

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

N°:



DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

**Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master II Académique**

Par : *Herizi Chemseddine*

Ahmed Azi Mebarka

Laichi khawla

Intitulé

***Rosmarinus Officinalis* : activités biologiques
et composés bioactifs.**

Soutenu devant le jury composé de :

Dr Areiche Mounira	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Président
Dr Bencheikh Dalila	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Rapporteur
Dr Guesmia Khawkha	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examineur

Année Universitaire: 2021/2022



DEDICACE

On tient en premier à remercier Dieu tout puissant de tous ses bienfaits.

On remercie nos chers parents qui sans eux on ne serait pas arrivés là où nous sommes aujourd'hui.

On remercie tous nos professeurs, depuis notre plus jeune âge, qui sans eux on n'aurait pas autant de connaissances et de savoir, les vivants mais aussi ceux qui ne sont plus de ce monde, que Dieu les accueille dans son vaste paradis.

On remercie nos proches et nos chers amis, chez qui on trouve toujours un soutien indéniable dans la réalisation de nos différents projets.



REMERCIEMENTS

*On tient à remercier en premier lieu notre encadrant,
Madame Bencheikh Dalila, qui nous a guidés tout au long de notre
mémoire, qui a su être disponible et répondait à toutes nos
interrogations, et qui était si gentille avec nous et très professionnelle..*

Merci.

*Nous tenons également à remercier Dr Areiche Mounira,
présidente des membres de jury pour avoir accepté d'analyser notre
travail.*

*Ainsi que Dr Guesmia Khawkha pour avoir pris le temps
d'examiner notre modeste mémoire.*



Résumé	iii
Liste des abréviations :	iv
Liste des figures :	v
Listes des tableaux :	vi
Introduction :	1
Chapitre I. Propriétés biologiques de <i>Rosmarinus officinalis</i>	5
I.1. Les plantes médicinales et la phytothérapie :	5
I.1.1. Généralités :	5
I.2. Définition des plantes médicinales :	5
I.3. Définition de la phytothérapie :	5
I.3.1. La phytothérapie traditionnelle:	6
I.3.2. La phytothérapie moderne:	6
I.4. Le stress oxydatif :	6
I.4.1. Origine du stress oxydatif :	7
I.5. Les antioxydants:	7
I.5.1. Définition :	7
I.5.2. Principaux antioxydants :	7
I.5.3. Les métabolites secondaires:	8
I.6. Description de la plante :	14
I.6.1. Historique :	14
I.6.2. Origine du nom :	14
I.6.3. Classification :	15
I.7. Principes actifs :	16
I.7.1. Définition :	16
I.8. Activités biologiques	17
1) Activité antioxydante :	17

2) Activité antimicrobienne :.....	17
Chapitre II. Matériels et méthodes	22
II.1. Matériel.....	22
II.1.1. Matériel Végétal:.....	22
II.1.2. Matériel Biologique :	22
II.2. Méthode:.....	23
II.2.1. Méthode d'extraction:.....	23
II.2.2. Dosage colorimétrique (spectrophotométrique) :.....	23
II.2.3. Activité antioxydante :	26
II.3. Etude statistique :.....	30
Chapitre III. Résultats et discussion.....	32
III.1. Rendement de l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i> :.....	32
III.2. Etude Phytochimique:.....	33
III.2.1. La caractérisation phytochimique :.....	33
III.3. Dosage des acides phénolique :	33
III.3.1. Dosage des polyphénols totaux :.....	33
III.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux :	34
III.3.3. Dosage des tanins totaux :	35
III.4. Activité biologique de l'extrait :	35
III.4.1. Activité anti-radicalaire par la méthode de réduction du radical libre DPPH : ...	35
III.4.2. Détermination d'IC50 :.....	36
III.5. L'activité antibactérienne:	37
III.5.1. Test antibactérien :.....	37
Conclusion.....	42
Références bibliographiques	43

ملخص

إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* هو نبات طبي وفير جدا في الجزائر ، و هو نبات طبي ينتمي إلى عائلة

Lamiaceae و يستخدم في الطب لتأثيراته العلاجية المختلفة.

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الأنشطة البيولوجية كالنشاط المضاد للأكسدة و المضادة للبكتيريا للمستخلص المائي

للنبات المستعمل بالإضافة إلى تقدير المركبات النشطة بيولوجيا.

سمحت الاختبارات المختلفة المستخدمة في تجربتنا باكتشاف العديد من الجزيئات النشطة ، حيث قدرت نتيجة المردود

للمستخلص المائي ب 14.47% . كما أظهر نتائج التقدير الكمي (polyphénols) و (flavonoïdes) باستعمال طريقة

التلوين أن هذا المستخلص غني بهذه المركبات (455.10µg EAG/mg d'extrait) و (7.33 µg EAQ d'extrait)

على التوالي. في حين بينت نشاطا مضادا للأكسدة باستخدام طريقة إزالة الجذور الحرة DPPH حيث ان IC50 قدر ب

0.128 (ملغ/مل) و هي قريبة من تلك التي تم الحصول عليها بواسطة BHT (ملغ/مل).

في حين تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات ضد ثلاث سلالات بكتيرية (*Staphylococcus aureus*)

Pseudomonas aeruginosa et Escherichia coli باستعمال طريقة الانتشار فوق الجيلوز. أظهرت النتائج أن

المستخلص له نشاط مضاد للبكتيريا على أساس تراكيز مختلفة على موجبة الغرام (*Staphylococcus aureus*) بينما لا

يوجد تأثير واضح في البكتيريا سالبة الغرام *Pseudomonas aeruginosa et Escherichia coli* مما يوضح اختلاف

حساسية السلالات البكتيرية التي تم اختبارها وفقا للتخفيف و الطبيعة البكتيرية.

نبتة إكليل الجبل ثمينة بالأنشطة البيولوجية و التطبيقات العلاجية للطب التقليدي مما يشجع البحث عن جزيئات طبيعية

جديدة تهدف إلى الاستثمار في مجالات مختلفة : الأدوية ، مستحضرات التجميل ، الأغذية ... الخ.

الكلمات المفتاحية : إكليل الجبل ، نشاط مضاد للميكروبات ، نشاط مضاد للأكسدة ، الجزيئات النشطة ، مستخلص

مائي .

Abstract

Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) is a very abundant species in Algeria. It is a medicinal plant belonging to the *lamiaceae* family, used for its various therapeutic effects. Our work focuses on the study of biological activities, bioactive compounds and the evaluation of antibacterial activities of the aqueous extracts of the plant. The different tests used in our experiment have allowed the detection of several bioactive molecules. The results obtained during this study show that rosemary has very important biological activities. We focused on the antioxidant and the antibacterial activities.

The different tests used in our experiment allowed the detection of several bioactive molecules. The resulting yield of the aqueous extract was estimated at 14.47%. Quantification of polyphenols and flavonoids by staining showed that this extract is rich in these compounds, 455.10 ($\mu\text{g EAG/mg extract}$) and 7.33 ($\mu\text{g EAQ / mg extract}$), respectively. In addition, the antioxidant activity was assessed using the DPPH free radical method, and the IC_{50} was estimated to be 0.128 (mg/ml) which is close to that obtained by *BHT* (mg/ml).

The sensitivity of the tested bacterial strains varies according to dilutions and bacterial nature. The antimicrobial activity of the three bacterial strains (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) was determined using the agar diffusion method. The results showed that the extract had activity against gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) while there was no significant effect on gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*), which explains the difference in susceptibility of the tested bacterial strains.

Rosmarinus officinalis has beneficial biological activities and therapeutic applications in traditional medicine, and subsequently encourages research into new natural molecules for investment in various fields such as pharmaceuticals, cosmetics and food, etc.

Key words: antibacterial activity, antioxidant activity, aqueous extract, bioactive compounds, , *Rosmarinus officinalis*.

Résumé

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) est une espèce très abondante en Algérie, c'est une plante médicinale appartenant à la famille des lamiacées, utilisée en médecine pour ses divers effets thérapeutiques.

Notre travail porte sur l'étude des activités biologiques, composés bioactifs et activité antioxydant ainsi que l'évaluation des activités antibactériennes de l'extrait aqueux de la dite plante.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude montre que le romarin possède des activités biologiques très importantes. On s'est basés sur l'activité antioxydant et antibactérienne.

Les différents tests utilisés dans notre expérimentation ont permis la détection de plusieurs molécules bioactives. Le résultat de rendement de l'extrait aqueux a été estimé à 14.47 %. La quantification des polyphénols et des flavonoïdes par coloration a montré que cet extrait est riche en ces composés, 455.10 ($\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$) et 7.33 ($\mu\text{g EAQ / mg d'extrait}$), respectivement. En plus de l'activité antioxydante utilisant la méthode des radicaux libres DPPH, l' IC_{50} a été estimée à 0.128 (mg/ml) qui est proche de celle obtenue par le BHT (mg/ml).

La sensibilité des souches bactériennes testées varie selon les dilutions et la nature bactérienne. l'activité antimicrobienne des trois souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion sur gélose. Les résultats ont montré que l'extrait avait une activité contre les bactéries gram-positives (*Staphylococcus aureus*) alors qu'il n'y avait pas d'effet évident sur les bactéries gram-négatives (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*), ce qui explique la différence de sensibilité des souches bactériennes testées.

Cette plante a des activités biologiques bénéfiques sur des applications thérapeutiques de la médecine traditionnelle, et ultérieurement encourage la recherche de nouvelles molécules naturelles visant à investir dans divers domaines tels que pharmaceutique, cosmétique et alimentaire...etc.

Mots clés : activité antibactérienne, activité antioxydante, composés bioactifs, extrait aqueux, *Rosmarinus officinalis*.

Liste des abréviations :

ADN : L'acide désoxyribonucléique.

ATCC : American Type Culture Collection

BTH : L'hydroxytoluène butylé.

CAT : Catalase.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CS : Colistine sulfate

CZL : Cefazoline

DPPH : Le 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle.

EAG : Equivalent acide gallique .

EAT : Equivalent acide tannique.

EQRO : extrait aqueux de *Rosmarinus Officinalis*.

ERO : Espèce radicalaire de l'oxygène.

GEN : Gentamycine

HE : Huile essentielle.

IC 50 : Concentration inhibitrice médiane.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

RO : *Rosmarinus Officinalis*.

ROS : Espèces réactives oxygénées

S : Streptomycine.

SOD : Superoxyde dismutase

UFC: Unité Formant Colonie.

Liste des figures :

Figure 1: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydant (Reuter, 2010).....	6
Figure 2 : Structure de base des composés phénoliques.	9
Figure 3 : Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).....	10
Figure 4 : Structure chimique des flavonoïdes (Bruneton, 1999).....	11
Figure 5 : Structures des différentes classes de flavonoïdes (Gamet-Payraastre et al., 1999)....	12
Figure 6 : Structure des tanins condensé (Catier et Roux, 2007).....	13
Figure 7 : Structure des tanins hydrolysables (Catier et Roux, 2007).....	13
Figure 8 : Aspects morphologiques.....	15
Figure 9 : photo réelle du romarin utilisé.....	15
Figure 10 : Différents types de résistance aux antibiotiques (Duval et Cossart, 2019).	18
Figure 11 : photo réelle est localisation GPS de Tessala Lemtai	22
Figure 12 : La préparation de l'extrait.	23
Figure 13 : Courbe standard de l'acide gallique pour la détermination des polyphénols totaux..	24
Figure 14 : Courbe standard de le quercétine pour la détermination des flavonoïdes totaux.	25
Figure 15 : Courbe standard de l'acide tannique pour la détermination des tanins totaux.....	26
Figure 16 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i>	27
Figure 17 : Les zones d'inhibition de la croissance des 03 bactéries utilisées, induites par l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i>	38
Figure 18 : Antibiogramme des souches : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> ,	39

Listes des tableaux :

Tableau 1 : Principales caractéristiques des souches bactériennes testées	28
Tableau 2 : Les antibiotiques utilisés pour l'activité antimicrobienne.....	28
Tableau 3 : Aspect, couleur, et rendement d'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i>	32
Tableau 4: Le screening phytochimique de la plante <i>Rosmarinus officinalis</i>	33
Tableau 5 : Teneur en polyphénols totaux de l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i>	33
Tableau 6 : Teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i>	34
Tableau 7 : Teneur en tanins totaux de l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i>	35
Tableau 8 : Valeurs d'IC50 de l'extrait aqueux et de BHT.	36
Tableau 9 : Les résultats des tests antibactériens.....	38
Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibition d'antibiogramme des trois souches testés (<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>).....	39

Introduction

Introduction :

Depuis le moyen âge, les plantes médicinales sont largement utilisées pour leurs propriétés particulièrement bénéfiques pour la santé humaine. Elles correspondent à des produits issus de la phytothérapie traditionnelle et moderne. Les plantes sont rarement utilisées toute entières, le plus souvent on utilise une ou plusieurs de ses parties qui peuvent avoir chacune une utilisation différente. En plus de leurs propriétés médicamenteuses, ces plantes peuvent avoir des usages alimentaires ou condimentaires (**Ducourthial, 2016**).

Selon l’OMS, 14 à 28% des plantes dans le monde sont répertoriées comme ayant un usage médicinal (**Padulosi et al., 2002**). Des enquêtes réalisées au début du *XXI^{ème}* siècle révèlent que 3 à 5 % des patients des pays occidentaux, 80 % des populations rurales des pays en développement et 85 % des populations au sud du Sahara utilisent des plantes médicinales comme principal traitement (**Najjaa et al., 2011**).

