



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR KHENCHELA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

FILIERE : Sciences Agronomiques

OPTION: Production végétale

Thème

**Etude phytochimique, activité antibactérienne
et antioxydante de la plante (*Rosmarinus
officinalis*) dans la wilaya de khenchela**

Présenté par :

Chaima Bleghmas

Siham Leghrour

Mémoire de Master académique soutenu devant le jury composé de :

Président : Dr. BOUZOU Mourad MCB Univ Abbès Laghrour -Khenchela.

Examineur : Dr. Mazhoud Amel MAA Univ Abbès Laghrour- Khenchela

Promotrice : Dr.MAMEN Nassima MCB Univ Abbès Laghrour- Khenchela.

Année universitaire 2023/ 2024

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu, le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail. La première personne que nous tenons à remercier est notre encadrant, Pr. Maman Nassima, pour l'orientation, la confiance, la patience et ses bonnes explications, qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions. Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui, par leurs compétences, nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail :

À la femme qui m'a portée toute ma vie et qui m'a enveloppée de gentillesse. À la femme la plus extraordinaire et la plus douce du monde Ma mère,

. J'exprime mon profond amour.

À celui qui a été et qui est toujours pour moi le modèle, la référence : Mon père. Je lui exprime mon profond respect et j'espère avoir été à la hauteur. Ma joie est que tu sois fier de moi.

À mes chères sœurs et mes frères

À mes chères meilleures amies Hana ensighaoui et Hind hayoune et Merci pour votre présence, votre soutien et pour m'avoir encouragée à aller plus loin.

À tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.

Tables des matières

Table des matières

Remercient.

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste abréviation

Introduction

Matériel et méthodes

I Présentation de la zone étude	4
I.1 Présentation de site expérimentale	5
I.2 Etude phytochimique.....	5
I.2.1 Matériel végétale.....	5
I.2.2 essais préalables	8
I.2.2 .1 Mettre en évidence les flavonoïdes	8.
I.2.2.2 Mettre en évidence des tanins	9
I.2.2.3 Mettre en évidence des mucilages.....	10
I.2.2.4 Mettre en évidence des coumarines.....	10
I.2.2.5 Mettre en évidence des alcaloïdes	10
I.2.2.6 Mettre en évidence des saponosides.....	10
I.2.3 Présentation de l'extrait méthanolique	10.
I.2.3.1 Dosage des polyphénols.....	11
I.2.3.2 Dosage des flavonoïdes	12
I.3 Etude antibactériennes.....	12
I.3.1 Préparation de l'extrait d'huile essentielle de romarin.....	14
I.3.2 T est antibactérienne.....	15
I.3.2.1 Préparation de gélule.....	15

I.3.2.2 préparations de milieu MH.....	16
I.3.2.3 Ensemencement et test antibactérien.....	18
I.4 Etude antioxydants.....	19

Résultats et discussion

II Résultats de l'étude phytochimique.....	22
II. 1 Mettre en évidence des compositions chimiques	22
II. 2 Résultats de l'extrait méthanolique	25
II. 3 résultats des dosage polyphénols et flavonoïdes	26
II. 4 Résultats de l'étude antibactériennes	28
II. 4.1 Résultats de l'extrait d'huile essentielles de romarin	28
II. 4. 2 Résultats des test antibactériene	28.
II. 5 résultats de l'étude anti oxydants	31

Concluions

Résume

Annexe

Réfirences

Liste des tableaux

<i>Tableau 1: Classification les souches bactériennes.....</i>	<i>14</i>
<i>Tableau 2:Compositions chimique de romarin</i>	<i>21</i>
<i>Tableau 3: Rendement de l'extrait méthanolique.....</i>	<i>24</i>
<i>Tableau 4: Teneur des flavonoïdes et polyphénols</i>	<i>25</i>
<i>Tableau 5:Rendement de l'extraction denl'huile essentielle de romarin.....</i>	<i>27</i>
<i>Tableau 6: Moyenne des zones d'inhibition de staphylococcus.....</i>	<i>29</i>
<i>Tableau 7: Moyenne des zones d'inhibition d'E. Coli.....</i>	<i>29</i>

Liste des figures

Figure 1: Carte de situation géographique de la wilaya de khenchela.(source PA.D.D dela wilaya de kheenchela,2009).....	4
Figure 2: Géolocalisation de la carte de la région khirane sur la carte d'Algérie.....	5
Figure 3: Plante de romarin pendant la récolte et le séchage	7
Figure 4: Le romarin après le broyage.....	8
Figure 5: Photographie de Rot vapeur	11
Figure 6:l'extraction d'huile essentielle	13
Figure 7 : Préparation des souches bactérienne	15
Figure 8 : Solution de MH.....	16
Figure 9 : Distribution et solidification le MH.....	16
Figure 10: Ensemencement et test antibactérienne.....	17
Figure 11 : Forme libre et réduit de DPPH.	18
Figure 12 : Test phytochimique d'indentification des flavonoïdes	21
Figure 13 : Test phytochimique d'indentification des tanins.....	22
Figure 14 : Test phytochimique d'indentification des mucilages.....	22
Figure 15: Test phytochimique d'indentification des saponosides	23
Figure 16: Test phytochimique d'indentification des coumarines	23
Figure 17 : Test phytochimique d'indentification des alcaloïdes	24
Figure 19 : Présentation graphique les teneur des polyphénols et flavanoides	25
Figure 20: Droits d'étalonnage de l'acide gallique	26
Figure 21 : droits d'étalonnage de quercétine.....	26
Figure 22: Photographie de test sur la souche staphylococcus.....	28
Figure 23: Photographie de test sur la souche staphylcoccus	28
Figure 24: Histogramme de moyenne des zones inhibition des souches sélectionnée.....	30
Figure 25: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations d'EM	30

Liste des abréviations

A **TTCC**: American type culture collection.

AG: Acide gallique.

AlCl₃: Trichlorure d'aluminium.

C°: Degré Celsius.

CM : centimètre

CH₂H₆ : Ethanol.

CH₃OH : Méthanol.

EMR : Extrait méthanolique romarin.

FeCl₃ : Chlorure de fer.

GN : Gélose.

HCl : Acide chlorhydrique.

HE : Huile essentielle.

G : Gramme.

H : heure.

L : Litre.

MIN : Minute.

ML millimètre.

MG : milligramme.

N : Normalité.

NaOH: Hydroxyde sodium.

NH₄OH: carbonate sodium.

P/V : poids / volume.

U : Ultra violète.

UG : Microgramme.

UL : Microlitre.

IC50 : Concentration inhibitrice a 50%.

$\mu\text{g EAG/mg E}$: équivalent microgramme d'acide gallique par milligramme d'extrait.

Introduction

INTRODUCTION

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (**Gurib-Fakim, 2006**) où certains sont issus du métabolisme secondaire.

En Algérie la flore médicinale naturelle est relativement abondante et compte plus de 3000 espèces utilisées en médecine traditionnelle (**ABED, 1997**). Avec ses espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% sont endémiques, la flore reste peu exploitée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique (**BOUZID et al., 2017**).

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles dans les soins de santé ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique. Leurs nombreux usages font qu'elles connaissent une demande de plus en plus forte sur les marchés mondiaux vu leurs propriétés médicinales en l'occurrence les propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, antibactérienne, antioxydante

(**Laiche et Mecheri., 2023**)

Dans notre étude, nous sommes concentrés sur la plante appelée romarin (*Rosmarinus officinalis* L.). c'est une plante médicinale, originaire des régions Méditerranéennes, il pousse spontanément dans le sud de l'Europe. On le cultive dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps. Il apprécie les climats chauds, modérément secs.

Dans le monde, Le romarin se repartit tout au long de la mer méditerranée et le reste de l'Europe d'où son nom « rose de la mer ». « Rose », « marinus » (**GUINOCHET, 1973**), elle est typiquement méditerranéenne qui n'existe pas à l'état sauvage en Belgique, (**ANGENO et al, 1981**). D'après (**PERROT et PARIS., 1971**) cette plante existerait aussi en Corse, au Portugal et En France, elle pousserait abondamment dans les terrains calcaires.

La plante de romarin peut être retrouvée à l'état sauvage, comme peut être cultivée. C'est la plante la plus populaire dans le bassin méditerranéen en Algérie. Les fleurs s'épanouissent tout au long de l'année ce qui attire de nombreux insectes (**Emberger, 1960**).

L'extraction d'une huile essentielle (HE) est nécessairement une opération complexe délicate. Elle a pour but, de capter et recueillir les produits les plus volatils, subtils et les plus fragiles qu'élabore le végétal, et cela sans en altérer la qualité.

D'un point de vue générale, il est intéressant de noter que les HE ne sont pas nécessairement identiques à celles produites par les plantes. Aussi poétique que soit l'idée qu'une HE puisse correspondre à l'esprit de la plante, et donc être une réplique exacte de ce qui est présent dans le végétal, elle n'en demeure pas moins erronée, du moins le plus souvent. Les HE subissent généralement des modifications de leur composition chimique lors du processus d'extraction causées par la chaleur ou bien par leurs interactions avec l'eau. En fait, seules les HE issues de l'expression à froid, n'ayant pas eu de contact avec le jus de fruit et protégées de l'oxydation, pourraient correspondre à la véritable essence de la plante(**Kaloustian et hadj- minaglou., 2012**)

Notre étude s'appuie sur la connaissance des composés Phytochimiques de la plante romarin et de son efficacité contre la bactérie.. et atioxyadante

Le travail, consiste en un aspect appliqué, dans lequel deux types d'études sont réalisées : une étude phytochimique et une étude d'activité contre les bactéries et antioxydante.



Matériel et Méthodes

I. Présentation de la zone étude

La région de KHENCHELA se trouve au nord- est de l'Algérie au pied de la chaîne montagneuse des autres entre $34^{\circ}12'36''$ et $35^{\circ}41'21''$ de latitude nord et $06^{\circ}34'12''$ et $07^{\circ}35'56''$ de longitude est, sa superficie estimée à $9715,6 \text{ km}^2$ (Khabtane, 2010). La composition physique de la wilaya présente une grande diversité (Dali et al, 2021). Elle se situe entre la chaîne steppique et les hauts plateaux, ce qui lui confère une nature forestière agro-pastorale et saharienne. La région de khenchela se caractérise par trois climats :

- Un climat très rude en hiver, modéré en été dans la région montagneuse centrale.
- Un climat modéré en hiver, chaude et sec en été dans les steppes .
- . -Un climat très froid en hiver, sec en été dans les hautes steppes au nord chaud et arides (Draoui et Hamadi,2017).

La plupart des sols de la wilaya sont pauvres et peu profonds, à l'exception des plaines du nord où ils sont plutôt plus profonds.

