

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département des sciences alimentaires

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

HAMIDI SARA et YAHIA BEY SOUHILA

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCE ALIMENTAIRE

Spécialité: Nutrition et Pathologie.

THÈME

*Etude de quelques propriétés biologiques des huiles essentielles de
Rosmarinus officinalis de la région de Mostaganem*

DEVANT LE JURY

Président	A. CHAALEL	Grade	MCA	U. Mostaganem
Examineur	N. BOUZIANE	Grade	MAA	U. Mostaganem
Encadreur	N. BOUKEZZOULA	Grade	MCA	U. Mostaganem

Thème réalisé au laboratoire des Microorganismes bénéfiques, des Aliments

Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS)

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciements

Tout d'abord, Nous remercions Allah, le Clément, le Miséricordieux qui nous a donné la patience, l'énergie et la volonté afin de finaliser ce travail.

Partant du principe que celui qui ne remercie pas les gens ne remercie pas Dieu, nous adressons nos plus grands remerciements et gratitude à tous ceux qui nous ont tendu la main et nous ont aidés à mener à bien cette recherche, et parmi eux je cite particulièrement à notre encadreur ***Dr N. Boukezzoula*** qui a supervisé très attentivement la recherche, et pour la patience et les efforts qu'elle a consacrés sincèrement grâce à ses conseils et à ses critiques constructives contre tout mal pour faire avancer la recherche au niveau requis jusqu'à la fin de ce mémoire.

On exprime toute nos gratitude et nos remerciements à les membres du jury ***Dr A. CHAALEL*** et ***Dr N. BOUZIANE*** pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail et de présider ce jury et pour sa grande disponibilité et pour son total dévouement.

Nous remercions tous les membres de l'équipe de laboratoire (LMBAFS) spécialement ***Mm Djahira*** pour leur accueil, leur sympathie ainsi que leurs idées constructives. Un grand Merci également à tous les enseignants de département "**Sciences alimentaires**".

Nous remercions en fin tous ceux qui n'ont pas été cités dans ces quelques lignes et qui ont contribués de près ou de loin par leur aide au bon déroulement de ce travail.

Dédicaces

Merci dieu le tout miséricordieux, ton amour et tes grâces à mon égard m'ont donné la persévérance et le courage pour accomplir ce travail.

Je me dédie ce succès et je voudrais me remercier pour ce qu'il est maintenant. Vous arriverez parce que vous méritez.

À mes plus grands soutiens et sources d'inspiration, je dédie ce travail avec tout mon amour et ma reconnaissance infinis.

À Mon paradis ma source de ma vie, ma lune et le fil d'espoir qui allumer mon chemin. Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles "**Ma mère**". A celui dont je porte le nom celui, qui m'a appris l'importance du travail acharné, de la persévérance et de l'honnêteté, je suis reconnaissante pour tes conseils avisés et ton soutien sans faille. Tu m'as inspiré à viser plus haut et à poursuivre mes rêves. Je te suis infiniment reconnaissante pour ton soutien indéfectible, ta confiance en moi et ton amour "**Mon père**".

Pour ceux avec qui j'ai grandi aux bougies qui éclairent mon chemin et à l'inspiration de ma réussite mes efforts et qui ont été partenaires de chaque sourire, de chaque larme et de chaque chagrin Et tous mes souvenirs, mon côté constant "**Mes frères**" (**Ahmed, Abdessamad, Abdelbassit**).

À compagnon de mille aventures et confident de tous les instants et amie de toujours, à celui qui a partagé avec moi le fardeau des débuts et la douceur des fins "**Souhila**".

À tous ceux qui m'ont apporté force et conseils, ont cru en moi et m'ont soutenu dans les moments difficiles pour atteindre mon objectif.... À chaque passant de ma vie qui a laissé une belle trace...

Sara

Dédicaces

Au nom de Dieu, le Très Miséricordieux, le Très Miséricordieux Louange à Dieu pour qui nous n'avons réussi ni relevés ni excellé sans Son bon plaisir, Louange à Dieu, qui n'a parcouru aucun chemin ni manqué un effort sauf par sa grâce, et c'est à lui que l'on attribue la perfection et l'achèvement. Après un parcours universitaire qui a duré 05 ans, qui a entraîné beaucoup de difficultés, d'épreuves et de fatigue, me voici aujourd'hui. Au seuil de mon diplôme de fin d'étude et je lève mon chapeau avec fierté, que Dieu soit loué, par amour, grâce et gratitude, je n'aurais pas fait cela sans la grâce de Dieu.

Je dédie mon diplôme à **Moi-même** et à l'âme pure de **Ma grand-mère Halima**.

À celle qui a été la première à me soutenir dans la réalisation de mes ambitions, la lumière de mes yeux, mon refuge et mon bras droit **Ma mère Yamina**.

À mon soutien la source de sécurité et ma fierté dans laquelle je puise ma force **Mon père Slimane**.

À aux mains qui ont enlevé les épines de l'échec de mon chemin, celles qui m'ont soutenu lorsque ma faiblesse et avec encouragement **Ma sœur Wafa** et **Mon frère Radouane**.

À ceux qui sont heureux de ma réussite et qui m'ont soutenu malgré mes difficultés **Ma tante Kheira** et **Mon frère Said** et je n'oublierai jamais **Mon grand-père Mohamed** et **Ma grand-mère Fatma**.

À compagnon de mille aventures et confident de tous les instants et amie de toujours, à celui qui a partagé avec moi le fardeau des débuts et la douceur des fins " **Sara** ". Mon parcours universitaire n'a pas été court et les choses n'ont pas été faciles, mais avec l'aide de Dieu, mon rêve est devenu réalité et je l'ai fait, **Dieu merci**.

Souhila

.Résumé

L'objectif de notre travail consiste à évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles obtenues à partir d'une plante médicinale (*Rosmarinus officinalis*), vis-à-vis de cinq souches pathogènes testées : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus cereus* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, en utilisant la méthode de diffusion des disques (Aromatogramme) sur un milieu gélosé (Muller Hinton).

Notre travail vise également à savoir l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* en utilisant le radical libre DPPH.

Les résultats de l'activité antimicrobienne sont exprimés par les diamètres des zones d'inhibition, concernant les huiles essentielles, les résultats diffèrent d'une souche à l'autre, ils sont compris entre 10,65mm et 16,56mm respectivement pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922.

Dans le but d'évaluer l'activité antioxydante, elle a démontré que les valeurs IC50 étant de l'ordre 91,93mg/ml pour les huiles essentielles des plantes de *Rosmarinus officinalis* et 63,06371mg/ml pour l'acide ascorbique. D'après les résultats obtenus, les huiles essentielles obtenues possèdent un pouvoir antioxydant important.

L'ensemble des résultats indiquent que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* possède un effet très intéressant et important vis-à-vis de souches pathogènes testées.

Mots-clés : *Rosmarinus officinalis* - Les huiles essentielles- Les souches pathogènes- Activité antimicrobienne- Activité antioxydante.

ملخص

الهدف من عملنا هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية التي يتم الحصول عليها من نبات طبي (*Rosmarinus officinalis*) مقابل خمس سلالات ممرضة تم اختبارها : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus cereus* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6633 ؛ باستخدام طريقة نشر القرص (Aromatogramme) على وسط أجار (Muller Hinton).

يهدف عملنا أيضا إلى تقييم نشاط مضادات الأكسدة للزيوت الأساسية (*Rosmarinus officinalis*) باستخدام الجذور الحرة DPPH.

يتم التعبير عن نتائج النشاط المضاد للبكتيريا من خلال أقطار مناطق التثبيط، فيما يتعلق بالزيوت الأساسية، تختلف النتائج من سلالة إلى أخرى، وتتراوح بين 65,10 ملم و 56,16 ملم على التوالي لـ *Escherichia coli* ATCC25922 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 من أجل تقييم نشاط مضادات الأكسدة، تم إثبات أن قيم IC50 تبلغ حوالي 91.93 مجم/مل للزيوت الأساسية لنباتات *Rosmarinus officinalis* و 63.06371 مجم/مل لحمض الأسكوربيك. ووفقا للنتائج التي تم الحصول عليها، فإن الزيوت الأساسية التي تم الحصول عليها لديها قوة كبيرة مضادة للأكسدة . تشير جميع النتائج إلى أن الزيوت الأساسية لـ *Rosmarinus officinalis* لها تأثير مثير للاهتمام ومهم للغاية مقارنة بالسلالات المسببة للأمراض التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: اكليل الجبل _ الزيوت الأساسية _ السلالات الممرضة _ النشاط المضاد للبكتيريا _ النشاط المضاد للأكسدة.

Abstract

The objective of our work is to evaluate the antimicrobial activity of essential oils obtained from a medicinal plant (*Rosmarinus officinalis*), vis-à-vis five pathogenic strains tested *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus cereus* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, using the disc diffusion method (Aromatogram) on a agar medium (Muller Hinton).

Our work also aims to evaluate the antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* HEs using the free radical DPPH.

The results of antimicrobial activity are expressed by the diameters of the inhibition zones, concerning essential oils, the results differ from one strain to another, and they are between 10,65mm and 16.56mm respectively for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922.

In order to evaluate the antioxidant activity, it demonstrated that the IC₅₀ values being of the order of 91.93 mg/ml for the essential oils of *Rosmarinus officinalis* plants and 63.06371 mg/ml for ascorbic acid. According to the results obtained, the essential oils obtained have significant antioxidant power.

All the results indicate that the essential oils of *Rosmarinus officinalis* have a very interesting and important effect compared to the pathogenic strains tested.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* - Essential oils - Pathogenic strains - antimicrobial activity - antioxidant activity.

Liste d'abréviation

°C : Degré Celsius

µg : Microgramme

µl : Microlitre

µm : Micromètre

ATCC : American type culture collection

BHA : Butyl Hydroxy Anisol

BHT : Butyl Hydroxy Toluène

cm : Centimètre

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

E. Coli : *Escherichia coli*

g : Gramme

GBIF : Global Biodiversity Information Facility

HE : Huile essentielle

IC₅₀: Concentration d'inhibition

kg : Kilogramme

L : Lamiaceae

LMBAFS : Laboratoire des micro-organismes bénéfiques des aliments fonctionnels et de la santé

m : Mètre

M.H : Mueller Hinton

mg : Milligrammes kilogramme

mm : Millimètre

nm : Nanomètre

OMS : Organisation mondiale de la santé

R. : Romarin

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

TBHQ : Ter-Butyl-hydroxy-quinone

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractéristiques de souches bactériennes testées	33
Tableau 02 : les valeurs des IC₅₀ des échantillons testés et d'acide ascorbique	46

Liste des figures

Figure 01 : Feuilles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	6
Figure 02 : Fleurs de <i>Rosmarinus officinalis</i>	6
Figure 03: Répartition géographique de <i>Rosmarinus officinalis</i> selon la biodiversité mondiale Centre d'information (GBIF)	9
Figure 04 : Aspect morphologique du <i>Rosmarinus officinalis</i> L	10
Figure 05 : Composés phénoliques caractéristiques des extraits de Romarin	12
Figure 06 : Structures chimiques de tanin présent chez <i>Rosmarinus officinalis</i>	12
Figure 07 : Structures générique des flavonoïdes chez <i>Rosmarinus officinalis</i>	13
Figure 08: Structures chimiques des principaux composés présents dans les feuilles de romarin, huiles essentielles (camphre, 1,8-cinéol, α-pinène, bornéol et x-terpinéol)	18
Figure 09 : Schéma du procédé d'entraînement à la vapeur d'eau	20
Figure 10 : Schéma du procédé d'hydrodiffusion	21
Figure 11 : Principe de la technique d'hydro distillation (Distillation simple)	22
Figure 12 : Schéma du procédé aux ultrasons : bac et sonde.	23
Figure 13 : Localisation du site de prélèvement des échantillons de <i>Rosmarinus officinalis</i>	30
Figure 14 : Partie aérienne de <i>Rosmarinus officinalis</i>	31
Figure 15 : Hydrodistillateur de type Clevenger pour l'extraction de l'huile essentielle de Rosmarinis Officinalis (laboratoire de Biochimie N°01 au niveau de faculté SNV université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem) et les huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	32
Figure 16 : Stérilisation du Matériels	34
Figure 17 : Réactivation des souches bactériennes	35
Figure 18 : Gélose Mueller Hinton stérile coulée dans des boites de pétr	35
Figure 19 : Ensemencement sur milieu MH	36
Figure 20 : Dépôt des disques sur milieu solide	36
Figure 21 : Principe du test DPPH	37

