



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur
et la recherche scientifique



Université Abbes Laghrou Khenchela

Faculté des sciences de la nature et de la vie

MEMIORE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

En biologie

OPTION : Biotechnologie et Amélioration des Plantes

Thème

*Etude de l'huile essentielle de
l'espèce *Rosmarinus officinalis*L.
et son activité antibactérienne*

Présenté par :

- Slimani Amira
- Miali Djamila

Jury de soutenance :

Présidente : Mme KADI K. MCA. Univ. Abbes Laghrou –Khenchela

Rapporteur :Mr mazouz L MAA Univ. Abbes Laghrou –Khenchela

Examineur: Mr Lebbaal MAA Univ. Abbes Laghrou –Khenchela

Année Universitaire 2015/2016

REMERCIEMENTS :

Nous remercions avant tout ALLAH tout puissant, de nous avoir guidé toutes les années d'étude et nous avoir donné la volonté, la patience et le courage pour terminer ce travail.

Nous remercions notre encadreur Mr, mazouz lakhdar pour ces conseils et ses orientations

Mme Kadi MCA de nous avoir fait l'honneur de présider le jury

Mr Lebbal MAA d'avoir accepté d'examiner ce travail

Nos remerciements vont également à tous les ingénieurs de laboratoire de l'université Abbas laghrour –KHENCHELA-

Nous ne pouvons oublier de remercier également tous nos enseignants et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

A toute la promotion 2016

AMIRA & DJAMILA

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à
la mémoire de mon regretté père :

Je prie Dieu de le garder à jamais dans ma mémoire et l'accueillir
en son vaste paradis
Ma merveilleuse mère, irremplaçable qui m'a offert tout le courage
et la volonté
d'étudier avec amour afin de devenir bénéfique,
Je t'aime maman tu es mon soleil.
Que Dieu lui procure bonne santé et longue vie.

A mes frères
Farid, Moussa ,Messaoud.

A mes soeurs
Safia ,Ibtissam Abla

A mes très chères amies.
Mariam, Mouna, Habiba , Souhila
A tous mes cher(e)s enseignant(e)s que Dieu les bénisse dans leur
travail
En fin, je remercie mon binôme Amira qui m'a aidé à la réalisation
de ce modeste
travail.

Djamila

DEDICACES

C'est avec une immense fierté que je dédie mon projet de fin d'étude aux deux personnes les plus chers à mon cœur, ces deux personnes m'ont offert l'amour et la volonté afin de toujours poursuivre mon idéal avec courage et honnêteté, a vous chère père et chère mère.

Je le dédie aussi :

A ceux à qui je porte beaucoup de respect et d'estime : mes Frères : Mounir et Abdalhalim

A mon Frère : Wacim et son épouse Sabah et leurs enfants : Iyade et Anfale.

A mon frère : Tarek et son épouse Karima et leurs enfants : Lou'aye ,line et Loujayne

A ma soeur : Ibtissam qui a contribué à ma réussite.

A ma sœur Amel et son mari Abdallah

A mes amis : Layla, Rima, Mariame , Warda , Khawla , Samia , Mouna , Saaida , Loubna , Rahima et Awatif .

A celle qui a partagé avec moi le travail ; mon meilleure amie : Miali Djamila

Et en dernier, je dédie ce mémoire à mes camarades de la promotion 2ème année master biotechnologie et amélioration des plantes.

AMIRA

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	
Dédicace	
Liste des Figures.....	
Liste des tableaux	
Introduction générale.....	I

PARTÉ THÉORIQUE

CHAPITRE N°1 : Aspects Botanique

1- Les plantes médicinales.....	1
2- Les lamiales.....	2
2-1 la famille des labiées	2
2-1-1 généralités.....	2
2-1-2 description de labiées.....	3
3- Fiche technique de (<i>Rosmarinus officinalis</i> L).....	3
3-1 taxonomie végétale.....	3
3-2 description botanique	4
3-3 origine et habitat	5
3-4 Aire géographique en Algérie.....	5
3-5 utilisation et propriétés du romarin.....	7
3-5-1 utilisation.....	7
3-5-2 propriétés	7
3-5-2-1 activité anti- bactérienne.....	7
3-5-2-2 activité antifongique.....	7
3-5-2-3 activité antivirale	8
3-5-2-4 activité anti-oxydante	8
3-5-2-5 effet anti-cancérogène	8
3-5-2-6 effet anti-acétylcholinestérase	8
3-5-2-7 effet hypoglycémiant.....	8
3-5-2-8 effet anti- hépatotoxique.....	9

CHAPITRE N°2 :

1- Généralité sur les huiles essentielles	10
2- Historique.....	11
3- Répartition et localisation des huiles essentielles	11
3-1 répartitions	11
3-2 localisations.....	11
4- Classification.....	12
5- propriétés physico chimiques	12
5-1 propriétés physiques.....	12
5-2 propriétés chimiques.....	13
5-2-1 les terpènes.....	13
5-2-1-1 monoterpènes.....	13
5-2-1-2 sesquiterpènes.....	15
5-2-2 les composés aromatiques	15

6- biosynthèse des terpènes.....	16
7- La conservation des Huiles Essentielles.....	17
8- Utilisation et propriétés économique des huiles essentielles.....	17
8-1 En pharmacie	17
8-3 En alimentation	18
8-4 En industrie.....	18
9- Huile essentielle de romarin.....	18
définition des quelque substances actives.....	19
1- Les flavonoïdes	19
2- Les alcaloïdes.....	20
3- Les saponines.....	20
4- Les coumarines.....	20
5- Les tannins	20
CHAPITRE N°3 : les méthodes d'analyse	
Extraction des huiles essentielles.....	22
A- Les différentes méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	22
1- Par distillation	22
1-1 hydro distillation	22
1-2 Distillation par vapeur d'eau.....	22
1-3 Distillation par vapeur d'eau direct.....	22
2- Par solvant organique.....	22
2-1 Par solvant volatil.....	23
2-2 Par solvant fixe.....	23
2-2-1 Enfleurage.....	23
2-2-1 macération.....	23
B- Les paramètres influents sur les procédés d'extraction.....	24
1- La durée d'extraction.....	24
2- La température.....	24
3- La vitesse de distillation	24
4- La quantité de vapeur d'eau	25
Les méthodes de séparation.....	25
1- La chromatographie sur couche mince (CCM).....	25
1-1 Principe de la technique.....	25
1-2 Le rapport frontal Rf.....	25
2- La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	26
2-1 Principe de la technique.....	26
CHAPITRE N°4 : les souche bactérienne testés	
1- Rappel sur les bactéries.....	27
2- La structure bactérienne.....	27
3- Les principaux germes testent.....	27
3-1 Escherichia coli.....	27
3-2 Klebsiella.....	28

3-3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
3-4 <i>Staphylococcus aureus</i>	29
4- La sensibilité aux agents antibiotiques.....	30
4-1 Les agent physique	30
4-2 les agents chimique.....	30

PARTÉ PRATIQUE

CHAPITRE N°5 : matériel et méthodes

1-Description des travaux d'extraction des huiles essentielles et principes actifs	32
1-1 L'extraction de l'huile par hydro distillation :.....	32
1-1-1Matériels	32
1-1-2 Récupération de l'huile essentielle	34
2- Essais photochimiques préliminaire	35
2-1 Extraction des principes actifs par solvants fixes	35
2-1-1 Matériels.....	35
2-1-2 Solvants	35
2-2 recherche de quelque substance active.....	36
2-2-1 préparations de l'infuse.....	36
3- Chromatographie sur couche mince (CCM)	37
3-1 Matériels utilisés.....	37
3-2 Réactifs.....	38
4- étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>rosmarinus officinalis</i> L	39
4-1 méthode utilisée	39
4-1-1 matériels et produits utilises	39
4-1-2 préparation des disques.....	40
4-1-3 milieu de culture.....	40
4-1-4 Inoculum	40
4-1-5 Ensemencement.....	41
4-1-6 témoins.....	41
4-1-7 dilution.....	41
4-1-8 La lecture	43

CHAPITRE N°6: résultat et discussion

1. Criblage phytochimique de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	44
2. Résultats de la chromatographiques.....	46
3. Résultats de l'antibiogramme.....	47

3.1 Interprétation des résultats de l'antibiogramme.....	49
3.1.1 Pour l'Huile essentielle extraite.....	49
3.1.2 Pour l'Huile essentielle commerciale.....	50
Conclusion générale.....	
Annexe	
Références bibliographiques.....	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°1 : quelques familles des plantes médicinales.....	1
Tableau N°2 : Aire géographique de romarin en Algérie.....	6
Tableau N°3 : Conditions opératoires d'hydro distillation de la plante romarin	34
Tableau N°4 : Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice.....	39
Tableau N°4 : les résultats de réactions en tubes de la partie arienne du romarin.....	44
Tableau N°5 : Résultats de contrôle chromatographique.....	47
Tableau N°6 : Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de romarin.....	47
Tableau N°7 : résultats de l'activité antibactérienne de l'antibiotique Amoxicilline et gentamycine	49

LISTE DES FIGURES

Figure N°1 : la plante (<i>rosmarinus officinalis</i> L) (romarin).....	5
Figure N°2 : Exemple de structure de monoterpène rencontrés dans les huiles essentielles.....	14
Figure N°3 : Exemple de structures de sesquiterpènes rencontrés dans les huiles essentielles.....	15
Figure N°4 : biosynthèse des terpènes.....	16
Figure N°5 : Squelette de base des flavonoïdes.....	19
Figure N°6 : Structure chimiques des flavonoïdes.....	19
Figure N° 7 : Squelette de base des tannins.....	21
Figure N°8 : <i>Escherichia coli</i>	28
Figure N°9 : <i>klebsiella</i>	28
Figure N°10 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
Figure N°11 : <i>Staphylococcus aureus</i>	30
Figure N°12 : montage d'hydro distillation.....	33
Figure N°13 : étapes de séparation des phases du distillat.....	34
Figure N°14 : les étapes d'Extraction des principes actifs par solvants fixes.....	36
Figure N°15 : l'infuse.....	36
Figure N° 16 : Muller –Hinton coulée en boite de pétrie.....	40
Figure N°17 : les étapes de l'ensemencement.....	41
Figure N° 18 : protocole de la dilution.....	42

Liste des figures

Figure N°19 : CCM de l'extrait brut méthanolique de romarin.....	46
Figure N°20 : Les témoins positifs et négatifs de l'activité antibactérienne.....	48
Figure N° 21 : effet antibactérien de l'huile essentielle synthétisée de romarin.....	48
Figure N°22 : effet antibactérien de l'huile essentielle commerciale de romarin.....	48

Liste des abréviations

CCM : Chromatographie sur couche mince

CO₂ : Dioxyde de carbone

CPG : La chromatographie en phase gazeuse

DMSO : diméthyl sulfoxyde

E. coli : *Escherichia coli*

FeCl₃ : chlorure de fer

GST : glutathion-S-transférase

H.E : huile essentielle

HCl : Acide chlorhydrique

HIV : Virus de l'immunodéficience Humaine

Kle.sp : *Klebsiella*

MeOH : Méthanol

Ms : matière sèche

NaOH : soude

Ø : diamètres

ppm : partie par million

Pseudo: *Pseudomonas aeruginosa*

R_{dt} : Le rendement en huile essentielle

R_f : Rapport frontale

Staph .au : *Staphylococcus aureus*

UV : Ultra-violet

µL : Microlitre

Introduction générale

Introduction générale

Oubliées pendant des années, les plantes sont pour de nombreux chercheurs et une grande partie de l'opinion publique redevenues des vedettes en matière thérapeutique à la suite des possibilités affirmées ou potentielles qu'offre le monde végétale à l'art de guérir.

Dès le début de notre ère, la découverte des propriétés curatives des végétaux était certainement fortuit. En voulant se nourrir de plantes, l'homme primitif trouvait la médecine. Mais après quelles néfastes expériences découvrait-il les vertus des plantes et peut-il en différencier les résultats ? Il était aidé par les animaux dont il savait se servir. **(André, 1981)**.

Grands nombres de malades veulent être traités par les seules thérapies naturelles au premier rang desquelles se placent les plantes et leur essences (huiles essentielles).

On connaît actuellement près de deux milles huiles essentielles parmi lesquelles près de 200 font l'objet d'importantes transactions commerciales internationales. Une centaine d'entre elles sont d'un usage courant et une dizaine servent de première pour d'importantes synthèses. **(Guydeysson, 1978)**.

Parmi les plantes à parfum à caractère industriel, le Romarin occupe une place de choix et son huile essentielle est des plus appréciées.

Le but de notre travail est l'obtention des métabolites secondaires, par la méthode d'hydro distillation, et par la suite l'étude phytochimique et biologique de l'espèce *Rosmarinus officinalis* L.

Notre travail est structuré en deux parties qui sont précédées par une introduction générale.

La partie théorique est constituée de quatre chapitres ; le premier comporte une description et taxonomie de la plante étudiée, le deuxième chapitre est consacré à

des généralités sur les huiles essentielles, Le troisième chapitre comporte les différentes méthodes d'extraction et d'analyse. Le dernier chapitre de cette partie comporte les souches bactériennes testées

La seconde partie concerne l'étude expérimentale où l'on a décrit la méthode utilisée pour l'extraction de l'huile essentielle de la plante étudiée suivie par des tests phytochimiques préliminaires tandis que les résultats des analyses par CCM feront l'objet du deuxième chapitre et nous exposons l'étude antibactérienne sur les huiles essentielles (synthétise et commerciales) diluées.

Ce travail sera achevé par une conclusion générale.

APERÇUS

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre N°1 :

Aspecte botanique

Chapitre N°2 :

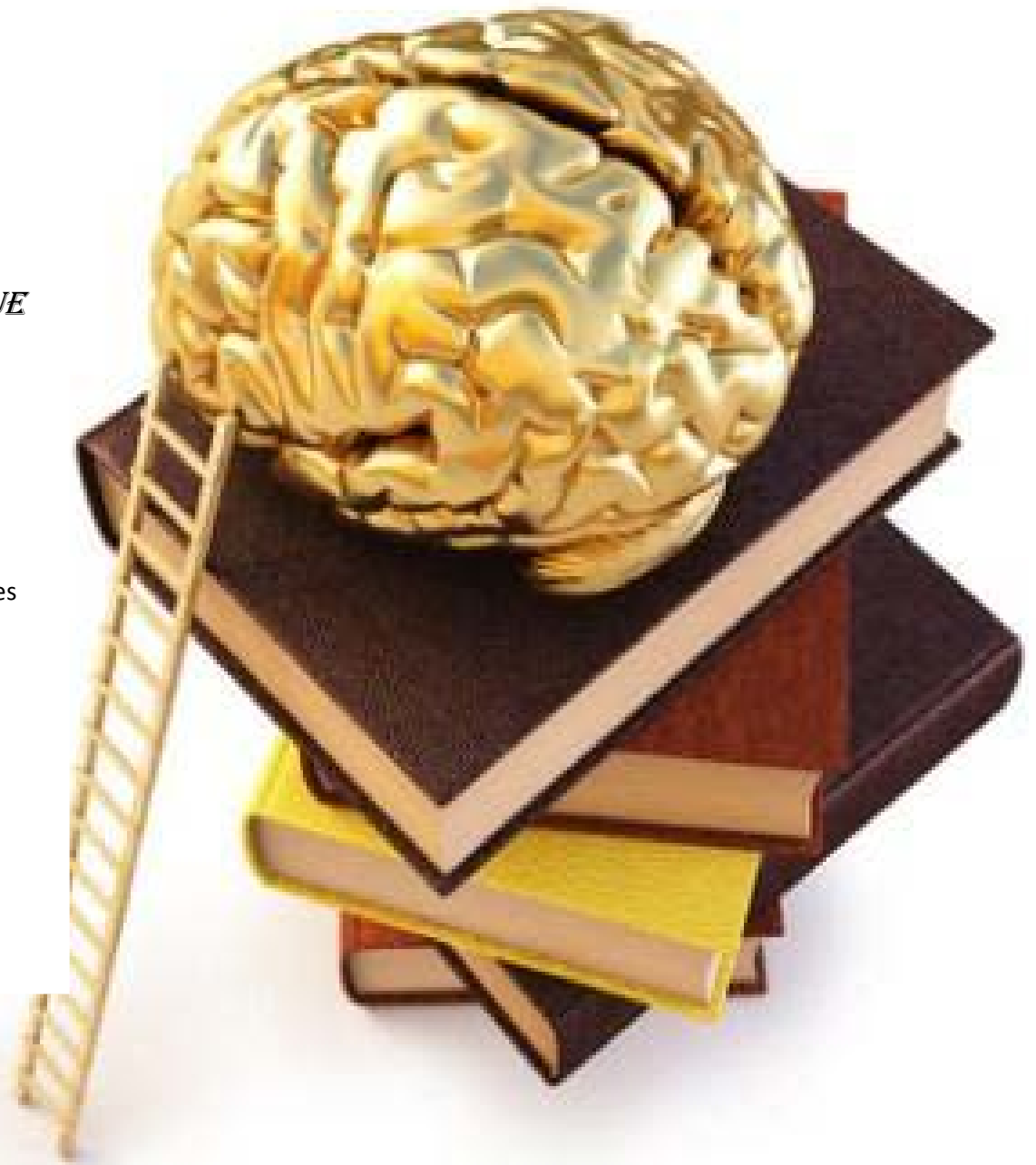
Métabolite secondaire et les huiles essentielles

Chapitre N°3 :

La méthode d'analyse

Chapitre N°4 :

Les souches bactériennes testées



Chapitre N°1

1. Les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont définies à la pharmacopée comme des plantes dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses.