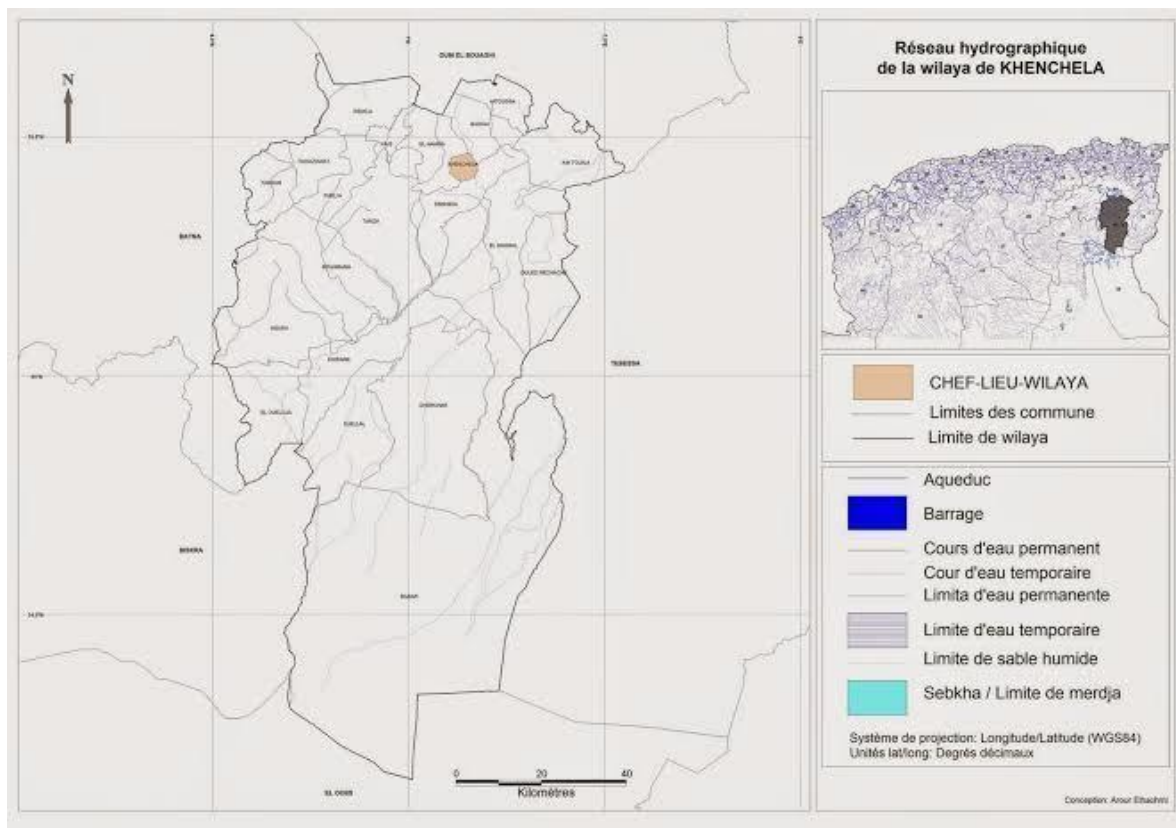


Figure 1: Carte de situation géographique de la wilaya de khenchela. (source PA.D.D de la wilaya de kheenchela,2009)

I.1 Présentation de site expérimentale

Khirane se trouve dans une région aride, où le climat est désertique sec et chaud, selon la classification de koppen, sa superficie est de 399,00 km², sa population est de 5752 habitants et sa densité de population est de 14,4 habitant par km².

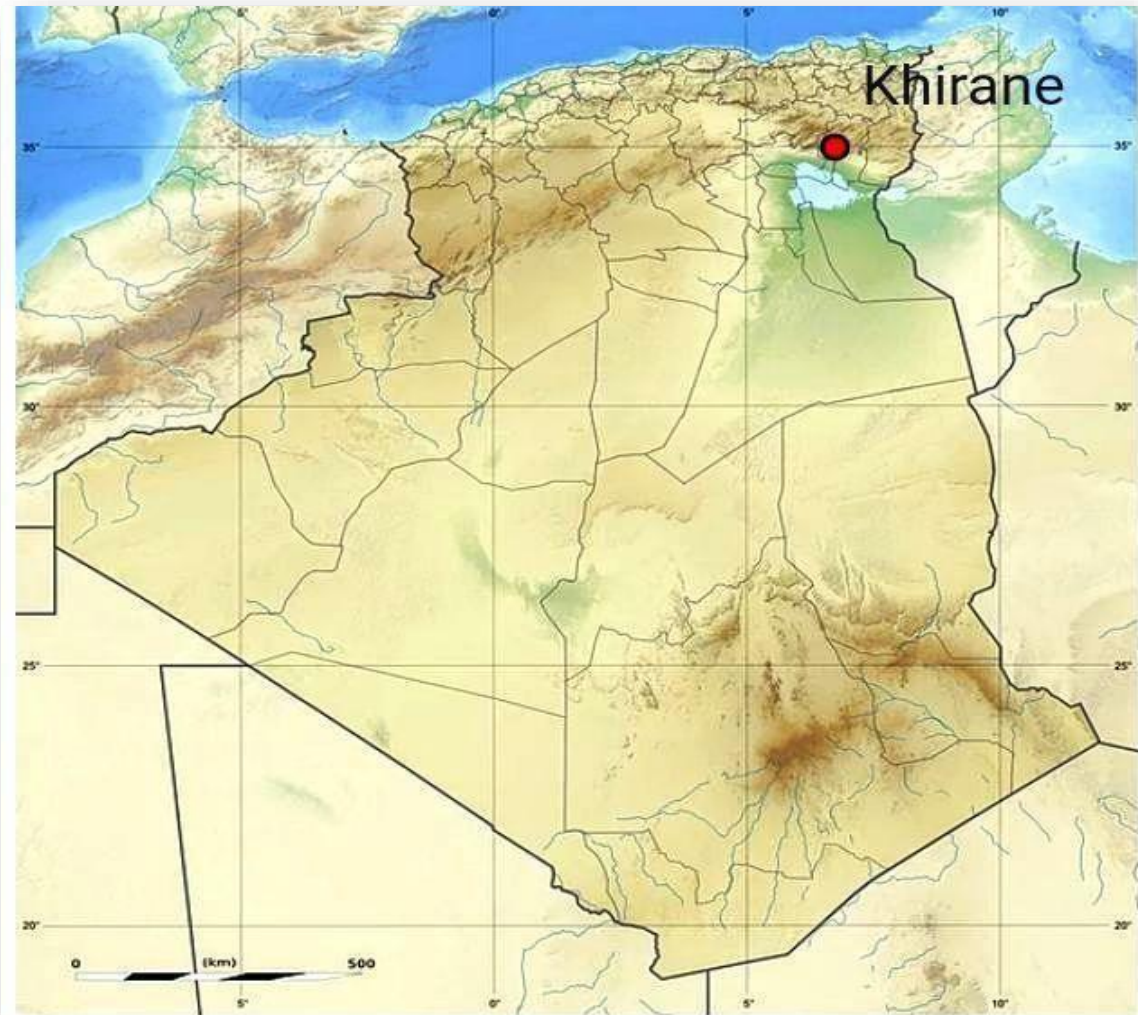


Figure 2: Géolocalisation de la carte de la région khirane sur la carte d'Algérie

I.2 Etude phytochimique

I.2.1 Matériel végétale et la récolte

❖ Description botanique de romarin

Rosmarinus officinalis appartient à la famille botanique des Lamiacées au sein du genre *Rosmarinus*. C'est un arbrisseau toujours vert de 0,5 à 2 m. La tige ligneuse est couverte d'une écorce grisâtre et se divise.

Feuille

Les feuilles sont étroitement lancéolées linéaires, faibles et coriaces, les fleurs d'un bleu pale, maculées intérieurement de violet sont disposées en courtes grappes denses s'épanouissent presque tout au long de l'année (gonzalez-trujano et al., 2007 ; AtikBekkara et al., 2007).

Fleure

Les fleurs sont des pentamères, en général Hermaphrodites. Le calice est plus ou moins bilabié persistant et la corolle bilabée, longuement tubuleuse, parfois à 4 -5 lobes subégaux ou à une seule lèvre inférieure trilobée, la supérieure est bilobée. L'androcée est formé de 4 étamines, la cinquième étant très réduite, parfois 2 étamines et 2 staminodes. Le Gynécée forme 2 carpelles biovulés subdivisés chacun par une fausse cloison en 2 logettes uniovulées (Madadori, 1982). Le style bifide gymno basique est le fruit constitué par 3 akènes plus ou moins soudées par leur face interne.

Racine

C'est la partie souterraine de la plante, spécialisée dans l'absorption de l'eau et des sels minéraux et dans la fixation au sol, la racine du *Rosmarinus officinalis* est profonde et pivotante.

Tige

Arbuste ou sous arbrisseau, rameau de 0.5 à 2 mètres cette tige est tortueuse, anguleuse fragile. L'écorce est linéaire à cyme axillaire plus ou moins simulant des épis (Sanon, 1992).

Fruit

Est tétrakène de forme ovale située au fond du calice. Peut être sous forme de baie, sèche et lisse.

❖ La récolte

Au mois de mai 2024 on a récolté la partie aérienne de *rosmarinus officinalis* dans la région de khirane de la wilaya de kenchela. Une fois la récolte terminée, la partie de la plante a été rincée à l'eau courante pour la conserver et éliminer la poussière et autres particules, ensuite la plante a été séchée à l'ombre dans un environnement sec et aéré pendant une période de 11 jours, la partie récoltée de la plante a été divisée en petits morceaux . afin de favoriser leur séchage rapide.

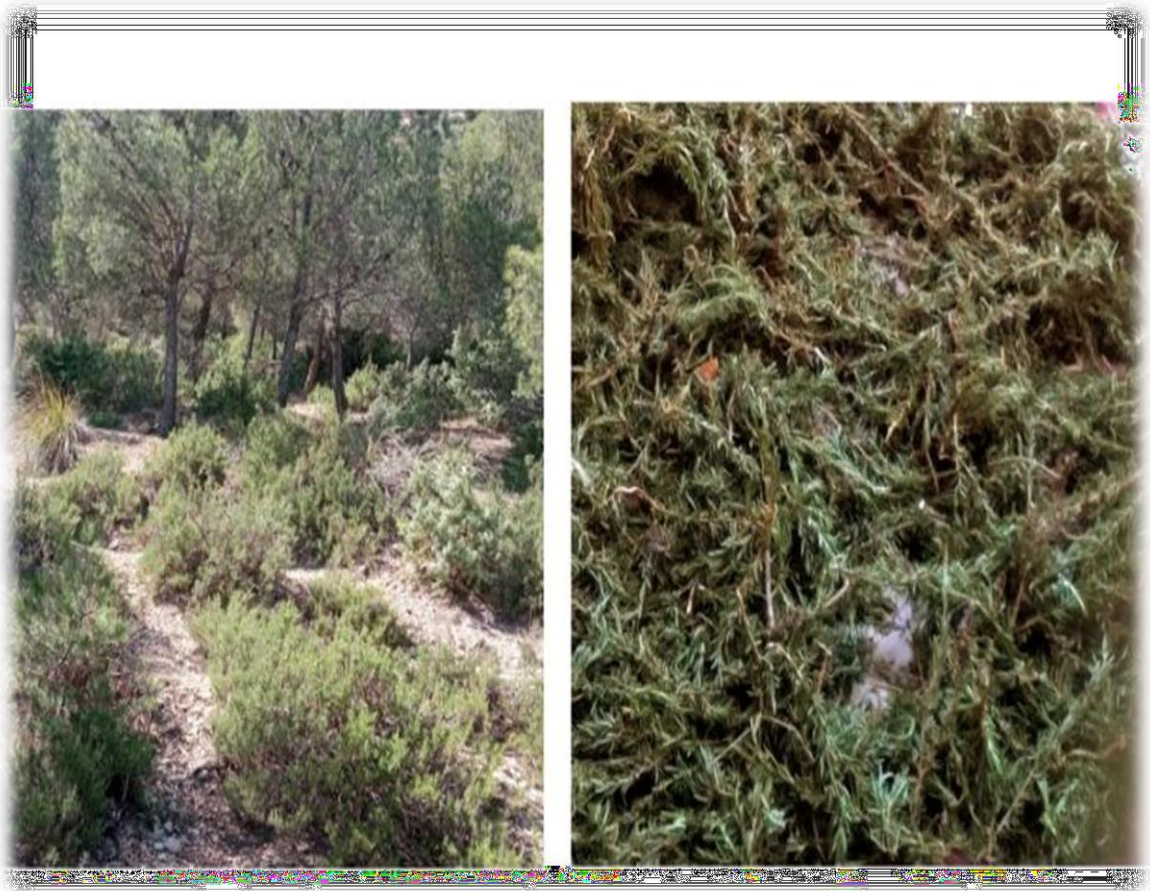


Figure 3: Plante de romarin pendant la récolte et le séchage.