Figure 22 : Préparation de la solution du DPPH	38
Figure 23 : Préparation des échantillons	38
Figure 24 : Mesure du diamètre de la zone d'inhibition.	41
Figure 25 : Résultats obtenus pour <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	41
Figure 26 : Diamètres des zones d'inhibitions <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	42
Figure 27 : Résultats obtenus pour <i>Bacillus cereus</i> ATCC 6633, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	42
Figure 28 : Diamètres des zones d'inhibitions <i>Bacillus cereus</i> ATCC 6633, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	43
Figure 29 : Activité de piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles du romarin	45
Figure 30 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique	46
Figure 31 : Diagramme représente la comparaison entre IC50 des HEs et IC50 d'acide ascorbique.....	47

Table des matières

Remerciement	
Dédicaces	
Résumé	
ملخص	
Abstract	
Liste des abréviations	
Listes des tableaux et des figures	
Table des matières	
INTRODUCTION.....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE I :L'espèce végétale	5
I.1. Définition	6
I.2. Taxonomie	8
I.3. Distribution géographique	8
I.4. Description botanique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	9
I.5. Composition chimique.....	11
Huile essentielle.....	11
Phénols diterpinéques.....	11
Dérivés de l'acide cinnamique (tannins).....	12
Flavonoïdes.....	13
I.6. Les propriétés du Romarin	13
I.7. Utilisations du romarin	14
I.7.1- En cosmétique	14
I.7.2- En gastronomie	14
I.7.3- En phytothérapie	15
CHPITRE II : Les huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	16
II.1. Définition des huiles essentielles	17
II.2. Compositions Chimique des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	18
II.3. Les Propriétés des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	18
II.4. Technique d'extraction des huiles essentielles.....	19
II.4.1. Techniques classiques.....	19
II.4.1.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	19
II.4.1.2. Extraction par Hydrodiffusion	20

II.4.1.3. Extraction par Hydrodistillation.....	21
II.4.2. Techniques récentes.....	22
II.4.2.1. Extraction assistée par microondes.....	22
II.4.2.2. Extraction aux ultrasons	23
II.5. Rôle des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	23
Chapitre III : Les micro-organismes étudiés Espèces bactériennes.....	25
III.1. Définition	26
III.1.1. Description des microorganismes étudiés	26
III.1.1.1. Escherichia coli	26
III.1.1.1.1. Pouvoir pathogène	26
III.1.1.2. <i>Candida albicans</i>	26
III.1.1.2.1. Pouvoir pathogène	27
III.1.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	27
III.1.1.3.1. Pouvoir pathogène	27
III.1.1.4. <i>Bacillus cereus</i>	27
III.1.1.4.1. Pouvoir pathogène	28
III.1.1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
III.1.1.5.1. Pouvoir pathogène	28
Chapitre IV : Matériels & Méthodes	29
IV.1. L'objectif de L'essai	30
IV.2. Préparation de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	30
IV.2.1. Matériels.....	30
IV.2.1.1. Matériels Végétal	30
IV.2.2. Méthodes	31
IV.2.2.1. Séchage de la plante <i>Rosmarinus officinalis</i>	31
IV.2.2.2. Extraction de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	31
IV.2.2.2.1. Mode opératoire.....	31
IV.3. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	32
IV.3.1. Matériels.....	32
IV.3.1.1. Matériels Biologiques	32
IV.3.1.1.1. Origine des souches.....	32
IV.3.1.1.2. Milieux de culture utilisés	33
IV.3.2. Méthodes	33

IV.3.2.1. Méthode d'étude de l'activité antibactérienne de <i>Rosmarinus officinalis</i>	33
IV.3.2.1.1. Aromatogramme.....	34
IV.3.2.1.1.1. Stérilisation du Matériels	34
IV.3.2.1.1.2. Réactivation et l'inoculum des souches bactériennes	35
IV.3.2.1.1.3. Ensemencement du milieu de culture en boîtes de Pétri et dépôt des disques	35
IV.3.2.1.1.3.1. Ensemencement	35
IV.3.2.1.1.3.2. Dépôt des disques.....	36
IV.4. Etude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	37
IV.4.1. Méthodes	37
IV.4.1.1. Méthode d'étude de l'activité antioxydante de <i>Rosmarinus officinalis</i>	37
IV.4.1.1.1. La méthode de DPPH	37
IV.4.1.1.2. Préparation du DPPH	38
IV.4.1.1.3. Préparation des échantillons.....	38
Chapitre V : Résultats & discussion.....	40
V.1. Résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis L</i>	41
V.1.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne.....	43
V.2. Résultats de l'activité antioxydante des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis L</i>	45
V.2.1. Détermination de la valeur IC ₅₀	46
Conclusion	49
Références Bibliographiques.....	50

INTRODUCTION

Introduction

L'engouement actuel du grand public pour les produits d'origine naturelle, accentué par les effets controversés de l'utilisation abusive des antibiothérapies et des additifs alimentaires de synthèse sur la santé humaine et animale, oblige de plus en plus les secteurs agroalimentaire et pharmaceutique à la recherche d'alternatives en remplacement de produits purement synthétiques à l'instar des additifs antioxydants BHT, BHA et TBHQ (**Outaleb, 2016**).

Grâce à leurs propriétés biologiques, les extraits de plantes médicinales et aromatiques constituent l'une des alternatives à l'utilisation de produits de synthèse. Ces plantes représentent une source inépuisable de substances ayant des activités biologiques très variées et dont la connaissance constituerait une raison de plus pour la préservation et la valorisation du riche patrimoine floristique Algérien (**Outaleb, 2016**).

Les plantes médicinales et aromatiques furent utilisées par l'homme depuis l'antiquité. De nos jours leur utilisation a pris un essor considérable dans les industries de parfum, produits cosmétiques et pharmaceutiques. Les plantes sont la source principale de substances actives où au moins 35 000 espèces sont utilisées dans le monde. L'Algérie avec sa diversité de climats et de sols, sa situation géographique et ses reliefs, présente une flore de 3 510 espèces dont 450 espèces sont répertoriées dans les hauts plateaux et le grand sud du pays (**Mouas et al., 2017**).

La flore Algérienne avec ses plantes médicinales appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15 % endémiques, reste très peu explorée sur le plan photochimique comme sur le plan pharmacologique. La valorisation des plantes médicinales de la flore nationale sera d'un grand apport pour l'industrie pharmaceutique algérienne et aura un impact économique certain (**Touafek, 2010**).

Les huiles essentielles extraites des plantes par hydrodistillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes. L'aromathérapie, l'art de soigner par les huiles essentielles, est devenue une science méthodique depuis qu'elle repose sur une classification de ces huiles selon leur capacité à lutter contre les bactéries (**Boulezazen, 2017**).

Le romarin *Rosmarinus officinalis* L. est une plante médicinale originaire du bassin méditerranéen qui pousse à l'état sauvage. Le romarin aime les terrains calcaires et

Introduction

s'accommode très bien des contrées arides et rocailleuses. On le reconnaît aisément, toute l'année. Ce sont les feuilles, les sommités fleuries, qu'on aura pris le soin de sécher, ou l'huile essentielle qui sont utilisées en phytothérapie (Mouas et al., 2017).

Le romarin a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire. Il possède des propriétés anti-inflammatoires et antispasmodiques et une action sur le système nerveux. Le romarin possède d'excellentes propriétés antioxydante et antimicrobienne. Le romarin, comme toutes les plantes aromatiques et médicinales, contient des composés chimiques ayant des propriétés antibactériennes. L'utilisation de ces molécules à base de plantes peut présenter de nombreux avantages par rapport aux produits de synthèse actuels (Mouas et al., 2017).

Notre modeste travail est scindé en trois chapitres :

Le premier chapitre regroupe un ensemble de données bibliographiques sur le romarin *Rosmarinus officinalis* en particulier.

Le deuxième est consacré au matériel utilisé et aux différentes méthodes et techniques utilisées au cours de notre travail expérimental.

Le troisième chapitre expose les résultats obtenus avec une discussion et enfin une conclusion.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

L'espèce végétale

I.1. Définition

Le nom latin du Romarin est *Rosmarinus officinalis* L. (Leplat, 2017). Romarin (*Rosmarinus officinalis* Linn. Fam. Labiatae) est un arbuste buissonnant et ramifié à feuilles persistantes, atteignant une hauteur de environ un mètre avec des tiges dressées, des fleurs bleu blanchâtre et feuilles vert foncé qui sont petites avec des bords tournés à l'envers. Sous ces bords roulés se trouvent peu Produits contenant des huiles aromatiques. Il pousse à l'état sauvage le long du côtes nord et sud de la mer Méditerranée, ainsi que sur les zones sub-himalayennes . Il est cultivé depuis jours anciens en Angleterre, en Allemagne, en France, au Danemark et autres pays scandinaves, Amérique centrale, Venezuela (El-sereiti et al., 1999).



Figure 01 : Feuilles de *Rosmarinus officinalis* (Photo personnelle, 2024).



Figure 02 : Fleurs de *Rosmarinus officinalis* (Photo personnelle, 2024).

Cependant, deux autres espèces de Romarin existent : *Rosmarinus eriocalyx* et *Rosmarinus tomentosus* mais n'ont que peu d'intérêt médicinal.

Les dénominations vernaculaires* du Romarin sont : rosemarine, herbe au couronnes, encensier (en provençal); encensier, incensier, lède, lédon, Romarin des troubadours, rose marine, rosmarin encens . L'épithète spécifique "officinalis" rappelle que le Romarin est une plante médicinale. La plante dégage une agréable odeur d'encens. Sa saveur est aromatique et légèrement Astringente (**Leplat, 2017**).

La pollinisation par les abeilles permet à celles-ci d'élaborer un miel très parfumé ("miel de Narbonne") .Il existe de nombreuses variétés et cultivars* de Romarin. Par exemple, *Rosmarinus officinalis* var. albiflorus (Romarin blanc), *Rosmarinus officinalis* «Benenden Blue», *Rosmarinus officinalis* «Aureus» (Romarin doré), *Rosmarinus officinalis* «Blue Lagoon», *Rosmarinus officinalis* «Boule», *Rosmarinus officinalis* «Fota Blue», *Rosmarinus officinalis* «Majorca pink», *Rosmarinus officinalis* «Miss Jessopp's Upright», *Rosmarinus officinalis* «Primley Blue», *Rosmarinus officinalis* «Roseus» (Romarin rosé), *Rosmarinus officinalis* «Severn sea», *Rosmarinus officinalis* «Sissinghurst Blue», *Rosmarinus officinalis* groupe des rampants (lavandulaceus, repens) . Une étude réalisée sur 6 cultivars en Sardaigne a montré une différence significative entre ces derniers (**Leplat, 2017**).

La composition de l'HE (huile essentielle) varie selon le cultivar, tandis qu'elle est constante au sein d'un même cultivar, et dans les deux différentes périodes de récolte (printemps et été). Les cultivars sélectionnés sont intéressants à de nombreux points de vue et particulièrement prometteurs pour la culture intensive. Par exemple, le cultivar «Sant' Antioco», grâce à sa grande vigueur et son port dressé, est adapté à cet usage. Son HE est riche en camphre (21,4%) et en 1,8-cinéole (17,6%). Le cultivar «Vignola» est caractérisé par une composition de son HE qui est typique de la plupart des cultivars de Romarin sélectionnés, avec 43,8% d' α -pinène comme composé majoritaire. Les cultivars «Sette Fratelli» et «Gerrei» sont riches en verbénone (environ 12%) (**Leplat, 2017**).

I.2. Taxonomie

La classification botanique complète du genre *Rosmarinus* L. n'a été achevée qu'au début du 20^e siècle en raison de l'extrême variabilité des espèces. Le romarin appartient à la deuxième série de la famille des labiées ou Lamiacées qui en compte six. Cette famille, l'une des plus importante de la flore d'Algérie, compte plus de 200 genres et 3500 espèces (Outaleb, 2016).

La systématique du romarin est la suivante :

Règne : Plantae (végétal)

Phylum : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae (alt. Labiatae)

Genre : *Rosmarinus*

Le genre *Rosmarinus*, du latin signifiant «rose de la mer», se présente sous forme d'un arbuste ou sous-arbrisseaux ligneux très odorant touffu, xérophyte, fortement rameux toujours vert, à racine pivotante et à tiges ligneuses, généralement érigées. Feuilles linéaires à marge révoluée, gaufrées, verdâtres en dessus avec corolle bleue pâle ou blanchâtre à 2 lèvres, la supérieure entière ou à peine émarginée pas plus longue que l'inférieure, cette dernière trilobée (Outaleb, 2016).

I.3. Distribution géographique

La plante est originaire du Caucase et de l'est Méditerranéen, bien qu'il ait été introduit dans de nombreuses régions du monde depuis l'Antiquité une espèce ornementale (par exemple, le reste de l'Europe, le Chili et la Chine). Cependant, c'est dans les pays dotés d'un Climat méditerranéen où il est le plus cultivé (Al-Sereiti et al., 1999).



Figure 03 : Répartition géographique de *Rosmarinus officinalis* selon la biodiversité mondiale Centre d'information (GBIF) (Al-Sereiti et al., 1999).