La pharmacopée remarque que des plantes ayant des propriétés médicamenteuses peuvent avoir également des usages alimentaires ou condimentaires ou encore servir à la préparation de boisson hygiénique (**Brunton ,1999**) .

1.1 Classification des plantes : aperçu sur les principales familles de plantes médicinales :

Le monde des plantes est assez vaste, on cite ces quelques familles dans lesquelles tout un cortège de plantes médicinales existe à titre exhaustif :

Tableau n°1 : quelques familles des plantes médicinales.

Liliacées	Ombelliféracées	Conifères
-Tulipe -Ail -Poireau	-Cerfeuil -Persil -Coriandre	-Cade -Cédre -Cyprès
Labiacées	Myrtaées	Composacées
-Basilic -Menthe -Origan -Lavande	-Eucalyptus -Girofle	-Armoise -Camomille
Polygonacées	Loranthacées	Lauriacées
-Rhubarbe	-Gui	-Laurier
Borraginacées	Chénopodiacées	Verbénacées
- Bourache - Cconsoude	-Arroche	- Ver vence
Papvéracées	Saxifragacées	Rutacées
- Pavot - Chélidoine	- Groeillier - Cassissier	- Bermagote - Citron

(Hadj *et al*, 2005)

2. les lamiales

On va s'intéresser tout particulièrement à cette famille puisque la plante objet de notre étude lui appartient.

L'ordre des lamiales ou verbinales, très voisin de celui des personales est caractérisé par la zygomorphie constante de la fleur « corolle toujours bilabée la réduction de l'androcée à quatre, par fois à deux étamines et de plus, par la réduction du gynécée à deux carpelles biovulés, partagés chacun en deux logette uniovulées.

Les caractères embryologique sont les même que chez les personales on y range les labiées, les verbénacées et les plantaginacées, ainsi que les petite familles des myoporacées et des globulariacées (Guydeysson,1978).

2.1 La famille des labiées

2.1.1 Généralités

Les labiés comprennent environ 3000 espèces dont l'aire de dispersion est extrêmement étendue, mais elles sont particulièrement abondantes dans la région méditerranéenne : Thym, lavandes, Rosmarinus, qui caractérisent la flore des garrigues les labiées sont rares, Dans les régions arctiques et en haute montagne quand elles vivent dans les endroits sec, elles présentent des adaptations leur permettant de résister à la transpiration :

Feuilles velues à limbe replie par-dessous à stomates en foncés, à hypoderme collenchymateux très développé.

Les labiées sont des plus anciennement décrites par les botanistes car elle présent des caractères marqués qui la rendent aisément reconnaissable, elle regroupe des plantes herbacées à arbustives, les tiges et feuille sont fréquemment porteuses de poils sécréteur à essences volatiles qui trouvent des applications dans différents domaines d'où l'intérêt porté à l'étude de cette famille.

Le feuillage des labiées possède souvent une odeur particulière plusieurs espèces de cette famille sont utilisées comme herbes, dont le thym, l'origan, la lamier, la monarde, l'ajiga de même que le coléus des espèces ornementales (Moureau, 1960 et Boumlick, 1995).

2.1.2 Description des labiées

Les caractères communs aux lamiacées sont bien définis :

- Les fleurs ne sont jamais isolées mais groupées à l'aisselle des feuilles ou en épis, elles possèdent 5 pétales soudés en tube, souvent asymétrique à deux lèvres. Le calice est composé de 5 sépales soudés en tubes. Les étamines sont réparties en deux groupes de deux grandes et de plus petites; quelques lamiacées n'ont que deux étamines « sauge, romarin, lycoperis, ». Le pistil est simple, fondu en deux à son sommet. Elles sont particulièrement bien adaptées à la pollinisation par les insectes grâce à diverses astuces « anthères mobiles, » elles fructifient en donnant les tétrachènes « 4 graines regroupées au fond du calice ».
- Ce sont des herbes à tiges quadrangulaires (souvent en flèches aux nœuds) et se multipliant en même saison à l'aide de rejets aériens « stolons » ou horizontaux plus rarement des arbrisseaux de petites tailles comme les thym ou les lavandes.
- Les feuilles sont toujours très simples et opposées : elles sont chez les espèces vivant dans les endroits secs, coriaces et présentent des adaptations leur permettant de réduire leurs transpirations (feuilles velues à limbes enroulés par dessous : stomates enfoncés).
- Ce sont des plantes aromatiques à huiles essentielles, l'odeur se dégage par simple attouchement : en effet, la localisation des huiles essentielles est très externe elle se trouve dans les poils à essence, et se localise sur la cuticule qui se soulève. Ces essences renferment des constituants variés et c'est à ce titre, surtout qu'elles sont médicinales (**André et Jacques, 1981**).

3. classification botanique de *Rosmarinus officinalis* L

3.1 Taxonomie végétale

On peut définir la famille des labiées de point de vue botanique selon les divisions suivantes :

Embranchement : spermaphyte .

Sous embranchement : Angiospermes.

Classe : Dicotylédones.

Sous classe : Gamopétales

Ordre : Labiées (lamiales)

Famille : Labiées (lamiacées)

Genre : Rosmarinus

Espèce : *Rosmarinus officinalis*

(Pascal et Pierre ,1991)

3.2 Description botanique

Commun à l'état sauvage, le romarin est sans doute l'une des plantes les plus populaires en Algérie, puisqu'il se rencontre dans tous les jardins et les parcs, en bordures odorantes dont les fleurs bleues, très intéressantes, s'épanouissent quasiment tout au long de l'année. (Beniston ,1984).

Arbrisseau aromatique touffu, rameux, d'environ 1M de hauteur , à tiges ligneuses, à feuilles persistantes opposées entières, étroitement lancéolées , sessiles, presque aciculaires , à bord réfléchis , à pubescence tomenteuse blanche sur la face intérieure les fleurs axillaires à corolle de type (labiée) sont de couleur bleu pâle à bleu violet clair avec des ponctuations violettes et disposées vers le sommet des rameaux en courtes grappes.

Ces inflorescences spiciformes portent en toute saison des fleurs subsessiles le calice gamosépale, bilabié en forme de cloche possède 3lobes, la corolle gamopétale est longuement tubuleuse avec une lèvre supérieure en forme de casque à 2lobes et une lèvre inférieure à 3 lobes. Les 2 étamines saillantes dépassent largement la corolle, 2 autres sont réduits. Les fruits est un akène brun.

Les feuilles pouvant atteindre 3cm de long et 4 mm de large , sont étroitement lancéolées , aciculaires , coriaces, et friables le bord est involuté vers le bas (rangée supérieure) les jeunes feuilles sont pubescentes sur la face supérieure alors que les plus âgées sont glabres

elles sont glabres elles sont ridées et striées en raison d'une nervure médiane enfoncée, en revanche très proéminente sur la inférieure, recouverte d'une pubescence blanche dense.

Odeur : très aromatique, presque camphrée, rappellent un peu l'encens.

Saveur : âpre et aromatique, amère, un peu piquante.

Synonymes : foliaantbos, foliaroris Marini, rossée de mer, rose marine, encensier; herbe aux couronnes; rosemary (angl), rosmarinblätterkrankkrautblätter, rosmarien (all). (Max et Rebert, 2003).

Floraison : septembre, juin (Pascal et Pierre, 1991).



Figure N°1 : la plante *rosmarinus officinalis* L (romarin)

3.3 Origine et habitat

Originnaire des régions méditerranéennes, le *Romarin* pousse spontanément dans le Sud de l'Europe. On le cultive dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps. Il apprécie les climats chauds, modérément secs, les branches récoltées pendant l'été sont séchées à l'air et à l'ombre (Heinrich et al, 2006).

3.4 Aire géographique en Algérie

En Algérie le romarin est répondu principalement dans les régions suivante :

Tableau n°2 : Aire géographique de romarin en Algérie.

Wilaya	Non local	Partie utilisée	Utilisation en médecine traditionnelle	Mode d'emploi	Superficie Approximative
Biskra	K'lil	Toute partie aérienne	Rhumatisme, Douleurs Stomacales, Défaillance de foie	Tisane	1500ha
Khenchela	K'lil	Feuilles	Maladies du cœur ; Estomac, Jaunisse	infusion	5000ha
Bouira	M'zir	Feuilles	Douleurs stomacales, plante Fourragère	infusion	
Ain Temou-Chent	Halhal	Toute partie aérienne	Asthénie, cellulite, Frigidité ; migraine nerveuse	Infusion Inhalation Massage...	8000ha
Naama	Yazir elbel	Rameaux Et fleurs	Antispasmodique Et antiseptique	Infusion Et bain	500ha
El-bayadh	Asir halhal	Feuilles	Insomnie, fonction Biliaire...	Tisane	
Mila		Feuilles	Antispasmodique Antiseptique...	infusion	4000ha
Mascra	Halhal	Feuilles	Antispasmodique Carminatif Cosmétique	Extrait	
Médéa	Yasir	Feuilles	Douleurs rhumatismales, Circulation du sang ; excitation de digestion	Infusion Essence Teinture Sirop...	
M'sila		Feuilles	Toux, conjonctive, Graines	Infusion collyres	45000ha
Sétif	K'lil	Feuilles fleurs	Douleur gastrique Et colique	infusion	3500ha
Soukhars		Feuilles	Estomac	infusion	4410ha

(Boukhalfa , 1991)

3.5 Utilisation et Propriétés du Romarin

3.5.1 Utilisation

Le *Romarin* est souvent cultivé pour son huile essentielle. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique. Il est considéré utile pour contrôler l'érosion du sol (**Heinrich et al ,2006**). L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires (**Arnold et al , 1997 in Benikhlef ,2014**).

3.5.2 Propriétés du Romarin

3.5.2.1 Activité antibactérienne

Les effets des extraits aqueux et méthanoliques du *Romarin*, sur la croissance du *Streptococcus sobrinus* et sur l'activité extracellulaire de l'enzyme glucosyltransferase ont été étudiés par les résultats ont suggéré que les extraits du *Romarin* peuvent empêcher la lésion de la carie en inhibant la croissance du *Streptococcus sobrinus* et peuvent aussi éliminer les plaques dentaires par suppression de l'activité de la glucosyltransférase (**Tsai et al ,2007**).

Afin de chercher de nouveaux antibiotiques et des agents antimicrobiens, une autre étude a été élaborée par examiner les effets antimicrobiens des extraits des composés isolés de certaines plantes, sur l'ensemble de 29 bactéries et levures avec pertinence dermatologiques. L'extrait obtenu par le dioxyde de carbone (CO₂) supercritique du *Romarin*, a présenté un large spectre antimicrobien. la croissance de 28 sur 29 germes a été empêchée par cet extrait d'acide carnosique (**Weckesser et al ,2007**).

3.5.2.2 Activité antifongique

La biosynthèse de l'aflatoxine a été inhibée totalement par l'huile essentielle du *Romarin* à une concentration de 450 ppm. Selon les résultats indiqués, le potentiel de cette huile essentielle en tant que conservateur naturel contre *Aspergillus parasiticus* (**Rasooli et al ,2008 in Benikhlef ,2014**).

En utilisant la technique standard de diffusion sur gélose, ont évalué l'activité biologique de 11 huiles essentielles y compris celle du *Romarin*, les résultats ont montré que de ces huiles ont une activité inhibitrice modérée sur les cinq levures (*Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*) examinées (**Sacchetti et al , 2005**).

3.5.2.3 Activité antivirale

L'évaluation de l'activité antivirale de l'extrait commercial du *Romarin* a indiqué qu'il y a une inhibition de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) à la concentration très basse. Cependant, le carnosol a montré une activité (anti-HIV) à une concentration modérée qui n'était pas cytotoxique (Arouma et al ,1996 in Benikhlef,2014).

3.5.2.4 Activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante du *Romarin* est connue depuis environ 30 années. En raison de ses propriétés anti-oxydantes, le *Romarin* est largement accepté en tant qu'épice dont l'activité anti-oxydante la plus élevée (Wang et al ,2008). Plusieurs auteurs ont étudié l'utilisation des extraits du *Romarin* comme antioxydant pour conserver les produits à base de viande (Balenine et al ,2006. Fernandez-L et al ,2005. Sebrotynek et al ,2005).

3.5.2.5 Effet anti-cancérogène

Grace à certains composants (Carnosol, Rosmaridiphénol, Rosmanol et l'acide rosmarinique), le *Romarin* est considéré comme une thérapie contre le cancer (Atik et al ,2007).

3.5.2.6 Effet anti-acétylcholinestérase

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% (Adsersen et al ,2006).

3.5.2.7 Effet hypoglycémiant

L'observation après l'administration orale de différentes doses de l'extrait éthanolique du *Romarin* à 3 groupes de lapins (lapins ayant une glycémie normale, lapins ayant une hyperglycémie provoquée par l'administration orale de glucose, lapins diabétiques d'alloxane) ont clairement montré que cet extrait exerce une activité hypoglycémiante remarquable à une dose de 200 mg/kg (Bakirel et al ,2008 in Benikhlef ,2014).

3.5.2.8 Effet anti-hépatotoxique

De nombreuses études ont été réalisées pour étudier l'effet anti hépatotoxique du *Romarin*, le travail a été concentré pour l'évaluation de l'efficacité de l'extrait méthanolique du *Romarin* pour normaliser certains paramètres histologiques et biochimiques du foie, après l'ingestion d'un hépatotoxine 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 bilirubine, la glycogène et l'activité de l'alanine aminotransférase) et enfin il a augmenté l'activité du glutathion-S-transférase (GST) (Mari et al., 2004).

Chapitre N°:2

Généralités sur les huiles essentielles

Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverses parties des végétaux. Elles sont concentrées, volatiles, non huileuses et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur. Actuellement, leurs utilisations en parfumerie et en alimentation est considérable, c'est pour cette raison que l'organisme de normalisation AFNOR NF et 150 ont donné une définition plus précise des huiles essentielles ; ces dernières sont des produits obtenus à partir d'une hydro distillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (Belhadi, 2010 in Benikhlef ,2013).