Après le séchage d'échantillon on le broie dans un robot jusqu'à l'obtention d'une poudre de romarin.



Figure 4: Le romarin après le broyage.

I.2.2 Essais préalables

I.2.2.1 Mettre en évidence Les flavonoïdes

On utilise 3g de la poudre de romarin avec 80 ml d'eau distillée dans un bécher. Le mélange est mis à bouillir pendant 15 min. On filtre et on laisse refroidir. **(In Mbodj, 2003).**

➤ Coloration en milieu alcalin

En milieu alcalin, la dissolution des flavonoïdes est facile et donne des couleurs allant du jaune au brun. A 2ml de l'extrait, on ajoute quelque millilitre de NaOH au 1/10 dans un tube à essai. Coloration jaune orangé, donc le test est positif **(in Mbodj, 2003).**

➤ Coloration perchlorure de fer (FeCl₃)

Les flavonoïdes en raison de propriétés phénolique dans leurs génies, ils produisent des couleurs différentes avec dilutions de FeCl₃. A 2 ml de solution extractive on ajoute 2 à 3 gouttes d'une solution de FeCl₃ diluée à 2 % (1,7g de FeCl₃ avec 50 ml eau distillée). On a eu une coloration verdâtre, indique que le test est positif **(in Mbodj, 2003).**

➤ Réaction de cyanidine

En solution alcoolique, les flavonoïdes donnent des colorations variées allant du rouge – orangé ou violet. Par introduction dans un tube 2ml de l'extrait. On ajoute 2 ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 96° = 2 volumes ; eau = 2volume ; Hcl concentré= 1 volume). Coloration orange puis violette donc le test est positif (**in Mobdj, 2003**).

I.2.2.2 Mettre en évidence des tanins

On verse 5g de poudre dans 100 ml d'eau bouillante dans un erlenmeyer, après une infusion de 15 min le filtrat est filtré on ajoute 100 ml de l'eau distillée. On introduit 5 ml d'infusé à 5% dans un tube à essai, puis on ajoute 1 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 1% (0.8g de FeCl₃ avec 50 ml de l'eau distillée). En présence de tanin, il se forme une coloration verdâtre ou bleu noir (**Edeogal et al., 2005**).

➤ Tanin gallique

On ajoute 15 ml de réactif de Stainsy à 30 ml de solution à 5 %, puis on chauffe au bain-marie à une température de 92C° pendant environ 15 minutes. Une fois le filtrat filtré, il est saturé avec 5g d'acétate de sodium. On ajoute alors 1 ml goutte à goutte d'une solution de FeCl₃ à 1 % la constatation d'une teinte bleu noir montre la présence de tanins gallique. (**Edeogal et al., 2005**).

➤ Tanin catéchique

Ajouter 5ml de solution de Hcl concentré à 5 %.L'ensemble est bouillonné pendant 15 min, puis on le filtre sur du papier filtre. Si des tanins catéchiques sont présents.un précipité rouge se forme (**Edeoga1 et al. ,2005**).

I.2.2.3 Mettre en évidence des mucilage

Placé 1 ml de décocté à 10 % dans un tube à essai et 5 ml d'éthanol absolu sont ajoutés. Après une dizaine de minutes, le mélange se transforme en un précipité floconneux, donc la présence de mucilage (**karumi et al.,2004**) .

I.2.2.4 Mettre en évidence des coumarins

Dans un tube à essai on ajoute 1g de la poudre, puis il est recouvert d'un papier imbibé d'une solution de NaOH et placé dans un bain –marie pendant quelques minutes. On ajoute 0,5 ml de NH₄OH (10%), puis appliqué deux taches sur papier filtre. Et étudiée sous l'effet de la lumière ultraviolette. La présence des coumarines est confirmée par la fluorescence des taches (Rizk, 1982).

I.2.2.5 Mettre en évidence des alcaloïdes

On incorpore 10g de la poudre dans un bécher puis on ajoute 50 ml de H₂SO₄ dilué 1/10 puis laisse macéré à la température du laboratoire, après filtré le filtrat sur papier lavé avec l'eau distillée (Dohou et al., 2003).

➤ Réaction de caractérisation

1ml de solution filtré + 5 gouttes du réactif de MAYER . Si un précipité se forme, cela signifie qu'il y a des alcaloïdes (précipité blanc- jaunâtre).

1ml de liquide filtré + 5 gouttes du réactif de WAGNER. (2g de KI et 1.27 g d'I₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée)

Si un précipité brun se forme, cela signifie qu'il y a des alcaloïde (Dohou et al., 2009)

I.2.2.6 mettre en évidence des saponosides

On porte à ébullition 100 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 250 ml puis on ajoute 1g de la poudre ensuite on maintient une ébullition pendant 15 min . Après filtration, on ajuste le filtrat à 100 ml. On remplit 1 ml du décocté à 1% préparé dans un tube à essais et on ajuste le volume à 10 ml avec l'eau distillée.

Pour confirmer la présence des saponosides, il faut former une mousse.

I.2.3 Préparation de l'extrait méthanolique

Dans un bécher on ajoute 50 g de la poudre sèche avec 200 ml de solution méthanolique (150 ml de CH₃OH+ 50 ml l'eau distillée), après le bécher entier a été recouvert et on place sur l'agitateur pendant 24 h. Ce protocole pour obtenir 3 extraits méthanolique à partir des 3 quantités de poudres (3 macération) , puis on filtre les mélanges et on évaporés à basse température 40°C° avec un rot à vapeur.

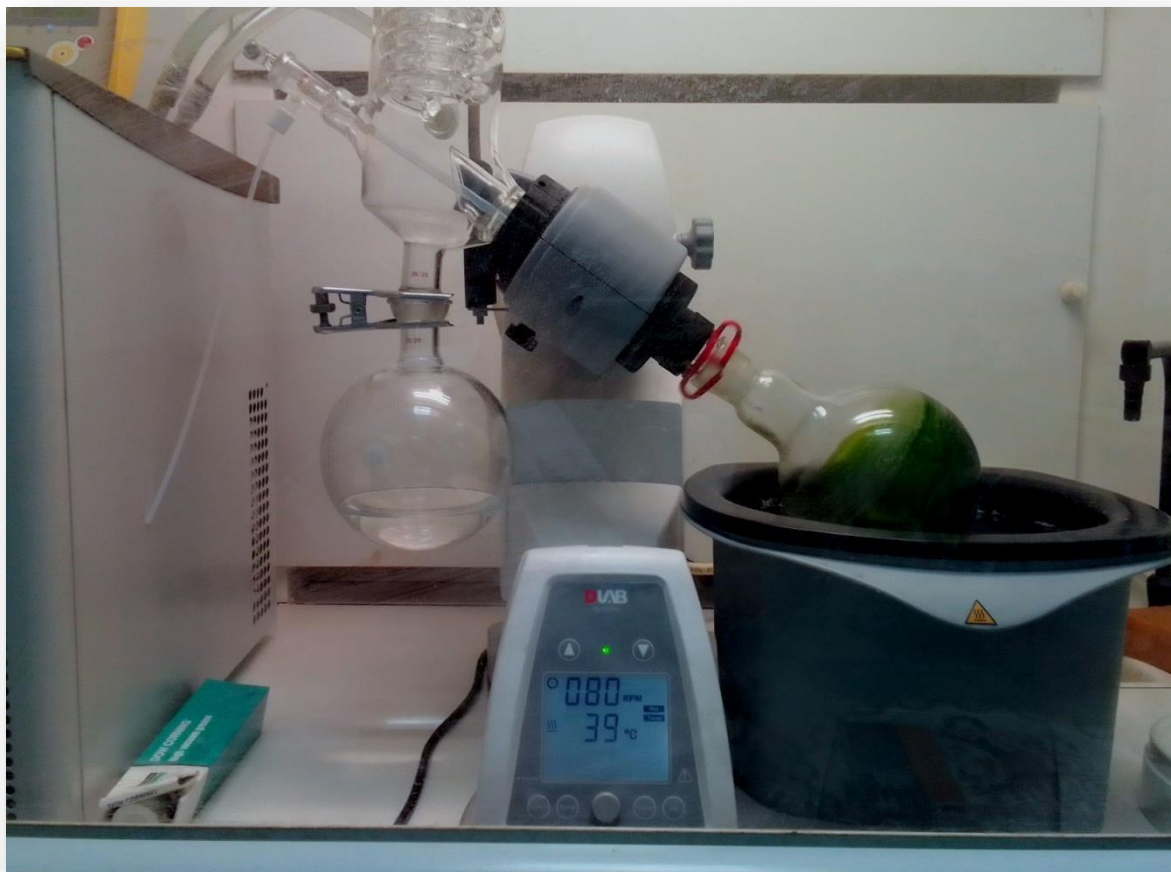


Figure 5: Photographe de Rot vapeur.

- **Calcule le rendement**

La formule suivante permet de calculer le rendement en pourcentage.

$$R = 100 m / m_0$$

R : le rendement en %.

m : la masse de l'extrait .

m₀ : la masse initiale de la plante

I.2.3.1 Dosage des polyphénols tatoux

- **Principe :**

La teneur en composés phénoliques d'extraits de romarin officinalis (EMC) a été estimée par la méthode de folin-ciocalteu selon (Li et al., 2007) basée sur la réduction en milieu alcalin

de mixture phosphotungstic (WO_4^{2-}) phosphomolybdic (MoO_4^{2-}) duré actif de Folin par groupement oxydables des compses polyphénolique.

- **Mode opératoire**

Dans un tube a essai on ajoute 1 ml de folin 1/10 (1 ml folin +9 ml eau distillée) à 200 μ l d'échantillon, puis une durée 5 min on met 600 μ l de solution $NaCO_3$ (0,18 g + 25 ml eau distillée). Après une incubation de 2 heurs a température aumibante on evalue l'absorbance à 765 nm.

La concentration des polyphénols est calculée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-600 μ l).

I.2.3.2 Dogase des flavanoides

- **Principe :**

La présence d'un groupement hydroxyle libre dans les flavonoïdes, en position 5, peut entraîner la formation d'un complexe coloré avec le chlorure. Par chélation des métaux, les flavonoïdes se transforment en complexes jaunâtres.

Cela indique que le métal perd deux électrons afin de s'associer à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique qui jouent le rôle de donneurs d'électrons.

- **Mode opératoire :**

Afin de préparer les échantillons, 2 mg de solution de carbonate de sodium doivent être utilisés dans un méthanol, puis en ajoute 1 ml dans chaque échantillon après 4 min en commence de réaction, on peut mesurer l'absorbance

Pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chaque extrait il faut faire une gramme étalon est établie séparément avec la quercétine (0-40 μ g /ml).

I.3 Etude antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de la plante consiste à estimer l'inhibition de la croissance des bactéries testées. Cette activité est évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélose basée à l'utilisation de disques stériles (**Cavallo et al., 2006**).