Le stress oxydant se définit par un déséquilibre entre la production d’espèces radicalaires de l’oxygène (ERO) et les capacités cellulaires antioxydantes. Les ERO ont longtemps été considérées comme des sous-produits toxiques du métabolisme normal de l’oxygène et impliquées dans de nombreuses pathologies. Les effets des radicaux libres en biologie sont maintenant bien documentés. Non seulement les organismes vivants se sont adaptés et coexistent en présence de radicaux ERO mais ils ont également développé des mécanismes pour les utiliser à leur avantage (**Migdal et Serres, 2011**).

Les bactéries sont responsables de plusieurs maladies. Leur résistance aux antibiotiques est de plus en plus prononcée. Pour arrêter ce processus de synthèse-résistance, il est nécessaire de chercher une autre approche afin de diminuer ou d’éliminer les affections sans l’utilisation des produits synthétiques, donc il est évident de trouver des solutions par l’utilisation des molécules bioactives qui sont à base de plantes (**Vanden-Berghe et Vlietinck, 1991**).

La situation est davantage plus préoccupante à cause de l’apparition des souches de micro-organismes antibiorésistants et l’émergence des infections non communes qui compromettent les traitements à l’aide des médicaments existants. Face à ces nombreux obstacles que présente l’utilisation des antibactériens disponibles, il est indispensable de chercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d’action (**Biyiti et al., 2004**).

Il existe un nombre incroyable de plantes médicinales dans le monde. L’Algérie est un pays très riche en ces plantes, qui poussent généralement à l’état spontané (**Baba Aïssa, 1991**).

Nous nous sommes intéressés dans notre étude à une espèce particulière de la famille des *lamiacés* (labiées), très connue de par le globe, étant largement utilisée comme épice mais aussi comme extrait à fort pouvoir antimicrobien entre autre et pharmacologique à savoir le Romarin « *Rosmarinus Officinalis* », en arabe ‘ IKLIL ELDJABEL’.

Le nom « romarin » viendrait du latin « *ros marinus* » (rosée de mer) (**Scheler, 1988**) ou bien du grec « *rhops myrinos* » (buisson aromatique) (**Genaust, 1996**) ou encore du latin « *rhus marinus* » (sumac de mer) (**Rameau et al., 2008**) . On l'appelle également « herbe-aux-couronnes » (**Max, 2008**). Le nom scientifique tend à être modifié en *Salvia Rosmarinus* depuis 2017, car l'espèce a été reclassée dans le genre *Salvia*. Cette plante est souvent utilisée efficacement par les tradipraticiens dans le traitement de diverses maladies infectieuses (**Beloued, 1998**).

Le but de notre travail est d'évaluer l'activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait aqueux du romarin' *Rosmarinus officinalis*' sur trois souches de bactéries : (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) et estimer la quantité des acides phénoliques qu'il contient.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE :

Chapitre I

Propriétés biologiques de

Rosmarinus Officinalis.

Chapitre I. Propriétés biologiques de *Rosmarinus officinalis*.

I.1. Les plantes médicinales et la phytothérapie :

I.1.1. Généralités :

Les plantes médicinales et aromatiques sont répandues et utilisées par l'homme depuis l'antiquité. De nos jours leur utilisation a pris une entité considérable dans les industries de parfum, produits cosmétiques et pharmaceutiques. Les plantes sont la source principale de substances actives où au moins 35 000 espèces sont utilisées dans le monde. L'Algérie avec sa diversité de climats et de sols, sa situation géographique et ses reliefs, présente une flore de 3510 espèces dont 450 sont répertoriées dans les hauts plateaux et le grand sud du pays (**Quezel et Medail, 1995**).

Le romarin fait l'objet de recherches dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire. Il possède des effets bioactifs tels des propriétés anti-inflammatoires et antispasmodiques (**Gianmario et al., 2007**) et d'excellentes propriétés anti-oxydante et antimicrobienne (**Jones, 1998, Thoresen et Hildebrand, 2003**). Il contient comme toutes les plantes aromatiques et médicinales des composés chimiques ayant des propriétés antibactériennes. L'utilisation de ces molécules à base de plantes peut présenter de nombreux avantages par rapport aux produits de synthèse actuels.

I.2. Définition des plantes médicinales :

Les plantes médicinales sont définies comme étant des drogues végétales au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Une drogue végétale est une plante ou une partie de plante, utilisée soit le plus souvent sous forme desséchée, soit à l'état frais (**Ducourthial, 2016**).

Des traces d'utilisation des plantes ont été retrouvées 5 000 ans avant Jésus Chris. En Chine, en Mésopotamie et en Égypte, tablettes cunéiformes et papyrus témoignent du recours aux plantes. Dans le monde occidental, les observations cliniques des effets des plantes par Hippocrate marquèrent l'intérêt pour ces remèdes (**Nicolas, 2003**).

I.3. Définition de la phytothérapie :

La phytothérapie désigne le traitement thérapeutique fondé sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels, dans le but de guérir, soulager ou prévenir une maladie (**Mills et Bone, 2000**).

On distingue deux entités différentes :

I.3.1. La phytothérapie traditionnelle:

Qui reprend des usages ancestraux, empiriques et se consacre aux effets de la plante dans sa globalité, et sur tout l'individu, en utilisant des préparations domestiques (consultations d'herboristes, achat de remèdes..), administrées essentiellement par voie orale (tisanes, infusions, poudres) (Mills et Bone, 2000). Cette médecine non conventionnelle est l'une des formes de traitement les plus anciennes qui continue à jouer un rôle important en Afrique, en Asie et en Amérique latine par l'usage de plantes médicinales (Singh et Ernst, 2014).

I.3.2. La phytothérapie moderne:

Ou phytothérapie rationnelle, ou encore phytothérapie médicale , qui utilise des méthodes modernes d'extraction des principes actifs contenus dans les plantes médicinales, et valide leurs propriétés bénéfiques pour la santé par une approche scientifique d'analyses biochimiques et pharmacologiques (Dey-Sarker et Nahar, 2018), ainsi que par des essais cliniques (Schulz *et al*, 2012).

I.4. Le stress oxydatif :

Le stress oxydatif appelé aussi stress oxydant, est un type d'agression des constituants de la cellule, apparaissant quand des espèces réactives oxygénées (ROS) et/ou des espèces réactives oxygénées et azotées oxydant pénètrent la cellule ou s'y forment. Ces molécules sont instables et très cytotoxiques car elles oxydent d'autres molécules en leur soustrayant un électron ce qui les rend instables (Gutierrez, 2019).

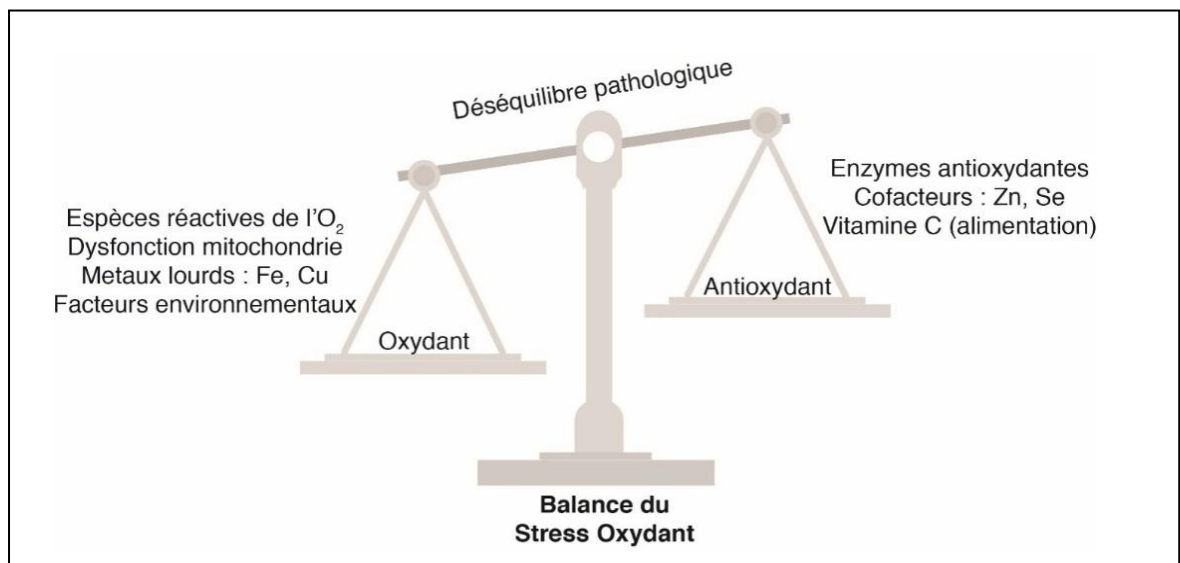


Figure 1: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydant (Reuter, 2010).

I.4.1. Origine du stress oxydatif :

Le stress oxydatif est induit par divers stress cellulaires biotiques et abiotiques (attaque de pathogènes, stress hydrique, thermique, excès de salinité...) (**Gutierrez, 2019**).

Il peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (Tabac, alcool, médicaments, rayons ultraviolets, pesticides, ozone, amiante, métaux toxiques) (**Magder, 2006**).

I.5. Les antioxydants:

I.5.1. Définition :

Les antioxydants sont des molécules ayant la capacité de neutraliser des radicaux libres qui sont responsables de nombreuses maladies. Ils sont des composés qui inhibent ou retardent le processus d'oxydation en bloquant l'initiation ou la propagation des chaînes de réactions oxydatives (**Behera et al., 2006**).

On désigne par antioxydant toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat (**Diallo, 2005**).

Certains antioxydants sont fabriqués par le corps comme les enzymes, d'autres proviennent de l'alimentation qui a une plus grande hétérogénéité comme les vitamines, les minéraux et les métabolites secondaires (les composés phénoliques). D'autres sont à la fois synthétisés en faible quantité par l'organisme et apportés par l'alimentation, c'est le cas de la cystéine et de la coenzyme. (**Pokorny et al., 2001**)

I.5.2. Principaux antioxydants :

A. Les antioxydants endogènes :

La production physiologique de l'extrait de *R.Officinalis* , est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (SOD, CAT, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone, ...) et de protéines (transferrine, ferritine, ...). Un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (**Pincemail, 2002**).

B. Les antioxydants exogènes :

Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes en médicaments. Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anti-hyperlipoprotéïnémiques, les bêta-bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés anti-oxydantes (**Vansant, 2004**).

C. Antioxydants naturels :

La vitamine C ou acide ascorbique, la vitamine E ou tocophérol, le sélénium, le β -carotène, les flavonoïdes, les tannins, les coumarines et les phénols sont des antioxydants naturels.

Il existe deux composés antioxydants de référence :

Le β -carotène:

1,1' – (3,7,12,16 – tétraméthyl – 1,3,5,7,9,11,13,15,17 – octadécanonaène – 1,18diyl) bis [2,6,6 – triméthylcyclohexène] (**Vansant, 2004**).

L'hydroxytoluène butylé ou BHT : L'hydroxytoluène butylé ou BHT est un additif alimentaire. Il s'agit du : 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol ou 2,6-Bis (1,1-diméthyléthyl)-4-méthylphénol. Le BHT est un puissant antioxydant synthétique et controversé. Il semble que trop peu d'études aient été faites à son sujet. (**Vansant, 2004**).

I.5.3. Les métabolites secondaires:

En plus des métabolites primaires classiques (glucides, protéides, lipides) produits par les végétaux, ces derniers accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisable par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Macheix et al., 2005**).

On distingue trois principales classes des métabolites secondaires : les Composés Phénoliques, les alcaloïdes et les terpénoïdes et stéroïdes. Mettons le point sur les premiers.

I.5.3.1. Les composés phénoliques:

Les composés phénoliques sont présents chez tous les végétaux supérieurs. Ils correspondent à une très large gamme de structures chimiques et sont caractérisés par une répartition qualitative et quantitative très inégale selon les espèces considérées, mais aussi les organes, les tissus et les stades physiologiques (**Macheix, 1996**).

Comme ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes, elles ont un rôle principal à la vie de la plante, et à la défense contre les agents

pathogènes principalement les moisissures et les bactéries, ainsi qu'à la protection contre les rayonnements UV (**Sarni et Veronique, 2006**).

Ils sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc.

Les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues (**Lugasi et al., 2003**).

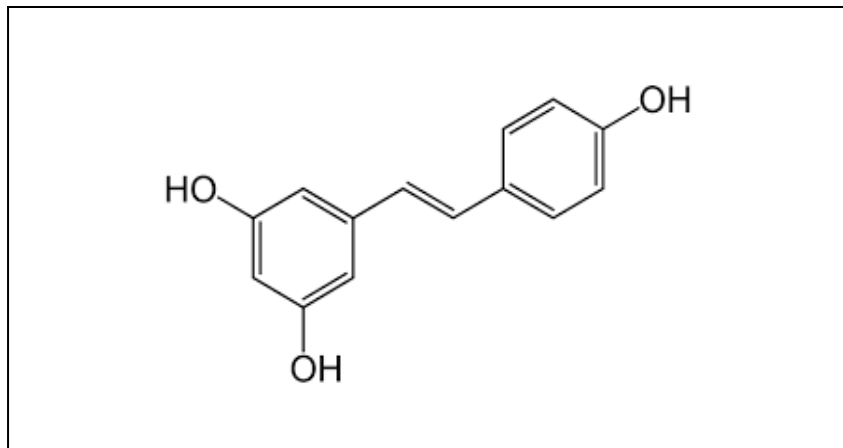


Figure 2 : Structure de base des composés phénoliques.

