**

## LES REFERENCES

---

### LES REFERENCES:

- A. AP,(2015) Octubre, EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PRODUCTOS NATURALES FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE LA FLORA ORAL. In Crescendo. Ciencias de la salud.
- ALCARAZ, M.J., JIMENEZ, M.J., 1988, Flavonoids as anti-inflammatory agents Fi toterapia5,9 , (1) , 25-38.
- Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P, (1999) ,Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J. Exp Biol*, 37(2), , 124-30.
- Amarti, F.( 2009).Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*14(1), 141-148.
- Araújo M., Silva R., Higino J., et al. (2008), Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. Sobre bactérias orais planctônicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 236-240.
- Ardila, Q. M., Vargas A, A., Pérez C, J. E., & Mejía G, L. F. (2009), Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia Caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* Y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. *Biosalud*, 47-57.
- Avila R, Navarro A, Vera O, Dávila R, Melgoza N, Ramón Meza R. (2011),Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*;15(43): 23-36.
- Avila-Sosa R., Navarro A., et al. (2013),Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*, 23-36.
- Badillet G ,(1975), Les dermatophytes. Atlas clinique et biologique, Éditions Varia, Paris.
- Başer, K. H. C., et Buchbauer, G. (2010), Introduction. In Başer, K. H. C., et Buchbauer, G. (eds.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications*, 1. Boca Raton, Floride,Etats-Unis: CRC Press.

## LES REFERENCES

---

- Baydar H, Sagida O, Ozkan G, Karadogan T,(2004),Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. *Food Control.*; 15: 169-172.
- Benjlali B, Tantaoui-Elaraki A, Ismaïli-Alaoui M, et al, (1986), Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie* 20 (2): 155-67.
- BEZANGER-BEAUOUESLN.E, P INKAS,M . , TORCK,M . , TROTIN,F , (1980),PANtES médicinalesd es régionst empérées,P ARIS: Ed Maloine,2 35p.
- Bicchi, C., A. Binello, and P. Rubinolo. (2000). Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis. *Phytochem. Anal.* 11:236–242.
- Bonjar GHS,(2004), Inhibition of Clotrimazole-resistant *Candida albicans* by plants used in Iranian folkloric. *Fitoterapia*, 75(1) , 74-76.
- Bourrel C, Vilarem G, Michel G,(1995),Étude des propriétés bactériostatiques et fongistatiques en milieu solide de 24 huiles essentielles préalablement analysées. *Rivista Italiana*, EPPOS 16: 3-12.
- BR|ESKORN, C.H., BECK, K., (1970), Hydrocarbons in the leaf wax of *Rosmarinus officinalis*, *Phytochem*, 9, 71, 1 633-1 640.
- Bruneton J, Lavoisier ,(1999).Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – Techniques et documentations, 3ème Edition, 1120 pages.
- BULT, H., HERMAN, A.G., RAMPART, M., (1985), Modification of endotoxine-induced haemodynamic and haematological changes in the rabbit by methylprednisolone, F (ab')<sub>2</sub> fragments and rosmarinic acid, *Br J Pharmac*, 84, 317-327.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Caillet, S., Lacroix, M., (2007). Les Huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leur applications potentielles en alimentaire. *Laboratoire de recherche en sciences appliquées à l'Alimentation (RESALA).INRS-Institut Armand-Frappier*, p.6-8.
- Carson CF, Hammer KA, Riley TV (2006) *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 50-62.
- Castaño, H. I., Ciro, G., Zapata, J. E., & Jimenez, S. L. (2010). Actividad bactericida del extracto etanolico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas

## LES REFERENCES

---

bacterias de interes alimentario. *Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 17, 149–154. Retrieved from <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewFile/6334/5835>.

-Cattaneo L, Cicconi R, Mignogna G, et al. Anti-Proliferative Effect of *Rosmarinus officinalis* L. Extract on Human Melanoma A375 Cells. Medina MA, ed. *PLoS ONE*.