I.3.1 Préparation d'extrait de l'huile essentielle de romarin

Toutes les fois, on mélange 50 g de la plante sèche avec 1 litre d'eau et on les place dans un ballon de deux litres. Tout cela est chauffé à ébullition pendant 3 h. Les vapeurs chargées d'huile essentielle traversant un réfrigérant de 40 cm se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, après récupérées dans de petits flacons (Caillet et Lacroix, 2007).

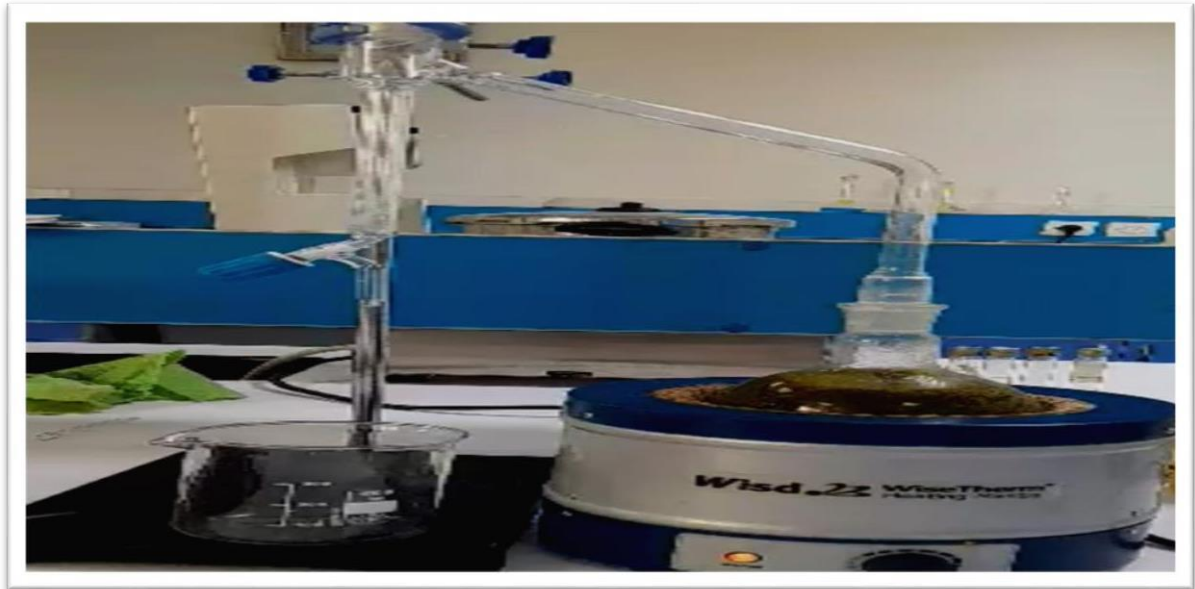


Figure 6:l'extraction d'huile essentielle.

I.3.2 Test antibactérienne

Les souches bactériennes sélectionnées :

- Escherichia coli à gramme négatif ATCC25922.
- Staphylococcus aureus à gramme positif ATCC2593.

Les staphylocoques sont des cocci à gram positif qui tendent à se grouper en amas (Nauciel,2000) irrégulier à la façon d'une grappe de raisin . Staphylococcus aureus est un germe aérobie - anaérobie facultatif (avril et al., 2000).

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. Escherichia coli est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers (Nauciel, 2000).

Tableau 1: Classification les souches bactériennes.

Classification	Staphylococcus aureus	E. Coli
Règne	Bacteria	Non défini pour embrenchemant
Classe	Bacilli	Gammaproteobacteria
Ordre	Bacillales	Ebterobacterales
Famille	Microccaceae	Enterobacteriaceae
Genre	Staphylococcus	Esherichia

I.3.2.1 Préparations de gélose (GN)

1) Mélange initial :

On met 14 g de gélose dans un 500ml d'eau distillée, après agiter sur agitateurs à chaud jusqu'à change de couleur jaune foncé.

Stérilisation et distribution :

On verse la gélose dans un flacon stérile bien close. Puis chauffer la solution au bain-marie.

Sortir la gélose du bain-marie et laisse refroidir, après distribuer la gélose dans 3 boites de pétri stériles plus proches d'un bec bunsen.

2) Solidification :

On laisse la gélose bien solidifier pendant 10 min

3) Préparation des souches bactériennes :

Prélever un échantillon de chaque bactérie avec une boucle de platine stérile. Puis inoculer les trois boîtes de pétri par déploiement sur la gélose. Après Clos les boîtes et incuber à 37c° pendant 24 h.



Figure 7 : Préparation des souches bactérienne

1.3.2.2 Préparation du milieu de MH

Préparer 40g de MH avec 1 litre d'eau distillée dans trois boîtes de pétri. Ensuite agiter et chauffer jusqu'à ébullition pour dissoudre.

Incuber dans un bain-marie.

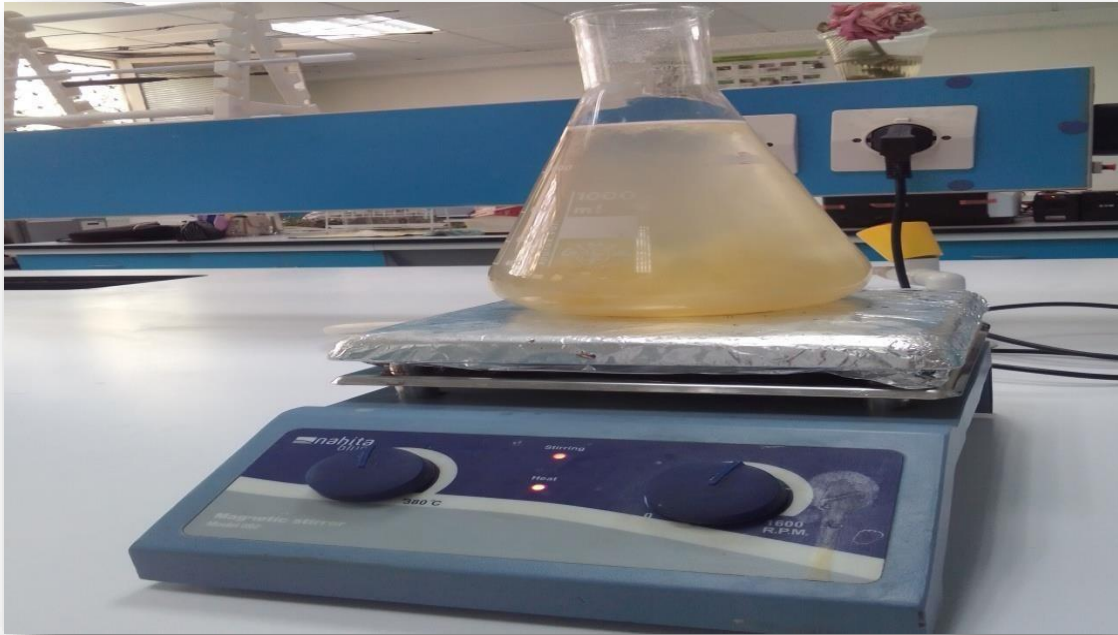


Figure 8 : Solution de MH.

1) Distribution et solidification

Verser le MH dans trois boîtes de pétri stériles et laisser solidifier quelques minutes.

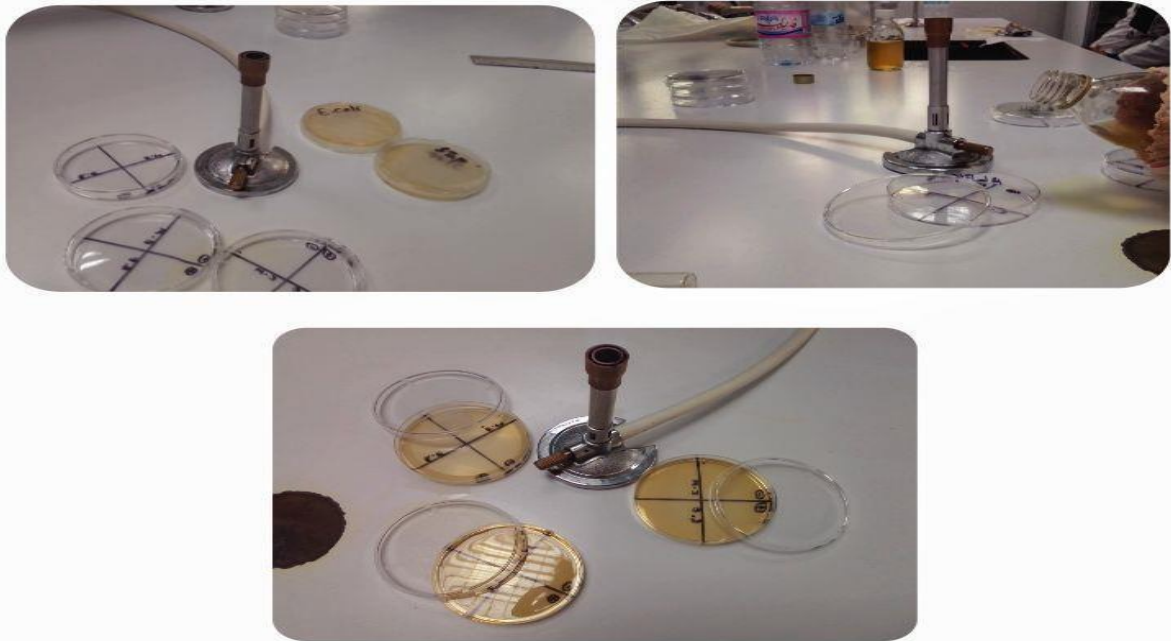


Figure 9 : Distribution et solidification le MH.

2) Préparation des échantillons

-Préparation des tubes de sérum physiologique :

On prépare trois tubes de 10 ml de sérum physiologique, puis stériliser les tubes dans un autoclave à 120 C° pendant 20 min.

- Préparation des dilutions :

Prélever un échantillon de chaque bactérie par écouvillon stérile. Ensuite transférer dans le premier tube de sérum physiologique et mélanger bien, puis égoutter légèrement l'écouvillon sur le côté du tube.

Répéter le processus pour les deux autres tubes.

I.3.2.3 Ensemencement et test antibactérienne

1) Ensemencement sur MH :

Diviser chaque boîte en quatre sections à l'aide d'un marqueur :

- + Zone négative : eau distillée.
- + Zone positive : antibiotique oxacilline.
- + Zone pour extrait méthanolique.
- + Zone pour HE.



Figure 10: Ensemencement et test antibactérienne.

1) Application des disques :

On place des disques stériles de 6 mm de diamètre sur chaque section de 6 mm de diamètre sur chaque section de la boîte, Puis ajouter respectivement l'eau distillée, l'antibiotique oxacilline, l'extrait méthanolique et huile essentielle sur les disques appropriés, puis laisser sécher.

2) Incubation :

Fermer les boîtes de pétri avec des parafilm. Puis incuber à 37C° pendant 24 h.

1.3.2.4 Lecture des résultats

1) Analyse des zones d'inhibition :

Mesurer les diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque, après comparer l'efficacité antibactérienne de chaque traitement.

I .4 Etude antioxydants

+ Principe :

Le DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) qui est un radical libre instable en acceptant un radical hydrogène, devient une molécule stable.

L'effet des antioxydants sur se traduit par leurs capacités à lui donner un radical hydrogène.