A. Classification:

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyle, en plus d'autres constituants (**Salunkhe et al., 1990**).

Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes :

- Les flavonoïdes
- Les tanins
- Les stilbènes
- Les lignanes et les coumestanes
- Autres phytoestrogènes
- Les saponines (triterpénoïdes)
- Les phytostérols et les phytostanols

Bien qu'ils ne soient pas des polyphénols, on ajoute ordinairement à cette liste les isothiocyanates, qui dérivent de l'hydrolyse des glucosinolates (**Dacosta, 2003**).

B. Biosynthèse :

Les polyphénols sont synthétisés via deux voies biosynthétiques :

- Celle de l'acide shikimique.
- Celle issue de l'acétate.

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine en biosynthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

C. Les acides phénoliques:

Les acides phénols, ou acides phénoliques, sont rares dans la nature. Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes : anti-inflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires, hépatoprotecteurs, immunostimulants (**Bruneton, 1999**).

Ils se divisent en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque (les acides hydroxycinnamiques) et les dérivés de l'acide cinnamique (les acides hydroxybenzoïques) (**Pandey et Rizv, 2009**).

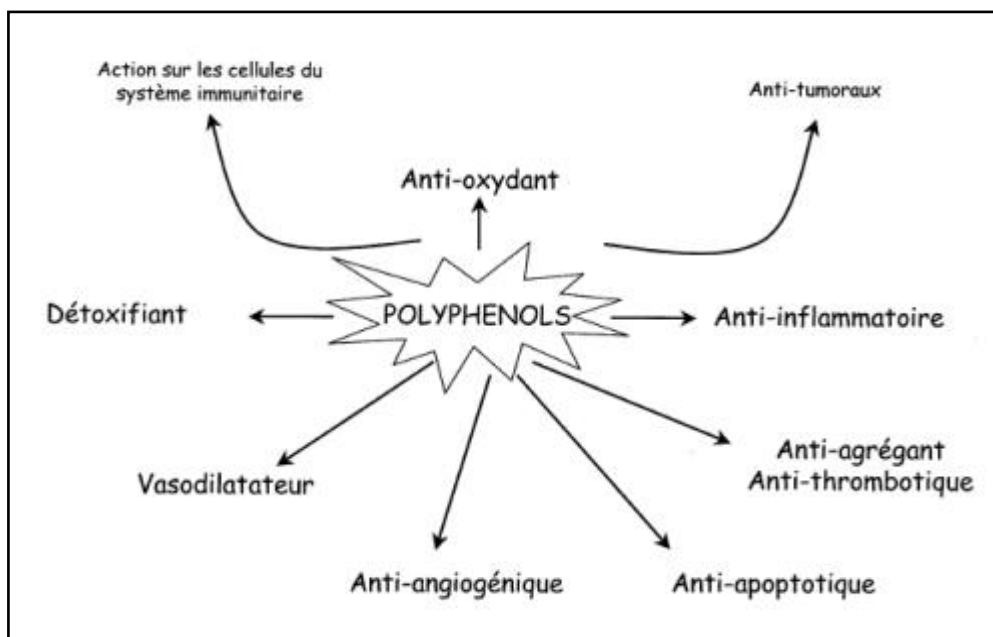


Figure 3 : Effets biologiques des polyphénols (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

D. Les flavonoïdes

L'expression flavonoïde a été introduite en 1952 par **Geissman et Hinreiner** pour désigner les pigments ayant un squelette (C6 – C3 – C6), provenant du mot latin flavus qui signifie la couleur jaune (**Bouakaz, 2006**). Les flavonoïdes sont responsables de la coloration variée des fleurs et des fruits. Ils sont présents en concentrations élevées dans l'épiderme des feuilles et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation (**Loto, 2011**).

- **Structure chimique des flavonoïdes :**

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, du degré d'hydroxylation, du degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence de double liaison C2-C3 du groupe 3-O, et la fonction 4-oxo (**Yao et al., 2004**).

Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base : deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones (figure 4) liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (**Bruneton, 1999**).

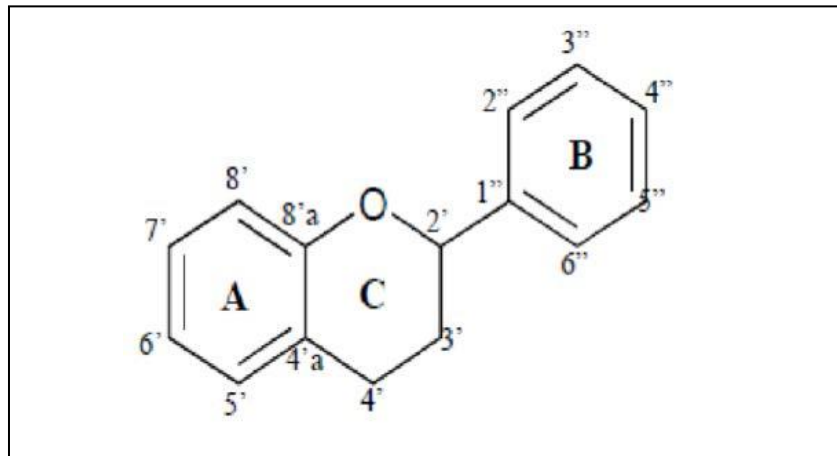


Figure 4 : Structure chimique des flavonoïdes (**Bruneton, 1999**).

- Classification des flavonoïdes :

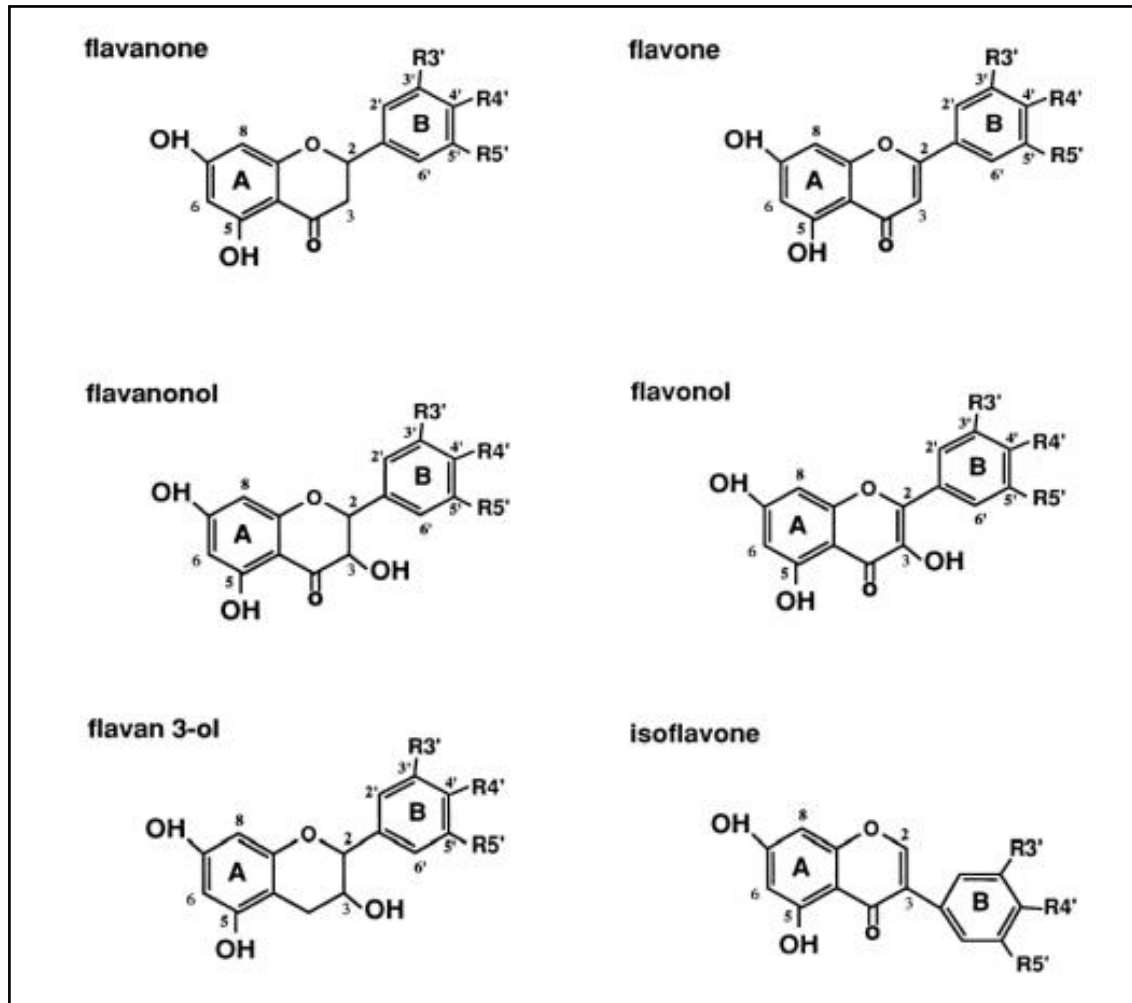


Figure 5 : Structures des différentes classes de flavonoïdes (Gamet-Payraastre *et al.*, 1999).

Propriétés biologiques :

- Activité anti-oxydante
- Propriétés pro-oxydantes
- Inhibition enzymatique
- Activité anti-tumorale
- Effets cardiovasculaires

E. Les Tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau. Ces substances ont la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant.

Très répandus dans le règne végétal, ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles quelquefois combinés aux protéines et aux alcaloïdes (**Alignan, 2006**).

Sur le plan structural, ils sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés (**Catier et Roux, 2007**).

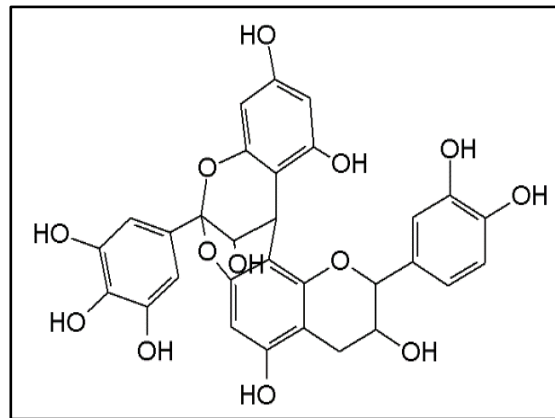


Figure 6 : Structure des tanins condensés (**Catier et Roux, 2007**).

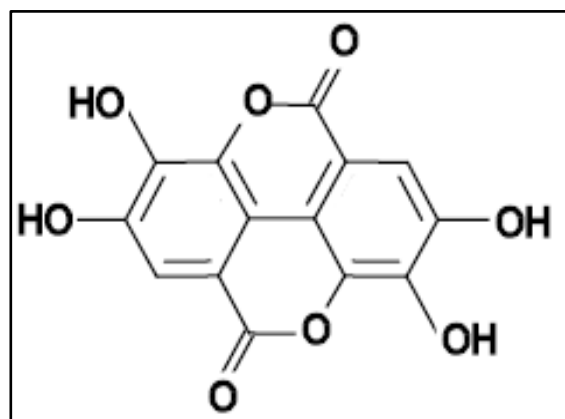


Figure 7 : Structure des tanins hydrolysables (**Catier et Roux, 2007**).

I.6. Description de la plante :

Rosmarinus officinalis, ou **romarin** : est une plante médicinale originaire du bassin méditerranéen qui pousse à l'état sauvage sur les terrains calcaires et s'accommode très bien des contrées arides et rocailleuses. On le reconnaît facilement tout au long de l'année. Les parties utilisées en phytothérapie sont les feuilles et les sommités fleuries, qui seront séchées, mais aussi l'huile essentielle (HE) (**Mouas *et al.*, 2016**).

I.6.1. Historique :

1. Le romarin, ou *Rosmarinus Officinalis* de son nom en latin, trouve son origine en Europe du Sud, où il est depuis longtemps utilisé comme aromate et plante médicinale (**Rameau, 2008**).

Dans l'Antiquité, les Grecs le dédiaient à la déesse Aphrodite et les Romains le faisaient brûler pour son effet bienfaisant. Plus tard, son effet énergisant fut mis au centre et le romarin devint un symbole porte-bonheur. Les mariées portaient une couronne de romarin, une branche était posée dans le berceau des baptisés et l'herbe aromatique accompagnait les morts dans leur dernier voyage (**Rameau, 2008**).

Au Moyen-âge, le romarin était utilisé comme plante médicinale pour obtenir gloire et célébrité. Aux temps anciens, cette plante aromatique avait des usages externes à la cuisine : on l'utilisait contre les rages de dents et les pieds froids, les problèmes gastriques, l'athérosclérose, les symptômes d'empoisonnement, la fatigue, les attaques cérébrales et pour la circulation sanguine. En outre, on se protégeait avec du romarin des mauvais esprits et de la peste aussi.

Il est aujourd'hui principalement cultivé aux Pays-Bas et dans les pays des Balkans (**Rameau 2008**).

I.6.2. Origine du nom :

Le Romarin est un arbrisseau qui doit son nom au latin *ros*, rosée et *marinus*, marin.