2. Historique

Les anciennes civilisations Utilisent avec succès les huiles essentielles et d'ailleurs, dès le 15^{ème} siècle, les apothicaires ont utilisé les plantes aromatiques dans un but thérapeutique ; en onguents ; bains ou fumigations , elles ont de tous temps permis des thérapies performantes , parfois empreintes de sacrés. aborigènes ; Australiens (Melaleuca,...) ; Indiens (coriandre, basilic,) Mésopotamiens (Cyprés,.....) Egyptiens, Grecs et Romains, etc Ont tous utilisé cette forme de soins. On en retrouve des témoignages écrits dans les textes védiques , chinois , arabes , etc. Dans la bible même on trouve une foule d'exemples de l'utilisation des plantes (origan ; cannelle ; myrrhe). Les grecs, y compris Hippocrate « père de la médecine » y avaient régulièrement recours comme d'ailleurs les romains qui prenaient des bains parfumés et se faisaient ensuite masser avec des huiles. Les Egyptiens, de leur côté étaient des experts et recevaient régulièrement la visite de médecins du monde entier qui venaient s'initier chez eux .

Lors des Croisades ; ce savoir sera introduit en Europe (11^{ème} /12^{ème} siècle). Les huiles essentielles seront utilisées lors de l'épidémie de peste du 14^{ème} siècle. Au 16^{ème} / 17^{ème} siècle ; les Herboristes et Apothicaires sont appelés « AROMATER II » c'est au 18^{ème} et 19^{ème} siècle que les scientifiques parviennent à identifier certains composants spécifiques des végétaux et à isoler les principes actifs des plantes. Dans les années 1920, les travaux des français VALNET et GRATTEFOSSE vont relancer l'aromathérapie.

Aujourd'hui, l'AROMATHERAPIE s'impose comme l'une des thérapies complémentaires les plus performantes en matière de santé mais aussi en matière de beauté , d'esthétique , par les soins naturel qu'elle prodigue à notre peau et à notre corps
www.feminin.ch/santé/aroma/aromathérapie.com .

3. Répartition et localisation des huiles essentielles

On rencontre les huiles essentielles dans divers familles botaniques elles se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante et forment dans le cytoplasme de cellules spécialisées (Degryse et *al.*, 2008 in Benikhlef ,2013) .

3.1 Répartition

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

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

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes de la plante, par exemples dans les sommités fleuries (*Menthe*, *Lavande*) les feuilles (*Eucalyptus*, *Laurier*) les rhizomes (*Gingembre*) les fruits (*agrumes*, *badiane*, *anis*), les racines (*Vétiver*), les graines (*Muscades*), bien que cela soit moins habituel dans des écorces (*Cannelier*) (Bellakhdar ,1997).

3.2 Localisation

Elles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante. Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules ou se rassemblent sous formes de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles (Gonzalez, et *al* ,2007).

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence des structures histologique spécialisés, souvent localisée sur ou à proximité de la surface de la plante qui sont : cellules à huiles essentielles de *Lauraceae*, les poils sécréteurs des *laminaceaes*, poches sécrétrices des *Myrtaceaes*, des *Rutaceaes*, et les *Laminaceaes*, et les canaux sécréteurs qui existent dans des nombreuses familles. Il est intéressant de remarquer que les organes d'une même espèce peuvent renfermer des huiles essentielles de composition différente selon la localisation dans la plante (Degryse et *al.*, 2008 in Benikhlef ,2014) .

4 .Classification

L'étude analytique et comparative du pouvoir antiseptique des H.E sur les germes pathogènes permet une classification qui est faite selon l'indice aromatique qui est un indice à valeur qui permet d'apprécier le pouvoir bactéricide de H.E sur un germe donné.

Groupe 01 : Les huiles essentielles majeures

Les H.E majeurs sont des huiles essentielles dont l'action antiseptique est forte et constante, l'indice aromatique d'essences de ce groupes se situe sensiblement entre 0,45 et 1 pour le gram(+) et gram (-) et la levure.

Les H.E majeurs sont au nombre de 6 et elles permettent de traiter selon les indications et dans les limites de l'aromathérapie plus de 90% des maladies infectieuses chroniques.

Ces H.E sont retrouvées dans les espèces suivantes :

- Thymus capitatus Hoffm et Link : Labiées, origan d'Espagne .

Satureia Montana L : Labiées, sariette des montagnes. Cinnamomum Zeylanicum

Ness : Lauracées.

- Thymus vulgaris L, Labiées-thym

- Eugenia Caryophyllata Thunb : Myrtacées- Girofle

- Melaleuca alternifolia (Lam.) Cheel, Arbre à thé.

Groupes 02 : Les huiles essentielles moyennes.

Ce sont des essences aromatiques qui ont été le plus utilisées et dont l'indice aromatique est inférieur à 0,45 certaines H.E moyennes sont retrouvées chez les espèces suivantes :

- Eucalyptus globulus Labill : Myrtacées, Eucalyptus officinale .

- Lavandula vera DC : Labiées, lavande vraie.

- Pinus sylvestris L : Conifères pin , Sylvestre.

- Myrtus Communitis L : Myrtacées, Myrte.

Il y aura ainsi trois groupes dont seul le dernier est assez homogène. **(Brunton,1993)**

- Essences hydrocarbonées, riche en carbures qui sont les plus nombreuses (essence de citron , essence d'orange).

- Essences oxygénées (essence de menthe, essence de rosé, essence d'amande amère).

- Essences sulfurées, caractérisées par la puissance de soufre (essence d'ail). **(André et Jacques ,1981)**.

5. Propriétés physico-chimiques

5.1 Propriétés physiques

Les propriétés physiques des huiles essentielles se résument en leurs indices, pouvoir rotatoire, viscosité, densité, solubilité dans l'alcool, point d'ébullition et congélation.

Généralement incolores ou jaune pâle, les essences sont liquides à température ambiante. La nature huileuse des huiles essentielles la rend liposoluble ainsi elles sont peu solubles dans l'eau mais le sont dans les solvants organiques apolaires, les huiles grasses, et dans les alcools. Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles et sensibles à l'oxydation. Elles ont tendance à se polymériser en donnant lieu à la formation de produits résineux ce qui induit la perte de ses propriétés.

Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (à l'exception des huiles essentielles de saffran, de girofle ou de cannelle constituent des exceptions). Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée

(Baser et Buchbauer ,2010).

5.2 Propriétés chimiques

Les huiles essentielles peuvent contenir une centaine de composés différents appartenant à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques spécifiques les terpènes et les dérivés du phénylpropane biosynthétisés essentiellement à partir de l'acide shikimique **(Bruneton ,1993).**

5.2.1 Les terpènes

Les huiles essentielles sont constituées d'un certain nombre de composés terpéniques, généralement les plus volatils dont la masse moléculaire n'est pas élevée. Ces constituants proviennent de l'isoprène répondant à la formule générale $(C_5H_8)_n$, ils sont également nommés isoprénoïdes ou terpénoïdes. Le terme « terpénoïde » définit l'ensemble des terpènes oxygénés et non oxygénés, alors que le terme « terpène » ne tient pas compte de la présence d'oxygène **(Baser et Buchbauer ,2010).**

Ainsi, on distingue selon le nombre de carbone: les monoterpènes (C 10), les sesquiterpènes (C 15), et moins fréquemment les diterpènes (C 20), les triterpènes (C 30) et les tétraterpènes (C 40). Certains composés terpéniques peuvent être toxiques, répulsives ou attractifs pour d'autres organismes, d'où leurs rôles dans les interactions entre les plantes et plantes-animaux

5.2.1.1 Monoterpènes

On y rencontre des monoterpènes acycliques (myrcène, ocimène), monocycliques ou bicycliques (pinènes, 3-carène, camphène, sabinène). Grâce à la réactivité des cations intermédiaires de ces terpènes, elles peuvent se rattache à un certain nombre de molécules **(Bruneton , 2008).**

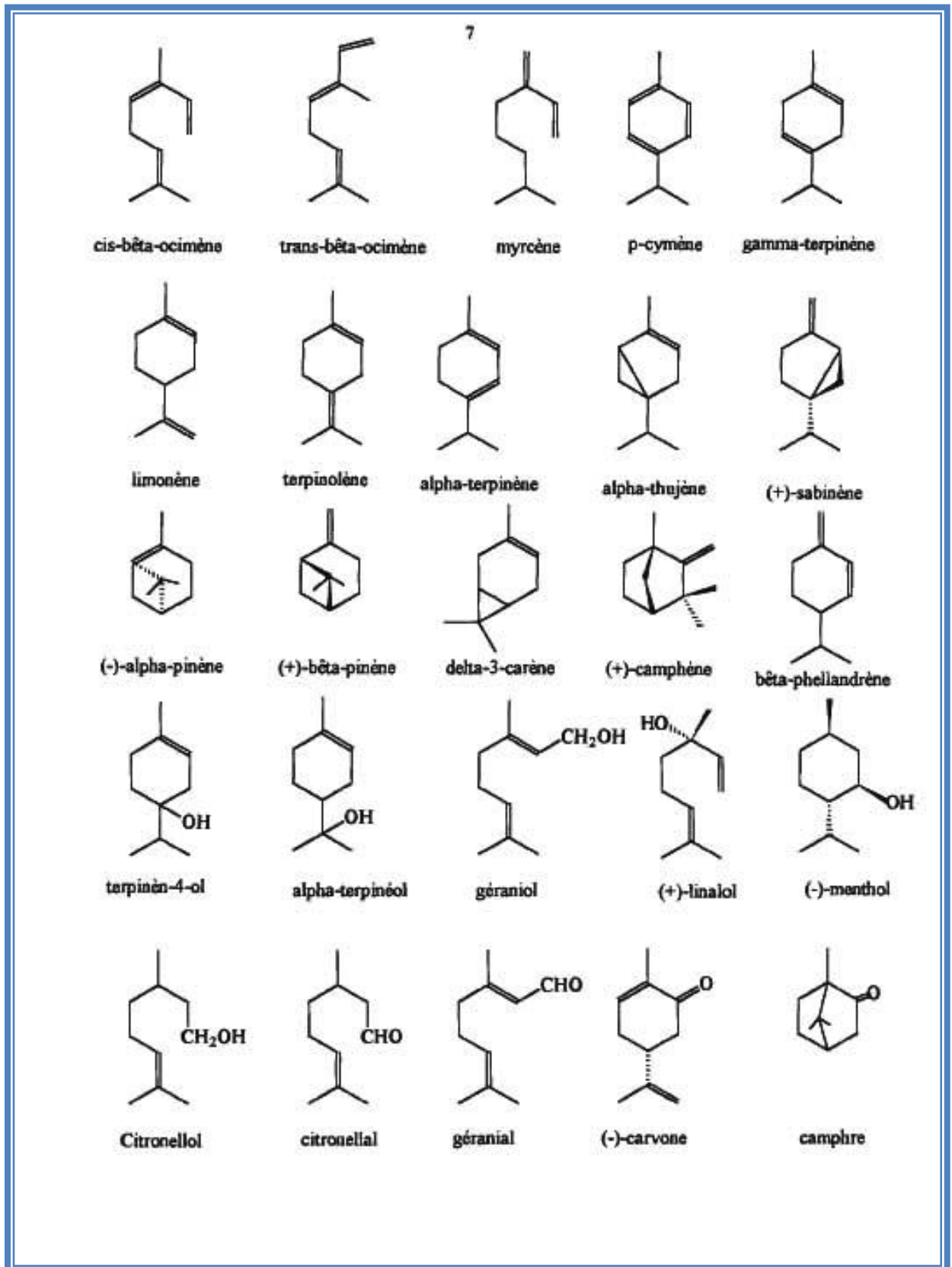


Figure N°2 : Exemples de structures de monoterpènes rencontrés dans les huiles essentielles

<http://herbierfrance.free.fr/Pharmacognosie/Flanonoides.htm>

5.2.1.2 Sesquiterpènes

L'allongement de la chaîne des sesquiterpènes amplifie le nombre des cyclisations possibles, plus d'une centaine de squelettes différents ont été décrits. On trouvera également des sesquiterpènes avec des fonctions chimiques caractéristiques : alcool (farnésol, carotol), carbures (β -caryophyllène), cétones, ester.

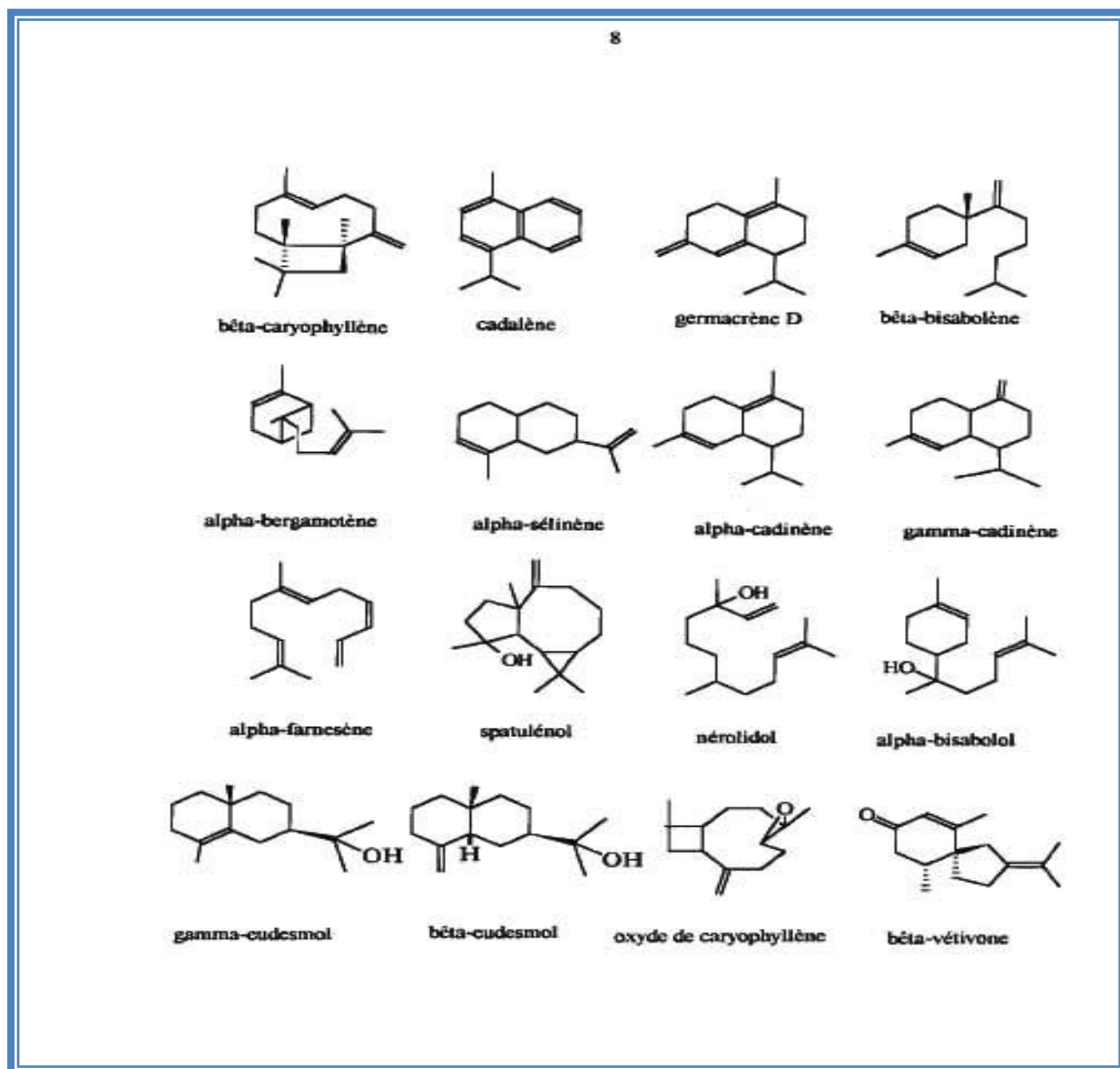


Figure N°3 : Exemples de structures de sesquiterpènes rencontrés dans les huiles essentielles

<http://herbierfrance.free.fr/Pharmacognosie/Flanonoïdes.htm>

5.2.2 Composés aromatiques

Les dérivés du phénylpropane (C₆-C₃), ou composés phénoliques s'agissant le plus fréquemment d'allyl ou propénylphébols, et ou aldéhydes. La biosynthèse par voie phénylpropanoïdes débute par des aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Ils

sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle. Egalement, la synthèse de ces constituants nécessite une série d'acides dont l'acide shikimique et l'acide cinnamique. Les phénylpropanoïdes sont moins répondeu dans l'HE que les terpènes, néanmoins elles sont caractéristiques dans certaines huiles essentielles d'Apiaceae (anis, fenouil, persil, cannelles (eugénole, myristicine, asarones, cinnamaldéhyde)) (Bruneton ,1999).