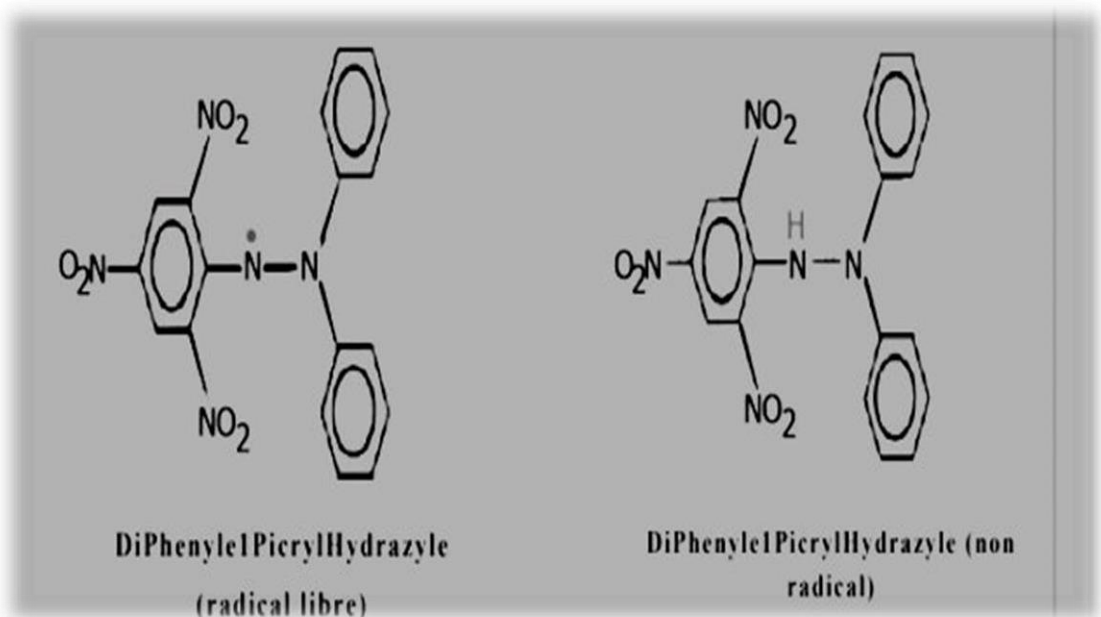


Figure 11 : Forme libre et réduit de DPPH.

Mode opératoire :

Tout d'abord, on prépare une solution DPPH comme suit :

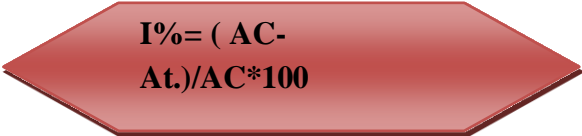
- On ajoute 5 mg de la poudre DPPH dans un 100 ml de méthanol.
- Ensuite on met 1 ml de la solution méthanolique du DPPH est ajouté à 1 ml de solution méthanolique d'extrait de plante romarin.
- Le mélange résultant est agité dans des tubes incubés à température ambiante et à l'observait pendant 30 min
- Un témoin négatif composé d'1 ml de la solution méthanolique de DPPH et 1 ml de méthanol.
- le blanc renferme uniquement 2 ml de méthanol.

La lecture est effectuée à 517 nm (Sanchez-Morena, 2002). L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif aux mêmes concentrations des extrait.

Expression des résultats :

- Calcul des pourcentages d'inhibitions :

Nous déterminons ainsi les pourcentages d'inhibition grâce à la formule suivante :


$$I\% = \frac{AC - At.}{AC} * 100$$

AC : Absorbance du contrôle.

At. : Absorbance du test effectué.

La concentration de l'extrait essentiel pour balayer 50% des radicaux libres ou IC50 a été calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés.



Résultats et discussion

II Résultats de l'étude phytochimique

II.1 Mettre en évidence des compositions Phytochimique :

Les testes phytochimique de la plante *Rosmarinus officinalis* ont montré les résultats indiqués dans tableau – ci- dessous :

Tableau 2:Compositions chimique de romarin.

Composition	Résultat
Alcaloïdes	–
Tanins	+
Coumarin	–
mucilage	+
Saponosoides	+
Flavonoïdes	+

Présence (+) ; Absence (-).

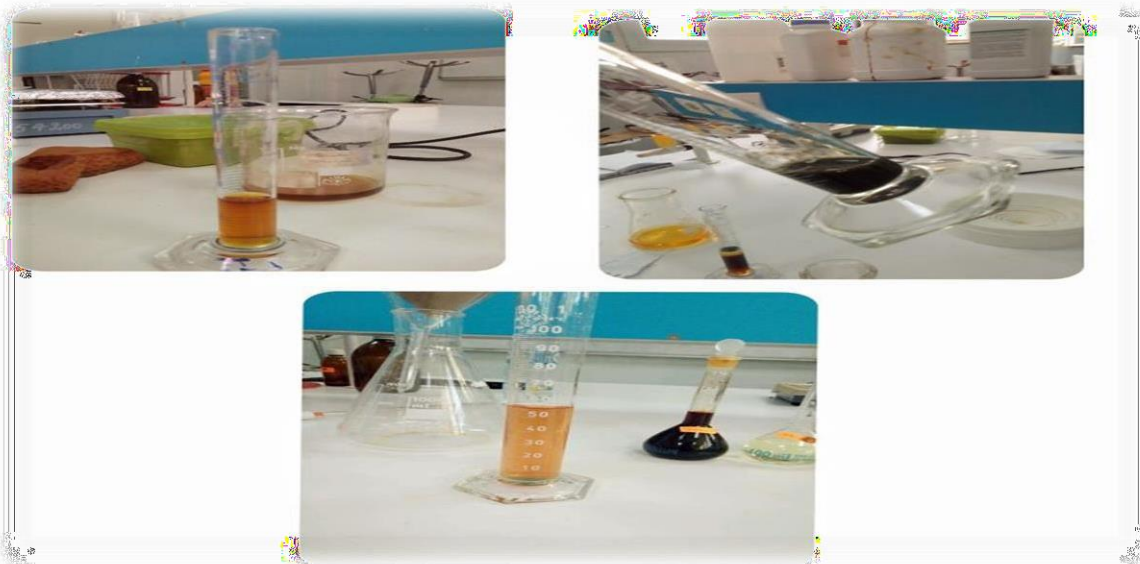


Figure 12 : Test phytochimique d'indentification des flavonoïdes

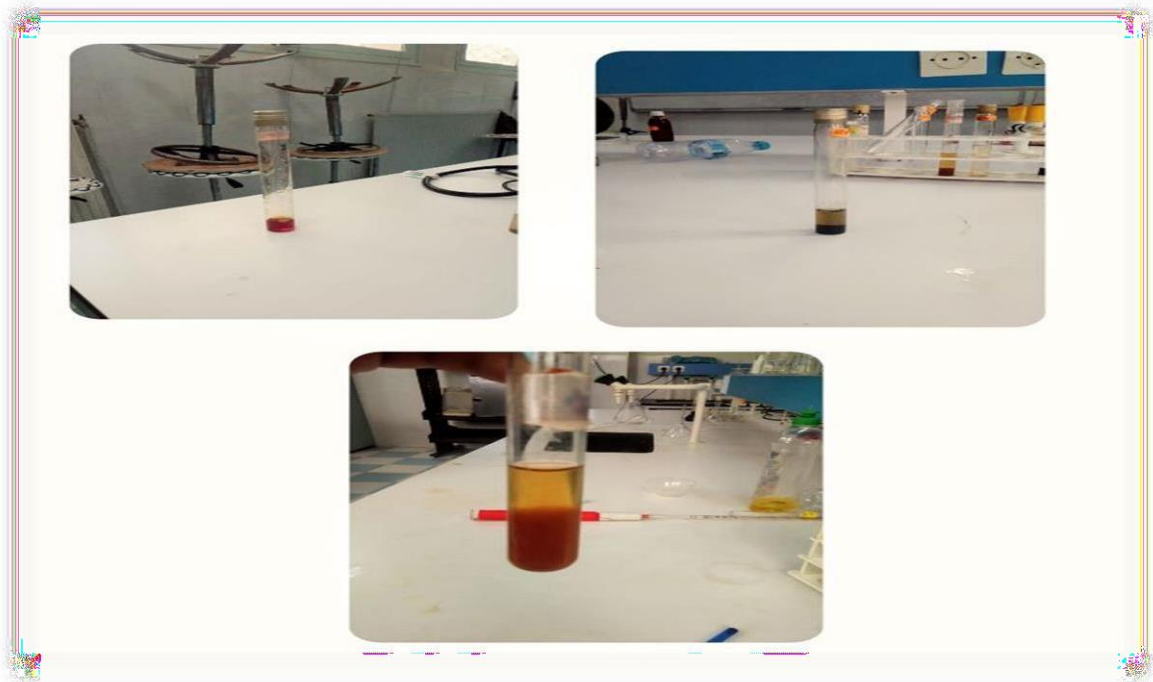


Figure 13 : Test phytochimique d'indentification des tanins.

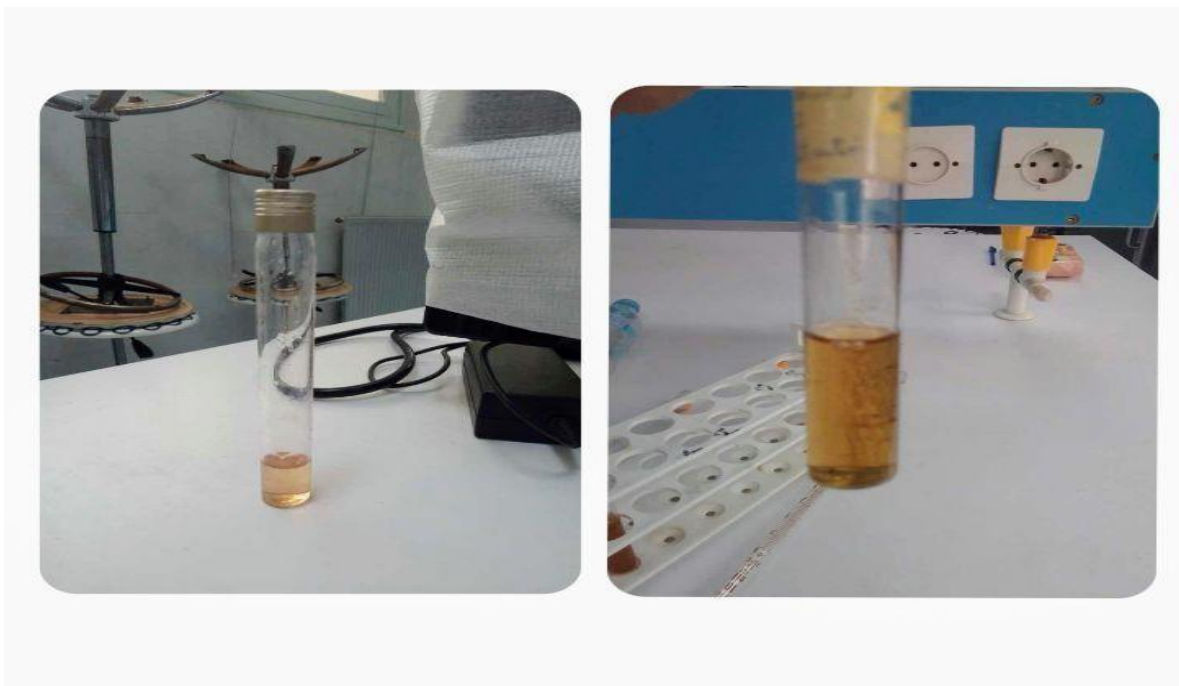


Figure 14 : Test phytochimique d'indentification des mucilages.