En effet, d'après la légende, le Romarin est une plante que l'on retrouvera seulement dans les régions où s'étend la rosée venant de la mer, au petit jour. Dans d'autres régions, on le surnomme "la Rose de mer" en latin *Rosa marina* qui a donné son nom au genre (**Leplat, 2017**).

I.6.3. Classification :



Figure 8 : Aspects morphologiques



Figure 9 : photo réelle du romarin utilisé.

du *Rosmarinus officinalis* (Quézel et Santa, 1963).

- **Classification botanique (Begum et al., 2013):**

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Tracheobionta*

Embranchement : *Spermatophyta*

Sous embranchement : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous classe : *Asteridae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Rosmarinus L.*

I.7. Principes actifs :

I.7.1. Définition :

Un principe actif est une molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animal. Il est contenu dans une drogue végétale ou une préparation à base de drogue végétale. Une drogue végétale en état ou sous forme de préparation est considérée comme un principe actif dans sa totalité, que ses composants ayant un effet thérapeutique soient connus ou non (**Chabrier, 2010**).

La plante contient plusieurs agents actifs responsables des différentes activités, parmi lesquels:

- Huiles essentielles : 1,8 cinéole, alpha-pinène, camphre de romarin (**Akroum, 2006**) bornéol (**Ibanez et al., 1999**), camphène (**Rao et al., 1998**).
- Flavonoïdes : lutéoline, apigénine, quercétine (**Akroum, 2008**) diosmine (**Serra et al., 2008**).
- Diterpènes : acide carnosolique, rosmadial (**Akroum, 2006**).
- Triterpènes et stéroïdes : acide oléanolique, acide ursolique (**Akroum, 2006**).
- Tanins (**Hui et al., 2010**).
- Lipides : n-alcanes , isolalcanes , alcènes (**Akroum , 2006**).
- Rosmaricine (**Hui et al., 2010**).
- Acide rosmarinique (**Hui et al., 2010**).

I.8. Activités biologiques

1) Activité antioxydante :

La famille des *Lamiaceae* a été au centre de la recherche sur les composés antioxydants en raison de sa forte teneur en polyphénols. De même, les feuilles de *Rosmarinus officinalis* sont couramment utilisées comme condiment pour aromatiser les aliments et comme source de composés antioxydants connue depuis plus de trente ans, utilisés dans la conservation des aliments notamment de la viande (**Andrade et al., 2018**).

2) Activité antimicrobienne :

Les extraits du *R. officinalis* et ses composants 1,8-cinéole, α -pinène et β -pinène possèdent une activité antibactérienne. Ces derniers ont été très efficaces contre 3 souches bactériennes. Ces souches sont : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Wang et al., 2012**).

a) Caractéristiques des souches bactériennes utilisées :

❖ *Staphylococcus aureus* :

Les staphylocoques sont des cocci à gram positif (**Nauciel, 2000**) qui ont tendance à se grouper en amas irrégulier à la façon de grappe de raisin (**Avril, 2000**).

Staphylocoque aureus est un germe aérobie-anaérobie facultatif (**Avril, 2000**).

❖ *Escherichia coli* :

Coccobacille est un bacille gram négatif radio-résistant de la famille des *Enterobacteriaceae*, il constitue tout au long de la vie de son hôte l'espèce bactérienne dominante de la flore aérobie facultative intestinale (**Tenaillon et al, 2010**).

❖ *Pseudomonas aeruginosa* :

Connu sous le nom de bacille pyocyanique, est une bactérie gram négative du genre *Pseudomonas*. Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement (**Mans et Canouet, 2008**).

b) Définition de l'antibiotique :

C'est une substance ayant la capacité de tuer les bactéries (effet bactéricide) ou d'inhiber leur multiplication (effet bactériostatique). L'action d'un antibiotique contre les micro-organismes est de nature sélective, certains organismes étant affectés et d'autres peu ou pas du tout, chaque antibiotique est ainsi caractérisé par un spectre antimicrobien spécifique.

L'action sélective d'un antibiotique se manifeste également contre les cellules microbiennes par rapport aux cellules hôtes. Les antibiotiques varient grandement dans leurs propriétés physiques et chimiques et dans leur toxicité pour les animaux. Les antibiotiques synthétiques sont habituellement des analogues ou des dérivés d'antibiotiques naturels (Laskin *et al.*, 2003).

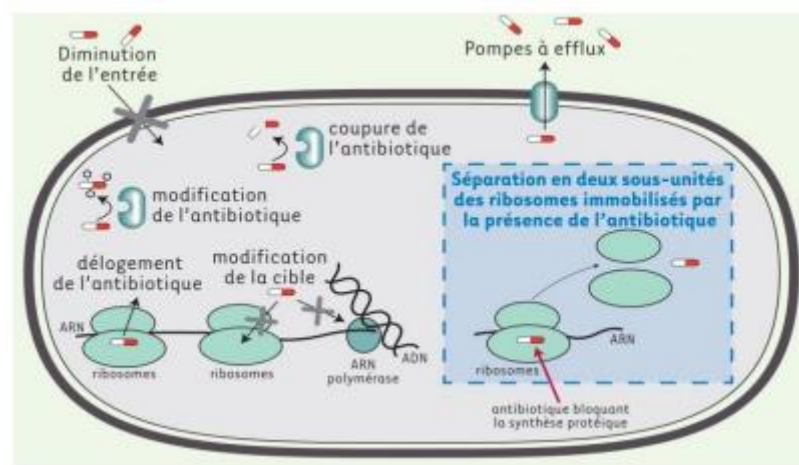


Figure 10 : Différents types de résistance aux antibiotiques (Duval et Cossart, 2019).

3) Activité anti-obésité :

L'extrait de romarin empêche la prise de poids en limitant l'absorption des lipides dans l'intestin. Cela a été rendu possible par l'inhibition de l'activité de la lipase pancréatique et encore inhiber la synthèse des lipides par la suppression du diacylglycérol acyltransférase (DGAT), la principale enzyme responsable de la production de triglycérides. L'acide carnosique inhibe l'adipogenèse, cette inhibition peut favoriser une perte de poids (Rafie *et al.*, 2017).

4) Activité anticancéreuse :

Le romarin a affiché une importante activité antiproliférative contre plusieurs cellules cancéreuses humaines où les principaux composés de l'extrait de *R. officinalis* comme l'acide carnosique, le carnosol et l'acide rosmarinique ont induit l'apoptose de ces cellules cancéreuses à travers la production d'oxyde nitrique (Rafie *et al.* 2017).

5) Activité insecticide :

L'utilisation des extraits de plantes comme insecticides est connue, depuis longtemps, comme meilleurs alternatives aux insecticides chimiques car respectueux de l'environnement et biodégradables (**Gitaari et al. 2018**). En agroalimentaire, les huiles essentielles extraites des feuilles des plantes aromatiques ont également révélé des propriétés insecticides très intéressantes contre une grande variété d'insectes ravageurs des stocks des denrées alimentaires (**Belarouci, 2016**).

6) Activité anti-cholinestérasique:

Des extraits aqueux et méthanoliques de 11 plantes utilisés dans la médecine traditionnelle chinoise pour l'amélioration de la mémoire ont été examinés pour évaluer leurs activités inhibitrices d'acétylcholinestérase en utilisant la méthode colorimétrique d'Ellman.

L'extrait méthanolique du Romarin a montré une inhibition modérée (17%) de l'enzyme à une concentration de 0.1% (**Adersen et al, 2006**).

7) Activité hypo-glycémiant :

Les observations après l'administration orale de différentes doses de l'extrait éthanolique du Romarin à 3 groupes de lapins (lapins ayant une glycémie normale, lapins ayant une hyperglycémie provoquée par l'administration oral du glucose, lapins diabétiques) ont clairement montré que cet extrait exerce une activité hypoglycémiant remarquable à une dose de 200 mg/kg (**Bakirel et al., 2008**).

8) Activité hépato-protectrice :

De nombreuses études ont été réalisées pour étudier l'effet anti hépatotoxique du Romarin, le travail a été concentré pour l'évaluation de l'efficacité de l'extrait méthanolique du Romarin pour normaliser certains paramètres histologiques et biochimiques du foie, après l'ingestion d'une hépato toxine ' le tétrachlorure de carbone '(CCL₄). les résultats ont indiqué que cet extrait a empêché la peroxydation lipidique (l'information, la nécrose, normalisé les taux de la bilirubine, le glycogène et l'activité du l'alanine amino-transférase) et enfin a augmenté l'activité du glutathion-S-transférase (GST) (**Marie et al, 2004**).

9) Activité sur le système nerveux :

L'administration d'huile de romarin, à la fois par inhalation et par voie orale, stimule l'activité du système nerveux central, respiratoire et locomotrice chez la souris (**Kovar, 1987**).

L'extrait alcoolique de *R.O* a montré une activité antidépressive sur la nage forcée et les tests d'immobilité de la souris (**Matsunaga, 1997**). Le romarin serait donc recommandé pour traiter les divers cas d'asthénie et de fatigue intense.

10) Activité sur la circulation sanguine et sur la coagulation :

L'utilisation d'huile de Romarin dans un bain stimule la circulation dermique et améliore l'hémodynamique pour les problèmes d'occlusion artérielle (**Rulffs, 1984**). Les extraits de la plante ont des activités anticoagulantes qui peuvent diminuer le risque de la formation de caillots dans les vaisseaux sanguins (**Boucheloukh et Kadja, 2019**).

PARTIE EXPERIMENTALE :

Chapitre II

Matériels et méthodes

Chapitre II. Matériels et méthodes

Notre travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie et de biochimie, université Mohamed Boudiaf, M'sila, Algérie.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel Végétal:

La partie aérienne de *Rosmarinus officinalis*. a été récoltée au mois de juin 2021 dans la région de **Tessala Lemtai**, municipalité affiliée régionalement au district de Bainen, dans l'extrême nord de la wilaya de Mila dans l'est de l'Algérie. La commune se caractérise par un caractère agricole montagnard, froid en hiver et modérément chaud en été, notamment au nord de la commune. Les parties récoltées sont débarrassées des impuretés puis séchées à l'abri du soleil, et déposées dans un endroit sec, ventilé et ombragé.

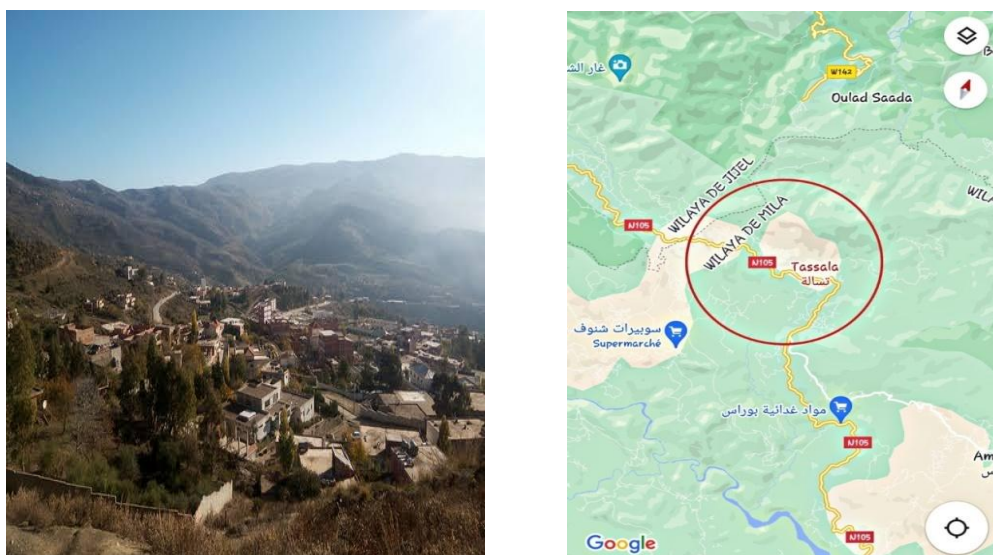


Figure 11 : photo réelle est localisation GPS de Tessala Lemtai.

II.1.2. Matériel Biologique :

Le matériel utilisé au laboratoire « appareillage, verrerie et réactifs » est énuméré dans l'annexe 1 .