-Cavé A. (1993), Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2éme Ed. Tec. Et Doc. Ed. Lavoisier, Paris ;, pp 274-285.

-Celiktas Y, Kocabas H. (2005), Actividades antimicrobianas de extractos de metanol y aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis*, dependiendo de la ubicación y las variaciones estacionales. *Química de Alimentos*. Volumen 100, Número 2 Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460500899X>.

-Chizzola, R., Michitsch, H. and Franz C. (2008). Anti-oxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: Comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **56**, 6897-6904.

-Chung Y-C., Chang C-T., Chao W-W., Lin C-F., et Chou S-T. (2002) Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 2454–2458.

-Clevenger, J. P. (1928). Apparatus for volatile oil determination, description of new type. *American Perfumer and Essential Oil Review*, 23: 467–503.

-Costa ABP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC. (1999), Atividade antifúngica dos Cowan, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Review*, 564–582.

-Costa ABP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC. (2009) Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* *Revista de Odontologia da UNESP*.; 38(2): 111-116).

-Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* **88**: 170-175.

-Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G, Saija A, Trombetta D (2007) ,Interaction of four monoterpenes contained in

## LES REFERENCES

---

- essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 6300-6308.
- Crsitina AM. (2001), PLANTAS MEDICINALES: Botanicva de interes medico. [Online].
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissioii MG. (2003), CIC-MS anaiysis of esseiitial oil from some greek aromatic plants and their fungjtoxicily on *Peniillium digilalum*. *J Ai;ric Food Chem.* 2(HKI;4a(6)r2li76-2581.
- De Billerbeck, G.(2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. Springer .Phytothérapie ,5: 249–253.
- De Sousa, Talita, M. P., & Monte Conceição, D. (2007), Atividade antibacteriana do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). *Ensaaios e Ciência*. Nursing;; 7-13.
- Debray M, Jacquemin H, Razafindrambo R. (1971), Travaux et documents de l'Orstom. (Paris, N°8).
- Del Campo J., Amiot M.J., Nguyen-The C. (2000). Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 10: 1359-1368.
- Dentone S., Morales S. (2017), Determinación in vitro de la actividad antimicótica del aceite de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Microsporum canis*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* [internet]. Mar[citado2018/02/24]. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S160991172017000100005&script=sci\\_arttext&tlng](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S160991172017000100005&script=sci_arttext&tlng)
- Denyer SP, Hugo WB (1991) *Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. Mechanisms of action of chemical biocides: their study and exploitation* Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom, p 171-187.
- Domingo D., & López M. (2003), Plantas con acción antimicrobiana. *EspQuimioterap*, 16(4), 385-393.
- Dorman HJ, Deans SG (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 308-316.
- Dulger B, Gonuz A , Aysel V. (2006), Inhibition of clotrimazoleresistant *Candida albicans* by some endemic Sideritis species from Turkey. *Fitoterapia.*, 77(5), , 404-5.
- Dung NT, Kim JM, Kang SC (2008) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food Chem Toxicol* 46:3632–9.