Dans la figure 3, aucune marque n'est représentée en Chine, au Pakistan, en Inde, en Afrique du Sud, etc. signifie que le romarin n'est pas trouvé dans ces pays, mais qu'il n'a pas été enregistré au Global Base de données du Centre d'information sur la biodiversité (GBIF). Il vit entre 0 et 1600 m d'altitude et est indifférent au type de sol. Il pousse mal dans les zones géographiques très humides ou très froides. Sa période de floraison a lieu entre fin décembre et avril dans le bassin méditerranéen. (hémisphère nord) (Al-Sereiti et al., 1999).

Culture : l'Espagne est le principal producteur mondial de romarin à des fins commerciales, suivi par la France, l'Italie et la Tunisie. Certaines régions d'Asie, des États-Unis, du Mexique et de l'Afrique du Sud cultivent-le également. Comme il s'agit d'une très petite culture, il n'existe pas de mesures officielles fiables de sa quantité de production. En 2005, les États-Unis ont importé 109 tonnes d'huile de romarin (Al-Sereiti et al., 1999).

I.4. Description botanique de *Rosmarinus officinalis*

Le genre *Rosmarinus* regroupe deux espèces de plantes de la famille des Lamiacées originaires du bassin méditerranéen le *Rosmarinus eriocalyx* et le *Rosmarinus officinalis* L.

Ses caractères sont les suivants :

- Arbuste toujours vert, de 60cm à 2m de haut et pouvant vivre jusqu'à 30ans,

- Tige, à l'écorce grisâtre, écailleuse et fissurée, se divisant en rameaux opposés tortueux, nœuds distancés de 0,5 à 2mm.
- Feuilles opposées, coriaces, sessiles, linéaires, entières, de 1.5 à 4.5cm de long, aux bords enroulés vers le bas; face supérieure vert sombre et glabre, face inférieure blanche, tomenteuse, parcourue par une nervure saillante, et portant des poils articulés ramifiés et poils glandulaires fortement serrés (Mouas, 2018).
- Inflorescence spiciforme, à fleurs subsessiles, qui s'épanouissent toute l'année.
- Calice gamosépale, poudré-blanchâtre, tube en forme de cloche, à 3 lobes, le plus large est la lèvre supérieure et les deux autres forment la lèvre inférieure.
- Corolle gamopétales, tubuleuses, à 2 lèvres (la supérieure à 2 lobes en forme de capuchon, l'inférieure à 3 lobes, avec le médian plus large, concave).
- 2 étamines, et des anthères allongées uniloculaires.
- Le fruit est un tétrakène, de couleur brune.
- Fleurs bleu pâle, lilas ou blanchâtres, maculées de petites taches violettes à l'intérieur (Mouas, 2018).



Figure 04 : Aspect morphologique du *Rosmarinus officinalis* L. (Mouas, 2018).

I.5. Composition chimique

La composition chimique de la plante dans son ensemble dépend du lieu de croissance et de récolte ainsi que du moment de la récolte dans le cycle végétatif (idéal quand le végétal a le maximum d'essence).

Les feuilles séchées et l'huile essentielle (de type Espagne et du type Maroc-Tunisie) de *Rosmarinus officinalis* L. Sont inscrits comme drogues végétales à la Pharmacopée Européenne 11^{ème} édition (**Leplat, 2017**).

□ **Huile essentielle** : Représente 1 à 3% de la plante, sa composition ainsi que la concentration dépend fortement des chémotypes. Cependant en terme de nature des composés, les études effectuées sur de nombreux échantillons d'huiles de *R. officinalis* et *tournefortii* ne montrent aucune différence notable. En effet ses principaux constituants peuvent être le 1,8-cinéole, l' α -pinène, camphor, borneol, de l'acétate de bornyl, de la verbénone, du p-cymène ou du myrcène; ils peuvent être accompagnés de β -caryophyllène, de limonène, de linalool, de β -pinène, de sabinène, de γ -terpinène, d' α -terpinéol et de terpinene-4-ol (**Outaleb, 2016**).

□ **Phénols diterpinés**: constitués principalement d'acide carnosolique (environ 0,35%) qui se dégrade facilement en carnosol, et est accompagné d'isorosmanol, de rosmariquinone, de rosmaridiphénol (**Outaleb, 2016**).

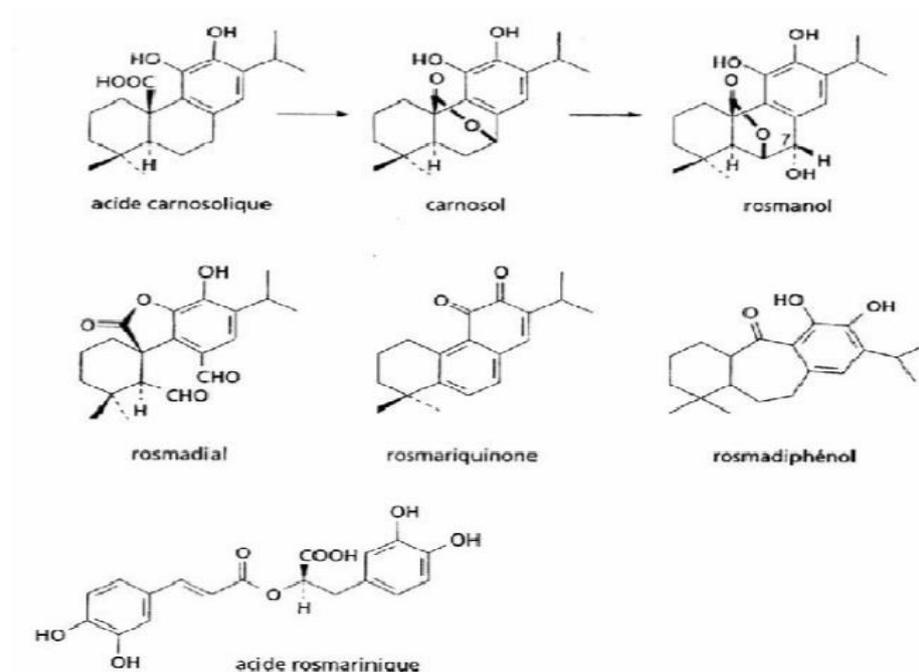


Figure 05 : Composés phénoliques caractéristiques des extraits de Romarin (Outaleb, 2016).

□ **Dérivés de l'acide cinnamique (tannins)**: représentent environ 3,5% et sont constitués principalement d'acide rosmarinique (1,1 à 2,5%) (Outaleb, 2016).

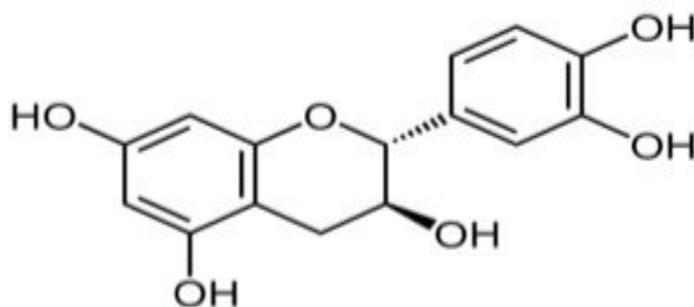


Figure 06 : Structures chimiques de tannin présent chez *Rosmarinus officinalis* (Berbache et al., 2022).

□ **Flavonoïdes** : présents sous forme d'aglycones et d'hétérosides comme la cirsimarine, la diosmine, l'hespéridine, l'homoplantiginine (Outaleb, 2016).

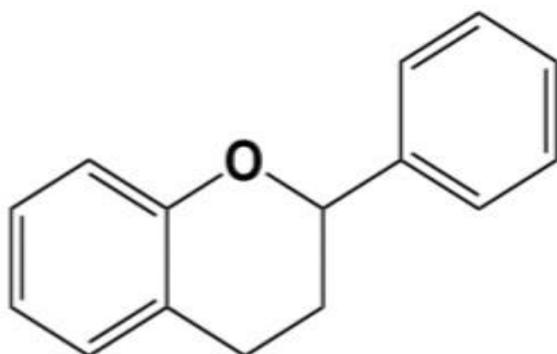


Figure 07 : Structures générique des flavonoïdes chez *Rosmarinus officinalis* (Berbache et al., 2022).

I.6. Les Propriétés du Romarin

Parce que les consommateurs sont préoccupés par les effets négatifs des produits chimiques synthétiques présents dans les aliments, il est nécessaire de trouver des « produits clean label ». Il existe donc un intérêt croissant pour l'utilisation d'extraits naturels comme alternatives aux additifs synthétiques en raison de leur synergie avec d'autres méthodes de conservation considérées comme sûres et de leurs propriétés spécifiques comme antioxydantes, antidiabétiques, antimutagènes, antitoxinogène et antibactérien (Nieto et al., 2018).

En général, les herbes et les plantes sont riches en composés dotés de propriétés antioxydantes, tels que les vitamines, le glutathion, les enzymes et les composés phénoliques. Plusieurs extraits d'épices ont montré leurs propriétés pour prévenir l'autoxydation des triacylglycérols insaturés. Plus précisément, l'extrait naturel de la famille des Lamiacées (thym, sauge et romarin) a été rapporté dans plusieurs études pour son activité antioxydante (Nieto et al., 2018).

Rosmarinus officinalis, L. originaire du bassin méditerranéen est une plante aromatique de la famille des Lamiacées. La province de Murcie (sud-est de l'Espagne) est l'un des principaux transformateurs et importateurs de romarin. Aux États-Unis et en Europe, le romarin est une épice unique disponible dans le commerce pour être utilisée comme antioxydant. Les extraits de romarin ont été utilisés dans le traitement de maladies, en raison

de son potentiel hépatoprotecteur, de son potentiel thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer et de son effet antiangiogénique. D'autre part, ils ont été utilisés dans la conservation des aliments, car ils empêchent l'oxydation et la contamination microbienne (Nieto *et al.*, 2018).

L'extrait de romarin pourrait donc être utile pour remplacer, voire diminuer, les antioxydants synthétiques dans les aliments. Comme conservateurs, les extraits de romarin offrent plusieurs avantages technologiques et bénéfiques pour les consommateurs.

L'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments) a examiné la sécurité des extraits de romarin. Elle a conclu qu'il existe des estimations d'apport élevé allant de 0,09 (personnes âgées) à 0,81 (enfants) mg/kg par jour de carnosol et d'acide carnosique. De nos jours, dans l'Union européenne, les extraits de romarin sont ajoutés aux aliments et aux boissons à des niveaux allant jusqu'à 400 mg/kg (somme de l'acide carnosique et du carnosol) (Nieto *et al.*, 2018).

I.7. Utilisations du romarin

Usages en cosmétique, en cuisine et en phytothérapie

I.7.1- En cosmétique : L'utilisation du romarin en parfumerie est très ancienne. Le premier parfum alcoolique dont on connait l'existence est l'eau de Hongrie, alcoolat fréquemment utilisé au XVII^e siècle et qui pourrait dater du XIV^e siècle, dont le romarin était l'un des principaux composants (Baghloul, 2019).

Le romarin entre dans la composition de parfums surtout masculins, hespéridés aromatiques (eaux de Cologne), boisés et fougères aromatiques.

I.7.2- En gastronomie : Les branches feuillues de romarin s'utilisent de préférence fraîches, mais peuvent également se conserver séchées.

S'emploient généralement :

- Comme aromate (infusion dans les ragoûts, les civets, les soupes et les sauces).
- Pour parfumer les grillades et la confection d'une marinade.
- Pour fumer la viande ou le poisson en déposant quelques branches sur les charbons, ou pour embrocher des légumes avant leur cuisson.

Les fleurs ont une saveur plus douce et se consomment crues, saupoudrées pour parfumer un plat ou un dessert. Le romarin est parfois utilisé en infusion pour parfumer des desserts comme les flans, les crèmes ou certaines confitures (**Baghloul, 2019**).

I.7.3- En phytothérapie : le romarin est présent dans toutes les pharmacopées mondiales et dans de nombreux médicaments, notamment comme cholagogue ou traitement symptomatique de troubles digestifs tels que : ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations, flatulence (**Baghloul, 2019**).

Traditionnellement utilisé pour faciliter les fonctions d'élimination urinaires et digestive. Son action puissante est très utilisée afin de soulager les quintes de toux embarrassantes lors de certaines affections pulmonaires comme la bronchite aiguë. Il s'agit de l'une des plantes les plus recommandées à cette fin (**Baghloul, 2019**).

Selon l'OMS le romarin est reconnu pour de nombreuses finalités. Aussi, aide à traiter l'asthme, l'eczéma, et le rhumatisme (**Baghloul, 2019**).

Les extraits de romarin possèdent de nombreuses activités biologiques, anti- microbiens , anti-mutagène (anti-hyper- glycémique, anti-ulcérogène et action d'antioxydant. La décoction de feuilles de romarin a été traditionnellement utilisée pour traiter les patients diabétiques sans beaucoup de preuves scientifiques de son utilité (**Baghloul, 2019**).