II.2. Méthode:

II.2.1. Méthode d'extraction:

II.2.1.1. Préparation de l'extrait:

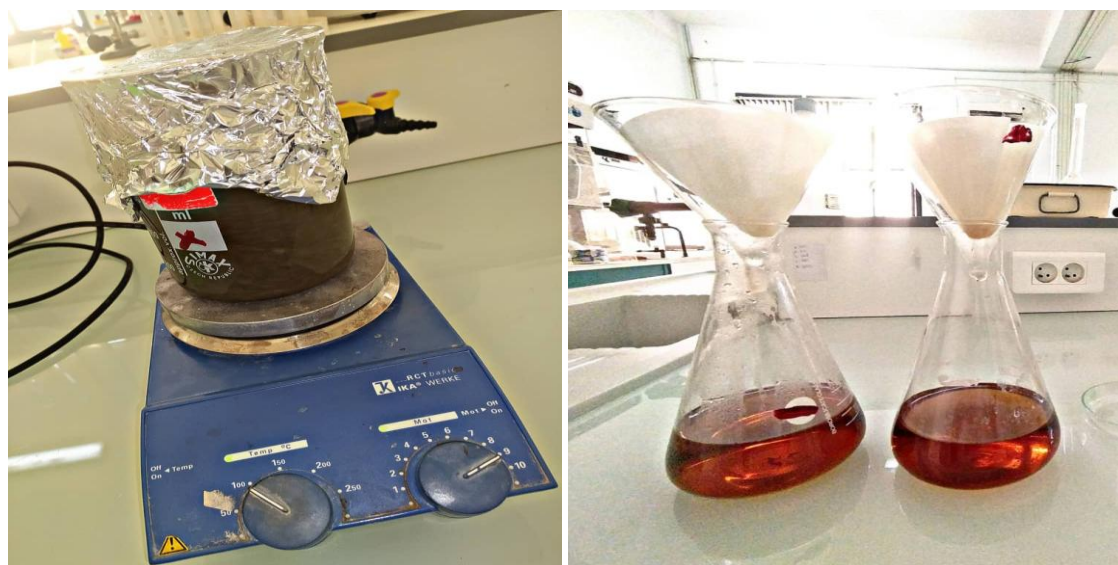
L'extrait aqueux de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis*, est obtenu à partir de la méthode de décoction. Cette dernière a été préparée selon **Chevallier (2001)**. Où 10g de l'extrait de plante est mis dans 250 ml d'eau distillée jusqu'à ébullition (100°C) dans un béccher pendant 15 à 20 minutes, puis refroidi avant d'être filtré, à l'aide d'une passoire et de papier wattman (deux fois).

La poudre obtenue après la décoction a été réservée et mise à l'abri jusqu'à utilisation.

Le rendement en extrait sec exprimé en pourcentage est calculé d'après la formule suivante :

$$RDT\% = M \text{ extrait} / M0 \text{ échantillon} \times 100$$

RDT% : rendement en pourcentage, **M** : poids de l'extrait sec (g) **M0**: poids de l'échantillon en poudre (g)



A: décoction

B: filtration

Figure 12 : La préparation de l'extrait.

II.2.2. Dosage colorimétrique (spectrophotométrique) :

II.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**). Ce dosage

est basé sur la quantification de la concentration totale des groupements hydroxyles présents dans l'extrait.

Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par **Skinkard et Singleton (1977)** en y apportant quelques modifications. Brièvement, dans des tubes à essai, un volume de 0.1ml de l'extrait a été ajouté, et leur volume complété à 4.5ml d'eau distillée pour donner un mélange de 4.6 ml, après on a rajouté un mélange de 0.1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 3 fois par de l'eau distillée) et 0.3 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2%. Les tubes sont agités et conservés pendant 2heures. L'absorbance est lue à 760 nm par rapport à un blanc contenant 0.1ml de solvant d'extraction, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis Shimadzu 1240 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon). Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique.

Les données ont été présentées comme la moyenne d'analyse en 3 répétitions :

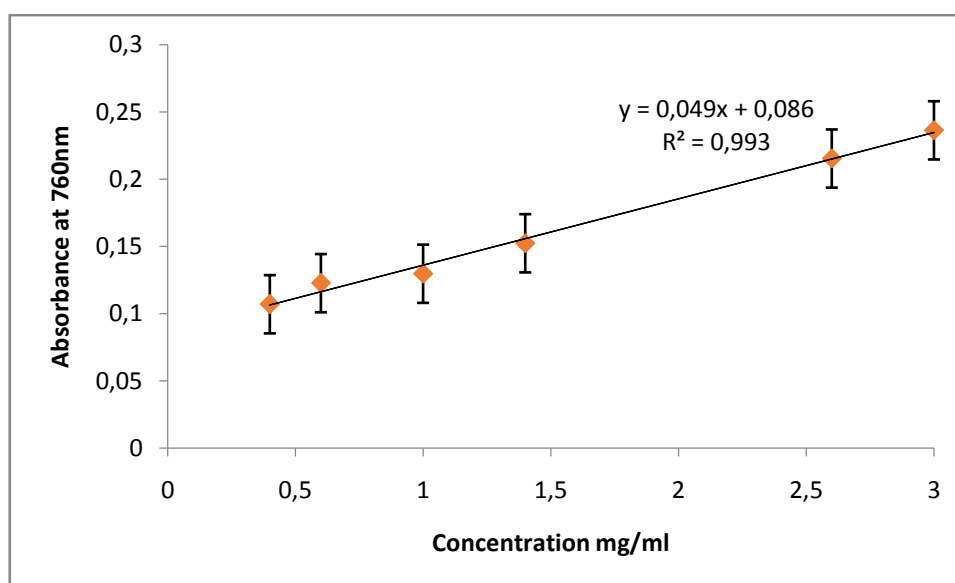


Figure 13 : Courbe standard de l'acide gallique pour la détermination des polyphénols totaux

(Moyenne \pm SD).

II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux:

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (**Lagnika, 2005**).

Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par **skanaka et al., (2005)**.

Dans un tube à essai, 0.25 ml d'extrait ou d'étalon, ou d'eau distillée pour le témoin, on été mélangés avec 1.25 ml d'eau distillée, suivi par l'addition de 0.75 ml d'une solution de NaNO_2 à 5%. Après 6 minutes, on a ajouté 150 ml d'une solution ALCL_3 à 10%, et on a laissé reposer le

mélange pendant 5 minutes. Un volume de 0.5 ml de M NaOH a été additionné au milieu, et le mélange a été complété à 2.5ml avec l'eau distillée et bien agité. L'absorbance est lue immédiatement à 510nm.

La solution de quercétine a été préparée avec des solutions filles préparées elles même à partir de la solution mère.

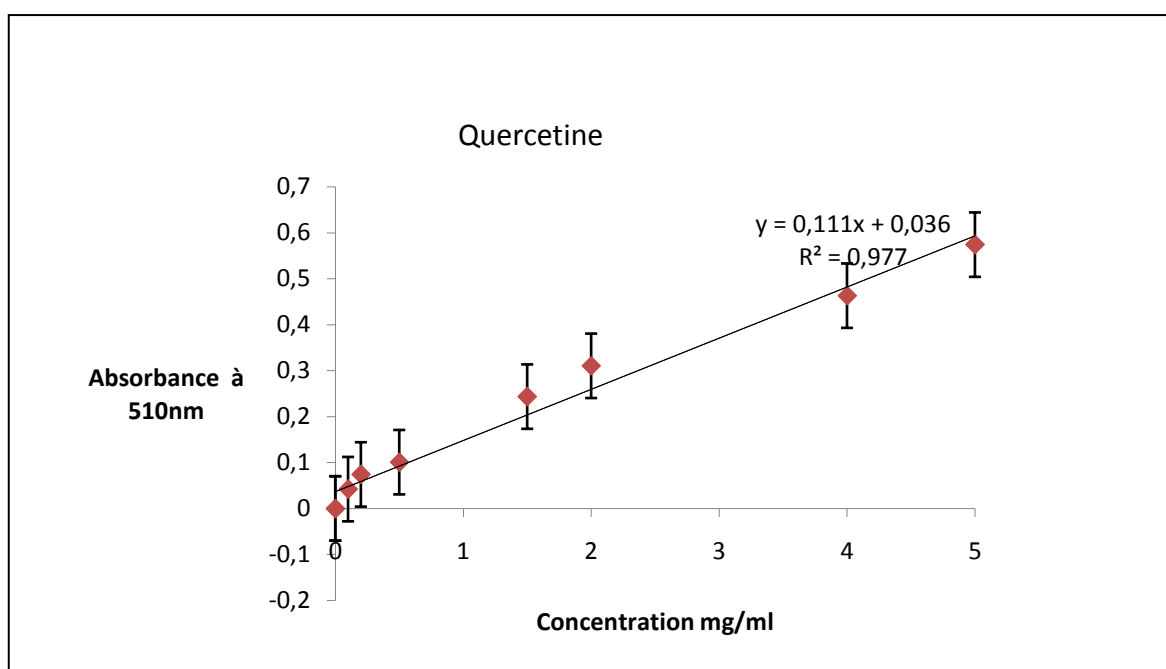


Figure 14 : Courbe standard de la quercétine pour la détermination des flavonoïdes totaux.

II.2.2.3. Dosage des tanins:

La teneur en tanins a été estimée par la méthode de **Bate-Smith (1973)**. Un volume d'extrait végétal a été dilué pour obtenir une concentration en polyphénols totaux d'environ 500 µg/ml et mélangé avec un volume égal de sang de mouton hémolysé (absorbance égale à 1.6). Après 10 minutes cette solution a été centrifugée pendant 20 minutes et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 576nm. L'efficacité de la précipitation des solutions testées est exprimée en µg d'équivalent acide tannique/g d'extrait.

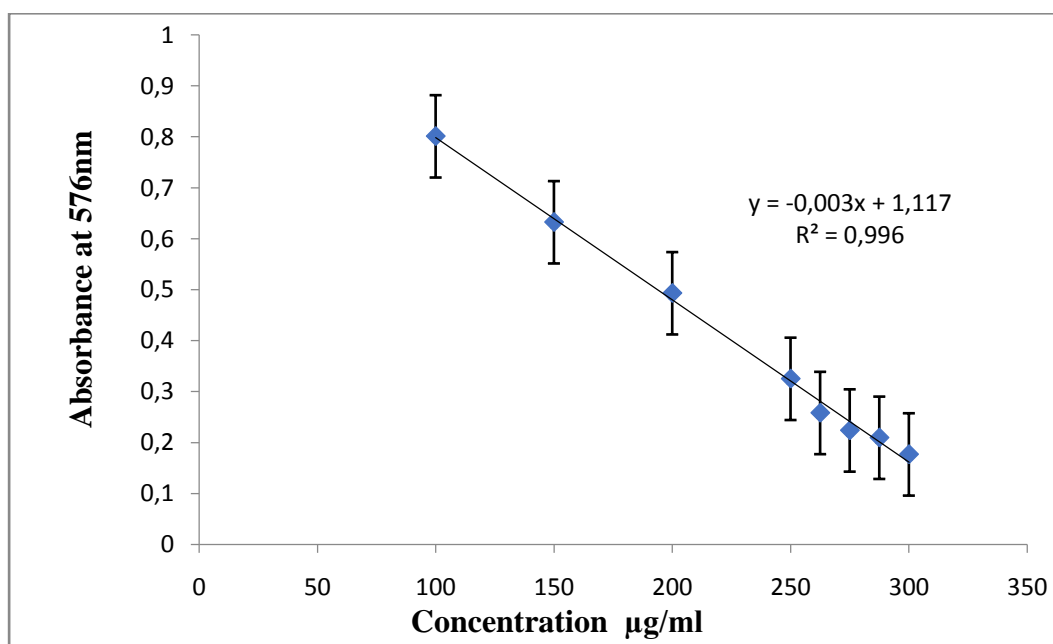


Figure 15 : Courbe standard de l'acide tannique pour la détermination des tanins totaux.

(Moyenne \pm SD).

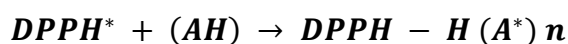
II.2.3. Activité antioxydante :

II.2.3.1. Test au DPPH :

- **Principe :**

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété anti-radicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation de DPPH:



(AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (Brand-William *et al.*, 1995).

Selon (Güllüce *et al.*, 2003), préparer 50µL de différentes concentrations des extraits sont ajoutés à 5ml de solution de DPPH de concentration 0.004%. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et dans l'obscurité, la lecture des absorbances se fait au

spectrophotomètre à 517 nm. Le contrôle négatif est représenté par la solution méthanolique du DPPH et le contrôle positif est représenté par le BHT.

$$\text{Inhibition \%} = (ABS_{\text{contrôle}} - ABS_{\text{test}}) \times 100 / ABS_{\text{contrôle}}.$$

Avec :

ABS_{contrôle}: Absorbance de contrôle à une longueur d'onde de 517nm;

ABS_{test}: Absorbance de l'échantillon à une longueur d'onde de 517nm.

(Güllüce *et al*, 2010) (Burits et Bucar, 2000)

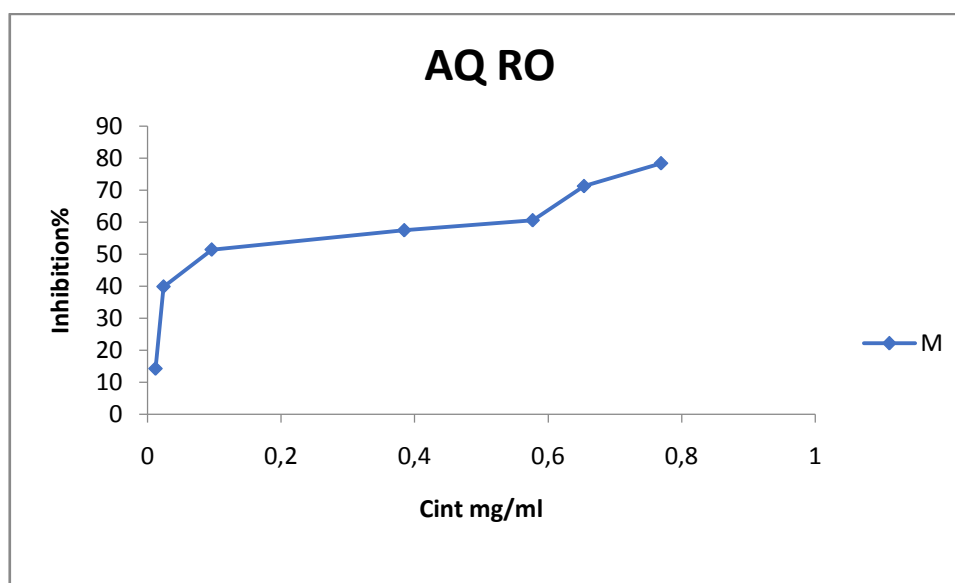


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extrait de *Rosmarinus officinalis*.