## LES REFERENCES

---

- Economou KD., Thomopoulos I'U. (1991), Antioxidant activity of some plant extracts of family labiatae.//1»; *Oil Chem Soc.*:fifi(2): 109-113.
- Elgayyar, M., F. A. Draughon, D. A. Golden, and J. R. Mount. (2001).,Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Prot.* 64:1019– 1024.
- ENGELBERGERW , HADD!NG, U. , ETSCHENBERGE, GRAF, 8 , LEYCK, WINKELMAN, J., PARNHAM, M.J., (1988), Rosmarinic acid : a new inhibitor complement C'-convertase with anti-inflammatory activity, *Int J Immunopharmac*, rcl, 729-73.7.
- Erenmemis ,oglu, A., Saraymen, R., Ustun, H., (1997). Effect of *Rosmarinus officinalis* leaves extract on plasma glucose levels in normoglycaemic and diabetic mice. *Pharmazie* 52, 645–646.
- Estrada O.S. (2010),Determinación de la actividad anitbacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymusvulgaris*). [*Doctorado*]. Riobamba Escuela Superior Politécnica del Chimborazo.
- Eugenia Caryophyllata, *Origanumvulgare*, *Rosmarinus officinalis* Y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. *Biosalud*, 47-57. extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas .
- Faixov Z, Faix S. (2008),Biological Effects of *Rosemary (Rosmarinas officinalis)* Essential oil. *Folia veterinaria*, 52, 3-4, , 135-139.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Salgueiro, L., Miguel M. G., Faleiro M.L. (2008). Portuguese Thymbra and *Thymus* Species Volatiles: Chemical Composition and Biological Activities. *Current Pharrmaceutical Design*, 14 (29), 3120-3140.
- Fonnegra, R. & Jiménez, S. L., (2006). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Segunda ed. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia.
- FOURNIER, P., (1948), *Livre des plantes médicinales et vénéneuses de France*, Tome 2, 334 337, PARIS : Ed Lechevalier.
- Friedrich H, (1976), Phenylpropanoid constituents of essential oils. *Lloydia* 39:1–7.
- Garro, O., & Okulik, N. (2006). Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides . *Facultad de Agroindustria UNNE*, 1(E-057), 1–4.
- Genena, A. K., Hense, H., Smania Junior, A., & Machado de Souza, S. (25 de Abril-Junio de 2008). Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and

## LES REFERENCES

---

- antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(2), 463-469.
- Ghanmi M, Satrani B, Aafi A et al ,(2010), Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guerçif (Maroc oriental). *Phytothérapie* 8 :295–301.
- Gianmario A, Silvio S, Rita P A, Teresa M, Roberto D, Aurelia T, (2007),*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, , 55(5), 1718.
- Giordani R. Kaloustian J,(2006),Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques *J Phytothérapie* (2006) Numéro 3,121-124.
- Gonçalves, M. J., Tavares, A. C., Cavaleiro, C., Cruz, T. M. Lopes, M. C., Canhoto, J. and Salgueiro, L. (2012). Composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oils of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Lainz from Portugal. *Industrial Crops and Products*, 39, 204-209.
- Gonzales Michel, A. (2013).*Guía técnica del cultivo de romero (Rosmarinus officinalis)*. La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Griffin SG, Wyllie SG, Markham JL ,(1999), The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragrance J* 14:322–32.
- Guy G, (1997). *Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse*. Édition L'Harmattan paris.
- Hafidi A, (1999), Contribution à l'étude des antioxydants naturels extraits à partir des plantes aromatiques et médicinales : Cas du romarin (*Rosmarinus Officinalis* L.) et du myrte (*Myrtus communis*). Doctorat, Faculté des Sciences (Kénitra)*Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications*, 83–84. Boca Raton, Floride,Etats-Unis: CRC Press.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV, (1996) ,Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Am. J. Infect. Control.* **24**: 186-189.
- Hamouda T, Baker JR ,(2000), Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. *J. Applied Microbiol.* **89**: 397-403.