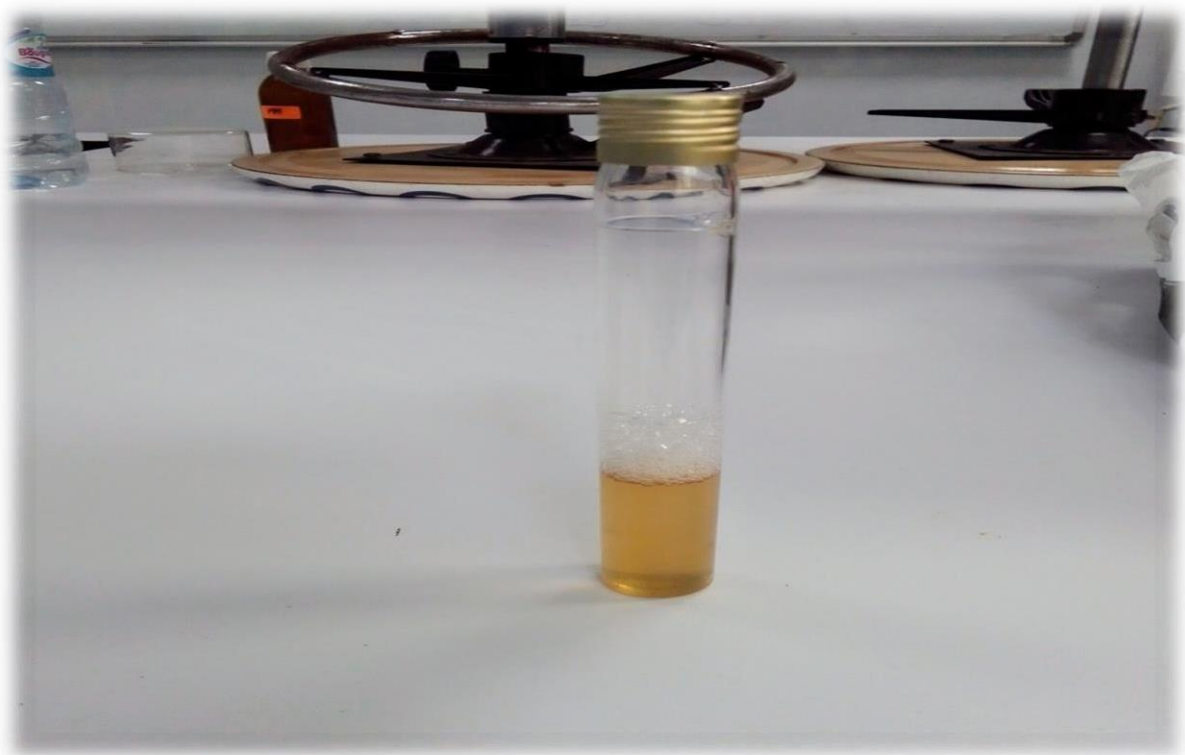


Figure 15: Test phytochimique d'indentification des saponosides.

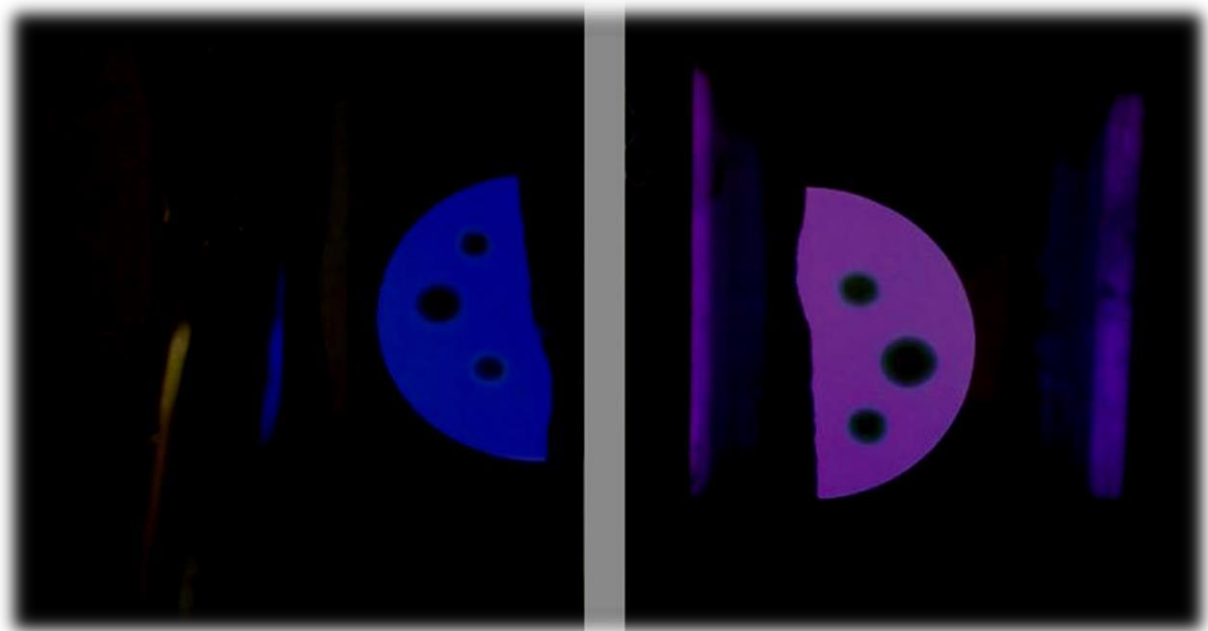


Figure 16: Test phytochimique d'indentification des coumarines.



Figure 17 : Test phytochimique d'indentification des alcaloïdes.

II.2 Résultats de l'extrait méthanolique

L'extraction de a 50g de la poudre de romarin avec du méthanol a donné un extrait méthanolique avec un rendement indiqué dans un tableau suivant :

Tableau 3: Rendement de l'extrait méthanolique.

La quantité d'extrait à partir de 150g	Rosmarinus officinalis
Rendement (g)	10.78
Rendement %	9.33

A partir de 150g de la plante romarin l'extraction méthanolique a donné 9.33 %. Alors la différence entre le rondement en g et le rendement en gramme est donc de 1.14mg.

II.3 Résultats des dosages polyphénols et flavonoïdes

On montre les résultats du dosage des polyphénols et des flavonoïdes dans le tableau suivant :

Tableau 4: Teneur des flavonoïdes et polyphénols.

Teneur (mg EAG/g)	Rosmarinus officinalis
Teneur polyphénols	129.55
Teneur flavonoïdes	85.8

✚ **Représentation les teneurs des flavonoïdes et polyphénols dans un cercle relatif**

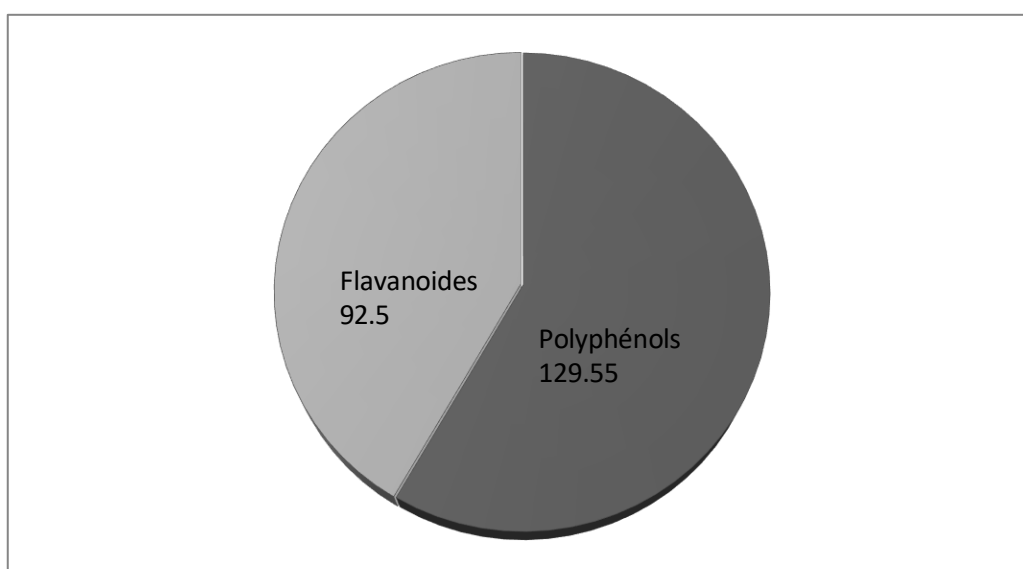


Figure 18 : Présentation graphique les teneur des polyphénols et flavanoïdes.

✚ **Représentation les dosage des flavonoïdes et polyphénols dans des courbes d'étalonnage.**

On présente le dosage des polyphénols et flavanoïdes comme suite :

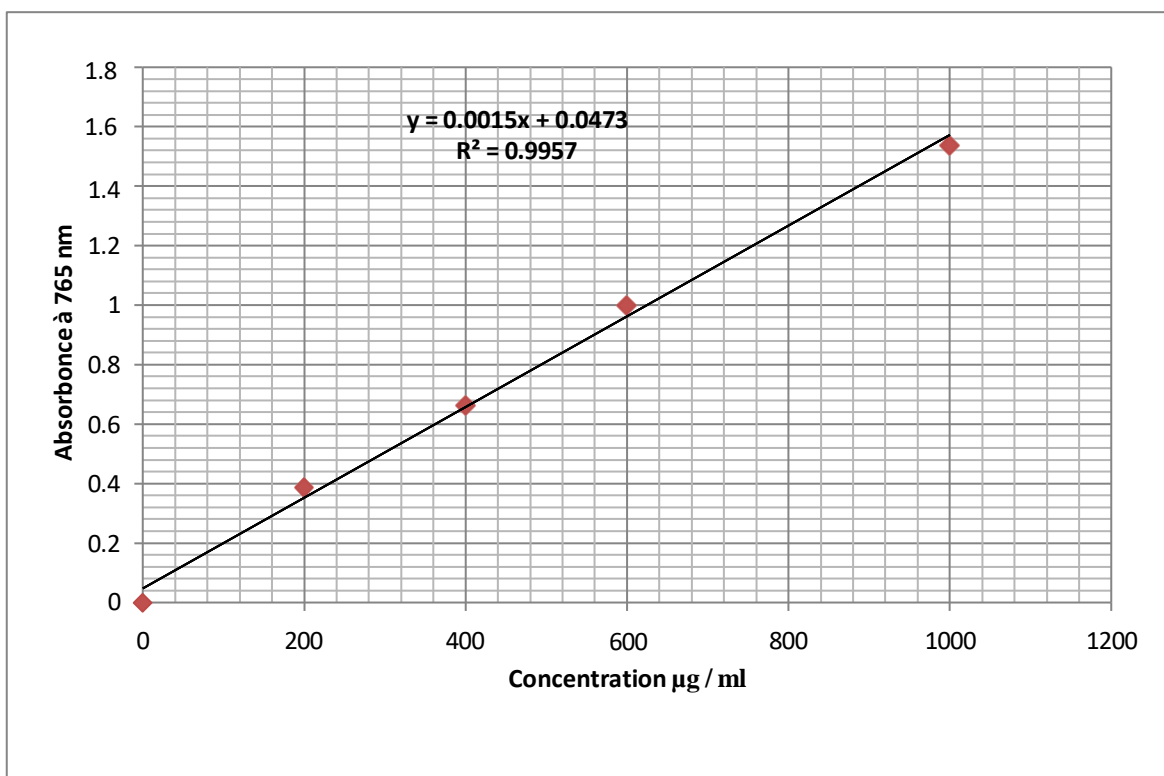


Figure 19: Droits d'étalonnage de l'acide gallique.