II.2.3.2. Matériel microbiologique :

Les souches microbiennes (**tableau 1**) ayant fait l'objet de cette étude ont été fournies par le laboratoire de microbiologie du département de microbiologie et de biochimie au sein duquel nous avons réalisé cette partie de notre travail, à savoir le test antibactérien.

Tableau 1 :Principales caractéristiques des souches bactériennes testées (Fauchère et Avril, 2002).

Famille	Micrococcaceae	Enterobacteriaceae	Pseudomonadaceae
Genres et espèces	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Origine	ATCC 22923	ATCC 22922	ATCC 27853
Gram	+	-	-
Formes et mobilité	Cocci Immobile	Bacille Mobile	Bacille Mobile
Caractères biologique	Aérobie facultatif Catalase+, oxydase- Coagulase+	Aérobie facultatif Oxydase-, lactose+ Indole+	Aérobie strict oxydase+
Habitat	Peau et muqueuses	Tube digestif	Commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux.
Pouvoir pathogène	Infections pyogènes graves.	Infections urinaires et gastro-entérites infantiles.	Infections nosocomiales.

ATCC : American Type Culture Collection

Tableau 2: Les antibiotiques utilisés pour l'activité antimicrobienne.

	Nom	Abréviation	Dose
Antibiotiques	Streptomycine	S	10µg/disque
	Gentamicine	GEN	10µg/disque
	Colistine sulfate	CS	10µg/disque
	Cefazoline	CZL	30µg/disque

II.2.3.3. Test antibactérien :

Principes de L'antibiogramme :

L'antibiogramme est une technique de routine d'analyse médicale. Il est réalisé lorsque l'examen bactériologique d'un prélèvement biologique a mis en évidence la présence de bactéries. L'antibiogramme permet alors de déterminer si une bactérie est résistante ou sensible à tel ou tel antibiotique testé. Grâce à ces résultats, le médecin pourra prescrire le traitement le plus adapté et efficace pour traiter l'infection bactérienne **(Cluzel, 1996)**.

L'évaluation des activités antibactériennes a été réalisée par la méthode de diffusion en gélose dite méthode de diffusion sur disques **(Rahal, 2006)**.

a) Stérilisation du matériels :

L'eau distillée, le tube à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier vierge (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

b) Préparation des pré-cultures microbiennes :

Les souches bactériennes conservées ont étéensemencées dans des tubes à essai contenant du bouillon nutritif puis incubées à 37°C pendant 24heures, afin de stimuler leur développement. Après croissance bactérienne, ces souches ont été repiquées sur une gélose nutritive coulée en boîte de Pétri puis incubées à 37°C pendant 24heures **(Neggaz, 2010)**.

c) Ensemencement du milieu de culture en boîtes de Pétri et dépôt des disques :

On prend un petit échantillon d'inoculum bactérien standardisé qui est déposé et étalé sur la surface du milieu de Muller Hilton. Un mouvement circulaire en forme de huit (8) permet de bien répartir la suspension bactérienne sur toute la surface du milieu. Le liquide en excès est aspiré avec une pipette Pasteur stérile **(Neggaz, 2010)**.

A l'aide d'une pince stérile, 3 disques de 9mm de diamètre, imprégnés de 30µL des 3 concentrations de l'extrait aqueux à 200, 400 et 600 mg/ml de l'EQRO à tester, sont respectivement déposés sur la surface du milieuensemencé. Les disques déposés dans les cultures témoin (3 boîtes) sont imprégnés uniquement d'eau distillé (solvant). Les boîtes sont incluses pendant 24heures **(Neggaz, 2010)**.

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm. **(Benkiki, 2006)**.

II.3. Etude statistique :

Toutes les expériences ont été réalisées en triple. Pour chaque test ou méthode, les moyennes et les écarts type des essais ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel **Excel 2010**.

Chapitre III

Résultats et discussion

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1. Rendement de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* :

L'extraction par la méthode de décoction permet d'obtenir un extrait aqueux à partir de la poudre de la plante aérienne de *Rosmarinus officinalis*.

Tableau 3 : Aspect, couleur, et rendement d'extrait de *Rosmarinus officinalis*.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement
Aqueux	Poudre	Marron foncé	14.49%

La préparation de l'extrait aqueux (EQRO) est faite par la décoction (l'eau distillée comme solvant polaire). Selon **Su et al (2006)**, la température affecte le rendement de l'extraction (le rendement augmente avec la chaleur), ce qui montre que plus la température est élevée, plus le processus de pénétration des cellules et la solubilisation des molécules par le solvant est facile (**Albano et Miguel, 2010**). La chaleur peut cependant conduire à la dégradation des molécules thermolabiles (**Seidel, 2005**), c'est la raison pour laquelle la décoction a été effectuée pendant un temps réduit.

Dans une étude réalisée par **Shama et al (2014)** qui a travaillé sur *Rosmarinus officinalis* originaire du Soudan, les résultats trouvés pour le rendement de l'extrait aqueux étaient de 24.3%, et une étude réalisée par **Dorman et al (2003)** ont trouvé que le rendement des extraits aqueux, originaire de Finlande est égale à 24%. Ces résultats sont supérieurs aux nôtres qui sont de l'ordre de 14.49%.

Hoefler (1994) a démontré que le rendement de l'extraction aqueuse sur la même espèce et de l'ordre de 14.3 % et 16.2% respectivement dans les deux régions : Montrichard et St Arty / Caderonne en France, extrait récolté en juin. Et dans une étude réalisée par **Tsai et al., (2007)**, les résultats trouvés montrent que l'extrait aqueux a donné un rendement de 14.49 % , cela signifie que notre résultat reste proche de celui de ces travaux.

D'une manière générale, le rendement de la méthode d'extraction dépend de plusieurs facteurs tels que le temps d'extraction, la température, ainsi que la localisation géographique, la période de récolte, le climat et la durée de stockage (**SU et al., 2006**). Il dépend aussi de la nature du solvant utilisé (**Zhao et al., 2006**) et de la méthode d'extraction appliquée (**Wojdylo et al., 2007**).

III.2. Etude Phytochimique:

III.2.1. La caractérisation phytochimique :

Les résultats des études phytochimiques effectuées sur la plante *Rosmarinus officinalis*. sèche, ont donné les résultats présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4: le screening phytochimique de la plante *Rosmarinus officinalis*.

Métabolites	Résultats obtenus
Polyphénols	+++
Flavonoïdes	+
Tannins	+

(+) la présence des métabolites testés.

Selon les résultats, le screening phytochimique de la plante nous a permis de connaître les composants majoritaires présents : **polyphénols, flavonoïdes et les tanins.**

III.3. Dosage des acides phénolique :

III.3.1. Dosage des polyphénols totaux :

la méthode de Folin-Ciocalteu a déterminé les polyphénols totaux. Cette quantification est réalisée à partir d'une courbe d'étalonnage représentant les absorbances des différentes concentrations de l'acide gallique sachant que le coefficient de corrélation est : $R^2 = 0.993$.

Le tableau 5 représente la détermination de la teneur en polyphénols totaux de L'extrait aqueux (EQRO) qui est de $455.10 \pm 0.07 \mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait. Cette valeur est beaucoup trop élevée. Le résultat montre alors que l'extrait aqueux est très riche en polyphénols.

Tableau 5 : Teneur en polyphénols totaux d'extrait de *Rosmarinus officinalis*.

Extrait	[C] des polyphénols ($\mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait)
Aqueux	455.10 ± 0.07

Des études menées sur les teneurs en composés phénoliques totaux issus de trois régions différentes de Turquie, variaient entre $70,3$ et $147,3 \text{ mg EAG}/\text{g}$, sont différentes par rapport à

nos résultats. La teneur élevée en polyphénols dans l'extrait aqueux est liée à la solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires (**Yesil-Celiktas et al., (2007)**).

La teneur de l'EQRO est ici proche à celle rapportée par **Erkan et al., (2008)** qui est de 162 mg EAG/g , et **Ho et al., (2008)** qui est de $127 \pm 3 \text{ mg AEG/g}$, mais assez loin à celle de **Tsai et al., (2007)** qui est de $58.1 \pm 0.9 \text{ mg AEG/g}$ et **Tawaha et al., (2007)** qui est de $39.1 \pm 3.6 \text{ mg AEG/g}$.

Perez et al., (2007) ont montré l'effet du traitement de pré-extraction (irradiation ionisante) et du solvant d'extraction, sur la concentration des composés phénoliques totaux dans les extraits du romarin.

Par ailleurs, la teneur en polyphénols des feuilles de *Rosmarinus officinalis* Françaises trouvées par **Kosar et al., (2005)**, et par **Aljabri, (2020)** pour l'extrait aqueux sont faibles par rapport à notre résultat, avec des teneurs de 200 mg EAG/g et 211 mg EAG/g d'extrait respectivement.

III.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3), la quercétine a été utilisée comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 576 nm. La teneur de flavonoïde de l'extrait a été obtenue à partir de la courbe d'étalonnage représentant les absorbances des différentes concentrations de la quercétine considérée comme un standard, et déterminée par l'équation de type : $Y = 0,003 x + 0,117$ sachant que le coefficient de corrélation est : $R^2 = 0,996$ (**figure 13**).

Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$) (tableau 6).

Tableau 6 : Teneur en flavonoïdes totaux d'extrait de *Rosmarinus officinalis*.

Extrait	[C] des flavonoïdes ($\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$)
Aqueux	7.33 ± 0.04

En outre, **Tsai et al., (2007)** ont également trouvé que l'extrait méthanolique du romarin contient $60.7 \pm 1.1 \text{ mg/g}$. Les teneurs rapportées par **Ho et Tsai** sont très élevées par rapport à nos résultats, cette différence trouve probablement son explication dans la différence de la méthode d'extraction utilisée pour le dosage des flavonoïdes.

Maisuthisakul *et al.*, (2008) ont constaté que la teneur totale des flavonoïdes des extraits ethanologiques de 28 plantes, est liée à la teneur des composés phénoliques totaux. De même nous avons trouvé que la teneur des flavonoïdes des extraits du romarin est corrélée significativement avec la teneur des polyphénols ($R_2 = 0.996$).

Cette différence peut être aussi expliquée par la méthode d'extraction de la partie aérienne de la plante (**Falleh *et al.*, 2008**).

Tsai *et al.*, (2007) ont mentionné que l'extrait du romarin contient des teneurs très élevées en flavonoïdes ce qui supporte nos résultats.

III.3.3. Dosage des tanins totaux :

Le dosage des tanins a été exprimé en microgramme d'équivalent de l'acide tannique par gramme de poids sec de l'extrait ($\mu\text{g EAT}/\text{mg Ps}$).

Tableau 7 : Teneur en tanins totaux d'extrait de *Rosmarinus officinalis*.

Extrait	[C] des tanins ($\mu\text{g EAT}/\text{mg d'extrait}$)
Aqueux	135.91 \pm 0.020

La teneur des tanins de notre extrait est de 135.91 \pm 0.020 $\mu\text{g EAT}/\text{mg d'extrait}$. Ce résultat montre que l'acide tannique induit une précipitation totale de l'hémoglobine.

Saima *et al.*, (2015), a mené une étude sur l'activité des tanins à partir de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officianilis* et a constaté qu'il est absent dans toutes les parties de la plante.

On note la présence de tanins, et selon **Iserin (2001)**, ils permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation.

III.4. Activité biologique de l'extrait :

III.4.1. Activité anti-radicalaire par la méthode de réduction du radical libre DPPH :

L'activité antioxydante de l'extrait a été évaluée in vitro par la méthode de réduction du radical libre DPPH. La présence des piègeurs des radicaux libres permet de réduire le DPPH de couleur violette en DPPH de couleur jaune.

Les résultats peuvent être exprimés en utilisant le paramètre IC_{50} , qui est défini comme la concentration du substrat qui cause une perte de 50% de l'activité du DPPH (**Markowicz et al., 2007**).

III.4.2. Détermination d' IC_{50} :

L' IC_{50} de BHT et de l'extrait aqueux est déterminée à partir de la partie linéaire de la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration.

Nos résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire (figure 15), révèlent que l'extrait testé ainsi que le BHT pris comme référence sont des anti-radicalaires.

Les résultats de l'action anti-radicalaire de l'EQRO montrent une IC_{50} de l'ordre de 0.128 mg/ml. Notre extrait est moins actif que le BHT (0.03 mg/ml).

Tableau 8 : Valeurs d' IC_{50} d'extrait aqueux et de BHT.

Extrait	BHT	EAQ (mg/ml)
IC_{50} (mg/ml)	0.031	0.128

La capacité antioxydante des extraits non volatils des plantes étudiées est inférieure à celle du témoin positif BHT mais a largement un effet, ce qui signifie que l'activité antioxydante suit un processus radicalaire (**Fadili et al., 2015**),

Nos résultats sont inférieurs par rapport à ceux rapporté par **Fadili et al., (2015)**, dont l' IC_{50} est de 0,001 mg/ml et 0,05 mg/ml respectivement pour l'extrait méthanolique et le standard de l'acide ascorbique.