## LES REFERENCES

---

- HARTMANN, V. E. , RACINE, P. , GARNEROJ, TOLLARDD 'AUDIFFRETY, . (1980), ÉES extraits de romarin (*Rosmarinus officinalis* Linnaeus) antioxygènes naturels utilisables dans la protection des huiles essentielles, *Parfums Cosmétiques Arômes*, 36, 33-40.
- HEGNAUER, (1966), *Chimiotaxonomie der Pflanzen*, BALE-STUTTGART: Ed Birkhäuser Verlag, Tome IV, 289-346.
- Hentz, S. M., & Santin, N. C. (Julio-diciembre de 2007). Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. *Evidência*, Joaçaba, 7(2), 93-100.
- HERRMANN, K., (1962), Über die antioxydative Wirkung der Labiatendrogen und der in.
- HUANG, M. T. , HO, C. T. , FERRAROT, . , WANG, Z. Y. , STAUBERK, GEORIGIADICS, LASKIN, J. D. , LONNEYA, . H. , (1992), *Proc Ann Assoc Cancer Res*, 33, 165.
- Ibáñez, E., A. Kuba'tova', F. J. Sen'orans, S. Cavero, G. Reglero, and S. B. Hawthorne. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *J. Agric. Food Chem.* 51:375– 382. ihnen enthaltenen Labiatensäure ('Labiatergerstoff'), *Z Lebensmittel Unters U Forschung* 1, 16, 224-228.
- Iserin P, Masson M et Restellini J P, (2007). *Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins*. Ed Larousse, pp14.
- JOYEUX, M., (1993), Mise au point in vitro, sur hépatocytes isolés, adapté à l'étude des propriétés antihépatotoxiques d'extraits végétaux : application à la recherche des principes antiradicalaires de *Rosmarinus officinalis* L., Thèse de Doctorat dg l'Université, Mention Pharmacognosie M, etz, 274p.
- Juhas, S; Bukovska, A; Cikos, S et al. (2009). Anti-inflammatory effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in Mice. *Acta. vet* 78: 121–127.
- Kalemba D, Kunicka A ,(2003), Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* **10**: 813-829.
- Kaloustian J, (2006). Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques *J Phytotherapie* Numéro 3, 121-124.
- Keszei A, Brubaker CL, Foley WJ, (2008), A molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. *Aust J Bot* 56:197–213.

## LES REFERENCES

---

- Kim, H., Lee, B. e Yun, K. W. (2013). Comparison of chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from three Pinus species. *Industrial Crops and Products*. 44: 323329.
- Koubissi H; (2002). Dictionnaire des herbes et des plantes médicinales. Édition Daar el kooub el Elmia Bierut, Liban, 82.
- LALLEMENT-GUILBERNT,. , BEZANGER-BEAUOUESNLE.(1970), Recherches ur les ftavonoides de quelgues Labiées médicinales, *PI Med Phyt*, 4, (21,92-107).
- Langenheim JH ,(1994), Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J Chem Ecol* 20:1223–80.
- Lo A.H., Liang Y.C., Lin-Shiau S.Y., Ho C.T., Lin J.K. (2002). Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down–regulating nuclear factor– $\kappa$ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 23: 983-991.
- López MT. (2008) El romero Planta aromática con efectos antioxidantes o f f a r m.; 27 (7): 60 – 63 .
- LOYOLA C. (2006) Actividad antibacteriana in vitro de algunos aceites esenciales de plantas. *BMC Complementary and Alternative Medicine.*;(36).
- Martinez, A. (2009). Aceites esenciales. In *Aceites Esenciales* (p. 35). Medellin: Universidad de Antioquia.
- Miguel G.M. (2010). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*, 15 (12), 9252-87.
- Miiiiurmi M. Wolleb U. Mueller V>, Pfeifer A. Aeschbacher HLI. (1992),Natural antioxidants as inhibitors of oxygen species induced mutagenicity. *Muial Res.*:2 69(2): 193-200.
- Moreno S., Scheyer T., Romano C.S., Vojnov A.A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary.
- Muñoz L. (2002), Plantas Medicinales Españolas. *Rosmarinus officinalis* L. (Laminiciae) (romero). *Stud. bot.*; 21:105-118.
- Musa, O.M., & J.C. Chalchat Chemical composition and antifugal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *International Journal of Food Science and*
- Musa, O.M., & J.C. Chalchat Chemical composition and antifugal activity of rosemary.