CHPITRE II :

Les huiles essentielles de

Rosmarinus officinalis

II.1- Définition des huiles essentielles

L'huile essentielle (HE) est une fraction principalement volatile et odorante isolée par un processus physique à partir de la matière végétale. Elle est produite grâce aux plantes aromatiques. Ces plantes sont utilisées comme sources de produits chimiques aromatiques et aromatisants dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. La plupart de ces plantes sont connues et traditionnellement utilisées dans le monde entier à des fins médicinales, à l'instar de la camomille ou du gingembre. La majorité de ces plantes a fait l'objet de recherche et agit efficacement sur la santé humaine (**Djousse et al., 2022**).

L'HE a une composition variable selon la période de récolte et la partie de plante récoltée.

Selon (**Leplat, 2017**) la plante aromatique utilisée pour extraire une HE doit être parfaitement définie avec:

- Sa dénomination internationale (latin) et française
- Son chimiotype (composition de l'HE différente)
- Son origine géographique
- La partie de la plante utilisée
- La période de récolte

II.2. Compositions Chimique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes qui contiennent des centaines de composés, volatils, monoterpènes, sesquiterpènes, composés aromatiques et autres dérivés . L'huile essentielle de romarin obtenue par distillation à la vapeur d'eau des feuilles (jusqu'à 2,5 %) est incolore à jaune clair, insoluble dans l'eau et possède un arôme caractéristique de camphre (**Andrade et al., 2018**).

L'huile incolore ou légèrement jaune contient du 1,8-cinéole (15 à 30 %), du camphre (10 à 25 %), de l' α -pinène (10 à 25 %) et du bornéol (3 à 20 %). Les structures chimiques de ces substances sont présentées sur la figure 1. Les autres composés sont l'acétate de bornyle (1 à 5 %), le camphène (5 à 10 %), le β -terpinéol, le myrcène, le limonène et le caryophyllène (**Wollinger et al., 2016**).

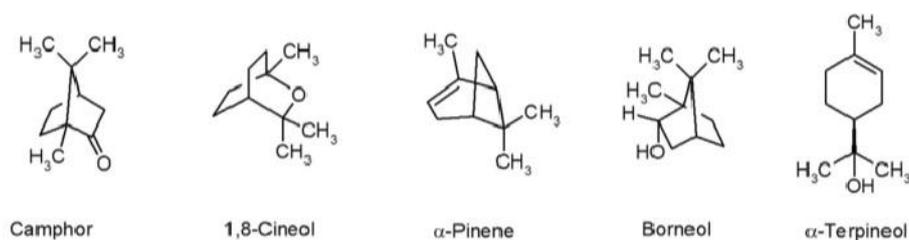


Figure 08 : Structures chimiques des principaux composés présents dans les feuilles de romarin, huiles essentielles (camphre, 1,8-cinéol, α -pinène, bornéol et x-terpinéol) (**Wollinger et al., 2016**).

II.3. Les Propriétés des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

L'huile essentielle de romarin est largement utilisée dans l'industrie alimentaire (boissons alcoolisées, desserts, bonbons, etc.). Elle agit comme agent aromatisant et conservateur du fait de ses propriétés antioxydante, antimicrobienne et antiradicalaire. Elle est aussi utilisée comme composant aromatique dans l'industrie des cosmétiques (savons, parfums, crèmes, etc.) (**Outaleb, 2010**).

Ces produits naturels sont décrits en tant que protecteurs efficaces contre le cancer, les dommages oxydatifs, le diabète (activité hypoglycémisante), ainsi que contre l'hypertension. Elles sont également connues pour calmer la toux et soigner les bronchites en tant que antiseptique pulmonaire (**Lakehal, 2016**).

Les huiles essentielles confèrent au romarin ses propriétés digestives à savoir : cholagogues, cholérétiques, antispasmodiques, carminatives et stomachiques. Des propriétés toniques, stimulantes, astringentes, sudorifique et antidiarrhéique ont été également mises en évidence (**Lakehal, 2016**).

Il est prouvé que l'action des huiles essentielles de romarin contribue dans la stimulation du système nerveux résultant sous contrôle l'amélioration de la mémorisation et de capacités de concentration (**Lakehal, 2016**).

Elles sont utilisées en usage externe (massage sédatif) contre l'arthrite, les contusions, les douleurs (musculaires, rhumatismales et traumatiques), les sciatiques et dans la revitalisation des membres paralysés, en augmentant la circulation sanguine des membres, ainsi que contre l'eczéma et la goutte (**Lakehal, 2016**).

II.4. Technique d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général, le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, rameaux), de la nature des composés (par exemple, les flavonoïdes, les huiles essentielles, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (**Mouas, 2018**).

II.4.1. Techniques classiques

Pratiquée sous des différentes formes, la distillation est sans doute la méthode la plus employée pour extraire les essences des plantes . Parmi ces techniques (**Kassoussi et Guidadou, 2022**).

II.4.1.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles (**Boukhatem et al., 2019**).

Le matériel végétal, dans ce système d'extraction, est placé dans un alambic, qui possède à la base une grille perforé au-dessous de laquelle on introduit de la vapeur d'eau fournie par une chaudière ou par de l'eau portée à ébullition en dessous de la matière première. La vapeur d'eau traverse le matériel végétal, éclate les cellules

et entraîne les molécules volatiles. En traversant un tube réfrigérant, la vapeur d'eau saturée en composé volatils se condense et huile est récupérée par une simple différence de densité ou par décantation (**Boumenikhra, 2015**).

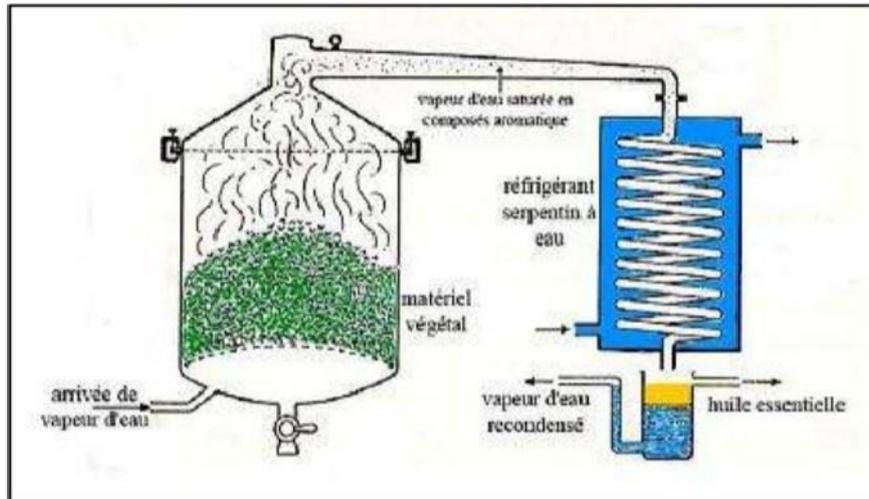


Figure 09 : Schéma du procédé d'entraînement à la vapeur d'eau (**Boumenikhra, 2015**).

II.4.1.2. Extraction par Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur (Figure 10). Dans le cas de cette méthode, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau – huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, elle permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur (**Lucchesi, 2005**).

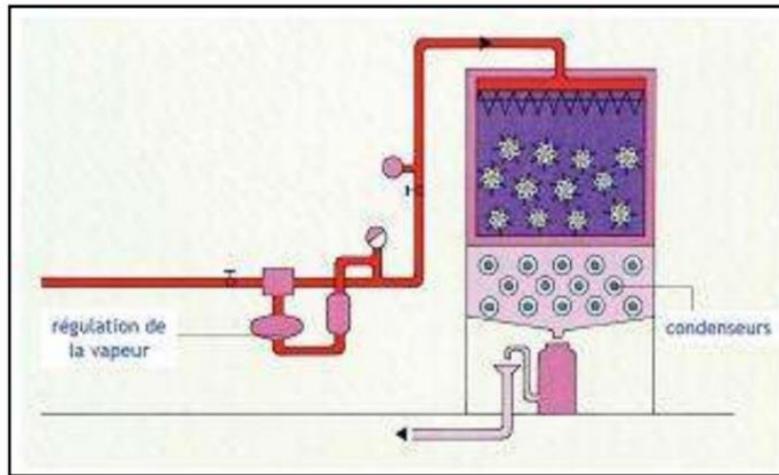


Figure 10 : Schéma du procédé d'hydrodiffusion (Boumenikhra, 2015).

II.4.1.3. Extraction par Hydrodistillation

L'hydrodistillation est sans aucun doute le procédé chimique le plus ancien. En effet, il fut importé en Europe par les Arabes entre le VIII^{ème} et le X^{ème} siècle mais le principe était déjà connu et utilisé par les Egyptiens dès le IV^{ème} siècle avant J.C. Il est aussi le plus utilisé, le plus rentable et convenant le mieux à l'extraction des molécules en vue d'une utilisation thérapeutique (Outaleb, 2016).

La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolysate par simple différence de densité. Etant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysate (figure 11).

En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (Mouas, 2018).

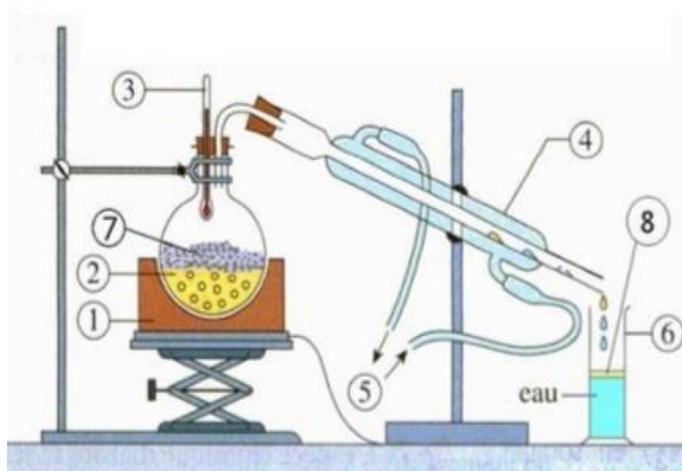


Figure 11 : Principe de la technique d'hydro distillation (Distillation simple). (Mouas, 2018). 1- Chauffe ballon. 2- Ballon. 3-Thermomètre. 4- Réfrigérant. 5- Entrée et sortie d'eau. 6-Erlenmeyer. 7- Matière à extraire l'essence. 8- La couche d'huile essentielle.

II.4.2. Techniques récentes

Ce sont des techniques qui répondent à un bon nombre d'exigences actuelles en termes de vitesse et d'automatisation utilisés pour obtenir les huiles essentielles ou d'autres composés des plantes. Parmi ces techniques : l'extraction aux ultrasons et l'extraction par micro-ondes (Kassoussi et Guidadou, 2022).

II.4.2.1. Extraction assistée par microondes

Cette méthode permet de réaliser des extractions à pression atmosphérique du matériel végétal frais ou un échantillon sec réhydraté. Elle consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur au sein d'un four micro-ondes. Le chauffage interne de l'eau intrinsèque de la plante permet de dilater ses cellules et provoquer la distillation d'un mélange d'eau/huile essentielle.

Un système réfrigérant situé à l'extérieur du four à micro-ondes permet la condensation du distillat en continu, puis le mélange est dirigé dans l'appareil de Clevenger où les composés aromatiques sont obtenus par simple séparation de phase. Pour l'extraction des autres composés végétale le solvant permet d'attaquer la paroi cellulaire et la pénétre pour atteindre les composés d'intérêt (Kassoussi et Guidadou, 2022).

II.4.2.2. Extraction aux ultrasons

Les ultrasons sont des ondes mécaniques capables de se déplacer dans un milieu élastique à une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz). Les ultrasons de puissance fonctionnant à une intensité entre 20 et 100 kHz sont utilisés pour l'extraction des arômes ainsi que d'autres molécules des plantes (Mnayer, 2014).

Lorsque les ultrasons se propagent à travers un liquide, les oscillations des molécules provoquent la formation des zones de compression et de dépression (raréfaction). Quand les cycles de raréfaction augmentent, les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues et des bulles de cavitation apparaissent. Les bulles vont imploser à côté de la surface du matériel végétal et provoquer la rupture des membranes des cellules qui libèrent leurs contenus à l'extérieur (figure 12) (Mnayer, 2014).