Dans une autre étude, **Makhloufi (2013)** a confirmé le pouvoir antioxydant de cette plante dans la région Bechar avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 80,70 % et 79,62% pour les deux extraits méthanolique et aqueux respectivement.

En effet, **Damak et al., (2008)** ont rapporté que la concentration en polyphénols totaux est corrélée significativement avec la capacité antioxydante évaluée généralement par le test DPPH.

On sait que l'activité antioxydante est forte et efficace, c'est-à-dire que la valeur d' IC_{50} est faible. Cette activité est déterminée par une diminution de l'absorbance produite par les substances anti-radicalaire (**Talbi et al., 2015**).

Les résultats sont en accord avec (Tepe *et al.*, 2006 ; Kivilompolo *et al.*, 2007). En effet le romarin est une plante qui appartient à la famille des *Lamiaceae*, qui inclut un grand nombre de plantes qui sont bien connues pour leurs propriétés antioxydantes, et que la plupart de leurs composants antioxydants ont été identifiés.

Le romarin fait partie des antioxydants naturels répandus et utilisés en tant qu'une des épices avec l'activité antioxydante des plus élevées (Peng *et al.*, 2005).

Selon Turkmen *et al.* (2007) les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale.

Pendant les 10 dernières années, le romarin et ses constituants (le carnosol, l'acide carnosique, l'acide ursolique, l'acide rosmarinique, l'acide caféique) ont été intensivement étudiés (Slamenova *et al.*, 2002). L'acide carnosique et le carnosol, sont responsables de 90% de l'activité anti-oxydante du romarin et représentent ensemble environ 5% du poids sec de ses feuilles (Wei et Ho, 2006, Visanji *et al.*, 2006).

III.5. L'activité antibactérienne:

III.5.1. Test antibactérien :

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition, déterminé par les différentes concentrations de l'EQRO autour des disques.

Les résultats consignés dans le **tableau 8** et **la figure 16** ont montré que l'extrait aqueux a une activité inhibitrice seulement sur les souches bactériennes *gram (+)* et *gram (-)* à différentes concentrations (A: 200, B: 400 et C: 600 mg/ml) avec des diamètres de 10 mm, 11 mm, et 12 mm respectivement.

On trouve que le romarin s'est révélé actif contre le *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition égale à 12mm et inactif contre *Escherichia coli*.

Tableau 9 : Les résultats des tests antibactériens.

Concentrations souches	C ₁ A: 200 mg/ml	C ₂ B: 400 mg/ml	C ₃ C: 600 mg/ml.
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 mm	11 mm	12 mm
<i>Echerichia coli</i>	00	00	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00	00	00

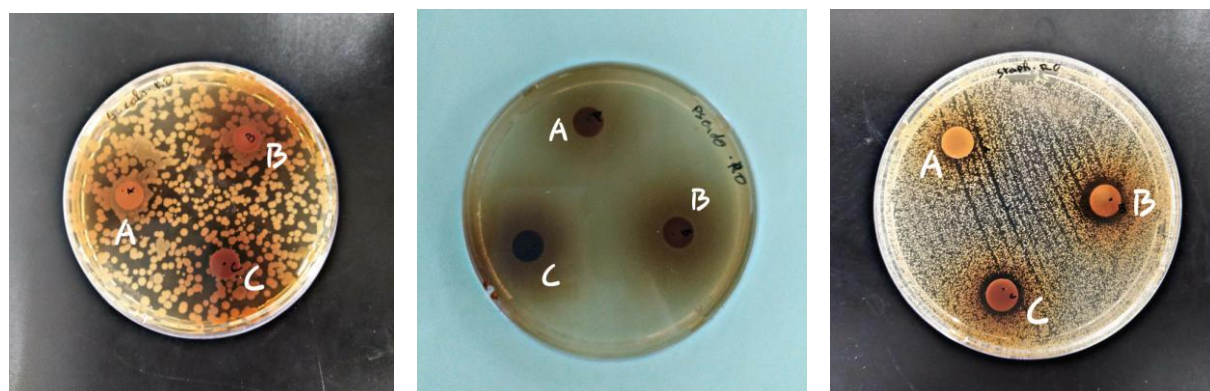


Figure 17 : Les zones d'inhibition de la croissance des 03 bactéries utilisées, induites par l'extrait de *Rosmarinus officinalis*.

L'activité antibactérienne des extraits aqueux de notre plante était comparable aux antibiotiques ; *GEN* (30 µg/dis), *S* (10 µg/dis), *CS* (10 µg/dis), *CZL* (10 µg/dis) qui indiquent leurs effets antibactériens.

Résultats du test de sensibilité aux antibiotiques :

- L'antibiogramme permet de mesurer la capacité d'un antibiotique à inhiber la croissance bactérienne.

- Les résultats obtenus sont représentés dans la **figure 17** et le **tableau 9**.

- L'antibiogramme a été réalisé sur trois souches de référence des bactéries vis-à-vis de 4 antibiotiques de différentes familles. La mesure du diamètre des zones d'inhibition de chaque

souche pour chacun des antibiotiques testé permet de caractériser les souches comme étant sensibles ou résistantes.

Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibition d'antibiogramme des trois souches testées (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*).

Les souches	Diamètres des zones d'inhibition (mm)				
	Contrôle Négatif (eau distillée)	Gentamicine (GEN)	Streptomycine (S)	Colistine sulfate (CS)	Cefazoline (CZL)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	31	21	12	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	34	24	0	0
<i>Escherichia Coli</i>	0	30	23	11	0



a) *P. aeruginosa*

b) *E. coli*

c) *S. aureus*

Figure 18 : Antibiogramme des souches : *Pseudomonas aeruginosa* , *Escherichia coli*,

Staphylococcus aureus.

- On observe que les souches bactériennes réagissent différemment à l'antibiotique testé, on constate que les souches testées présentent une zone supérieure entre 30 et 34 mm cela explique leur sensibilité à la Gentamicine.

- La Cefalozine n'exprime aucune zone d'inhibition sur les trois souches bactériennes testées, et pour la Colistine sulfate on ne trouve aucune zone d'inhibition sur *S. aureus*. Cela veut dire que les souches bactériennes sont résistantes à ces antibiotiques.

Bien que, l'éthanol et le méthanol fussent les meilleurs solvants que d'autres en extrayant les composés phénoliques, en raison de leur polarité et de leur bonne solubilité pour ces composés, les résultats ont prouvé que l'éthanol était le meilleur solvant pour extraire les composés phénoliques, suivi du méthanol et finalement par de l'eau (**Mohsen et Ammar, 2009**) ce qui pourrait expliquer la différence mentionnée ci-après.

Nous avons constaté une différence en comparant la zone d'inhibition d'*Escherichia Coli* ATCC (0.00 mm) obtenue par l'EQRO du romarin avec celle obtenue par l'extrait éthanolique (16.62 mm) testé par **Zhang et al. (2009)**.

Nos résultats sont en accord avec les travaux scientifiques de **Balouiri (2011)**. Mentionnons que l'extrait aqueux de *Rosmarinus officinalis*. est inactif sur toutes les souches à Gram – (*E. coli*, *P. aeruginosa*).

L'activité antimicrobienne ne dépend pas seulement de la présence des composés phénoliques, mais également de la présence de divers métabolites secondaires (**Kil et al., 2009**), de l'emplacement et du nombre de groupes d'hydroxyles (**Falleh et al., 2008**).

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

Plusieurs classes de polyphénols telles que les acides phénoliques, flavonoïdes et les tannins servent de mécanisme de défense des plantes contre les micro-organismes, les insectes, et les herbivores pathogènes (**Falleh et al., 2008**). Les Polyphénols, les tannins et les flavonoïdes comme l'epigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine, (**Shan et al., 2007**) et la lutéoline (**Askun et al., 2009**) sont des substances antibactériennes importantes.

Conclusion

Conclusion

Certains constituants du Romarin sont une source importante de composés phénoliques possédant une bonne activité antioxydante et antimicrobienne. A la lumière de nos résultats on ressort avec les points importants suivants :

Nous avons pu détecter plusieurs molécules bioactives via les différents tests de notre travail.

Le résultat de rendement de l'EQRO a été estimé à 14,47 %, dépendamment de plusieurs facteurs tels que le temps d'extraction, la température, la localisation géographique, la période de récolte, le climat et la durée de stockage ainsi que la nature du solvant utilisé et de la méthode d'extraction appliquée. Nos résultats en comparaison à certaines études étaient proches d'une étude faite en France, mais inférieures à une autre faite en Finlande.

La quantification des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins a montré que l'EQRO est riche en ces métabolites. La teneur en polyphénols étant de 455.10 (μg EAG/mg d'extrait), qui est une valeur beaucoup plus importante que toutes celles qu'on a pu trouver dans les autres études notamment plusieurs faites en France.

Pour les flavonoïdes la teneur est de 7.33 (μg EAQ / mg d'extrait) obtenue à partir la méthode de trichlorure d'aluminium, utilisant la quercétine comme standard. Nos résultats étaient inférieurs à ceux publiés utilisant des extraits méthanoliques et éthanoliques.

La teneur des tanins de notre extrait est de 135.91 ± 0.020 (μg EAT/mg d'extrait), alors que ailleurs il a été prouvé qu'ils sont totalement absents dans les extraits méthanoliques.

L'activité antioxydante de l'EQRO en utilisant la méthode des radicaux libres DPPH, l'IC50 a été estimée à 0,128 (mg/ml) qui est proche de celle obtenue par le BHT (mg/ml).

La sensibilité des souches bactériennes testées varie selon les dilutions et la nature bactérienne. L'activité antimicrobienne des trois souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion sur gélose. Les résultats ont montré que l'extrait avait une activité contre les bactéries gram-positives (*Staphylococcus aureus*) alors qu'il n'y avait pas d'effet évident sur les bactéries gram-négatives (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*), ce qui explique la différence de sensibilité des souches bactériennes testées.

En conclusion, l'EQRO étant doté de tous ces bienfaits est jugé d'une grande importance biologique, nous donnons de belles perspectives d'avenir si on vulgarise son utilisation large tant dans les domaines thérapeutiques, cosmétiques, et culinaires.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Adersen, A., Gauguin, B., Gudiksen, L., & Jäger, A. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 104 : 418 – 422 (2006).
2. Albano, S., Miguel, M. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*. 1- 6p (2010).
3. Alignan, M. Thèse de doctorat : Phoma du Tournesol : déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie, Toulouse 64p (2006).
4. Aljabri, M. Composition and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract. *Eurasian Journal of Biosciences*, 14: 2179-2185 (2020).
5. Askun, T., Tumen, G., Satil, F., Ates, M. In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *Food Chem*. 116: 289-294 (2009).
6. Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. *Bactériologie clinique*. 3ème édition Ellipses (Ed) Paris, 602 p (2000).
7. Ayadi. S., Jerribi, C., Abderraba. M. Extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* cueillie dans trois régions différentes de la Tunisie. *Journal de la Société Algérienne de Chimie* 21(1) : 25-33 (2011).
8. Bakirel,. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan- diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol*, 116:64-73(2008).
9. Bate-Smith, E. Haemanalysis of tannins, the concept of relative astringency. *Phytochemistry*, 12 : 907-912 (1973).
10. Behera, J.N., Rao, J.A., Ni²⁺ (S = 1) Kagome Compound Templated by 1,8-Diazacubane *American of Chemistry Society* 128 (29), 9334 -9335 (2006).
11. Bouakaz, I. Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Batna (2006).
12. Bruneton, J. Pharmacognosie. *Phytochimie Plantes médicinales*, 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. P : 227-310-312-313-314.494 (1999).
13. Burits, M., Bucar, F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*. 14, 323-328 (2000).
14. Catier, O., Roux, D. Botanique, pharmacognosie, phytothérapie : Cahiers du préparateur en pharmacie. 3^{ème} ed. France : Walters Kluwer (2007).