6. Biosynthèse des terpènes

Les terpènes ne sont pas vraiment formes dans la nature a partir de l'isoprène qui n'a jamais été détecte dans un organisme vivant. Le véritable précurseur universel de tous les terpènes est l'acide mevolonique découvert en 1956 qui est forme par voie enzymatique a partir de l'acétyl coenzyme A

Acétyl COA (CH₃-COS-COA)

Dans la biosynthèse des terpènes (figure n°3), l'acide mevolonique est active enzymatiquement par phosphorylation. Une élimination avec decarbocylation donne ensuite le pyrophosphate d'isopentene 3-yle. On obtient le pyrophosphate de geranyle qui peut s'hydrolyser facilement en géranol. Par voie similaire, on peut généralement obtenir le linalol.

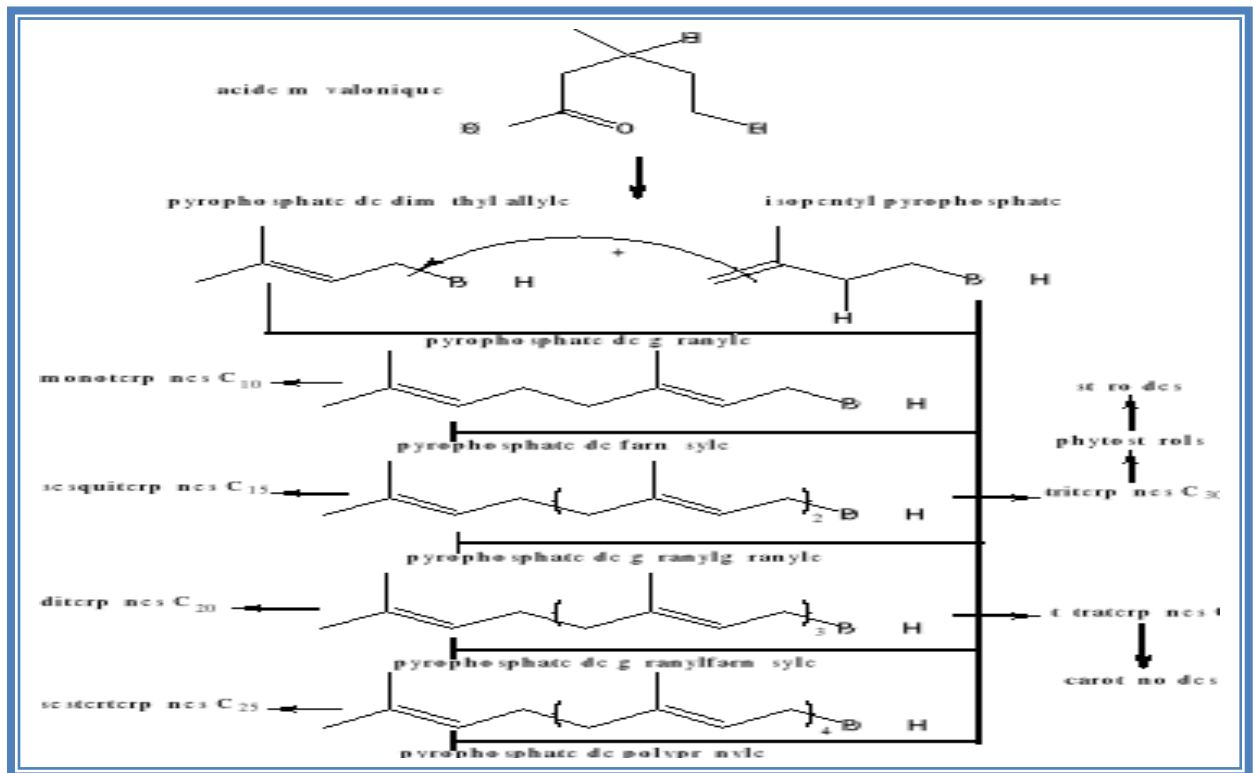


Figure N°4: biosynthèse des terpènes

(Mann ,1987)

7. La conservation des Huiles Essentielles

Les HE doivent être conservées correctement pour préserver leur qualité ,avec le temps : elles s'oxydent, ce phénomène étant amplifié par la chaleur, l'air et la lumière. Il faut les conserver dans un endroit frais, à l'abri de l'air et de la lumière, dans du verre brun et ou de l'aluminium vitrifié. A une température de 22 à 25°C. (Brunton , 1999 et Grund,1983)

8. Utilisation et propriétés économique des huiles essentielles

8.1 En pharmacie

Au nombre d'un certain environ les huiles essentielles sont des substances ayant une part importante dans les traitements de phyto-aromathérapie, leurs modes d'utilisation et leurs formes pharmaceutiques conditionnent leurs activités, en plus de leurs pouvoirs antiseptiques, les essences ont d'autres propriétés pharmaceutiques qui gèrent a bien, définie en 1984 en les classant en trois groupes (Pascal et Pierre ,1991).

-Groupe N°1 : se faire à leur antiseptique.

-Groupe N°2 : comprend les H.E aux propriétés irritantes expectorantes et diurétiques.

-Groupe N°3 : comprend les essences aux propriétés antispasmodiques et sédatives.

Nous évoquerons principalement des H.E expectorantes puis celles qui ont une action spécifique sur les systèmes nerveux et enfin, les H.E qui agissent sur le sphère cardio-vasculaire.

➤ Les huiles essentielles expectorantes

Au niveau de l'arbre trachéo-bronchite, les H.E d'eucalyptus globules stimulent les cellules mucus fluides les sécrétions et le mouvement de l'épithélium..

Il est possible que les H.E balsamiques entrent en synergie avec pouvoir antiseptique des essences majeures dans le traitement des infections broncho-pulmonaires (Daufine ,1999).

➤ Sur les systèmes nerveux

Les H.E ont un tropisme pour le système nerveux et certaines d'entre elles peuvent donner des résultats intéressants principalement dans les maladies du système nerveux.

Propriétés générales antispasmodique et sédatives des huiles essentielles

Certaines huiles essentielles ont une action antispasmodique sur le sphère gastro- intestinale exaltent sécrétion gastrique et permettent l'élimination des gaz intestinaux (**Pascal et Pierre , 1991**).

8.2 En alimentation

Les huiles essentielles sont très utilisées comme aromatisants des aliments (jus de fruits, pâtisseries) .

8.3 En industrie

Les huiles essentielles sont utilisées comme matières premières pour la synthèse des principes actifs médicamenteux, des vitamines, des substances odorantes. (**Pascal et Pierre ,1991**)

9. Huile essentielle de romarin

Les huiles essentielles du romarin (1 à 2% de la plante) contiennent selon la prévenance de l' α -pinène (2-25%), verbénone(1-37%), le camphre(2-14%),l'aucalyptol (1-35%),hornéol (4-19%), l'acétate de bornyle (jusqu'à 17%),camphène, il y aussi parfois du δ -3-crène, caryophyllène, β -pinène,l' α -terpinéol, β -terpinéol,terpinène -4-ol,limonène ,linalol,géranéol et myrcène. (**Bellakhdar ,1997**)

Les huiles essentielles du romarin sont fluides, jaunâtre, très odorantes, entre aussi dans la composition des extraits et de lotions pour fortifier le cuir chevelu, eau de toilette, eau de Cologne et poudre dentifrice. (**Mahmoudi ,1998 in Benikhlef , 2013**)

Les huiles essentielles du romarin sont utilisées comme ingrédients dans la fabrication des mousses et des pommades .Une grande partie de l'huile essentielle sert à parfumer les savons, les désodorisants et à dénaturer l'alcool destiné à la parfumerie. Elle est antibactérienne et anti fongique.

L'acide rosmarinique qu'elle contient est anti-inflammatoire. L'huile essentielle du romarin est utilisée aussi en massages sédatifs dans les rhumatismes et la sciatique.(**Porte et al ,2000 in Benikhlef ,2013**)

Les sommités fleuries sont conseillées en cas de fatigue intellectuelle, elles réveillent la mémoire et favorise la concentration .Elles sont recommandées pour protéger et stimuler la fois. (**Peroti ,1996 in Benikhlef ,2013**)

L'essence de romarin est toxique et peut provoquer à doses élevées des hémorragies gastro-intestinales, la néphrite, la dégénérescence hépatique. (Mahmoudi ,1998 in Benikhlef ,2013)

I.B. Définition des quelque substances actives

1. Les Flavonoïdes

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composé naturels appartenant à la famille des polyphénols. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà la de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaines), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme «leuco», ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire .ce n'est que depuis quelques années que certaines propriétés pharmacologiques ont pu être mises en évidence et que leur étude a pris un nouvel essor. (M.Gàbor, 1988).

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés une chaîne en C3 (schéma 4)

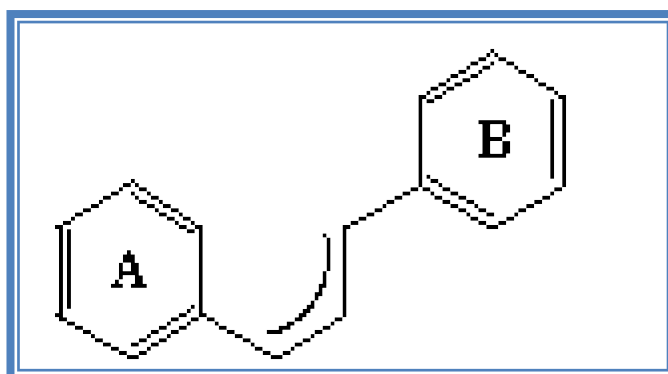


Figure N°5 : Squelette de base des flavonoïdes.

<http://tpechoc.free.fr/tpe/tpechoc/flavo.php>

Ces composés sont caractérisés par une structure de type benzo-y-pyrone (ou chromone).on distingue plusieurs grands types noyaux (ou génines) : flavone , flavonol , isoflavone , xanthone.....

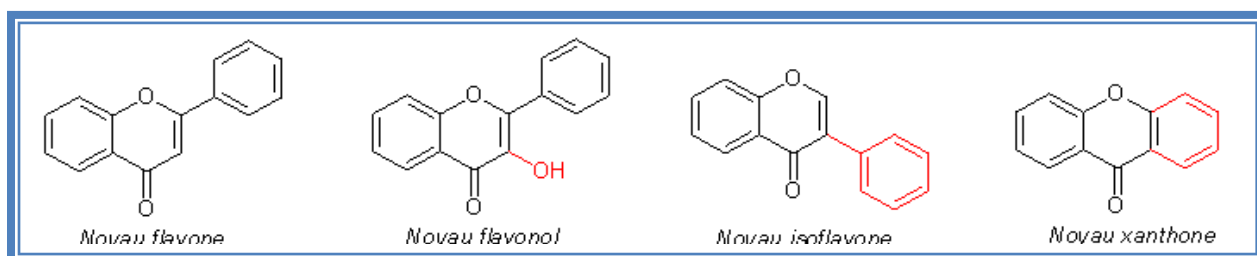


Figure N°6 : Structure chimiques des flavonoïdes

<http://herbierfrance.free.fr/Pharmacognosie/Flanonoïdes.htm>

2. Les alcaloïdes

La définition suivante proposé par : MPOLONOVSKI : primitivement étendue a tous les principes basiques des plantes, la dénomination d'alcaloïdes sont aujourd'hui limités, par l'usage aux substances organiques azotées complexes, l'origine végétales pour la série cyclique à réaction plus moins basique le plus souvent douées d'une forte acidité physiologique et commune vis-à-vis de certaines actifs chimiques. (**Régnier et Weitz ,1991**)

3. les saponines

Les saponines présentent eux – mêmes des substances organique de caractère de glucosides la majorité de ces composés provoquent un hémolyse des globules du sang lors de l'agitation des extraits aqueux des saponines, ils se forment de mousse comme les savons poisson , serpents , les grenouilles,, les saponines provoquent une paralysie (mort) même par d'une petite dose (1/10000000).

Les molécules de saponines comme les autres glucosides sont composés de partie de glucide et aglycone qui appelé saponigenine (**Anonyme , 1983**).

4. Les coumarines

Sont des composés naturels .la base de base ces composés est de benzo-o-pyrone ils se trouvent dans les plantes sous forme de dérivés de coumarines et furocoumarines localisés dans les différentes parties de plantes : les racines, les écorces, les feuilles et les fruits . Les coumarines possède une propriété anticoagulante, activité photo dynamique c.-à-d. ils peuvent augmenter la sensibilité de la peau à la lumière UV et c'est pourquoi en trouve une application dans le traitement .ils possèdent une activité spasmolytique et antiseptique, ainsi les coumarines sont caractérisés par des différentes actions sur l'organisme d'homme (**Anonyme ,1967**).

5. Les tannins

Les substances tannins sont appelés des composés polyphenols de végétaux de différentes masses moléculaire ayant une capacité de tanner du cuir. A l'époque actuelle on extrait des composés de phénols à basse masse moléculaire ; il ne pas de capacité de tanner du cuir, mais ils sont présentés comme les prédécesseurs biogéniques des substances tannantes (**Anonyme ,1977**).

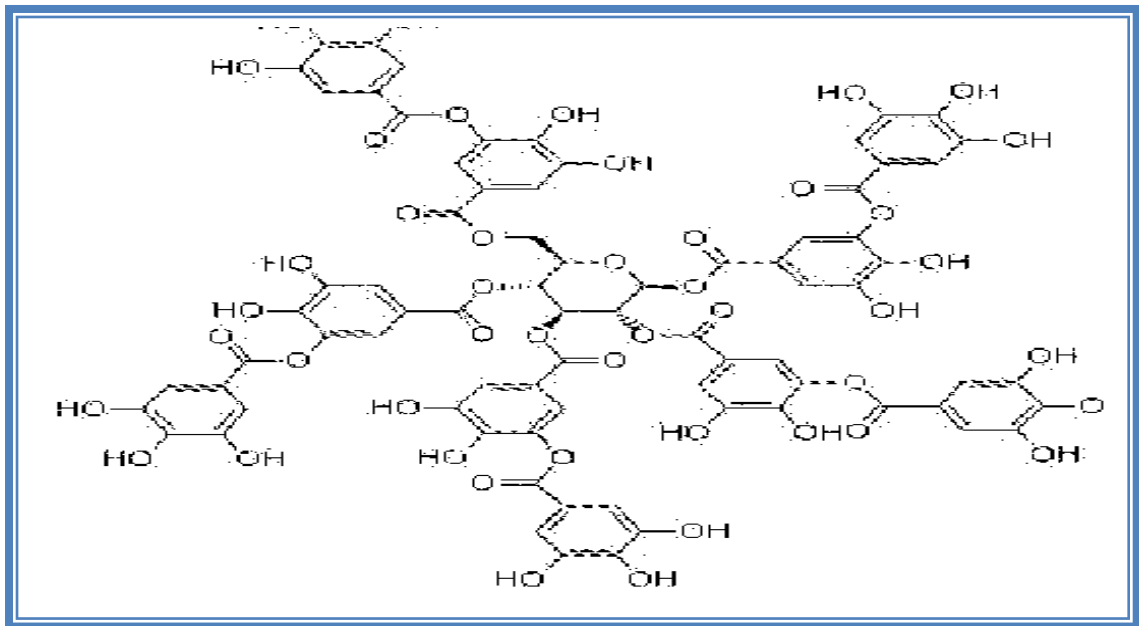


Figure N° 7: Squelette de base des tannins

<http://herbierfrance.free.fr/Pharmacognosie/Flanonoïdes.htm>

Chapitre N°:3

I- Extraction des huiles essentielles:

A. Différentes méthodes d'extraction des huiles essentielles

Le mode précis de l'extraction dépend de la texture de l'échantillon végétal à extraire ; sa contenance en eau et le type de substance à isoler ; cependant diverses techniques d'extraction sont utilisées pour extraire les huiles essentielles à partir des plantes aromatiques (**Laouer ,1995**).