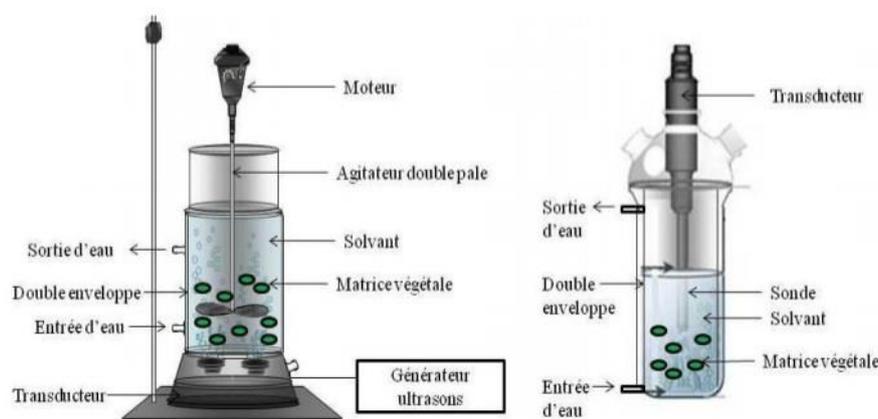


Figure 12 : Schéma du procédé aux ultrasons : bac et sonde (Mnayer, 2014).

II.5. Rôle des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

Bien que de nombreuses hypothèses aient été avancées pour expliquer les raisons de la synthèse de l'essence par la plante, personne ne sait avec exactitude pourquoi la plante fabrique son essence. Mais ce qui est probable c'est que le rôle des huiles essentielles au niveau du matériel végétal est intimement lié à leur situation. Les spécialistes considèrent les huiles essentielles comme des sources de signaux chimiques permettant à la plante de contrôler ou réguler son environnement. Par exemple, ces huiles confèrent un rôle défensif contre les champignons et microorganismes et attractif vis-à-vis des insectes pollinisateurs. Un feuillage

renfermant une teneur élevée en essences végétales le protège contre les herbivores. Le rôle des huiles essentielles au niveau des racines, des écorces et du bois confère à la plante un effet antiseptique vis-à-vis des parasites telluriques (**Drrioueche et Mahi, 2016**).

De nos jours, l'usage des huiles est très large dans les domaines de la pharmacologie, la cosmétique, l'agroalimentaire, et récemment l'agrophytosanitaire, et leurs propriétés thérapeutiques font l'objet de nombreuses recherches scientifiques (**Outaleb, 2010**).

Le romarin renferme une huile essentielle à laquelle il doit ses propriétés intéressantes ; il est connu pour ses propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, analgésiques, anti-inflammatoires (**Minaiyan, 2011**) et anti-ulcérogènes. Il stimule le fonctionnement de la vésicule biliaire, il agit sur les fermentations intestinales et sur les douleurs abdominales qu'elles entraînent, il calme aussi la toux et contribue au confort de l'asthmatique. Il est tonocardiaque, hypotenseur décongestionnant veineux, régulateur hépatique etc. La production nationale en matière des huiles essentielles du romarin est estimée à environ 40 tonnes (**Kamli et al., 2017**).

Chapitre III :
Les micro-organismes
étudiés

III.1. Définition

Les bactéries sont très nombreuses et ont souvent été considérées comme des agents pathogènes et agressifs, responsables de maladies plus ou moins graves. Mais, contrairement au virus, ce n'est pas toujours le cas... En effet, le corps humain est colonisé par de nombreuses bactéries qui constituent la « flore commensale ». Par exemple, au niveau du système digestif, le microbiote intestinal, largement impliqué dans les processus de digestion et de défense de l'organisme, est composé d'environ mille milliards de bactéries (Benmerzoug et Toukal, 2023).

III.1.1. Description des microorganismes étudiés

III.1.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli appartient à la microflore commensale de l'homme et de nombreux animaux. C'est une bactérie colonisatrice du tube digestif des animaux à sang chaud mais également des reptiles.

Escherichia coli est un bacille à coloration de Gram négative, aérobie-anaérobie facultatif, mesurant de 2 à 4 μm de long et d'un diamètre d'environ 0,6 μm , possédant une nitrate réductase et une catalase, dépourvue d'oxydase et non halophile. C'est une bactérie immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche et non-sporulée. Sa température optimale de croissance est de 37°C. Bactérie non exigeante. *E. coli* est capable de fermenter le lactose (Balière, 2016).

III.1.1.1.1. Pouvoir pathogène

Les souches d'*Escherichia coli* pathogènes sont capables de se multiplier et de persister dans le tractus digestif de l'hôte en contournant les défenses immunitaires et d'induire des dommages cellulaires. L'étude des différents modes d'interactions entre l'hôte et la bactérie lors des infections permet de classer les souches d'*Escherichia coli* pathogènes en deux principaux pathotypes regroupant les pathogènes extra intestinaux, responsables d'infections urinaires, de méningites chez les nouveaux-nés ou de septicémies et les pathogènes intestinaux responsables de maladies entériques. (Balière, 2016).

III.1.1.2. *Candida albicans*

Elle est la principale espèce d'intérêt médicale, au moins 60% des isollements de levures en pratique médicale. *Candida albicans* est une levure cosmopolite, commensale des muqueuses oropharyngées, gastro-intestinales et génito-urinaires,

elle peut occasionnellement coloniser la peau. Morphologiquement, *Calbicans* présentent toujours comme de petites levures rondes ou ovalaires, elle se caractérise par sa capacité à former des chlamydospores et des filaments vrais ou hyphes qui jouent un rôle important dans sa virulence (**Bouguerra et Nedjaoum, 2013**).

III.1.1.2.1. Pouvoir pathogène

Candida albicans est saprophyte, elle devient pathogène s'il elle est retrouvée en grand quantité, elle provoque un érythème cuisant recouvert par fois de dépôts blanchâtre crémeux. Sur la peau *Candida* est pathogène, elle est source de placards érythémateux prurigineux émiétés (**Hamri et Brinis, 2018**).

III.1.1.3. *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 µm. Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Elles sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule, coagulase et catalase positive. De nombreuses souches de *S. aureus* produisent un pigment jaune doré (**Hallali et Hached, 2019**).

S. aureus est un commensal de l'Homme et de nombreuses espèces animales. Chez l'Homme, elle colonise 25% des individus en dehors de tout contact hospitalier (2 milliards de personnes dans le monde), préférentiellement au niveau de la peau et des muqueuses, incluant sa niche préférentielle, la muqueuse nasale des narines antérieures (**Mouton, 2018**).

III.1.1.3.1. Pouvoir pathogène

S. aureus tient également à la production d'un grand nombre de substances diffusibles ou associées à la paroi (hémolysines α , β , γ et δ). Elle est la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée (**Hallali et Hached, 2019**).

III.1.1.4. *Bacillus cereus*

C'est une bactérie gram positif, aérobie, dont les cellules sont de grandes tiges, formant des spores. D'autres caractéristiques, y compris les caractéristiques biochimiques sont utilisés pour différencier et confirmer la présence de *Bacillus*, bien que ces caractéristiques sont partagées avec *Bacillus var cereus*, *mycoides*, *B. thuringiensis* et *B. anthracis*. La différenciation de ces organismes dépend de la détermination de la motilité (le *B. cereus* est plus mobile), de la présence de cristaux

de toxines (pour le *B. thuringiensis*) et de l'activité hémolytique (*B. cereus* est hémolytique tandis que *B. anthracis* est généralement non hémolytique) (**Hadj bouazza, 2016**).

III.1.1.4.1. Pouvoir pathogène

L'intoxication alimentaire au *Bacillus cereus* est de deux types: le type diarrhéique causé par une protéine de grand poids moléculaire, tandis que le type émétique est supposé être provoqué par un peptide de faible poids moléculaire, stable à la chaleur (**Hadj bouazza, 2016**).

III.1.1.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie ubiquitaire retrouvée dans l'environnement (sols, eaux...), sous forme planctonique, ou à l'état sessile dans un biofilm . Il s'agit d'un bacille à Gram négatif en forme de bâtonnet de 1 à 3 µm de long et 0,5 à 0,8 µm de large. *P. aeruginosa* est une bactérie dépourvue de spores et de capsules, mobile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire. C'est une bactérie mésophile capable de se développer dans des températures allant de +4°C à +45°C avec une température optimale de croissance entre 30 et 37°C. *P. aeruginosa* est une bactérie aérobie possédant un métabolisme oxydatif, mais en absence d'oxygène elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons (**Talhi et al., 2018**).

III.1.1.5.1. Pouvoir pathogène

Pseudomonas aeruginosa est un agent pathogène opportuniste essentiellement responsable d'infections nosocomiales. Une enquête méditerranéenne de prévalence en 2010, le classe comme étant le troisième principal agent des infections nosocomiales, juste après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* , il est un commensal du tube digestif, peu abondant chez l'homme en bonne santé(2 à 10 % de porteurs), mais la proportion de porteurs asymptomatiques chez les patients hospitalisés (essentiellement des personnes immunodéprimées) peut atteindre 50% sur certains sites et 60 % sur les plaies de brûlures ou d'escarres . Il provoque de nombreuses infections tels que : les infections cutanées, oculaires, pulmonaires, urinaires, digestives ainsi que des septicémies. (**Talhi et al., 2018**).

Chapitre IV :

Matériels & Méthodes

III.1. L'objectif de L'essai

L'ensemble de ce travail a été effectué au laboratoire de biochimie de faculté de la science de la nature et de la vie et le laboratoire des micro-organismes bénéfique des aliments fonctionnels et de la santé de faculté des sciences de la nature et de la vie (SNV) de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem du mois de février de l'année universitaire 2024. Le but de ce travail consiste à l'étude «in vitro» de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur différents souches bactériennes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

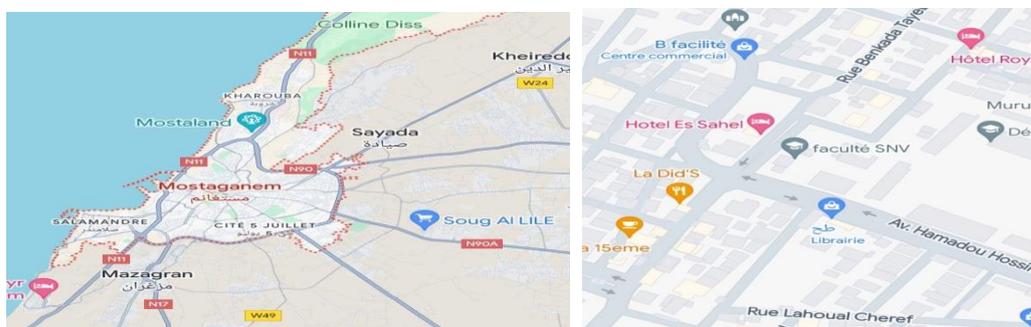


Figure 13 : Localisation du site de prélèvement des échantillons de *Rosmarinus officinalis* (Google Maps, 2024).

III.2. Préparation de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

L'extraction des huiles essentielles a été réalisée de laboratoire de biochimie du département des sciences alimentaires à l'université de la science de la nature et de la vie de Mostaganem par la méthode d'hydrodistillation.

III.2.1. Matériels

III.2.1.1. Matériels Végétal

Pour faire ce travail, nous avons sélectionné les parties aériennes de *Rosmarinus officinalis* au mois de février 2024. Les échantillons ont été récoltés manuellement à partir de l'université de la science de la nature et de la vie de Mostaganem. La récolte a été réalisée tôt le matin et au moment de débourrement de la plante, elle concerne seulement la partie aérienne de l'arbre adultes; choisis au hasard. Les parties récoltées sont débarrassées des impuretés puis séchées à l'abri du soleil, et déposées dans un endroit sec, ventilé et ombragé.



Figure 14 : Partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* (photo personnelle, 2024).

III.2.2. Méthodes

III.2.2.1. Séchage de la plante *Rosmarinus officinalis*

Le matériel végétal de *Rosmarinus officinalis* est séché à température ambiante et conservé à l'abri du soleil et de l'humidité pour une durée d'une semaine et enfin transportées au laboratoire de biochimie afin de commence les procédés d'extraction.

III.2.2.2. Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

III.2.2.2.1. Mode opératoire

L'extraction de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* à été effectuée par hydrodistillation dans un distillateur de type Clevenger. Avant l'emploi, l'appareil a été nettoyé à l'acétone puis rincé à l'eau distillée afin d'éliminer les poussières et les graisses probablement présentes dans l'appareil afin d'éviter toute contamination de l'huile au cours de l'extraction.

Le procédé consiste à appliqué 100 g de feuilles sèches de *Rosmarinus officinalis* ont été placé sur une grille métallique et introduite dans une cocote minute contenant d'eau. Cet ensemble est porté à ébullition pendant deux heures et les huiles essentielles sont entraînées à la vapeur d'eau. Après condensation et liquéfaction, l'huile surmontant l'eau (non miscible) est séparée de l'eau, puis séchée par congélation. Après extraction, le volume d'huile essentielle obtenu a été mesuré puis conservé dans un flacon bien bouché. Le flacon a été couvert d'un papier aluminium à l'abri de la lumière puis conservé dans un réfrigérateur jusqu'à son usage pour les tests chimiques et biologiques.



Figure 15 : Hydrodistillateur de type Clevenger pour l'extraction de l'huile essentielle de Rosmarinis Officinalis (laboratoire de Biochimie N°01 au niveau de faculté SNV université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem) et les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* (Photos personnelle, 2024).