## LES REFERENCES

---

- Nolkemper S, Reichling J, Stintzing FC, Carle R. (2006), Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Plant Medicinale*;72(15):1378-1382.
- Nychas G.J.E. (1995), Natural antimicrobials from plants. In: *New methods of food preservation*. Gould G.W. (ed.). London, Blackie Academic and Professional: 58-89.
- Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A., Piette G.J.-P., Begin A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37: 155-162.
- Paris A. Strukelj B. Renko M, et al. (1993), Inhibitory effect of camosolic acid on HIV-1 protease in cell-free assays. *J. Pharm. Med.*;56(8): 1426-1430.
- Paris R, Moysse H. (1969), *Précis de matière médicale*. Paris: Masson.
- PARNHAM, J., KESSELRING.(1985), Rosmarinic acid, *Drug Future*, 10(9), 756-757.
- Paulino de Sousa, T. M., & Monte Conceição, D. (2006-2007). Atividade antibacteriana do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). *Anhanguera Educacional Ltda*, 7-13.
- Pinheiro MA, Brito DBA, Almeida LFD, Cavalcanti YW, Padilha WWN. (2012) Efecto antimicrobiano de productos de teñido naturales en las bacterias causantes de la caries. *Rev Bras Promoç Saúde* abr./jun; 25(2): 197-201.
- Pintore G. Usai M. Bradesi P, et al. (2002), Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flm- Fragr J.*:17:15-19.
- Pintore, G., M. Usai, P. Bradesi, C. Juliano, G. Boatto, F. Tomi, M. Chessa, R. Cerri, and J. Casanova. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour Fragr. J.* 17:15–19.
- Plouzek, C., Ciolino, H., Clarke, R., & Yeh, G. (1999). Inhibition of Pglycoprotein activity and reversal of multidrug resistance in vitro by rosemary extract. *European Journal of Cancer*, 35(10), 1541-1545.
- Ramos, A. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales e hidrosoles de *Rosmarinus officinalis* y *Taraxacum officinale* frente a microorganismos patógenos  
Retrieved from <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/11850%5Cnhttp://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/11850/1/RamosPencueAdrianaMarcela2014.pdf>.

## LES REFERENCES

---

- Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi MK, Kawachi M, Eslamifar A, Schmidt OJ, Schmidt A, Allameh A, Yoshinari T (2006) Ultrastructural evidences of growth inhibitory effects of a novel biocide, Akacids@plus, on an aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Toxicon*. 48: 1075-1082.
- Reddy, V.S., Sahay, R.K., Bhadada, S.K., Agrawal, J.K., Agrawal, N.K.,(2000). Newer oral antidiabetic agents. *Journal Indian Academy of Clinical.Medicine* 1, 245– 251.
- Reyes Jurado F PELMA. (2012),Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. Puebla: Universidad de las Américas, Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental. [Online].
- Rizk A.M. (1982), Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia*, , Vol. 52 (2); pp 35-42.
- Rodríguez E., Árias A., et al. (2012), Rendimiento y Capacidad Antioxidante de Extractos de *Rosmarinus Officinalis*, *Salvia Officinalis* y *PsidiumGuajava* Obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico. *Acad*, XXXXVI(140), 306-315.
- Salvador Cañigueral BV,(2003), editor. *Fitoterapia*. 4th ed. España: ELSEVIER MASSON;.
- Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibanez E, Senorans FJ, Reglero G ,(2005), Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J. Food Prot.* **68**: 790-795.
- Schmidt, E. (2010). Production of essential oils. In Başer, K. H. C., et Buchbauer, G. (eds.),
- Schnitzler, P., Schuhmacher, A., Astani, A., et Reichling, J. (2008). *Melissa officinalis* oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. *Phytomedicine*, 15 (9): 734–740.
- Seenayya G, Prasad MM. (2000), Effects of spices on growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt. *Food Research International*, 33, 793-798.
- Shelef L.A. (1983). Antimicrobial effects of species. *Journal of Food Safety*, 6: 29-44.
- Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**: 8022-8028.
- Silva. MSA, Silva MAR, Higinio JS. (2008), Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctónicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* Abr./Jun.; 18(2): 236-240.
- Song MJ, Kim NM ,(2003), Antimicrobial action of *p*-hydroxyphenyl acrylate. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* **52**: 107-113.