1. Par distillation

Ce procédé risque de provoquer une modification de la composition de l'essence, due à la chaleur. La distillation se subdivise en hydro distillation, distillation à vapeur d'eau, et distillation par vapeur directe.

1.1 Hydro distillation

L'hydro distillation simple consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (**Bruneton ,1999**).

1.2 Distillation par vapeur d'eau

C'est la méthode la plus employée pour récupérer les huiles essentielles ,80 % d'entres elles sont récupérées, la distillation s'effectué en faisant passer à travers le matériel végétal un courant de vapeur d'eau qui entraine l'huile essentielle, les extraits obtenus sont refroidis, décantés et distillés et huile récupérée.

1.3 Distillation par vapeur d'eau directe

C'est la technique la plus récente, le matériel à distiller est déposé sur une grille de façon que la vapeur puisse le saturer et extraire l'huile essentielle qui sera véhiculée vers le réfrigérant pour être condensée (**Laouer ,1995**).

2. Par solvant organique

Certaines huiles essentielles ont une densité de celle de l'eau et le procédé de distillation ne peut être utilisé d'où la nécessité de recourir à une extraction par solvant organique, malgré leur faible pourcentage d'utilisation 3%.

2.1 Par solvant volatil

L'extraction par solvant volatil consiste en la mise e contact de la matière végétale avec un solvant qui dissout et extrait les constituants solubles contenus dans la plante. le solvant évacué ; l'opération peut être renouvelée plusieurs fois sur la même charge de matière végétale.

Actuellement les solvants les plus utilisée dans l'industrie sont : l'hexane, l'alcool éthylique et l'eau (**Benhabiles ,1995**).

2.2 Par solvant fixe

Cette méthode est appelée aussi extraction par épuisement au moyen de corps gras la solubilité des essences végétales dans les corps gras est un phénomène observé depuis longtemps et dans l'antiquité, on connaissait des huile parfumée par infusion des fleurs notamment des roses dans une huile végétale. (**Benhabiles ,1995**) Cette opération faite à froid porte le nom d'enfleurage et faite à chaud dans la graisse fondue celui de macération.

2.2.1 Enfleurage

L'enfleurage est procédé d'extraction très ancien. On l'utilise surtout pour des fleurs délicates comme la rose et le jasmin, l'artisan dispose les pétales de la fleur sur un corps gras purifié qui s'imbibe peu à peu des parfums de la fleur, lorsque le gras atteint son poids de saturation et qu'il ne peut absorber d'avantage de parfum, l'artisan nettoie la pommade obtenue, puis, il y ajoute de l'alcool, il laissera ensuite le tout se mélanger pendant environ 24 heures, cette étape sert à séparer le corps gras et les huiles essentielles. En dépit de la grande qualité des huiles essentielles obtenues par enfleurage,cette méthode n'est plus très courante, l'enfleurage est en effet un procédé très laborieux et il nécessite beaucoup de temps.Les huiles essentielles ainsi obtenues coutent donc très chères (**Laouer ,1995**).

2.2.2 La macération

La macération est un procédé qui consiste à laisser séjourner un solide dans un liquide froid pour en extraire les composés solubles, ou bien pour qu'il absorbe ce liquide afin d'en obtenir le parfum ou la saveur, pour le conserver ou pour qu'il s'y décompose. (**Laouer ,1995**).

B. Les paramètres influents sur les procédés d'extraction

1. La durée d'extraction

La durée de d'extraction dépend de la quantité désirée. Dans le cas d'une extraction par hydro distillation, le rendement augmente jusqu'à durée de temps déterminée expérimentalement, suite à cela il y a apparition d'un plateau qui indique la fin de l'extraction. Il fournit des informations sur la localisation de l'huile essentielle à l'intérieur de la plante. Ainsi les plantes dans lesquelles l'huile essentielle est située dans les grandes exogènes auront un temps d'extraction relativement court, tandis que les plantes dans lesquelles l'huile essentielle est située dans les grandes endogènes auront une tempe d'extraction plus long (**Flamand et Bioldeau ,1986**).

2. La température

La température du distillat est liée à la solubilité et l'évaporation de l'huile essentielle, dont il faut tenir compte pour le choix d'une température convenable. La récupération complète de l'huile essentielle des eaux de condensation dépend donc de la température de distillat recueilli à la sortie du condenseur. En augmentant celle –ci, la densité de l'huile essentielle diminue plus rapidement que celle de l'eau, et par conséquent, la séparation est améliorée, mais les risques d'évaporation et de solubilité sont alors importants.il faudra donc en tenir compte et choisir un compromis entre ces deux paramètres, en tenant compte d'autre facteurs, comme la nature de l'huile essentielle à extraire. De plus, si l'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau est effectuée à une assez grande échelle (semi-pilote) il faudra tenir compte de deux autre paramètres importants qui sont : la vitesse de distillation et la quantité de vapeur d'eau (**Flamand et Bioldeau ,1986**).

3. La vitesse de distillation

Elle est définie comme étant le volume de distillat recueilli pendant une heure à partir d'un appareillage de distillation ayant une capacité de 100 litres. Elle est exprimée en pourcentage ou en litre/heure ou parfois millilitre/minute (**Flamand et Bioldeau ,1986**).

4. La quantité de vapeur d'eau

On définit la quantité de vapeur d'eau utile, la vapeur utilisée pour l'entraînement de l'huile essentielle. Elle est évaluée par la quantité des eaux de distillation et s'exprime en kg de vapeur/kg de matière végétale, Elle dépend fortement de l'état de la matière végétale utilisée, de la quantité et de la composition de l'huile essentielle, ainsi que de la vitesse. (Flamand et Bioldeau ,1986).

II- Les méthodes de séparation

La méthode de séparation des constituants des plantes nécessitent une ou plusieurs technique chromatographique, le choix d'une technique dépend de largement des propriétés de solubilité et de volatilité des composés séparés (Ait hamlet,1998).

1. La chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode physico- chimique très largement utilisée, le but de cette opération n'est pas de conduire à une identification structurale des individualités, mais plus simplement de permettre une première approche de composition de l'échantillon, nombre de composés, classe chimique (Yrjone ,2004).

1.1 Principe de la technique

Il s'agit de migration du solvant par capillarité à travers le support d'une manière ascendante. Après la migration le repérage de molécules a effectué soit par ultraviolet (UV) soit par un colorant spécifique ou encore par exposition aux vapeurs d'iode ou par la localisation radioactive.

La distance de migration des composés est ensuite mesurée et comparée à celle de front de la phase mobile, ceci permet de définir la référence frontale R_f caractéristique de chaque composé (Laouver ,2004).

1.2 Le rapport frontal R_f

La valeur de R_f est définie comme suite :

R_f =distance entre l'origine et la tache de produit après élution/ distance entre l'origine et le front du solvant après élution.

Il existe une relation entre la structure flavonique et le RF ; cette valeur ne peut être considérée comme une constante physique de corps car elle est influencée par de nombreux facteurs tel que la qualité de la matière, la nature du solvant la technique employée, la température ainsi que les substituants, leur position sur le squelette flavonique. (Rzmdera ,1971) .

2. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Réalisé expérimentalement en 1952 par James et Martin , la chromatographie en phase gazeuse s'est montrée une méthode de plus appropriée à la séparation et l'identification des constituants des huiles essentielles particulièrement avec la programmation de la température. Elle permet à la fois l'analyse qualitative et quantitative (**J.Phys et Godon ,1969**)

2.1 Principe de la technique

Un fluide appelé phase mobile parcourt un tube appelé colonne, renferment un granulé poreux éventuellement imprégné d'un liquide appelé solvant ; ou phase liquide stationnaire a phase mobile qui l'entraîne à travers celle –ci. Si la phase stationnaire a été bien choisis, les constituant du mélange appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par celle –ci lors de la traversée de la colonne .de ce phénomène appelé « rétention » il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leur vitesses de déplacement sont en outre inégales ceci le conduit à sortir de la colonne les uns après les autres.

Accessoirement on enregistre un signal constant, appelé ligne de base en présence du fluide porteur, seul, et un pic au passage de chaque soluté séparé .le temps de chaque pic ou temps de rétention, caractérise qualitativement la substance concernée. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté objectif fondamental de la chromatographie moderne. (**Tranchant , 1995**) .

Chapitre N°4

1. Rappel sur les bactéries

Une bactérie est un microbe formé d'une seule cellule, visible au microscope, appartenant à une zone de transition entre le règne animal et le règne végétal. Comme toute cellule, les bactéries sont constituées d'un noyau, isolé ou diffus, un protoplasme contenant des granulations et des vacuoles, une paroi parfois d'une capsule. Certaines bactéries sont mobiles grâce à des cils vibratiles. Selon leur mode de nutrition et leur comportement vis-à-vis de l'oxygène, les bactéries sont classées en aérobies et en anaérobies.

Les bactéries se reproduisent selon deux modes:

La division simple ou scissiparité la sporulation, la spore représentant la forme de résistance et de dissémination du germe. Pour croître, les bactéries doivent trouver dans le milieu extérieur des conditions physico-chimiques favorables qui leur sont nécessaires et les aliments couvrant leurs besoins énergétique élémentaires et spécifiques. Sur le plan pratique, ces besoins sont satisfaits dans des milieux élaborés par l'homme en vue d'étudier les bactéries et sont appelés de ce fait milieux de culture (**Mogode ,2005**).

2. La structure bactérienne

Une bactérie est composée:

d'un noyau, contenant dans un seul chromosome, le patrimoine génétique de la cellule d'un cytoplasme contenant des ribosomes, siège des protéiques et éventuellement des plasmides d'une paroi, ou membrane, lui donnant sa forme, sa rigidité et ses antigènes, le constituant essentiel d'une paroi bactérienne est mucopeptid (**Rozier et al ,1985**).

3. Les principaux germes testés

L'étude de l'aromatogramme a été effectuée sur plusieurs souches bactériennes parmi lesquelles on indique:

3.1 *Escherichia coli*

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm , *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été ,diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (**Percival ,2004**).

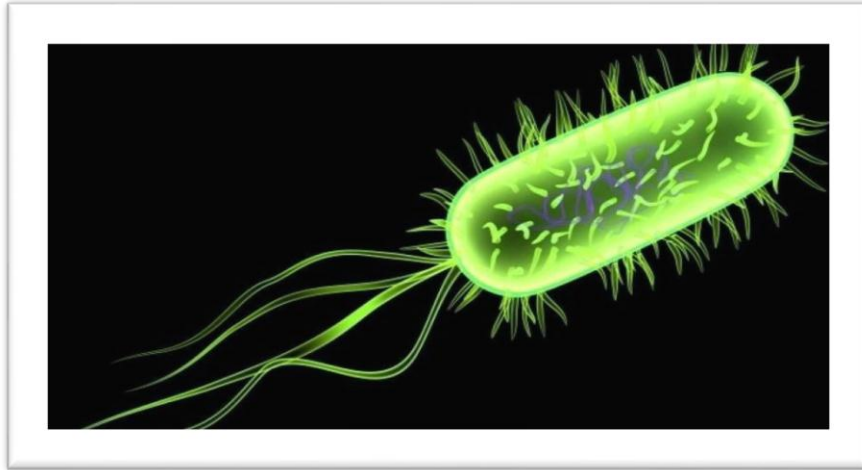


Figure N°8 : *Escherichia coli*

3.2 Klebsiella

Les espèces du genre klebsiella sont fréquemment présentes dans le sol et l'eau ; nombre de ces bactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique ce que certaines considèrent comme un avantage sur le plan nutritif pour les populations isolées dont le milieu environnemental comprend peu d'azote protéique, l'espèce klebsiella pneumoniae cause parfois une forme grave de pneumonie chez les humains. (Tortora, 2003)

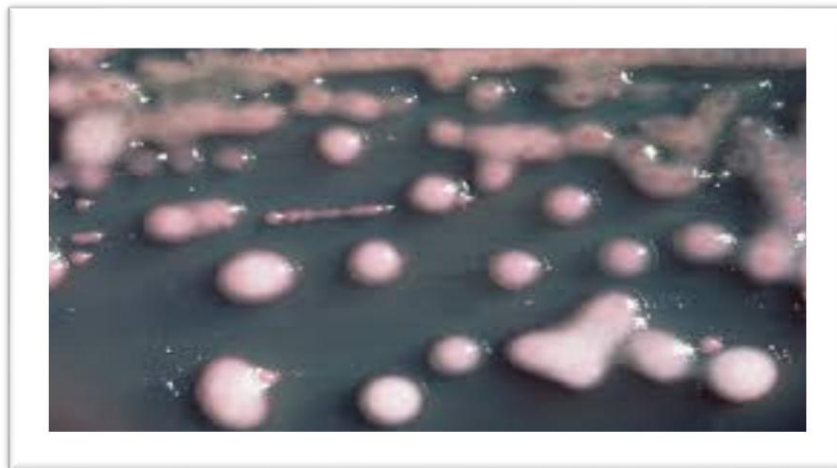


Figure N°9 : *klebsiella*

3.3 Pseudomonas aeruginosa

Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, ce type de bactérie synthétise de types principaux de pigments

pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine: jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques (**Percival , 2004**). *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales (**Van ,1998**).



Figure N°10 : *Pseudomonas aeruginosa*

3.4 *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries de type cocci à Gram positif ,qui se retrouvent fréquemment chez les personnes en bonne santé, habituellement dans la muqueuse du nez. La bactérie peut ensuite coloniser d'autres régions, via les mains, et en particulier les parties humides du corps comme les aisselles ou la zone génitale.

Parmi la quarantaine de type de staphylocoques existants, le staphylocoque doré (*staphylococcus aureus*) est le plus souvent rencontré dans les pathologies infectieuses . ce staphylocoque peut causer des infections graves .

De plus, il est l'un des principaux responsables des infections nosocomiales, c'est -à-dire contractées en milieu hospitalier, ainsi que des intoxications alimentaires.

Les staphylocoque sont à l'origine d'affections de la peau , le plus souvent bénignes comme l'impétigo , mais , le staphylocoque doré peut entraîner des infections plus graves comme certaines forme de pneumonies et de méningites bactériennes .ce type de bactérie est également une des principales causes d'intoxication alimentaire liée à des cas de gastroentérite. Lorsque les staphylocoques dorés se développent dans la circulation sanguine ,

ils peuvent se fixer dans les articulations, les os, les poumons ou le cœur .l'infection peut se révéler très grave et parfois même être mortelle (**Marshall et Wilmoth ,1981**)



Figure N°11 : *Staphylococcus aureus*

4. La sensibilité aux agents antibiotiques

Tout d'abord, il faut noter qu'il existe deux types d'agent antibactérien :

4.1 Les agents physiques

Les assurent la distraction des germes en modifiant leur environnement physico-chimique, leur multiplication est arrêtée et leur survie et compromise.

4.2 les agents chimiques

Ce sont des substances dans le contact avec les bactéries entraîne soit l'arrêt de leur multiplication (bacterostase) , soit leur destruction (bactéricide).

La découverte des antibiotiques a marqué une étape capitale de lutte contre les maladies infectieuses. Ces molécules ont permet d'épargner un grand nombre de vies. Ainsi, pour chaque souche isolée la recherche de la résistance doit être effectué.

La résistance aux antibiotiques est un phénomène recentre chez l'homme et chez l'animale.

Cette résistance consiste une caractéristique propre à l'espèce et délimite le spectre d'activité des antibiotiques.