III.3. Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

Les tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés au sein de laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS), Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

III.3.1. Matériels

III.3.1.1. Matériels Biologiques

A travers ces études, nous avons choisi cinq souches testées ont été sélectionnées pour étudier l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

III.3.1.1.1. Origine des souches

Les souches utilisées dans ce travail proviennent de la collection du laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS), Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

Tableau 01: Caractéristiques de souches bactériennes testées.

Souches	Origine de la souche	Famille	Gram	Température de croissance
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	LMBAFS	Enterobacteriaceae	Gram -	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	LMBAFS	Staphylococcaceae	Gram +	37°C
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	LMBAFS	Saccharomycetaceae	/	37°C
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 6633	LMBAFS	Bacillaceae	Gram +	37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	LMBAFS	Pseudomonadaceae	Gram +	37°C

III.3.1.1.2. Milieux de culture utilisés

Les milieux de culture utilisés pour les différents tests microbiologiques sont les suivants:

- **Pour les bactéries**

Bouillon nutritif

Gélose nutritive

Milieu Mueller Hinton (M.H)

III.3.2. Méthodes

III.3.2.1. Méthode d'étude de l'activité antimicrobienne de *Rosmarinus officinalis*

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est réalisée par la méthode suivante:

La méthode de diffusion sur des disques (Aromatogramme), en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries vis-à-vis des huiles essentielles.

III.3.2.1.1. Aromatogramme

- **Principe**

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des H.E. testées, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d'huile essentielle.

(Bouadjemi, 2018).

III.3.2.1.1.1. Stérilisation du Matériels

L'eau distillée, le tube à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier vierge (6 mm de diamètre) ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.



Figure 16 : Stérilisation du Matériels (Photos personnelles, 2024).

III.3.2.1.1.2. Réactivation et l'inoculum des souches bactériennes

100 μ l de chaque souche bactérienne conservées ont été ensemencées dans des tubes à essai contenant 10ml du bouillon nutritif. Après 24h d'incubation à 37°C, les inoculums ont été sera ajusté à une turbidité standard de 0,5MC Ferland (UFC/mL), ce qui correspond à une densité optique qui s'étend de 0.08 à 0.10 à 620nm, afin stimuler leur développement.



Figure 17 : Réactivation des souches bactériennes (Photos personnelles, 2024).

III.3.2.1.1.3. Ensemencement du milieu de culture en boîtes de Pétri et dépôt des disques

III.3.2.1.1.3.1. Ensemencement

La gélose stérile Mueller-Hinton a été coulée dans des boîtes de Pétri stériles et répartie uniformément sur celles-ci. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm. Un mouvement circulaire permet de bien répartir la gélose sur toute la surface du milieu. Ensuite, nous le laissons refroidir à température du laboratoire avant leur emploi.



Figure 18: Gélose Mueller Hinton stérile coulée dans des boîtes de pétri (Photos personnelles, 2024).

Devant un bec bunsen, on prend un petit échantillon d'inoculum bactérien standardisé qui est déposé et étalé sur la surface du milieu de Muller Hilton à l'aide d'un coton-tige stérile. Ensuite on frotte le morceau de coton sur la surface de haut en bas. L'opération doit être répétée en retournant la boîte de pétrie, puis on la frottant sur les bords. Les boîtes ainsi ont été mises à sécher à température ambiante.



Figure 19 : Ensemencement sur milieu MH (Photos personnelle, 2024).

III.3.2.1.1.3.2. Dépôt des disques

A l'aide d'une pince stérile, Nous imprégnons des disques de papier stériles (disque Whatman) d'un diamètre de 6 mm avec de l'huile essentielle (HE) du *Rosmarinus officinalis* et on les place au centre des boîtes de telle façon à éviter le chevauchement des zones d'inhibitions sur Muller Hinton qui ont été préalablement inoculés par essuyage avec les souches testées (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*), nous appliquons une légère pression sur chaque disque afin d'obtenir une bonne adhérence, ensuite elles sont incubées dans une étuve à 37°C pour une durée de 24 heures.



Figure 20 : Dépôt des disques sur milieu solide (Photos personnelle, 2024).

III.4. Etude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

L'activité antioxydante des huiles essentielles du romarin a été effectuée au niveau du laboratoire des micro-organismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS), Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

III.4.1. Méthodes

III.4.1.1. Méthode d'étude de l'activité antioxydante de *Rosmarinus officinalis*

III.4.1.1.1. La méthode de DPPH

1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (capteur de proton) est un radical libre, stable au cours du temps et largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé quelconque, le radical DPPH en solution est coloré en violet. En présence d'antioxydant (donneurs de proton); le radical DPPH est réduit en formant une liaison moléculaire stable (Figure 22). Le produit réduit présente une coloration qui tire vers le jaune. On mesure à l'aide d'un spectromètre UV à 517 nm, la diminution de coloration de la solution qui est proportionnelle à la quantité d'antioxydant. L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition (Toure, 2014).

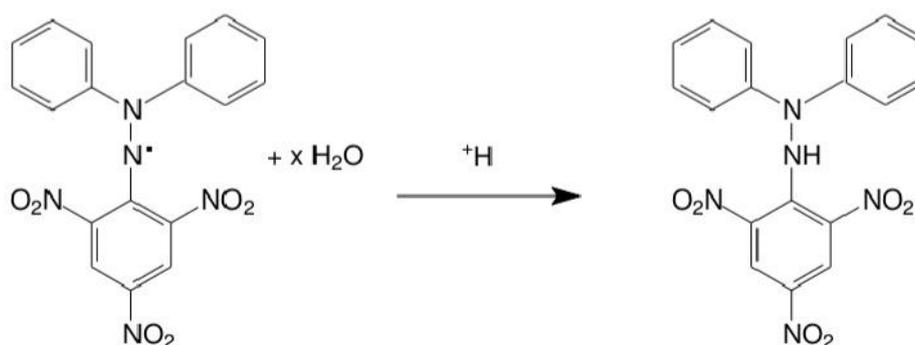


Figure 21 : Principe du test DPPH (Toure, 2014).

III.4.1.1.2. Préparation du DPPH

4 mg de DPPH est dissoute dans 100ml du méthanol pure pour obtenir une solution de **DPPH**.

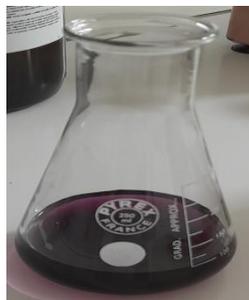


Figure 22 : Préparation de la solution du DPPH (Photo personnelle, 2024).

III.4.1.1.3. Préparation des échantillons

Un volume de 200 μ l de notre extrait d'huile essentielle de romarin est dissous dans 2ml de méthanol avec sa dilution. Ce dernier est préparé en parallèle en plaçant 1ml de chaque dilution de ces extraits dans un tube à essai avec l'ajout de 500 μ l de solution DPPH après 30 minutes. D'incubation à température ambiante et dans l'obscurité, l'absorbance est lue au spectrophotomètre (DLAB, SP-UV1 100) versus vide à 517 nm.



Figure 23 : Préparation des échantillons (Photos personnelle, 2024).

Les valeurs obtenues sont transformées ensuite en pourcentages d'inhibition et calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}) \times 100 / \text{Abs contrôle}$$

Avec :

Abs contrôle : Absorbance du contrôle à la longueur d'onde 517nm

Abs test : Absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde 517nm

La variation du pouvoir de réduction en fonction de la concentration de l'huile essentielle et de l'acide ascorbique, permet également de calculer le paramètre CE50 qui représente « la Concentration Efficace », Cette dernière est définie comme CE étant la concentration de l'huile essentielle (ou de l'acide ascorbique) nécessaire pour réduire 50% de l'activité de DPPH°.

Les valeurs CE50 moyennes sont déterminées par les régressions linéaires de trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des échantillons testés et l'ordonnée par le pouvoir de réduction en pourcentage (**Abdelli, 2018**).

Chapitre V :

Résultats & discussion

V.1. Résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L*

Nous avons étudiés le pouvoir antibactérien des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton). L'activité antibactérienne est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour de disques contenant des huiles essentielles à tester vis-à-vis de cinq souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*) après 24heurs à 37°C. Le pouvoir antibactérienne de ces huiles essentielles à été déterminée par la mesure du diamètre de zone d'inhibition en (mm) a l'aide d'un pied à coulisse.



Figure 24 : Mesure du diamètre de la zone d'inhibition (Photos personnelles, 2024).

D'après les résultats obtenus on remarque que notre huiles essentielles montre un grand effet sur les souches bactériennes testés, les diamètres d'inhibitions mesurées sont compris ente 10mm et 16mm.

Les résultats relatifs aux diamètres des zones d'inhibition par les huiles essentielles sont regroupés dans les figures suivantes.

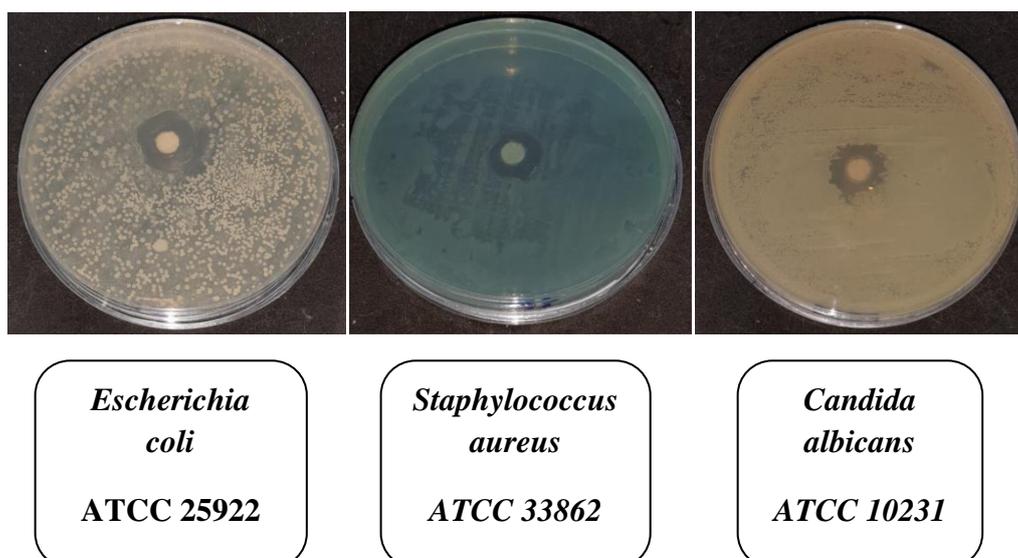


Figure 25 : Résultats obtenus pour *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Candida albicans* ATCC 10231 (Photos personnelles, 2024).

Les diamètres d'inhibition obtenus pour *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Candida albicans* ATCC 10231 sont respectivement comme suite : 16,56mm, 13,93mm et 12,88mm.

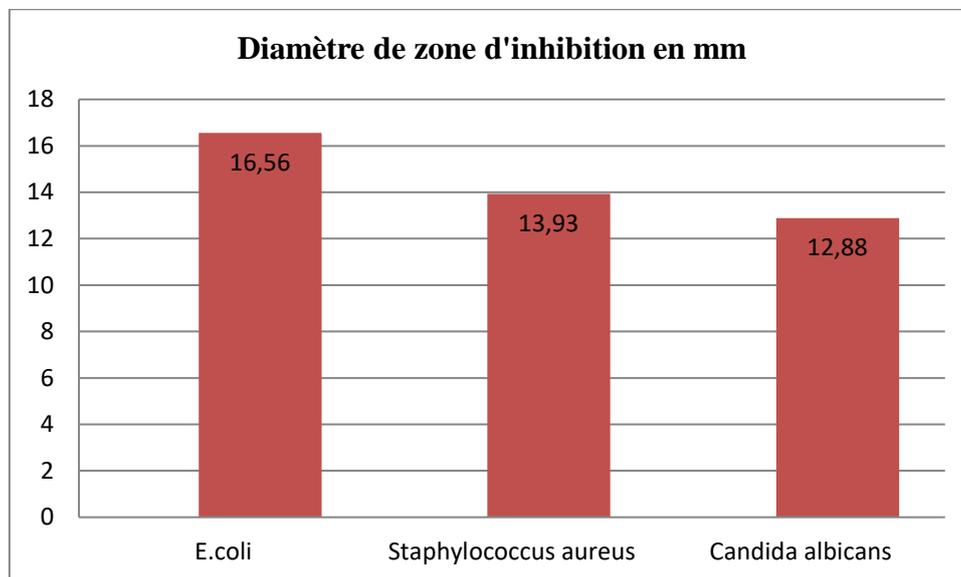


Figure 26 : Diamètres des zones d'inhibitions *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Candida albicans* ATCC 10231.

E. coli exhibe un diamètre d'inhibition de l'ordre de 16,56mm, ce qui reflète la forte sensibilité de cette souche bactérienne.