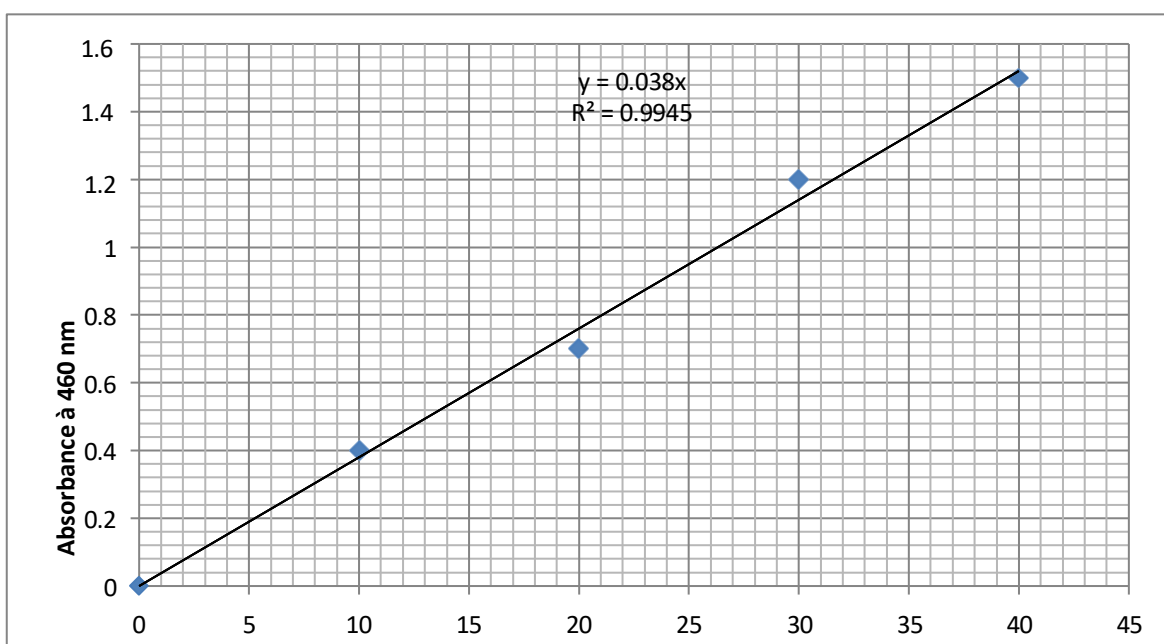


Figure 20 : droits d'étalonnage de quercétine.

Les résultats montrent que l'extrait méthanolique contient 129.55 mg polyphénols et 92.5mg flavonoïdes, Donc l'extrait méthanolique est riche en polyphénols et flavonoïdes.

Lors d'expériences phytochimique sur des composés chimiques, nous avons constaté que l'extrait en poudre de romarin contient des flavonoïdes, mais lors d'un dosage sur l'extrait méthanolique nous avons constaté que sa quantité est inférieure à celle des polyphénols.

La teneur d'extrait méthanolique du *Rosmarinus officinalis* est si proche à celle de **Erkan et al., (2008)** : (162 mg EAG/g) et **Ho et al., (2008)** : (127 ± 3 mg EAG/g),

II.4 Résultats de l'étude antibactérienne

II.4.1 Résultats de l'extrait de l'huile essentielle de romarin:

L'huile essentielle a été extraite du romarin par hydro distillateur de type clevenger .Nous avons obtenu une huile de couleur jaune avec une odeur agréable et fraîche (**Laiche et Mecheri, 2023**). Le rendement de l'extraction indique dans le tableau suivant :

Tableau 5:Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de romarin.

La quantité d'extrait à partir de 3 kg	Extrait de l'huile essentielle de romarin
Rendement en %	2%
Rendement en ml	11 ml

II. 4. 2 Résultats des tests antibactérienes

Dans le cadre de nos travaux d'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique et huile essentielle de romarin, il en est ressorti les résultats suivante :

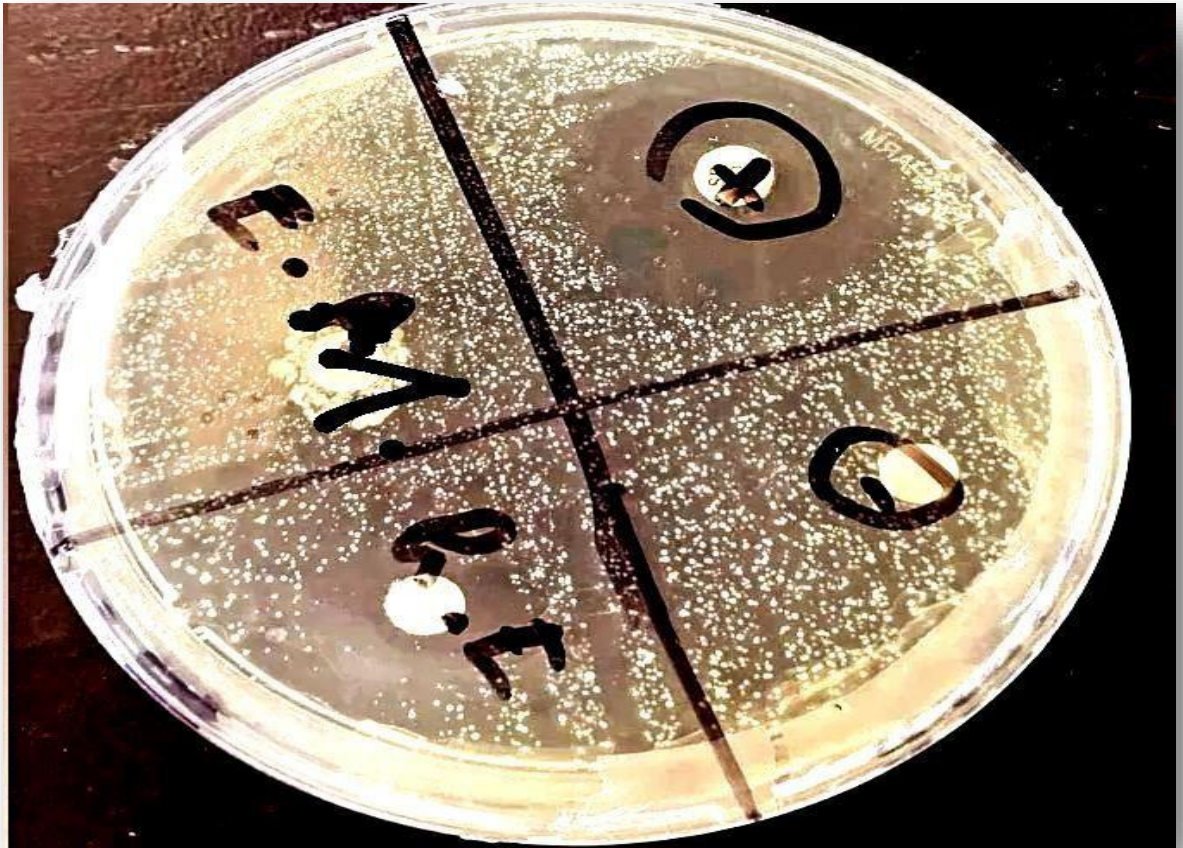


Figure 21: Photographie de test sur la souche staphylococcus.

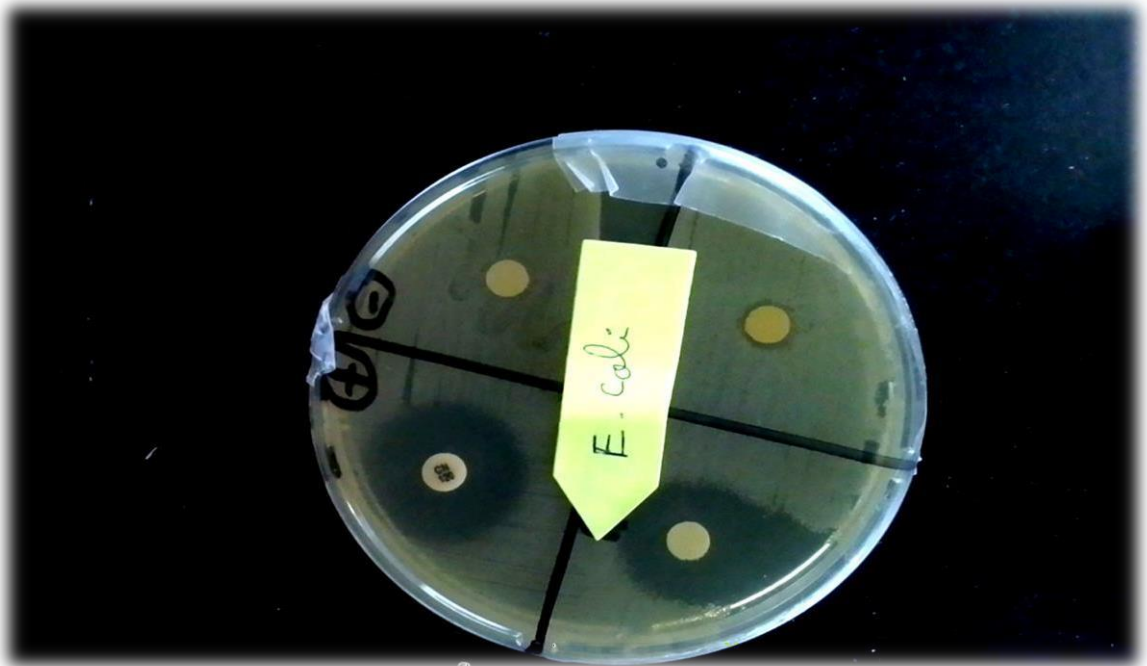


Figure 22: Photographie de test sur la souche staphylococcus.

Tableau 6: Moyenne des zones d'inhibition de staphylococcus

Les zones d'inhibition	Sensibilité	Diamètre (mm)
Eau distillé	Nulle	0 (négative)
Extrait méthanolique	Nulle	0(négative)
Huile essentielle	Très sensible	17
Antibiotique	Extrêmes sensible	32

Tableau 7: Moyenne des zones d'inhibition d'E. Coli.

Les zone d'inhibition	Sensibilité	Diamètre mm
Eau distillé	Nulle	0
Extrait méthanolique	Sensible	8
Huile essentielle	Très sensible	19
Antibiotique	Extrêmes sensible	21

Les résultats des tests contre les bactéries nous ont montré ce qui suit :

En ce qui concerne les résultats de zone positive d'antibiotique, il s'est avéré qu'elle avait un effet et une activité puissante contre les bactéries, car le taux d'inhabitation d'E. Coli et des bactéries atteignait 18 mm, ce qui signifie qu'elles y sont extrêmes sensibles.

Quant aux résultats de région pour l'huile de romarin, nous constatons qu'elle a un fort effet contre les deux types, car nous avons enregistré le même taux d'inhibition pour les deux avec 18 mm, ce qui signifie qu'ils sont très sensibles a l'huile de romarin.

Quant à l'extrait méthanolique de romarin, nous constatons qu'il a une activité contre la bactérie staphylococcus.