PARTIE
EXPÉRIMENTALE

Chapitre N°5 :
Matériel et méthodes

Chapitre N°6 :
Résultat et discussions



Chapitre N°5

1. Description des travaux d'extraction des huiles essentielles et principes actifs

Avant de décrire le protocole d'extraction, il est utile de signaler les différentes tâches préliminaires entre autres :

✓ Echantillonnage

Le choix de la plante médicinale a porté sur le romarin dont le nom scientifique est «*Rosmarinus officinalis* L.». La partie aérienne servira comme matière première pour l'extraction des huiles essentielles.

✓ La récolte

La plante a été récoltée entière (tiges et feuilles) au niveau de la région d'El Hamma wilaya de Khenchela au mois de Mars.(pleine floraison).

✓ Le séchage

L'échantillon est nettoyé des poussières et impuretés, puis la partie aérienne qui constitue la matière d'étude a été séchée pendant 15 jours, dans une salle bien aérée à une température ne dépassant pas 35°C, à l'ombre pour éviter la photosensibilité.

Après séchage, le matériel végétal est broyé dans un broyeur électronique, la poudre est pesée à hauteur de 200g.

1.1 L'extraction de l'huile par hydro distillation

L'extraction de l'huile essentielle est réalisée au niveau de laboratoire de l'université de Khenchela, la méthode utilisée est celle de l'hydro distillation, ce procédé permet non seulement d'isoler les huiles essentielles à l'état pur mais, fournit aussi les meilleurs rendements.

1.1.1. Matériels

- Chauffe ballon de puissance 500w
- Ballon de capacité 2000ml
- Support
- Tube recourbé de conduite de vapeur.
- Réfrigérant.
- Ampoule à décanter

Mode opératoire

La matière végétale broyée (100g) est introduite dans un ballon en verre de 1L , rempli au 2/3 d'eau distillée , l'ensemble est portée à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon électronique régulé .

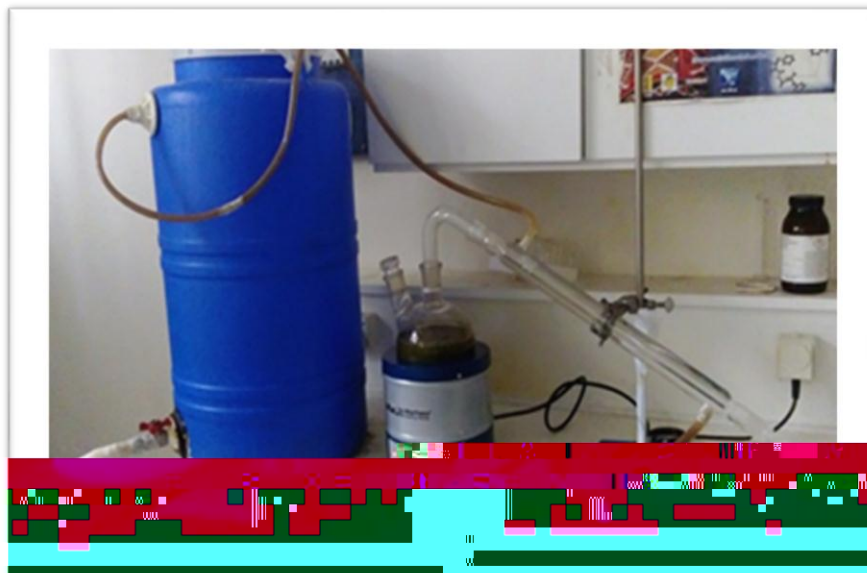


Figure N°12 : montage d'hydro distillation

Les vapeurs chargées d'eau et d'huile traversent un coude jouant le rôle d'une petite colonne, et se condensent dans un réfrigérant qui sera maintenu en position légèrement inclinée. Le distillat s'écoule goutte à goutte, il est recueilli dans une ampoule à décanter située à l'extrémité du tube réfrigérant ; Le ballon est alimenté d'eau aromatique (l'eau qui reste après récupération de l'huile essentielle) de façon à maintenir son niveau d'eau constant. La récupération se fait par fraction séparée à différents intervalles de temps jusqu'à 5 heures d' extraction .

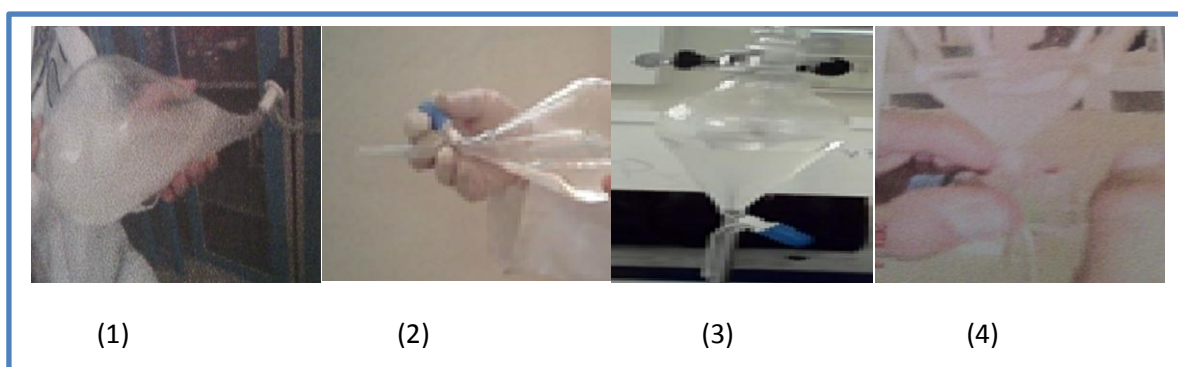
Tableau N°3 : Conditions opératoires d'hydro distillation de la plante romarin

Quantité de matière végétale	Quantité d'eau	température	Temps d'hydrodistillation
100g	1litre	100C°	5heures

1.1.2 Récupération de l'huile essentielle

La séparation des huiles essentielles de l'espèce *Rosmarinus officinalis* L, a été réalisée par l'éther de pétrole. le distillat a été transvasé dans une ampoule à décanter et auquel a été ajouté une quantité de l'éther de pétrole (½ le volume de distillat). L'ampoule à décanter a été hermétiquement fermée puis le contenu est agité pendant 3 mn en dégazant de temps en temps .L'ampoule est ensuite déposée sur un support pendant quelques minutes pour laisser décanter le contenu. Après décantation, deux phases apparaissent dans l'ampoule, une phase aqueuse, située dans la partie inférieure et une phase organique, de densité plus faible et contenant les huiles essentielles située au-dessus. Celles – ci sont recueillies séparément dans des flacons différents. le séchage de la phase organique a été effectué à l'aide d'un évaporateur rotatoire. Cette opération aboutit à l'élimination de l'éther de pétrole de l'huile essentielle.

Les huiles essentielles obtenues ont été conservées à la température de 4 C° jusqu'à leur utilisation.



(1) et (2) : agitation et dégazage du contenu de l'ampoule, (3) : séparation des deux phases (la phase organique : H,E + chloroforme. La phase aqueuse : eau distillé + traces d'huile). (4) : récupération de la phase organique dans un flacon et élimination de la phase aqueuse(H₂O)

Figure N°13 : étapes de séparation des phases du distillat

1.1.3 Le rendement en huile essentielle

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse de la matière végétale séchée traitée il est exprimé en pourcentage :

$$R_{dt} = (g/G) \cdot 100$$

g : masse de huile essentielle en (g)

G : masse de la matière végétale sèche en (g)

$$R_{dt} = (1,65 / 100) \cdot 100 = 1,65$$

Le rendement obtenu est très acceptable .

2. Essais photochimiques préliminaire

2.1 Extraction des principes actifs par solvants fixes

2.1.1 Matériels

- Fioles
- Papier filtre ou coton
- Rota vapeur

2.1.2 Solvants

- Méthanol
- Eau distillée

Mode opératoire

Les feuilles broyées, subissent une macération dans un mélange des solvants 70% (MeOH et 30% H₂O) pendant 24 heures.

Les divers fractions récupérées sont réunies et évaporées sous pression réduite à une température inférieure a 50°C au rota vapeur, jusqu'à l'obtention d'un résidu sec prêt a l'analyse . Ce dernier est récupère avec le MeOH



Figure N°14 : les étapes d'Extraction des principes actifs par solvants fixes

2.2 Recherche de quelques substances actives

Le but de ces tests est de connaître la composition en métabolites secondaires de *rosmarinus officinalis* L

Les tests sont effectués soit sur la poudre de broyat soit sur une infuse.

2.2.1 préparation de l'infuse

10g de poudre sont mis à infuser dans 100 mL d'eau bouillant pendant 15mn .le filtrat est ajouté à 100mL avec l'eau distillée.

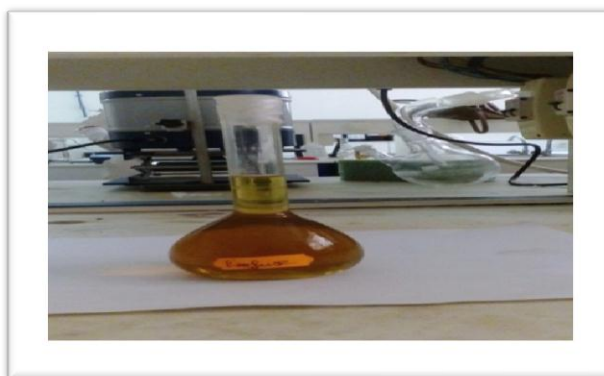


Figure N°15: l'infuse

a) Les polyphénols

Quelques gouttes d'HCl, sont ajoutées à 5ml d'infuse , la réaction donne une coloration rouge en présence de polyphénols .

b) Les Anthocyanes

Quelques gouttes d'ammoniaque sont ajoutés à 5ml d'infuse la réaction donne une coloration bleu en présence d'Anthocyanes.

c) les leucanthocyanes

Quelques grammes (2g) de plante, sont portés au bain marie bouillant pendant quelques minutes dans 20ml d'un mélange de propanol/ acide chlorhydrique, une coloration rouge se développe en présence de leucanthocyanes

D) les tannins

Quelques gouttes d'une solution de $FeCl_3$ 5% sont ajoutés à 5ml d'infuse .

La réaction donne une coloration bleue en présence des tannins .

e) les coumarines

mettre environ 1g d'une plante humide dans un tube à essais , couvrir le tube avec du papier filtre imbibé avec une solution de NaOH , placer le tube dans un bain marie chaud pour 2 mn , enlever ensuite le papier filtre et ajouter 0,5 de NH_4OH ,examiner sous lampe UV , une coloration de jaune fluorescent indique la présence des coumarines .

f) les alcaloïdes

Quelques goutte de réactif de Mayer est ajoutée à 5ml d'infuse. La réaction donne une précipitation.

g) Les composés réducteur

1 ml de l'extrait ajouter 5ml d'acide acétique contenant des traces de $FeCl_3$ et 5ml d'acide sulfurique contenant des traces de $FeCl_3$.

La présence des composés réducteurs est confirmé par la formation de deux phases, une coloré en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu- vert (acide sulfurique).

H) Les flavonoïde

5mL de l'extrait butanolique sont traité avec quelques gouttes d' $AlCl_3$ (1%).

La présence des flavonoides est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune

3. Chromatographie sur couche mince (CCM)**3.1 Matériels utilisés**

- Cuve chromatographique
- Micropipette
- Plaque d'aluminium recouverte de gel de silice
- Lampe de Wood pour la détection (UV 254nm , 365nm)

3.2 Réactifs

- Acétate d'éthyle
- Acide acétique Glaciale
- Eau
- Chloroforme
- Méthanol
- Acide formique
- n-butanol
- éther diéthylique

Mode opératoire

On introduit dans la cuve une quantité suffisante du mélange de solvant pour obtenir une épaisseur de 5 à 10 mm de liquide et on dépose l'extrait par une tache circulaire de 2 mm à 6 mm de diamètre à 10 mm environ du bord inférieur et à 10 mm au moins des bords latéraux de la plaque.

Lorsque l'échantillon est déposé et vaporisé, on place la plaque dans la cuve chromatographique en position verticale et on renferme la cuve.

Lorsque la phase mobile atteint environ 10 mm du bord supérieur, on enlève la plaque et on la laisse sécher pendant 15 mn.

Enfin Procéder à la révélation des tâches par exposition de la plaque à des chromatogrammes par l'ultraviolet à 254 nm et 365 nm.

Tableau N° 4: Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice

CCM sur gel de silice		
	Systèmes solvants	Proportions
Systèmes essayés	S1 :éthyle acétate/acide formique/acideacétique glacial / eau	100 : 11 : 11 : 26 v/v
	S2 :n-butanol/eau/acide acétique glacial	10 : 5 : 5 v/v
	S3 :chloroforme/acide acétique glacial/méthanol/eau	64 : 32 : 12 : 8 v/v
	S4 :Chloroforme/Acétate d'éthyle/acide formique	50 :40 :10 v/v
Systèmes choisis	S1 :éthyle acétate/acide formique/acideacétique glacial / eau	100 : 11 : 11 : 26 v/v
	S3 :chloroforme/acide acétique glacial/méthanol/eau	64 : 32 : 12 : 8 v/v

4. étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *rosmarinus officinalis* L

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles du romarin été effectuée aux niveau du laboratoire de biologie (Université de khenchela) sur les souches bactériennes : *Escherichia coli* ; *Klebsiella* ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Staphylococcus aureus* .

4.1 méthodes utilisées .

La méthode de diffusion sur milieu gélosé antibiogramme (méthode des disques)

4.1.1 matériels et produits utilises

- disque stériles de papier wattman (d=6mm)
- Milieu gélose (Müller-Hinton)
- L'eau physiologique pour la dilution des germes
- Souches a testé
- Micropipette

- Pipette pasteur
- L'anse de platine
- Boite de pétri
- Disque vierge
- Pince métallique
- Etuve à 37C°

4.1.2 préparation des disques

On a utilisé le papier wattman N°03 coupes en disques de 6mm. Ces derniers doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer.

Les disques seront placés dans un tube à vis pour stérilisation à l'autoclave pendant 20mn à 120C°

4.1.3 milieu de culture

La gélose Müller – Hinton est coulée en boite de pétrie à une épaisseur de 3 mm, et laisser condensée avant l'emploi.



Figure N° 16: Muller –Hinton coulée en boite de pétrie

4.1.4 Inoculum

A partir d'une culture pure de 18 H sur le milieu d'isolement, on recalc quelques colonnes bien isolées et parfaitement identiques.

On décharge l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile

- Bien homogénéiser la suspension bactérienne.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique s'il est trop fort.

4.1.5 Ensemencement

Cette opération doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

On fait placer (04) disque sur chaque boîte de pétrie, chaque une contient respectivement : **Escherichia coli** ; **Klebsiella** ; **Pseudomonas aeruginosa** ; **Staphylococcus aureus** .

A l'aide d'une micropipette, on met sur chaque disque une concentration différente (D_0 , D_1, D_2, D_3) de même H.E, puis on incube pendant 24 heures à l'étuve ($37C^\circ$).



Figure N°17 : les étapes de l'ensemencement

4.1.6 témoins

On prend un disque imprégné dans le DMSO et met dans le milieu ensemencée, ce disque représente un test témoin(-).

On prend deux disques imprégnés dans l'antibiotique « Amoxicilline » et « Gentamycine » et met dans le milieu ensemencé, ces disques représentent un test positif.

4.1.7 dilution

La dilution se fait par DMSO, possédant donc une activité antiseptique.