En ce qui concerne les souches *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 et *Candida albicans* ATCC 10231, on constate une réaction positive et efficace avec un diamètre de l'ordre de 13,93mm et 12,88mm respectivement.

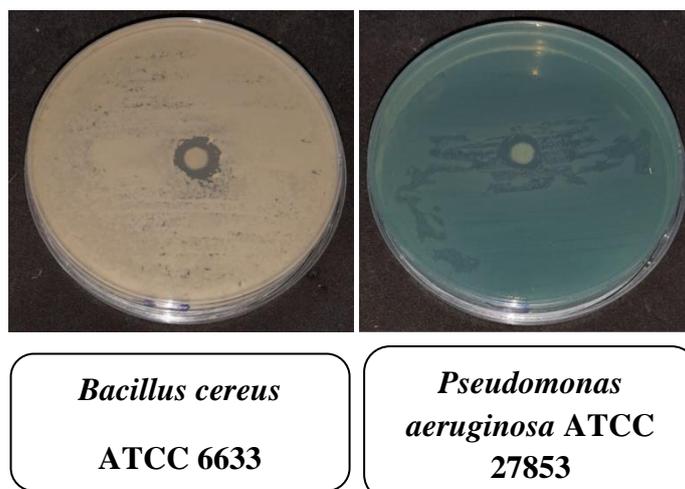


Figure 27 : Résultats obtenus pour *Bacillus cereus* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Photos personnelles, 2024).

Les diamètres d'inhibition obtenus pour *Bacillus cereus* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sont respectivement comme suit : 11,18mm et 10,65mm.

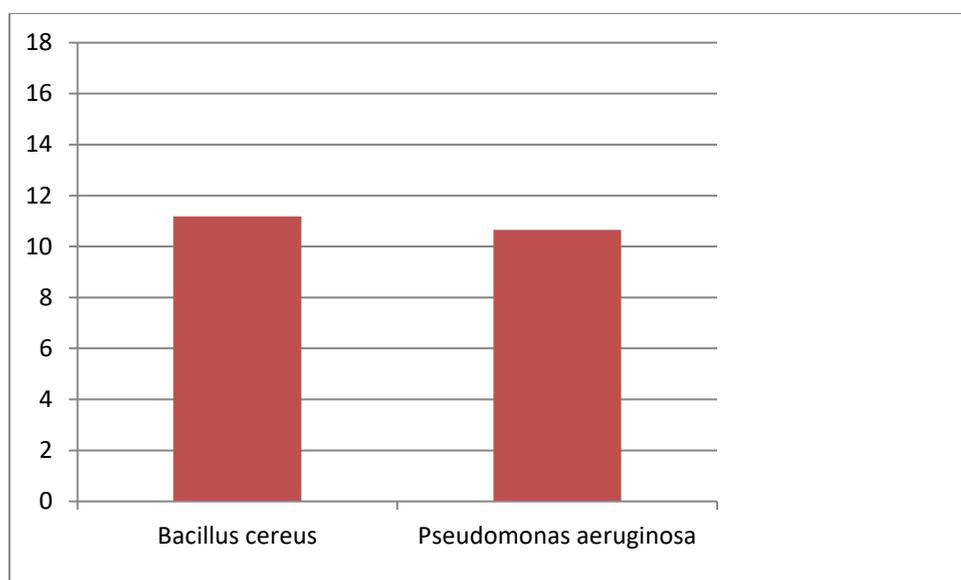


Figure 28 : Diamètres des zones d'inhibitions *Bacillus cereus* ATCC 6633 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Pour les deux bactéries *Bacillus cereus* ATCC 6633 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 on constate une réaction positive et efficace avec un diamètre de l'ordre de 11,18mm et 10,65mm respectivement.

V.1.1. Évaluation de l'activité antimicrobienne

La méthode d'aromatogramme nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de romarin vis-à-vis des cinq microorganismes testés. Les résultats présentés dans les Figures (24, 25, 26, 27 et 28), montrent que l'huile essentielle de romarin étudié, présente une activité importante, qui s'étend sur la totalité des souches testées.

Nous constatons d'après nos résultats, que *E. coli* ATCC 25922 est la souche la plus sensible parmi les souches testées, avec un diamètre égal à 16,56mm suivie par *Staphylococcus aureus* ATCC 33862 et *Candida albicans* ATCC 10231 et qui sont de l'ordre de 13,93mm et 12,88mm respectivement. Alors que *Bacillus cereus* ATCC 6633 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ont été légèrement moins sensibles par rapport aux autres souches, avec un diamètre de l'ordre de 11,18mm et 10,65mm respectivement.

A partir ces résultats des diamètres de zones d'inhibition, nous remarquons que l'huile essentielle du Romarin possède une activité antimicrobienne vis à vis des cinq souches testées, notamment sur la souche *E. coli*. Sur la base de ces résultats, nous concluons que la croissance de ces microorganismes étudiés est intéressante suites à cette forte action de notre huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* étudiée.

Les résultats de (Mouas et al., 2017) indiquent que l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. des deux régions Blida et Djelfa possède une bonne activité contre les bactéries testées, sauf *Pseudomonas aeruginosa*. Les données enregistrés indiquent que les souches les plus sensibles aux huiles essentielles des deux écotypes Blida et Djelfa sont *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* avec respectivement des diamètres de 23,75 mm et 22,75 mm pour Blida, et pour la région de Djelfa, des diamètres de l'ordre de 16,75 mm et 14,25 mm respectivement pour les deux souches. Quant aux souches *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*, ils ont noté des diamètres moins importants et qui sont respectivement de l'ordre de 11,75mm et 9,5mm.

A partir de ces comparaisons on peut dire que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. de Blida présente une activité antimicrobienne plus élevée que celle de Djelfa, ce qui nous laisse constater que les différences de cette activité est due aux facteurs et aux conditions géographiques. Ainsi, on peut constater que l'activité antimicrobienne dépend de la qualité d'huile essentielle (écotype) d'une part et dans une autre part de la souche microbienne elle-même (Mouas et al., 2017).

Les résultats obtenus à partir de l'aromatogramme (Boutabia et al., 2016) ont montrés que les huiles essentielles pures du romarin de la région de Hammamet possède une activité antibactérienne contre les micro-organismes sélectionnés dans le cadre du protocole entrepris. Seulement, il faudrait mentionner que la sensibilité des souches testées varie selon les dilutions. Les *Staphylococcus aureus* (25923) et *Staphylococcus aureus* (SAMR), ont été les bactéries les plus sensibles aux extraits du *Rosmarinus officinalis*.

D'autre part (Kalemba et Kunicka, 2003) ont montré que la sensibilité d'un micro-organisme aux huiles essentielles dépend, tout d'abord, des propriétés de l'huile essentielle et du micro-organisme lui-même. Quelques règles générales ont été fixées qui nous permettent parfois de prédire les résultats des expériences. Cependant,

compte tenu de la spécificité du micro-organisme et de l'huile essentielle, des expériences distinctes devraient être entreprises pour chaque système.

Nos résultats ont montré que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* étudié a exercé une activité antimicrobienne élevée sur *E. coli* (Gram-), par rapport à **Bozin et al. (2007)** qui ont montré que Les souches de bactéries à Gram positif testées semblaient être plus sensibles aux huiles essentielles examinées.

V.2. Résultats de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres par notre huile essentielle, nous avons employé la méthode au DPPH (**Mimouni, 2016**).

Ce radicale libre présente une coloration violette, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydante, la forme réduite confère à la solution une coloration jeune pale (**Mimouni, 2016**).

Les résultats de l'évaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH et par les huiles essentielles de *R. officinalis* étudiées sont illustrés dans la Figure (29) ci dessous.

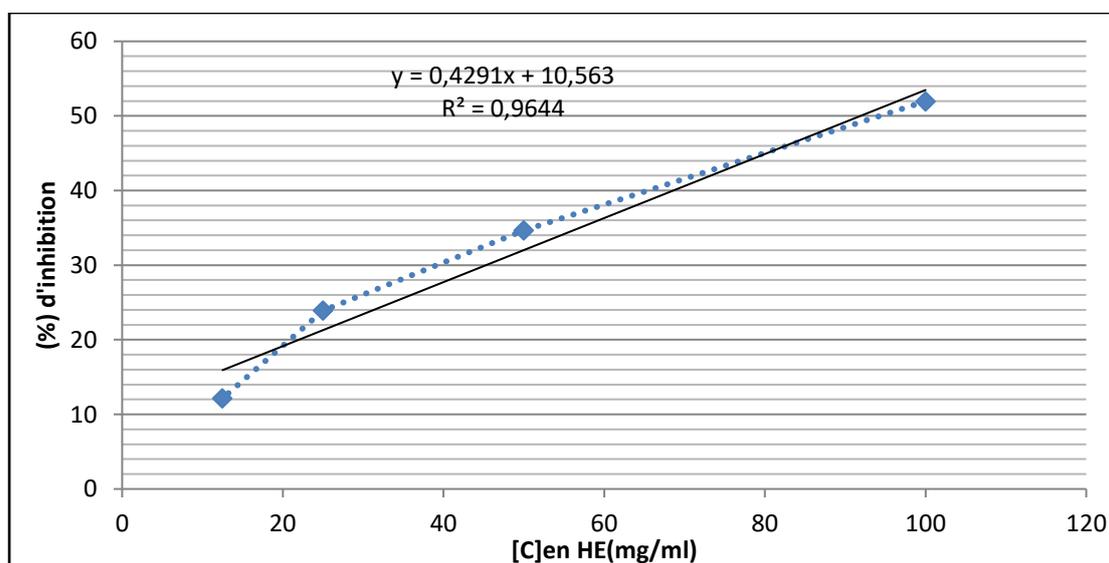


Figure 29 : Activité de piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles du romarin.

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration des huiles essentielles de

Rosmarinus officinalis. À la concentration la plus faible 12,5µL, le pourcentage d'inhibition pour les huiles essentielles est de 12,15%. À la concentration la plus élevée de 100µL le pourcentage d'inhibition a été estimé à 51,96%.

Le pouvoir anti-radicalaire de l'acide ascorbique (antioxydant standard) a été également évalué afin de le comparer au pouvoir des huiles essentielles.

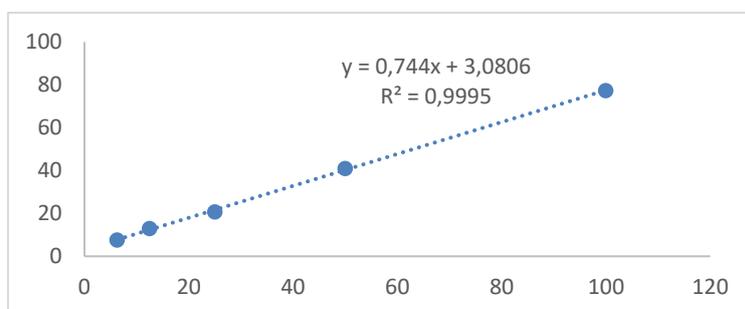


Figure 30 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

V.2.1. Détermination de la valeur IC₅₀

IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Ismaili et al., 2017).

À partir de l'équation linéaire de courbe de la concentration des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* en mg/ml en termes de pourcentage d'inhibition des radicaux libres, $Y = 0,429x + 10,56$, nous calculons la valeur de la IC₅₀. L'IC₅₀ est également calculée pour l'acide ascorbique.

Les valeurs IC₅₀ déterminées mg/ml exprimant la concentration efficace des huiles essentielles nécessaires pour le piégeage et la réduction de DPPH ainsi que l'acide ascorbique (Tableau 02).

Tableau 02 : Les valeurs des IC₅₀ des échantillons testés et d'acide ascorbique.

L'échantillon	IC ₅₀
Les huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	91,93 mg/ml
Acide ascorbique	63,06371mg/ml

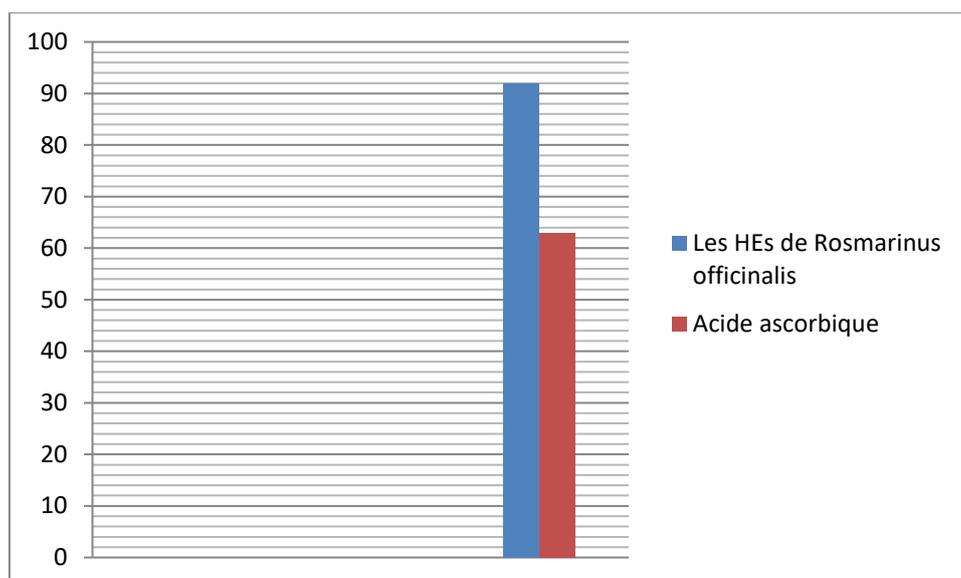


Figure 31 : Diagramme représente la comparaison entre IC₅₀ des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et IC₅₀ d'acide ascorbique.