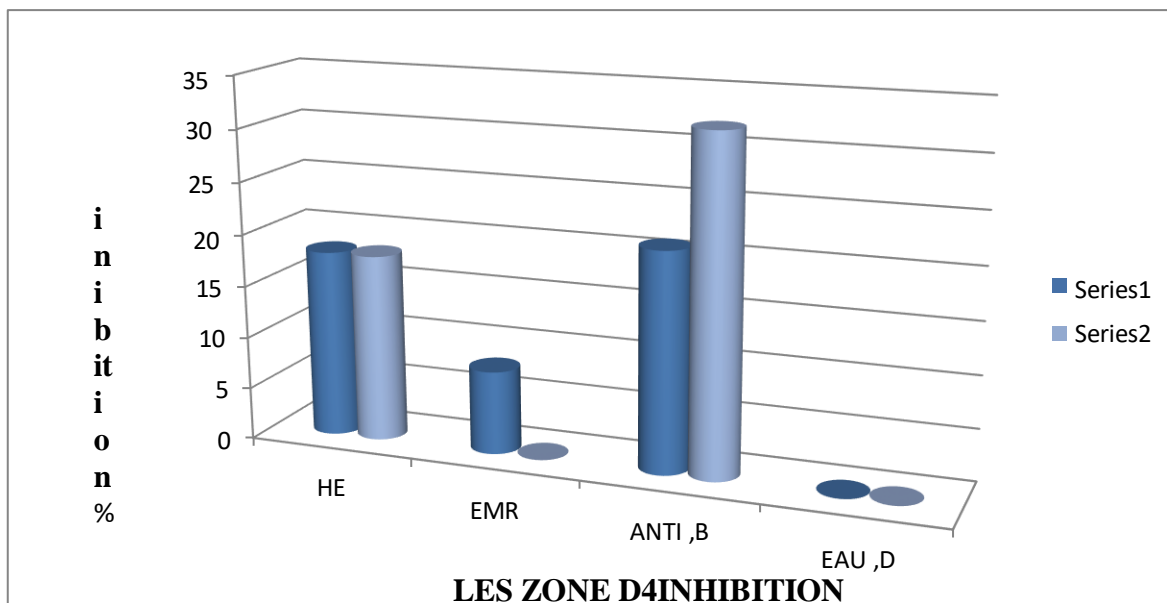


Figure 23: Histogramme de moyenne des zones inhibition des souches sélectionnée.

Donc les bactéries ont une résistance à la zone négative, alors qu'elles ont une forte sensibilité à l'huile essentielle et antibiotique.

Ainsi, nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par (Miliani, 2012) où l'extrait méthanolique n'avait pas enregistré une activité antibactérienne vis-à-vis des deux souche testées.

II.5 Résultats de l'étude antioxydante

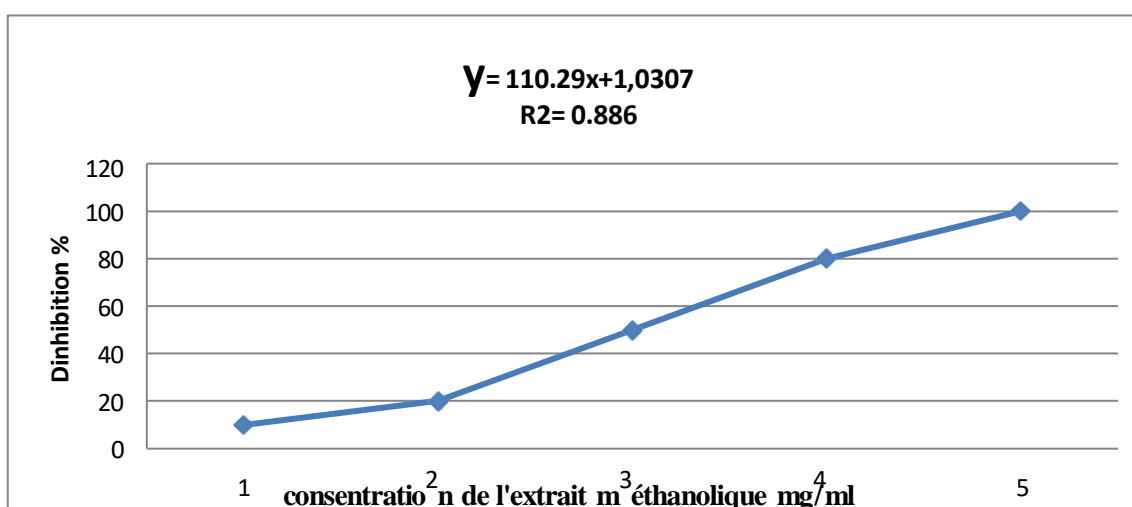


Figure 24: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations d'EM.

✚ **Calculer IC50 :**

La capacité antioxydant d' extrait a été déterminée par IC50, la concentration requise pour réduire les radicaux libres de 50 %.

Le calcul s'effectue comme suit : $(y-b/a)$

donc :

$$IC50 = 0,45 \text{ mg / ml.}$$

Les résultats montrés une bonne activité antioxydant sa valeur a atteint 0.45 mg/ml.

Nos résultats montrent une efficacité plus forte par rapport à l'étude de **(Taroq et al. 2008)** qui ont enregistré IC50 à l'ordre de 0.31 ± 0.009 mg/ml.

Par conséquent, l'extrait de méthanol a une forte activité antioxydant.



Conclusion

Conclusion

La wilaya de kenchela fait partie des états riches en plante aromatique, le romarin, car c'est un état riche en chaînes de montagnes , ce qui en fait un foyer pour les humains.

Nos travaux à travers des études physico-chimiques et bactériennes du romarin nous ont conduit à des à certains résultats.

L'étude physico-chimique a montré que le romarin est riche en flavonoïdes, mucilages, tanins, saponosides

Le rendement moyen de l'extrait méthanolique était de 9.33 % et le dosage de polyphénols et flavonoïdes a montré qu'il s'agit d'un extrait riche en ces composés

D'une part, l'étude de l'activité du romarin contre les bactéries à travers ses extraits a montré que ;

Le rendement de l'extraction de l'huile essentielle était 2%.

L'effet de huile essentielle du romarin sur les 1 souches sélectionnée son effet est très fort, ce qui signifie que les bactéries E. coli et staphylococcus n'y ont aucune résistance. C'est – à- dire qu'elles sont très sensibles à cette huile. Contrairement à l'extrait méthanolique, où l'on constate très faible et nous en concluons que l'huile a une propriété distinctive de réduire la croissance des bactéries.

Concernant l'étude antioxydant, nous concluons que l'extrait de la plante romarin a une forte activité antioxydant.

Par conséquent. notre étude est une considération de tests et de résultats préliminaires qui nécessitent des études plus approfondies pour obtenir des informations plus certaines.

Résumé

L'objectif de notre travail est basé sur la mise en évidence de la plante de romarin dans la wilaya de kenchela et la région de khirane afin d'étudier ses caractéristique phytochimique par des testes phytochimique aussi que d'évaluer son activité et efficacité antibactériennes et antioxydante.

Cette étude que la plante *Rosmarinus officinalis*.L ont montré est riche en les flavonoïdes, tanins, saponosides, mucilage, polyphénols

Les résultats d'une étude activité contre les bactéries ont montré que l'huile de romarin a une forte efficacité pour réduire la croissance des bactéries car nous constatons que *E. Coli* et *staphylococcus* sont très sensibles à cette huile (18 mm).

L'étude a prouvé que les deux bactéries ont une forte résistance à l'extrait méthanolique de romarin. En revanche, on constate que l'extrait méthanolique a une forte activité antioxydante

(IC50= 45 mg / ml).

MOTS Clés : romarin, huile essentiel, composés photochimique, antibactérienne, antioxydant.

المخلص

يرتكز عملنا بتسليط الضوء على نبات اكليل الجبل في منطقة خنشلة بهدف التعرف و دراسة مركباته الكيميائية عن اختبارات الفيز وكيميائية وكذلك تقييم نشاطه وفعالته ضد البكتريا

اظهرت نتائج الدراسة الفيز وكيميائية بان هذه النبتة غنية بالبوليفينول فلافونويد العفص الصمغ السابونيدات

اظهرت نتائج دراسة لنشاط ضد البكتيريا أن زيت إكليل الجبل لها فعالية قوية في تراجع نمو البكتيريا حيث نجد أن كل من البكتيريا القولونية و المكورات العنقودية حساستان جدا لهذه الزيت 18 مل

اظهرت هذه الدراسة ان كل من البكتيرييتين مقاومتان للمستخلص الميتانولي كما يظهر انها لها نشاط مضاد للأكسدة

Abstract

The objective of our work is based on highlighting the rosemary plant in the Khenchela province and the Khirane region to study its phytochemical characteristics through phytochemical tests, as well as to evaluate its antibacterial and antioxidant activities and effectiveness.

This study showed that the plant *Rosmarinus officinalis* L. is rich in flavonoids, tannins, saponins, mucilage, and polyphenols.

The results of the antibacterial activity study demonstrated that rosemary oil has strong efficacy in reducing bacterial growth, as evidenced by its significant effect on *E. coli* and *Staphylococcus*

The study proved that both bacteria have high resistance to the methanolic extract of rosemary. However, the methanolic extract showed strong antioxidant activity ($IC_{50} = 45$ mg/ml).

Keys words; Rosemary, Phytochemical, Antibacterial, Antioxidant, Oil rosemary

Les Annexe

ANNEXE

Les équipements de l'étude phytochimique :

Spectrophotomètre.

Agitateur vortex

Balance de précision

Rot vapeur R-215

Cuve de chromatographie.

Préparations les solutions chimique

AlCl₃ (1%) : 0.1g AlCl₃+ 5 ml eau distillée.

FeCl (1%) : 0.8g+50 ml eau distillée.

FeCl(2%) : 1 ,7g + 50 ml eau distillée

NH₄OH:1.5 g +3.5 ml eau distillée.

Folin (1/10) : 1ml+ 9 ml de folin.

L'équipement de l'étude antibactérienne.

Méthanol,

L'eau physiologique,

BaCl₂,

Gélose Nutritive,

Gélose de Mueller Hinton,

Bouillant nutritive

Les équipements

Autoclave

Four Pasteur

Etuve

Verrerie

Réfrigérateur

Boîtes de pétri.

Couvaient

Préparations les solutions :

Préparation le méthanol : 5 g+100 µl DMSO.

Les références

BOUZID, A., CHADLI, R., BOUZID, K.(2017), «Etude ethnologique de la plante médicinale Arbutus unedo L. dans la région de Sidi Bel Abbès en Algérie occidentale » *Phytothérapie*, V.15 , 373-378.

DOHOU N et al., (2003). Screening Phytochimique d' une Endémique IBÉRO-MAROCAINE : *Thymelaea lythroides*; *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 142 : 61 -78.

Edeoga1 H.O., Okwu D. E. et Mbaebie B.O., (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* . 4 (7) : 685-68.

Erkan N., Ayranci G., Ayranci E., (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis L.*) extract, blackseed (*Nigella sativa L.*) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* 110: 76-82.

Karumi Y., Onyeyili P.A., Ougubuja V.O., (2004). Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci.* 4(3):179-182.

Laiche Ch ., Mecheri M,(2023).Extraction des huiles essentielles et hydrolats.

Khabtane A., (2010). Contribution à l'étude du comportement éco-physiologique du genre *Tamarix* dans différents biotopes des zones arides de la région de khenchela. Mémoire de Master en biologie, Université abbes laghrour, khenchela,

Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F et Jiang Y., (2007).

Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Foodchem.* 102 : 771-776.

Laiche et Mecheri,(2023) : Extraction des huiles essentielles et hydrolat p(26).

Kaloustian., et hadj M (2012) La connaissance des huiles essentielles ;Qualitologie aromathérapie entre science et tradition pour une application médicale raisonnée Paris France collection phytothérapie protique.

Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El-Elimat T., (2007).

Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species.

Food Chem. (in press).

Richter J., et Schellenberg L (2007) Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/ gas chromatography analytical and bioanalytical chemistry 387 (6) 2207-2217.

Rizk A.M., (1982). Constituents of plants growing in Qatar. Fitoterapia. 52 (2):35-42.