Le DMSO entre dans la composition de plusieurs préparations thérapeutiques, il solubilise les composants actifs de l'HE, C'est pour ces raisons que nous avons utilisé le DMSO comme solvant pour l'étude antibactérienne. La dilution de chaque huile essentielle se fait selon le protocole suivant :

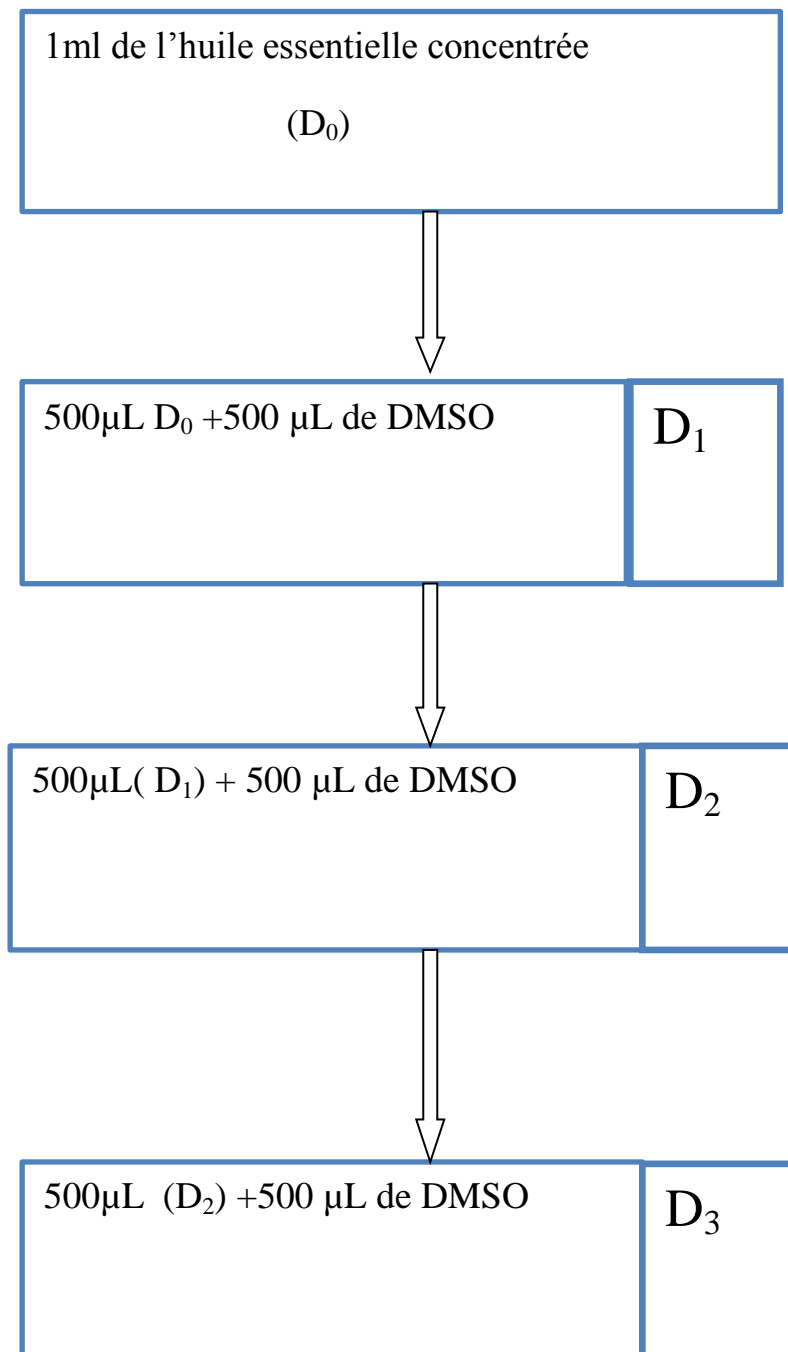


Figure N° 18 : protocole de la dilution

4.1.8 La lecture

L'activité antibactérienne de chaque HE de la plante test est évaluée par l'apparition des zones d'inhibition autour les disques .

Après 24 heures d'incubation de chaque boîte, on mesure avec précision les diamètres de ces zones d'inhibition avec un pied à coulisse ou une règle, pour chacune des boîtes de pétrie.

Si les diamètres des zones d'inhibition sont :

- $\emptyset < 8$: la bactérie résistante.
- $8 < \emptyset < 14$: la sensibilité est limite.
- $14 < \emptyset < 20$: un peu sensible.
- $\emptyset > 20$: la bactérie est très sensible

Mode opératoire

L'activité antibactérienne en milieu solide consiste à ensemencer le germe sélectionné par culture sur gélose en boîte de pétrie ou sont déposés les quatre disques , chacun imprégné d'une concentration différente de l'HE, après incubation a 37C° pendant 24 heures , les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones intactes autour des disques, donnés au comparaison avec le témoin .

On peut exprimer l'activité antibactérienne par indication directe du diamètre de la zone d'inhibition en (mm)




Chapitre N°:6


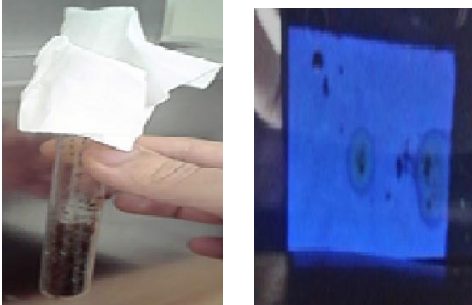
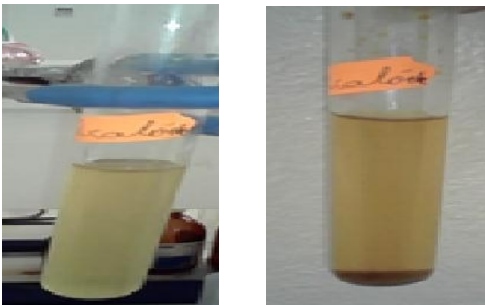
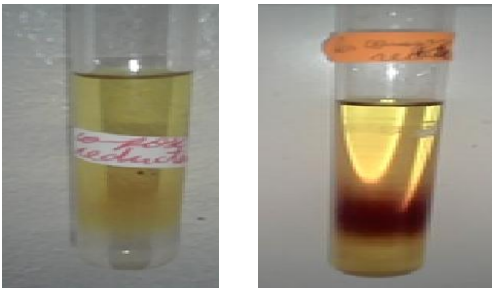
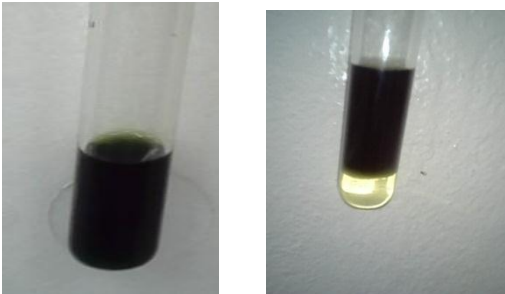
Résultats et discussions1. Criblage phytochimique de l'espèce *Rosmarinus officinalis* L :

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existants dans les parties étudiées de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

Les résultats obtenus des tests phytochimiques sont résumés dans le Tableau N°5

Tableau N°5 : les résultats de réactions en tubes de la partie arienne du romarin

Recherche	Résultats	
Les tanins	Apparition d'une coloration bleue noir(+)	Extrait brut 
Le polyphénol	Coloration rouge (-)	Extrait brut 
Les Anthocyanes	Coloration bleu (+)	Extrait brut 

les leucanthocyanes	une coloration rouge se développe(-)	Extrait brut 
les coumarines	une coloration de jaune fluorescent(+)	Extrait brut 
les alcaloïdes	une précipitation(+)	Extrait brut 
Les composés réducteurs	Une couche bleu vert pour l'acide sulfurique et une couche brun rouge pour l'acide acétique. (+)	Extrait brut 
Les flavonoïdes	L'apparition d'une couleur jaune (+)	Extrait brut 

La présence de l'intensité de la coloration et /ou des précipités .

Au vu de ces résultats, nous déduisons que la plante (*rosmarinus officinalis* L) échantillonnée à la région d'El Hamma wilaya de Khenchela , comme d'autre espèces de la famille des labiées , est riche en divers métabolites secondaires .Les résultats ont été positifs avec les tanins, Les Anthocyanes , les coumarines , les alcaloïdes , Les composés réducteurs et les flavonoïdes ;,ce qui explique l'intérêt et l'attention particulière portée par les chercheurs à travers les études scientifiques à cette plante. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par (Deghbouche selma et bellaa ibtissam (2013) qui ont travaillé sur une espèce de la même famille « labiées » que le romarin « *Teucrium polium* » .

2. Résultats de contrôles chromatographiques

Le développement de la méthode pour la Chromatographie sur Couche Mince commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire, la technique de développement choisie, dimension de la chambre de développement et de l'espace vapeur ont un effet prononcé sur la séparation.

Les chromatogrammes résultants comportent une série de spots, l'identification des composés était basée sur la comparaison des Rfs et couleurs observés sous lampe UV des taches apparues sur CCM.

Les spots apparaissent en différentes colorations (vert, jaune, violet, ...). Tout ce nombre de spots élevé et de couleurs variés constitue une indication sur la présence de plusieurs types de substances chimiques selon (Bruneton ,1993)

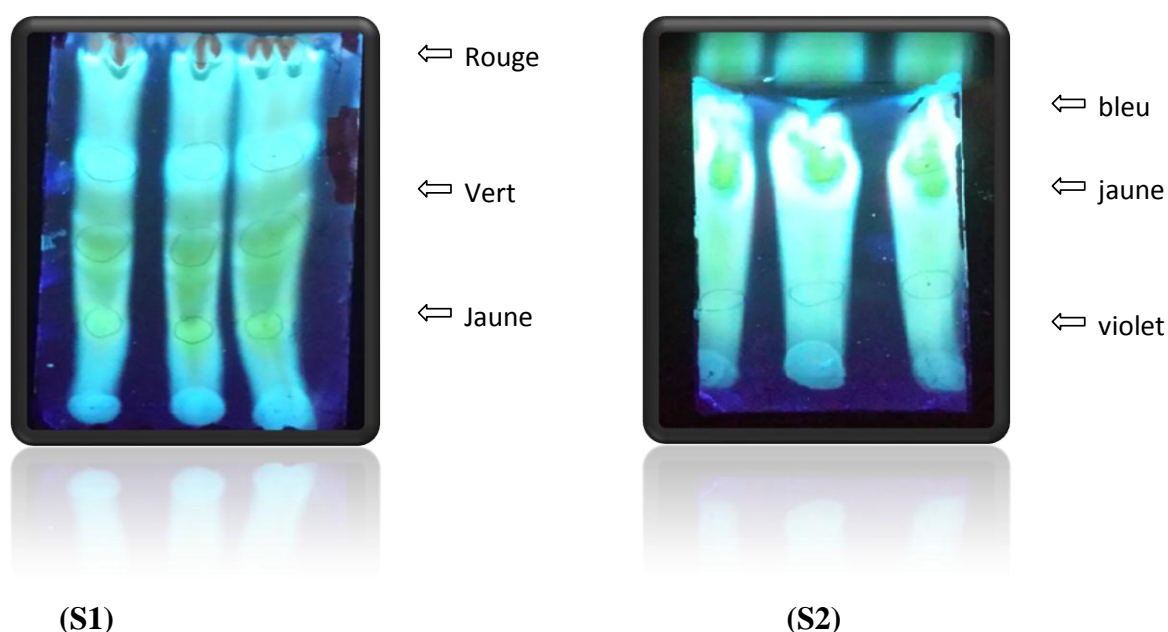


Figure N°19 : CCM de l'extrait brut méthanolique de romarin.

Tous les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau N°6 : Résultats de contrôle chromatographique

		Révélations sous lumière UV $\lambda = 254\text{nm}$					
Extrait brut méthanolique	Système		Nombre des tâches	Couleur	Rapport frontal (RF)	Type de Composé probable	
	01	éthyle acétate/acide formique/acide acétique glacial / eau					03
	03	chloroforme/ acide acétiqueglacial/ méthanol /eau		03	Bleu Jaune Violet	0.75 0,71 0,51	Les flavanones, méthoxyflavon es les flavonols

Rf = la distance entre le centre de la tâche et le point de départ / la distance entre le front du solvant et le point de départ .

Le CCM de l'extrait brut du romarin présente les tâches suivantes : (Rouge ,vert, jaune ,bleu,jaune,violet) ce qui indique la présence des (Flavone,Hydroxyflavone,Dihydroxyflavone, Les flavanones,méthoxyflavones,les flavonols Nos résultats concordent avec ceux obtenus par (**Zeghad ,2009**), qui a travaillé sur la même plante « (*rosmarinus officinalis* L » que nous. ces résultats démontrent la grande richesse de notre huile en différents composés, ces derniers confèrent à l'huile des vertus thérapeutiques remarquables

Résultats de l'antibiogramme

Après 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition des HE apparues sont mesurés pour les deux types d'HE (extrait et commerciale) et les quatre types de bactéries ((*Escherichia coli* ; *Klebsiella* ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Staphylococcus aureus*) avec quatre concentrations

d'HE de la plus concentrée vers la moins concentrée. les résultats sont mentionnés dans le tableau ci-dessous





E. coli	Klebsiella	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus
			

Figure N°20 : Les témoins positifs et négatifs de l'activité antibactérienne




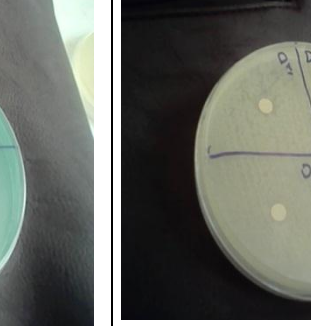
E. coli	Klebsiella	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus
			

Figure N° 21: effet antibactérien de l'huile essentielle extraite de romarin





E. coli	Klebsiella	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus
			

Figure N°22 : effet antibactérien de l'huile essentielle commerciale de romarin

Tableau N°7: Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de romarin

	Diamètre en (mm)				
	concentration	E.coli	Staph .au	Pseudo	Kle.sp
HE. de romarin extraite	D ₀	08	10	-	17
	D ₁	06	09	-	14
	D ₂	-	08	-	13
	D ₃	-	-	-	11
HE. de romarin commerciale	D ₀	-	-	-	-
	D ₁	-	-	-	10
	D ₂	-	-	-	-
	D ₃	-	-	-	-

3.1 Interprétation des résultats de l'antibiogramme

3.1.1 Pour l'Huile essentielle extraite

- Les résultats négatifs obtenus pour la souche *Pseudomonas* dans le tableau précédant peuvent être expliqués par le fait que notre échantillon (H.E) a un effet inhibiteur vraiment peu important sur la souche testée. L'absence de l'effet de l'huile extraite sur la souche (*pseudo*) peut être expliquée par la faible concentration des polyphénols dans notre échantillon. Ce qui est en accord avec les résultats obtenus par (**Benikhlef, 2014**) , sur la partie aérienne .
- Les résultats du test montrent également que l'H.E extraite a une activité antibactérienne acceptable sur les trois espèces (*E.coli* ; *Staph .au* ; *Kle.sp*) avec toutefois un certain gradient croissant d'efficacité : avec une zone d'inhibition de 08 et 06 mm pour *E.coli* et de 10,09 et 08 mm pour *Staph .au* et 17, 14, 13, 11 mm) pou (*Kle.sp*) , ce gradient décroissant est dans le sens klebs, staph et coli
- La zone d'inhibition augmente lorsque la concentration d'échantillon augmente.

3.1.2 Pour l'Huile essentielle commerciale

L'H.E commerciale n'a présenté aucune activité inhibitrice sur les trois souches (E.coli ; *Staph .au* ; pseudo) et pour toutes les concentrations .

Une activité limite apparente pour la souche (*Kle.sp*) avec une zone d'inhibition égale à 10 mm.

Tableau N°8 : résultats de l'activité antibactérienne de l'antibiotique Amoxicilline et gentamycine

Souches bactériennes	Le diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
	Amoxicilline	gentamycine	DMSO
E.coli	46	20	-
Staph .au	32	20	-
pseudo	-	13	-
Kle.sp	12	27	-

- L'amoxicilline s'est révélée très active vis-à-vis des souches testées avec des diamètres d'inhibition (46, 32, 12mm) tandis qu'elles manifestent une résistance à l'action de la gentamycine. Une résistance qui peut être expliquée par l'utilisation intense de cet antibiotique (La Gentamycine)

Conclusion

générale

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail de recherche sur l'extraction de l'huile essentielle de romarin et sur son activité biologique a conduit aux conclusions suivantes :

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle de romarin proche de celui des différents auteurs cités par la bibliographie et qui est d'ailleurs fort intéressant, rend l'utilisation de cette plante pour des applications médicamenteuses et dans l'industrie de la parfumerie très conseillée.