## LES REFERENCES

---

- Sqalli H, El Ouarti A, Farah A, Ennabili A, Haggoud A, Ibsouda S, Houari A, Iraqui Houssaini M. (2009), Antibacterial activity of *Thymus pallidus* Batt. and determination of the chemical composition of its essential oil. *Acta Bot Gallica*, 156(2), 303-310.
- T ulay Bakirel, Utku Bakirel, Oya Ustuner Keles, Sinem Gunes , Ulgen, Hasret Yardibi: (2008) , In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University, Avcılar 34320, Istanbul, Turkey. *Journal of Ethnopharmacology* 116 ,64-73.
- Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F, Carelle MS, Falcioni L, Cioni PL. (2005), The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*, 159(3), , 339-345.
- Tena, M. T., M. Valca´rcel, P. Hidalgo, and J. L. Ubera (1997). Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from rosemary: comparison with liquid solvent sonication. *Anal. Chem.* 69:521–526.
- Trease E., Evans W.C. (1987), Pharmacognosie. Billiare Tindall. London 13th Edition. P, 61-62. In Karumi Y., Onyeyili P.A. et Ogugbuaja V.O. Identification des principes actif de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume du pomme). *Journal of Medicine and Scientific.* Vol.4 (3); pp 179-182. Nigeria. ISSN 1682-4474.
- Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R (2002), The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1561-1568.
- Vivancos, V. (2014), Estudio de la Variabilidad química, propiedades antioxidantes y biocidas de poblaciones espontáneas de *Rosmarinus officinalis* L. en la región de Murcia. [Doctorado]. Murcia.
- Volção LM, Marques JL, Ribeiro GA. (2011), Evaluación de la actividad antibacterial del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en patógenos alimentarios. XX Congreso de iniciación científica, II Muestra Científica UFPEL.
- Wanderley Y., Almeida L., Nascimento W. (2011), Anti-adherent activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Candida albicans*: an SEM analysis. *OdontoCienc*, 26(2), 139-144.
- Weidenhamer JD, Macias FA, Fischer F ,(1993), Just how insoluble are monoterpenes? *J Chem Ecol* 19:1799–807.

## LES REFERENCES

---

-Zaouali Y, Bouzaine T, Boussaid M. (2010), Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem. Toxicol.*, 48(11), 3144-52.

-Zuzarte, M., Gonçalves, M.J., Canhoto, J., Salgueiro, L. (2011). Antidermatophytic activity of essential oils. *Formatex*. 1167-1178.

# **Annexes**

**Matériels du laboratoire utilisés :**

			
<b>Bain marie</b>		<b>Etuve</b>	
			
<b>Spectrocolorimétrie</b>	<b>Autoclave (popinel)</b>	<b>Centrifugeuse</b>	
			
<b>Plaque chauffante</b>	<b>Vortex</b>	<b>Bec bunsen</b>	<b>Balance</b>

**Annexe01:Matériel du laboratoire utilisé**

**Annexe02 :****Milieux de culture :****Bouillon Nutritif (BN, Fluka) :**Formule (en g/l)

Peptone..... 15,0

Extrait de levure .....3,0

Chlorure de sodium..... 6,0

Glucose .....1,0

Eau Distillée qsp1L

pH = 7,5 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre 25g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

**Gélose Nutritive :**Formule (en g/l)

Peptone..... 15,0

Extrait de levure..... 3,0

Chlorure de sodium..... 6,0

Glucose..... 1,0

Agar..... 15,0

Eau Distillée qsp 1L

pH = 7,5 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre 40g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

**Bouillon Sabouraud :**Formule (en g/l)

Peptone (Fluka)..... 10,0

Extrait de levure (Fluka)..... 3,0

Glucose (Sigma-Aldrich)..... 20,0

Eau Distillée qsp 1L

pH = 5,8 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre la poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer si c'est nécessaire pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

**Gélose Sabouraud :**Formule (en g/l)

Peptone (Fluka).....	10,0
Extrait de levure (Fluka).....	3,0
Glucose (Sigma-Aldrich).....	20,0
Agar.....	15,0

Eau Distillée qsp 1L

pH = 5,8 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121 °C pendant 15 min.