15. Chabrier, J-Y. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Sciences pharmaceutiques. hal-01739123 73p (2010).
16. Chevallier, A. Encyclopédie des plantes médicinales. Larousse. pp: 61, 293 (2001).
17. Cluzel, R. Overview of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Clinical Microbiology and Infection* 2, S3-S4 (1996).
18. Damak, N., Bouaziz, M., Ayadi, M., Sayadi, S., and Damak, M. Effect of the Maturation Process on the Phenolic Fractions, Fatty Acids, and Antioxidant Activity of the Chétoui Olive Fruit Cultivar. *Agric. Food Chem.* 56, 1560-1566 (2008).
19. Dellaras, C. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris. 654 p (2007).
20. Diallo, A. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat. Mali (2005).
21. Dorman, H.J.D., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry* 83: 255–262 (2003).
22. Duval, M., et Cossart, P. Un nouveau mécanisme de résistance aux antibiotiques-Le recyclage des ribosomes. *médecine/sciences*, 35(8-9), 613-615 (2019).
23. Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* 110: 76-8 (2008).
24. Fadili, K., Amalich, S., Soro, K.N., Bouachrine, M., Mahjoubi, M., El hilali, F., Zair, T. Polyphenols content and antioxidant of two species from Moroccan high Atlas : *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides*. *Journal of innovation and scientific research*, Vol.17, pp.24-33 (2015).
25. Fellah, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdely C. Phenolic composition of *Cynara Cardunculus* L. Organs, and their biological activities. *Compte rendu biologie*, 331 : 372-379p (2008).
26. Gamet-Payrastre, L., Manenti, S., Gratacap, M.P., Tulliez, J., Chap, H., Payrastre, B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *General Pharmacology*. 32: 279-286 (1999).
27. Gianmario, A., Silvio, S.P.A., Rita, M., Teresa, D. Roberto, T. Aurelia. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L (2007).
28. Gonzalez, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J. Guevara-Fefer P, Deciga-Camps M, Lopez-Munoz F.L. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis*

- L. using three different experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 476-482 (2007).
29. Gülüce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Ozkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sokmen, A., and Gupta, V., Mittal, P., Bansal, P., Khokra, S.L., and Kaushik, D. Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A review. *International journal of pharmacology science of drug research*. 2, 12-6 (2010).
30. Gutierrez Nicolas, C. brève publié par Science & Avenir (2019).
31. Guy, Ducourthial,. Flore médicale des signatures : XVI^e – XVII^e siècles, L'Harmattan, 670 p (2016).
32. Hanen Najjaa, Sami Zouari, Ingrid Arnault, Jacques Auger, Emna Ammar & Mohamed Neffati. « Différences et similitudes des métabolites secondaires chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum* L. et *Allium ampeloprasum* L », *Acta Botanica Gallica*, vol. 158, n° 1, p. 112 (2011).
33. Hart, T., et Shears, P. *Atlas de poche de microbiologie. Médecine-sciences*. Lavoisier, 314p (1997).
34. Hoefler, C. Contribution à l'étude pharmacologique des extraits de *Rosmarinus officinalis* L., et notamment des jeunes pousses : activités cholérétiques, antihépatotoxiques, anti-inflammatoires et diurétiques. Thèse de Doctorat, Université de Metz, France, 146p (1994).
35. Huguette Max, *La route des épices*, 190p (2008).
36. Hui, Y., Feng, C., Nollet, L., Raquel, P., Olga, M., Minguez, M., Poliyath, D., Pessoa, F., Jlle, Q., Jiwan, S., Nirmal, K. S., Peggy, S. *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors* (2010).
37. Ibáñez E., Kubátová A., Señoráns F. J., Cavero S., Reglero G. et Hawthorne, S. B. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary Plants. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, 51 (2): 375-382 (2003).
38. Ibáñez, E., Oca, A., Murga, G., López-Sebastián, S., Tabera, J., Reglero, G. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants (1999).
39. Joli, B., et Reynaud, A. *Entérobactéries : Systématique et méthode de diagnostic. Technique et Documentation*. Lavoisier, Paris.392 p (2002).
40. Jones, C. Rosemary's Whole-Plant Properties Counter Cancer. *Nutrition Sciences News* , 1- 4 (1998).

41. Kivilompolo, M., Hyotylainen, T. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *J Chromatography A*. 1145: 155-164 (2007).
42. Kosar, M., Dorman, H. J.D., Hiltunen, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry* 91: 525–533 (2005).
43. Kovar, K.A., Gropper, B., Friess, D., & Ammon, H.P.T. *Planta Med*, 53, p 315 (1987).
44. Laskin, A.I., Bennett, J.W., Gadd, G.M. *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier Science (2003).
45. Leplat, M. Le Romarin, *Rosmarinus officinalis L.*, une Lamiacée médicinale de la garrigue provençale, Marseille (2017).
46. Loto, C.A. Inhibition effect of tea extract on the corrosion of mild steel in dilute sulphuric acid. *J.Mater. Environ. Sci.* 2 (4) 335-344 (2011).
47. Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K.V., Biro, L. The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta. Biol. Szegedensis*, 1-4: 119-125 (2003).
48. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, pp 3 (2005).
49. Macheix, J.L. Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XXème siècle ?, *Acta Botanica Gallica*, 143:6, 473-479 (1996).
50. Magder, S. Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life? *Critical Care Med Journal*, Vol 10, pp. 208-216 (2006).
51. Maisuthisakul, P., Pasuk, S., Ritthiruangdej, P. (2008) Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J Food Composition and Analysis*. 21: 229-240 (2008).
52. Makhloufi, A. Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis L*) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru (2013).
53. Mans, S., Canouet, S. « *Pseudomonas aeruginosa* : Une histoire d'eau », sur www.cclin-sudouest.com, Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales du Sud-Ouest (2008).
54. Marie, E., Chemat, F., Jacqueline, S. *Flavour And Fragrance Journal* *Flavour Fragr. J.*; 19: 134 – 138 (2004).

55. Markowicz Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R.R., Sawaya, A.C.H. F., Cunha, I.B. S., Carvalho, P.O., Eberlin, M.N. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. 12: 423-432 (2007).
56. Matsunaga, K., Lu, X.C., Yasuda, H. *Nat Med*, 5 p 63 (1997).
57. Migdal, C., et Serres, M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant, université de Lyon, *Med Sci (Paris)* ; 27 : 405–412 (2011).
58. Mouas, Y., Djemal, H., Megdad, F., Benrebiha, F.Z. Etude de l'influence de trois écotypes différents (Blida, Djelfa et Msila) sur la variation des paramètres physiologiques et biochimiques du romarin *Rosmarinus officinalis* L. *Revue Agrobiologia*, 6 (1): 96-100 (2016).
59. Nassima Boucheloukh, et Takia Kadja. « Étude botanique et phytochimique de la plante médicinale *Rosmarinus officinalis* L » , (2019).
60. Nauciel, C. Bactériologie médicale. Masson (Ed).Paris, 276p (2000).
61. Nicolas, A. Plantes médicinales : Pharmacopée, préface, 2p (2003).
62. Okamura, N., Haraguchi, H., Hashimoto, K. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*, 37 (5): 1463-1466 (1994).
63. Pandey, K.B., et Rizvi, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Vol. 2 (5) : 270 – 278 (2009).
64. Peng, Y., Yuan, J., Liu, F., Ye, J. Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39: 431 (2005).
65. Perez, M.B., Calderon, N.L., Croci, C.A. Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.).*Food Chem*. 104: 585-592 (2007).
66. Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16: 233-239 (2002).
67. Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon, M. (2001). Antioxidants in food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington, Cambridge, England, 3 : 7-21 (2011).
68. Quezel, P., et Medail, F. La région circumméditerranéen, Centre mondial majeur de biodiversité végétale. Institut Méditerranéen d'Ecologie et de la Paléoécologie, France, 152-55 (1995).

69. Rahal, J.J. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clinical infectious diseases*, 43(Supplement 2), S95-S99 (2006).
70. Rameau, J.C. Flore forestière française: Région méditerranéenne, p106 (2008).
71. Rao. *Rosemary (Rosmarinus officinalis L.): Impact of drying on its flavor quality*, (1998)
72. Reuter, S. *Free Rad Biol Med*, 49, 1603-161 (2010).
73. Rulffs, W. *Munch Med Wochensch*, 126 p 207 (1984).
74. S, B. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosmariny Plants. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, 51 (2): 375-382 (2003).
75. Sakanaka, S., Tachibana, Y., & Okada, Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*, 89, 569–575 (2005).
76. Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadam, S.S. Nutritional consequences of dietary tannins : consequences and remedies. Boca Raton. Florida : CRC press. Pp 113-146 (1990).
77. Sarni-Manchado, P., Veronique, C. Les polyphénols en agroalimentaires. Collection sciences et techniques agroalimentaires, édition TEC et DOC, Paris (France) : 398 (2006).
78. Satyajit, Dey-Sarker., et Lutfun, Nahar. *Computational Phytochemistry*, Elsevier, 346 p (2018).
79. Seidel, V. Initial and Bulk Extraction. In: Sarker , S and Gray, A . *Natural products isolation*. Ed, Totowa , Humana Press , 27-37p (2005).
80. Serra, H., Mendes, T., Bronze, M., R., Simplicio, A.L. Prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones (2008).
81. Shama, I.Y. A., Abdullah, A.Y.A., Adam, K.M.O., Aldai, M.A.B. Omer, A.M.A.R., Abdelgadir, W.S. In vitro Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* leave extracts. *Journal of Agri-Food and Applied Sciences*. Vol. 2(1), pp. 15-21(2014).
82. Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J Food Microbiology*. 117: 112- 119 (2007).
83. Simon Mills, et Kerry Bone. *Principles and Practice of Phytotherapy : Modern Herbal Medicine*, Churchill Livingstone, p. 16-20 (2000).
84. Simon Singh, et Edzard Ernst. (trad. de l'anglais), *Médecines douces : info ou intox ?*, Paris, Cassini, 407 p. (ISBN 978-2-84225-208-3, p. 229 et 253 (2014).

85. Slamenova, D., Kuboskova, K., Horvathova, E., Robichova, S. Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and FPGsensitive sites in mammalian cells treated with H₂O₂ or visible light-excited Methylene Blue. *Cancer Letters*.177: 145-153 (2002).
86. Slinkard, K., & Singleton, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55 (1977).
87. Souâd Akroum, Étude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba* L.(2006).
88. Souâd Akroum, Inhibition de quelques bactéries pathogènes par les extraits éthanoliques de *Rosmarinus Officinalis*, Sept (2008)
89. Stefano Padulosi , Danna Leaman, & P. Quek, « Challenges and Opportunities in Enhancing the Conservation and Use of Medicinal and Aromatic Plants », *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, vol. 9, n° 4, p. 243-267 (2002).
90. Su, X., Duan, J., Jian, Y., Shi, J., Kakuda, Y. Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of Oolong tea's food composition Anal. 19: 348- 353 (2006).
91. Suzana, I., Katarina, R., Dusan, G., Mirjana, R. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L.. *Journal of Food Chemistry* 104, 774-782 (2007).
92. Talbi, H., Boumaza, A., El-mostafa, K., Hilali, A. Evaluation de l'activité antioxydant et la composition physico-chimique des extraits méthanoliques et aqueux de la *Nigella sativa* L. *Sci*, 6(4) : 1111-1117p (2015).
93. Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem* (2007).
94. Tenailon, O., Skurnik, D., Picard, B., et Denamur, E. « The population genetics of commensal *Escherichia coli* », *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, n° 3, p. 207–217 (2010).
95. Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem*. 95: 200-204 (2006).
96. Thoresen, M.A., Hildebrand, K.S. (2003). Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts. Aspects of accurate quantification. *Journal of Chromatography A*, 119-125 (2003).

97. Tsai, P.J., Tsai, T.H., Ho, S.C. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*, *Food Chemistry* 105: 311–316 (2007).
98. Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat, G. Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. 12:484-496 (2007).
99. Vanden-Berghe, D.A. & Vlietinck, A.J. Screening for antibacterial and antiviral agents. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 6, Assays for Bioactivity. London, Academic Press, 47-59 (1991).
100. Vansant, G. Radicaux libres et antioxydants : Principes de base. Symposium « Antioxydant et alimentation » Institut Danone (2004).
101. Visanji, J.M., Thompson, D.G., Padfield, P.J. Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Letters*. 237: 130-136 (2006).
102. Volker Schulz, Rudolf Hänsel, et Varro, E. Tyler, *Rational Phytotherapy. A Physicians' Guide to Herbal Medicine*, Springer-Verla, 383 p (2012).
103. Wei, G.J., Ho, C.T. A stable quinone identified in the reaction of carnosol, a major antioxidant in rosemary, with 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Food Chem*. 96: 471- 476 (2006).
104. Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. Antioxidant activity and phenolic Compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940–949 (2007).
105. Yang, R.Y., Lin, S., et Kuo, G. 2008. Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species. *Asia of pacific journal of clinical nutrition*. 17 (S1): 275-279 (2008).
106. Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Dattan., Sinanusong, R., Chen, S.S. Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr.* Vol (59): 113-122 (2004).
107. Yesil-Celiktas, O., Girgin, G., Orhan H., Wichers, H-J., Bedir, E., and Vardar-Sukan, F. Screening of free radical scavenging capacity and antioxydant activities of *Rosmarinus Officinalis* extract with Focus on location and harvesting times. *European food research and technology* 224 : 443-51 (2007).
108. Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., Lin, Y., Fan, W., Gu. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction

capacity and Selectivity for free phenolic compounds in barley *Hordeum vulgare* L. J. Agric. Food Chemistry 54: 7277–7286 (2006).

ANNEXES

Annexes :**Annexe1:**

Appareillage
Etuve
Balance de précise
Spectrophotomètre
Incubateur
Vortex
Autoclave
Centrifugeuse
Agitateur magnétique
Verrerie : béchers, éprouvettes graduées, tube à essais, micropipette, pipette Pasteur, boîte pétri, boîte en verre, erlenmeyre, entonnoir

Produit	Formule brute	Fournisseur
Méthanol	CH_3OH	Sigma-Aldrich
Quercetine	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	Sigma-Aldrich
DPPH(2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	/	Sigma-Aldrich
L'eau distillée	/	/
Chlorure d'aluminium	AlCl_3	Sigma-Aldrich
Carbonate de sodium	Na_2CO_3	Sigma-Aldrich

Réactif de Folin-Ciocalteu	/	Sigma-Aldrich
Acide gallique	$C_7H_6O_5$	Sigma-Aldrich
Hydroxyde de sodium	NaOH	Sigma-Aldrich
Sodium nitrate	$NaNO_3$	Sigma-Aldrich
Mueller-Hinton (MH)	/	Sigma-Aldrich

Eau physiologique	
Na cl	0.9 g
Eau distillée	100 ml