Les tests phytochimiques ont montré que les huiles essentielles renferment bon nombre de composés chimiques et principes actifs qui donnent au romarin son large éventail d'indications :

Les huiles essentielles renferment des essences de camphre, de cinéol, de verbénone ou de pinènes. Le romarin contient des flavonoïdes (diosmine, lutéoline), des diterpènes, comme le rosmadial et l'acide carnosolique, mais aussi des lipides (alcanes et alcènes). On trouve également des stéroïdes et des triterpènes (acide aléanolique, acide ursotique) et des acides phénoliques (acide rosmarinique, acide chlorogénique). Des phytoestrogènes ont des effets comparables aux hormones féminines.

Le CCM de l'extrait brut du romarin présente les tâches, ce qui indique la présence des (Flavone, Hydroxyflavone, Dihydroxyflavone, Les flavanones, méthoxyflavones, les flavonols ; ces omposés sont d'une importance primordiale dans les effets thérapeutiques que possède le romarin.

L'étude bactériologique sur les H.E (extraites et commerciales) par la méthode des disques à montré que les huiles essentielles concentrées présentent :

Une bonne activité antibactérienne sur des souches bien déterminées.

Toutefois, des analyses plus poussées sur la sensibilité seront souhaitables.

Les huiles essentielles extraites à partir de romarin algérien seront d'un intérêt économique certain pour l'industrie pharmaceutique algérienne.

les tests négatifs pour une huile essentielle commerciale du romarin comparée aux tests positifs de notre extrait renseignent sur la contrefaçon que connaît ce secteur.

Références bibliographiques

A

Adersen S ,2006. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase incisory activity. *J Ethmopharmacol*.

AIT H et ,Assag C , 1998 . Extraction des huiles essentielles de quelques plantes de annaba. and Applications. CRC Press. UK

André D et, Jacques B , 1981. nouveau dictionnaire médical, éd

Anonyme ,1977. les composés phénoliques origines végétales . Moscou édition Mir .p66-

Anonyme ,1983 .Analyse chimique des plantes médicinales Moscou édition académie vischaya chkala.

Anonyme, 1967 . les coumarines naturelles .Moscou édition naouka

Anonyme,1965 . matière médicale , tome 3 paris , H.moyes ,édition Masson paris.

Atik B,2007 .Composition chimique de L'huile essentielle de *Romarins officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & santé* .7 :6-11.

B

Balentine A ,2006 . The pre-and post-grinding application of rosemary and its

Baser Ket Buchbauer G, 2010 . Handbook of Essential oils : Science, Technology

Belakhdar J,1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Idis PRESS (Ed). Paris, p. 764.

Benhabiles N.H ,1995 . Comparaison de l'huile essentielle de deux espèce des Romarin : *Rosmarinus vicolyx* et *Rosmarinus officinalis* L extraction et étude analytique. Thèse magister.

Benikhlef A ,2014 Comparaisant entre les huiles essentielles et leurs effets antibactériens sur *Rosmarinus officinalis* de la région de Bechar et Ouargla , Université Abor Belkaid-Tlemcen

Références bibliographique

Boukhalfa T, 1991 . apport du couplage CPG/Smet CPG/TR dans l'analyse des mélanges naturels complexes : exemple de l'huile essentielle de romarin, thèse de magistère, USTB, Alger .

Boumlick,1995. botanique – systématique des spermaphytes ; édition : office des publications universitaires (ORU)

Bruneton J,1993. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. *2ème Ed Tec&Doc. Paris.*

Bruneton J,1999 . Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Tec. Et Doc.

Bruneton J,2008. Pharmacognosie – Phytochimie, plantes médicinales, 2eme Ed, Paris, Tec

D

Daufine A, 1999. secret herboriste 250 plantes médicinales ; m anctionetmulot 5^{ème} édition.

Deghbouche selma ,bellaa ibtissam , 2013 . Effet cicatrisant et antibactérien des extraits de *Teucrium polium* (El- khayata) à de la région de kenchela

Dupont F et Guignard J ; 1944.Lguignard,édition Masson. Botanique 9ème édition

E

effects on lipid oxidation and during storage of ground beef. *Meat Science*.73, p.413-421.

EL shazlua,Dorai G et Wink M,2002 . composition antimicrobial activiy of essential oil and Hescane . Ether Extract of different plantes . Freinbr and fertigo Z . Naturforsh .

F

Fernandez L ,2005. Antioxidant and antibacterial activites of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat science*.p.69 :371-380.

Flamand E et Bioldeau J,1986 . chimie organique moderne

Références bibliographique

G

Gonzalez M E,2007. Evaluation of antinociceptive effect of *Romarin officinalis* L.using three différent experimental models in modents .*J theopharmacol.* 111:476-482.

Grund D,1983. Plantes médicinales, 256 illustrations en couleur, paris

Guydeysson ,1978 . organisation et classification des pentes vasculaires cours de botanique générale .Ed.SEDES. 435p

H

Hadj chadi M, benchouikh.Z et cherifi,S,2005. dérige par Melle Ismaili, S mémoire de fin d'étude option chimie pharmaceutique : extraction et analyse de l'huile essentielle de la menthe poivrée et formulation une pommade antiseptique.

Henrich, 2006. Ethnobotany and Flavonoids-potent and versatile.

L

Laouer H, 1995 . thèse de magistère en biologie végétale – setif-contribution a l'étude des plantes médicinales du massif de boutaleb phytomasse de resmarines tournefortu de noé ; effet de l'altitude et l'exposition sur la composition des ses huiles essentielles

Laouwer H, 2004. Diplôme de doctorat d'état. Option :Ecologie végétal.

Lavoisier. 3eme édition. 1999, P: 484-488.

M

Mann J,1987, Secondary metabolism. Second edition, Clarendon press, Oxford, p.374

M.Gàbor,1988 .plantes flavonoids in biology and Medecine II ; biochemical , celluler and Medicinal Properties , édés, V Cody, E , Middleton Jr, J. B .Harborne ,A, Beretz ; A,R ; liss , inc, New yotk1-15 .

Marie E, Farid CH, Jacqueline N et Smadja H,2004. Flavour And Fragrance Journal Flavour Fragr. J.; 19: 134-13 8.

Max W et Rebert, A, 2003. plantes médicinales, 2émé édition

Références bibliographique

Mogode L,2005. Etude phytochimique et pharmacologique de cassia nigricansvahl (caesalpiniaeeae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchd » .

Moureau F, 1960. botanique , encyclopédie de la pléiade ,édition : gallimard. msterdam; Boston, 2004, p. 480.

N

NT et WS Beniston,1984. fleurs d'Algérie

P

Pascal H ,Pierre C ,1991 . Encyclopédie de médecin naturelle : phytothérapie aromathérapie ; belaille ; paris

Percival,2004 . Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, A

Phys,Bauer J, et Godon A ,1969. chromatographie en couche mince et sur papier des huile essentielles Ed ; Masson .paris .

R

Régnier Jet WEITZ R ,1991 . tome premier ; MASSON ET C , éditeurs LIBRAIRES de l'académie de médecine 120 , boulevard saint . Germain Paris (VI).

relative antioxidant effectiveness in pork sausage. Meat science .69:289-296.

-Répartition, contribution : membres du réseau Tela botanica.

Rozier J et bolnot,V,1985. Carlier, bases microbiologique de l'hygiène des aliments. Maison alfortparis

Rzmdera , K,1971. chromatographie couche mince.

S

SacchettiA et Collaborateurs ,2005. Growing in Argentina.Bioresource Technology. (In press).

Références bibliographique

Sebrotynek H,2005. Comparison of natural rosemary extract and BHAIBHT for

T

Tortora F,2003. introduction à la microbiologie.

Tranchant J,1995. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse , Ed Masson .paris

Tsai S, 2007. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of streptococcus sodrinus .Food chem. (in press).

V

Van Delden C. and Iglewski B H ,1998 . Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 4: 551-560.

voak Jet stokalo J, 2008 . les plantes médicinales ; 256. Illustration en couleurs .

W

Wang T ,2008. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L.essential ou comared to its main components.Food Chem. 108:1019-1022.

Weckesser E,2007. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. Phytomedicine. (In press).

Y

yassin Fourati ,2005 . Mémoire de fin d'étude d'igénieur « étude phytochimique et biologique de l'espèce rosmarinus officinalis ». M'sila.

Yrjonen T,2004. Extraction and planar chromatographic separation Technique in the analysis of natural products. Conference Room 513 at Viikki infocentre (Viikinkaari11),Faculty of pharmacy of university of helsinki.65P.

Z

Références bibliographique

Zeghad N,2009 . Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne

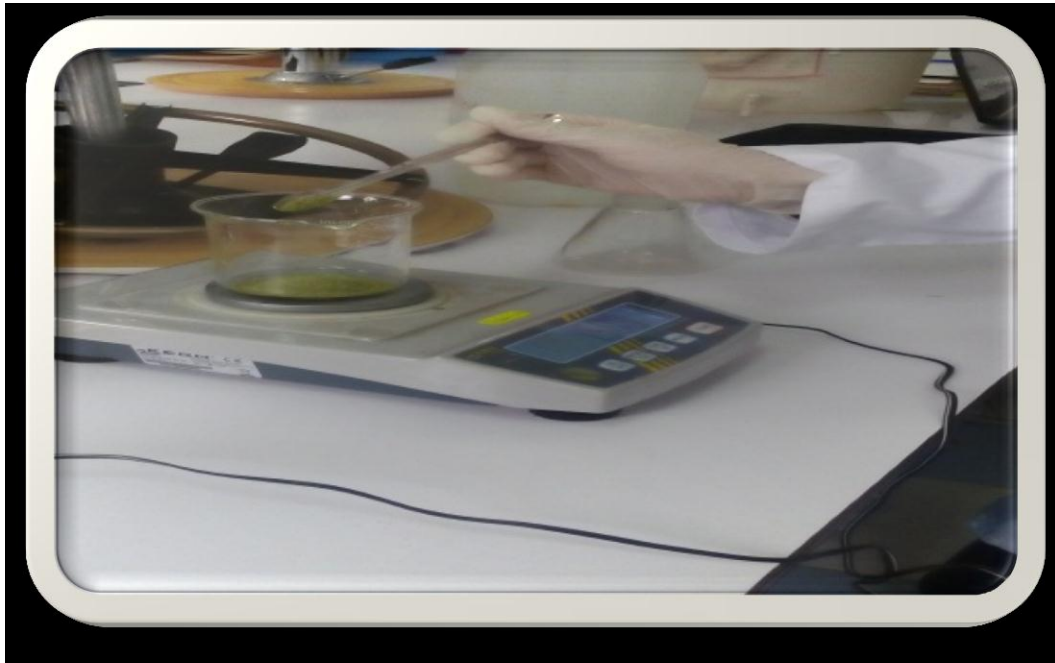
(1) www.feminin.ch/santé/aroma/aromathérapie.com.



Rota vapeur



Plaque chauffante



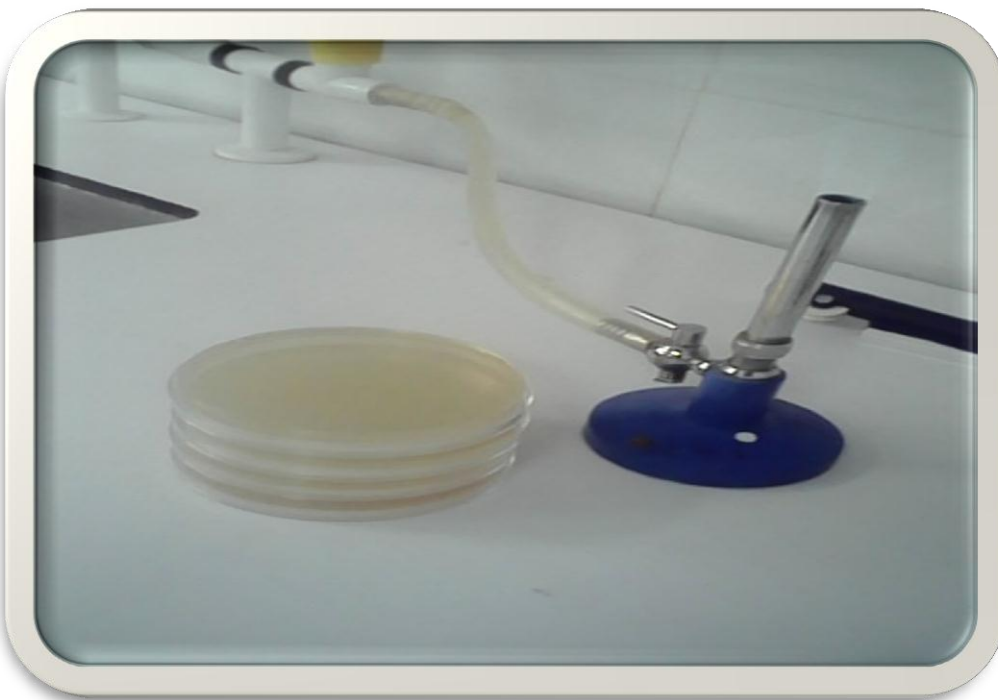
Balance



Bain marie



Lampe UV



Bec bunsen

Résumé :

Le romarin est une plante médicinale très répandue en Algérie, elle est riche en composés biologiquement actifs.

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par l'hydro distillation simple.

Le screening phytochimique a révélé que cette plante contient : des tanins, des Anthocyanes, des coumarines, des alcaloïdes, des composés réducteurs et des flavonoïde.

La technique d'analyse chromatographique (CCM) a permis d'isoler un spot qui peut signifier la présence de (Flavone, Hydroxyflavone, Dihydroxyflavone, Les flavanones, méthoxyflavones, les flavonols).

Le test de l'activité antibactérienne de notre huile essentielle sur 4 souches bactériennes *E.coli*; *Staph .au*; *Kle.sp et pseudo a* révélé une sensibilité acceptable de ces bactéries vis-à-vis de notre extrait

Mots clés : Rosmarinus officinalis, huile essentielle, activité antibactérienne

ملخص:

الاكليل من النباتات الطبية الشائعة الانتشار في الجزائر , غنية بالمركبات النشطة بيولوجيا

تمت عملية استخلاص الزيوت الاساسية بطريقة التقطير المائي العادية

الفرز الفيتوكميائي لهذا النبات اثبت انه يحتوي على الفلافونودات, الدبغيات, الكومارينات, المركبات المرجعة و الفلويديات

اختبارات فيتوكميائية على هذه النبتة اعتمدت على استخلاص مواد فعالة و زيوت اساسية-

طريقة التحليل الكروماتوغرافي CCM سمحت بعزل المركبات التالي (Flavone, Hydroxyflavone, Dihydroxyflavone flavanones, méthoxyflavones, les flavonols

تقييم الفعالية ضد البكتيري الزيت الاساسي على 4 سلالات : (*E.coli*; *Staph .au*; *Kle.sp et pseudo*)

كان بطريقة الانتشار عبر الاقراص .

النتائج المتحصل عليها اوضحت وجود حساسية مقبولة تجاه بعض الجراثيم

الكلمات المفتاحية: نبتة الاكليل , الزيت الاساسي, الفعالية ضد البكتيريا ,

Summary :

Rosemary is an herb widely used in Algeria, it is rich in biologically active compound.

The extraction of essential oils was carried out by hydro simple distillation.

The phytochemical screening revealed that this plant contains: tannins, anthocyanins, coumarins, alkaloids, reducing compounds and flavonoids.

The chromatographic analysis technique (TLC) was used to isolate a spot that could mean the presence of (Flavone, hydroxyflavone, Dihydroxyflavone, The flavanones, méthoxyflavones, flavonols).

The test of the antibacterial activity of our essential oil on bacterial 4souches *E.coli*; *Staph .au*; *Kle.sp and pseudo* revealed an acceptable sensitivity vis-à-vis bacteria in our extract

Keywords: Rosmarinus officinalis, essential oil, antibacterial activity