**Bouillon Mueller Hinton:**Formule (en g/l)

Infusion de viande de bœuf.....	2,0
Hydrolysate de caséine.....	17,5
Amidon.....	1,5

Eau Distillée qsp 1L

pH = 7,4 ( $\pm 0,2$ ) à 37°C

Suspendre 23 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, en suite stériliser par autoclavage à 12°C pendant 15 min.

**Neutraliseur :**Formule (en g/l)

Gélose nutritive.....	23
NaCl.....	5
Tween 80.....	5
Jaune d'œuf.....	75

**GN-NaCl :**Formule (en g/l)GN.....

23NaCl.....	50
Tween 80.....	5
d'œuf.....	75

Jaune

**Préparation de la solution tampon PBS:**

Pour préparer 1 litre de PBS 100mM, il suffit de mélanger une quantité suffisante pour 20mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et une quantité suffisante pour 80mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  additionnée par 150mM de NaCl. Compléter à 1000 mL avec de l'eau distillée.

**Résumé :** Ce travail s'intéresse à la valorisation d'une plante médicinale poussant à l'état spontané dans la région de Saida, il s'agit de *Rosmarinus officinalis*, par l'étude de l'activité antimicrobienne, pouvoir antioxydant et le mécanisme d'action antibactérien de ses extraits (aqueux et méthanolique) et de ses huiles essentielles. L'extraction a été effectuée par macération (extrait méthanolique), infusion (extrait aqueux) et hydrodistillation (huile essentielle). Après, des tests phytochimiques ont été réalisés pour déterminer les différentes familles des métabolites secondaires. L'activité antioxydante a été révélée par deux méthodes (piégeage du DPPH et réduction du fer). Ensuite, nous avons évalué l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion des disques et la méthode de microdilution sur microplaque, ainsi que le mécanisme d'action sur *Bacillus cereus*. L'extrait méthanolique a présenté le rendement le plus élevé (17.30%). Les résultats obtenus ont révélé la présence des tanins, des saponines, des alcaloïdes, des terpénoïdes, les anthocyanes et les quinones dans l'extrait aqueux et méthanolique. L'activité anti-oxydante a montré que l'extrait méthanolique est le plus puissant par rapport les autre par une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 13.989 mg/ml. L'activité antimicrobienne a été étudiée vis-à-vis de six souches bactériennes et trois souches fongiques. L'activité antibactérienne de l'huile essentielle était la meilleure comparativement à celle des deux extraits avec une zone d'inhibition maximale de 25 mm vis-à-vis *Bacillus cereus*. En outre, l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a exercé une activité antifongique vis-à-vis *Candida albicans* avec un diamètre d'inhibition de 16 mm. La raison pour laquelle nous avons sélectionné l'étude du mécanisme d'action de l'huile essentielle vis-à-vis choisi *Bacillus cereus* dont son effet sur la viabilité cellulaire et la tolérance au sel a montré une réduction du taux de la population bactérienne.

**Mots clés :** *Rosmarinus officinalis*, phytochimie, extrait méthanolique, antimicrobien, antioxydante, mécanisme d'action.

**Abstract:** This work focuses on the valuation of a medicinal plant growing spontaneously in the region of Saida, it is *Rosmarinus officinalis*, by the study of the antimicrobial activity, antioxidant power and the mechanism of antibacterial action of its extracts (aqueous and methanolic) and its essential oils. The extraction was carried out by maceration (methanolic extract), infusion (aqueous extract) and hydrodistillation (essential oil). After, phytochemical tests were carried out to determine the different families of the secondary metabolites. Antioxidant activity was revealed by two methods (DPPH trapping and iron reduction). Then we evaluated the antimicrobial activity by the disk diffusion method and the microdilution microplate method, as well as the mechanism of action on *Bacillus cereus*.

The methanolic extract exhibited the highest yield (17.30%). The results obtained revealed the presence of tannins, saponins, alkaloids, terpenoids, anthocyanins and quinones in the aqueous and methanolic extract. The antioxidant activity showed that the methanolic extract is the most powerful compared to the other by an IC<sub>50</sub> of the order of 13.989 mg/ml. The antimicrobial activity was studied against six bacterial strains and three fungal strains. The antibacterial activity of the essential oil was the best compared to that of the two extracts with a maximum inhibition zone of 25 mm against *Bacillus cereus*. In addition, the essential oil of *Rosmarinus officinalis* exerted antifungal activity against *Candida albicans* with a 16 mm inhibition diameter. The reason we selected the study of the mechanism of action of the essential oil against *Bacillus cereus* whose effect on cell viability and tolerance to salt showed a reduction in the bacterial population.

**Key words:** *Rosmarinus officinalis*, phytochemistry, methanolic extract, antimicrobial, antioxidant, mechanism of action.

**ملخص :** يركز هذا العمل على تقييم النبات الطبي الذي ينمو تلقائيًا في منطقة سعيدة ، وهو *Rosmarinus officinalis* ، من خلال دراسة النشاط المضاد للميكروبات وقوة مضادات الأكسدة وآلية العمل المضاد للبكتيريا لمستخلصاته (المائية والميثانولية) وكذا الزيوت الأساسية. تم الاستخلاص بواسطة التسريب (مستخلص الميثانول) ، النقع (المستخلص المائي) والتحلل المائي (الزيت العطري). بعد ذلك ، تم إجراء اختبارات كيميائية نباتية لتحديد العائلات المختلفة لمركبات الأيض الثانوية. تم الكشف عن نشاط مضادات الأكسدة بطريقتين (محاصرة DPPH وخفض الحديد). ثم قمنا بتقييم نشاط مضادات الميكروبات من خلال طريقة نشر القرص وطريقة التخفيفات، وكذلك آلية العمل على *Bacillus cereus* . أظهر مستخلص الميثانول أعلى عائد (17.30٪). كشفت النتائج التي تم الحصول عليها عن وجود العفص والسابونين والقلويات والترينويد والأنتوسيانين والكينون في المستخلص المائي والميثانولي. أظهر نشاط مضادات الأكسدة أن مستخلص الميثانول هو الأقوى مقارنة مع الآخر بواسطة IC<sub>50</sub> من 13.989 ملغ/مل. تمت دراسة نشاط مضادات الميكروبات ضد ستة سلالات بكتيرية وثلاث سلالات فطرية. كان النشاط المضاد للبكتيريا في الزيت العطري هو الأفضل مقارنةً بالمستخلصات الأخرى اللذين يحتويان على منطقة تثبيط قصوى تبلغ 25 مم. بالإضافة إلى ذلك ، مارس الزيت العطري لـ *Rosmarinus officinalis* نشاطاً مضاداً للخمائر *Candida albicans* ذات قطر تثبيط 16 ملم. السبب في اختيارنا لدراسة آلية عمل الزيت العطري ضد بكتيريا *Bacillus cereus* الذي أظهر تأثيره على بقاء الخلية والتسامح مع الملح انخفاضاً في عدد البكتيريا.

**الكلمات المفتاحية :** *Rosmarinus officinalis* ، الكيمياء النباتية ، مستخلص الميثانول ، مضادات الميكروبات ، مضادات الأكسدة ، آلية العمل.