Nos résultats révèlent que l'IC₅₀ des huiles essentielles du romarin 91,93 mg/ml et plus élevée que la valeur d'IC₅₀ d'acide ascorbique qui est 63,06371mg/ml.

Selon les résultats enregistrés, montrent que IC₅₀ des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* avec un valeur de 91,93 mg/ml est plus élevé que l'IC₅₀ d'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 63,06371mg/ml cela signifie que les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* doté d'un pouvoir antioxydant important qui est proche de celui l'acide ascorbique.

Selon (Mimouni, 2016) qui a appliqué la méthode du radical libre DPPH aux huiles essentielles du romarin, où il a trouvé que L'huile essentielle de la région de Mostaganem a une valeur de l'ordre 71.15±6.15 mg/ml, ce qui signifie que leur pouvoir antioxydant est plus grand que celui de la région Relizane avec une valeur enregistrée est 124.20±16.63 mg/ml.

Dans le test DPPH, la capacité de piégeage des radicaux de l'huile essentielle testée a augmenté en fonction de la concentration. Les valeurs pour une élimination de 50 % (IC₅₀) sont données dans l'huile essentielle a montré une meilleure élimination des radicaux IC₅₀ : 20.9µg/ml (0.02mg/ml) que le composant principal de l'huile essentielle de *R. officinalis* (Hussain et al., 2010).

Au vu des résultats de (Zidi et Houilia, 2020), dans lesquelles ils constatent que les 6 huiles essentielles provenant des régions d'Algérie (Oum-El-Bouaghi, Djelfa, Oran, Bejaia, Borjbou Arreridj et Souk Ahras) présentent une bonne efficacité antioxydante. Ce sont des valeurs proches malgré la différence du climat de chaque région. Les valeurs déterminées par la méthode DPPH varient entre $IC_{50} = 120.4$ et $200.1 \mu\text{l/ml}$, avec l'efficacité d'inhibition la plus élevée observé de l'ordre de $120.4 \mu\text{l/ml}$ pour l'huile essentielle provenant de Ain Mlila (Oum-El-Bouaghi). Par rapport à d'autres pays : Les huiles essentielles de romarin d'Iran de Tunisie et de Serbie présentent une activité antioxydante élevée avec un $IC_{50} = 3.8, 6$ et $24 \mu\text{l/ml}$ respectivement. Et pour d'Espagne et de Maroc présentent une activité antioxydante très faible avec un $IC_{50} = 533.8$ et $523.41 \mu\text{l/ml}$ respectivement.

Conclusion

Le romarin ou romarin officinal (*Rosmarinus officinalis*) est un arbrisseau appartenant à la famille des Lamiacées originaires du bassin méditerranéen, c'est une plante d'intérêt nutritionnel et médicinal possède d'excellentes propriétés antioxydante et antimicrobienne. Ce travail consiste à évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis de cinq souches bactériennes par la méthode de diffusion des disques (Aromatogramme), et de l'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de radical libre DPPH.

Les résultats de l'activité antimicrobienne sont exprimés par les diamètres des zones d'inhibition. L'évaluation de cette activité a montré une efficacité vis à vis de toutes les souches testées à (Gram+), à (Gram-) et de levure, concernant cette huile essentielle, elle s'est marqué par un maximum d'activité obtenu sur la souche *Escherichia coli* ATCC25922 avec un diamètre de l'ordre de 16,56 mm.

Les résultats de l'activité antioxydante sont exprimés par la méthode de DPPH, dont les résultats montrent que cette huile extraite possède un pouvoir antioxydant important.

On conclut que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* représente un effet inhibiteur très important vis à vis des microorganismes testées. L'exploration de la l'importance de huile essentielle de cette plante médicinale aromatique apportera certainement une contribution significative dans les domaines pharmaceutique et agro-alimentaire. D'autre part, il serait intéressant d'introduire ces huiles dans la conservation des produits alimentaires, car ils empêchent l'oxydation ainsi que la contamination microbienne.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

(A)

Abdelli W, 2018. Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *thymus vulgaris*. Thèse de doctorat. *Microbiologie appliquée*. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. P 122.

Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P, 1999. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*.37.124-130.

Andrade JM, Faustino C, Garcia C, Ledeiros D, Reis CP, Rijo P, 2018. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future science* OA. 4 (4). FOS 283.

(B)

Baghloul F, 2019. Bio-décontamination en agro-alimentaire par des molécules bio-actives naturelles d'une plante médicinale :*Rosmarinus officinalis*. Thèse de doctorat. Biochimie appliquée. Université badji mokhtar – annaba. P 97.

Balière C, 2016. Les *Escherichia coli* potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral : cas des STEC et des EPEC. Thèse de doctorat. Microbiologie. Université de Bretagne occidentale. P 178.

Benmerzoug D, Toukal IME, 2023. Préparation d'un système IPN de polymères à usage pharmaceutique. Mémoire de Master. Chimie des matériaux. Université Mohamed el Bachir el Ibrahim-Bordj Bouarreridj. P 50.

Belloul K, Chouiref M, 2016. Etude de l'activité antioxydante d'une plante médicinale (le romarin). Unv Echahid Hamma Lakhdar –EL-OUED. P 60.

Bouadjemi KH, 2018. Etude comparative des différents parties de la plante romarin «*Rosmarinus officinalis*» par rapport aux pouvoirs antibiotiques sur le yaourt. Mémoire de Master. Biotechnologie Alimentaire. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. P 39.

Bouguerra S, Nedjaoum A, 2013. Contribution à l'étude de quelques facteurs immuno-déficients dans l'apparition des vaginites mycosiques chez la femme. Mémoire de master. Biologie moléculaire et cellulaire/ Immunologie approfondie. Université huit mai 1945 Guelma. P 41.

Boukhatem MN, Ferhat A, Kameli A, 2019. Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : revue de littérature. *Agrobiologia*. 3(4), 1653-1659.

Boulezazen A, 2017. Évaluation de l'activité Antioxydant et antimicrobienne d'une plante aromatique, (*Rosmarinus officinalis. L*) de la forêt BéniMelloil–khenchla. Mémoire de Master. Biologie et valorisation des plantes. Université Echahid Hammam Lakhder El-oude. P 42.

Boumenikhra K, 2015. Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles de trois espèces d'agrumes. Mémoire de Master. Biotechnologie des Plantes Aromatiques et Médicinales et Produits Naturels. Université de blida 1. P 40.

Boutabia L, Telailia S, Bouguetof I, Guenadil F, Chefrou A, 2016. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L* de la région de hammat (Tébessa-Algérie). *Bulletin de la société Royale des sciences de liège*. 85, 174-189.

Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E, 2007. Antimicrobial and antioxydant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis L*. Lamiaceae) essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55 (19), 7879-7885.

(D)

Djousse BMK, Ngoune NF, Djoukeng HG, Nono LW, Sogang HS, Tangka JK, 2022. Extraction et Caractérisation des Huiles Essentielles de Trois Plantes Aromatiques Cultivées à l'Ouest-Cameroun : *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* et *Cymbopogon citratus*. *Cameroon Journal of Biological and Biochemical Sciences*.30 (2), 121-133.

Drioueche A, Mahi Y, 2016. Valorisation biologique des huiles essentielles de *Ruta montana* et d'*Artemisia herba alba* modifiés par thionation. Mémoire de Master. Matériaux et Produits Organique et Industrielle. UNIVERSITÉ de BLIDA 1. P 55.

(G)

González-Minero FJ, Bravo-Díaz L et Ayala-Gómez A, 2020. *Rosmarinus officinalis L.* (Rosemary): An Ancient Plant with Uses in Personal Healthcare and Cosmetics. *Cosmetics*. 7(4) ,77.

(H)

Hadj bouazza S, 2016. Production de parasporine bactérienne à activité anticancéreuse dans des milieux de grande pharmacie. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise. Biologie cellulaire et moléculaire. Université du Québec à Trois-Rivières. P 48.

Hallali H, Hached L, 2019. Etude de l'activité antimicrobienne de l'algue rouge *Corallina officinalis*. Mémoire de fin d'études. Nutrition et pathologie. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. P35.

Hamri A et Brinis A, 2018. Effets antimicrobiens des extraits de *Thymus vulgaris* chez *Candida albicans* responsable des infections uro-génitales. Mémoire de fin d'études. Microbiologie Fondamentale. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem. P58.

Hussain AI, Anwar F, Chatha SAS, Jabbar A, Mahboub S et Nigam PS, 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian journal of microbiology*. 41. 1070-1078.

(I)

Ismaili R, Houbairi S, Sanà L, Khadija M et Abdeslam L, 2017. Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales marocaines. *European scientific journal*, ESJ. 13 (12). 323.

(K)

Kalemba D, Kunicka A, 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*. 10 (10), 813-829.

Kamli TEL, Errachidi F, Eloutassi N, Majid H, Chabir R, 2017. Comparaison Quantitative Et Qualitative Des Huiles Essentielles De *Rosmarinus officinalis* Obtenues Par Différentes Méthodes. *European Scientific Journal*.. 13 (21), 1857-7881.

Kassoussi D, Guidadou FZ, 2022. Activité antibactérienne des huiles essentielles de la plante *Rosmarinus officinalis.L.* MÉMOIRE DE MASTER. Biochimie Appliquée. Université Mohamed Khider de Biskra. P 23.

(L)

Lucchesi ME, 2005. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat. Chimie. Université de la Réunion. P 143.

Lakehal S, 2016. Extraction et caractérisation des composés secondaires de deux plantes : armoise blanche (*Artemisia herba-alba* asso.) et romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) de la région de djelfa. Effets thérapeutiques et biopesticides. Mémoire de Magister. Agro-ressources. Université Blida 1. P 118.

Leplat M, 2017. Le romarain , *Rosmarinus officinalis L* , une Lamiacée médicinale de la garrigue provençale. Thèse de Doctorat. Pharmacie. D'Aix-Marseille. P 207.

(M)

Mimouni M, 2016. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* de deux régions Mostaganem et Relizane. Mémoire de fin d'études. Biologie. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. P 44.

Mnayer D, 2014. Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens. Thèse de Doctorat. Chimie. L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. P 125.

Mouas Y, Benrebiha FZ, Chaouia C, 2017. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *Rosmarinus officinalis L.* *Agrobiologia*. 7(1), 363-370.

Mouas Y, 2018. Effet comparatif des parametres physiologiques, biochimiques et thérapeutiques de romarin *Rosmarinus officinalis L.* Thèse de Doctorat. Science agronomique. Universite saad dahleb de blida. P 104.

Mouton W, 2018. Etude de l'impact de *Staphylococcus aureus* sur la formation du tissu osseux. Mémoire. Bactériologie. École pratique des hautes études. P 82.

(O)

Outaleb T, 2010. Huiles essentielles et extraits de romarin: composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne. Mémoire De Magister. Sciences alimentaires. Ecole Nationale Supérieure d'Agriculture-El Harrach-Algérie. P 110.

Outaleb T, 2016. Extraits de romarin d'Algérie (*Rosmarinus officinalis L.* et *Rosmarinus tournefortii De Noe*): Analyse chimique et activités antioxydantes et antimicrobiennes. Thèse de Doctorat. Sciences agronomiques. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie - El Harrach-Alger. P 114.

(T)

Talhi A, Teboula Z, Boussaha M, 2018. Etude de l'activité antibactérienne des huiles des trois plants médicinales (*Salvia sclarea, Sysygium aromaticum et Allium cepa*). Mémoire de Master. Infectiologie. Université 8 mai 1945 Guelma. P 38.

Touafek O, 2010. Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud algériens. Thèse de Doctorat. Chimie organique. Université mentouri-Constantine. P 255.

Toure D, 2014. Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse de doctorat. Biochimie. Université felix houphouët-boigny. P 90.

(W)

Wollinger A, Perrin É, Chahboun J, Jeannot V, Touraud D, Kunz W, 2016. Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis L.* leaves determined by DPPH assays. Comptes Rendus. Chimie 19 (6). 754-765.

(Z)

Zidi M, Houilia S, 2020. Contribution à l'étude de L'activité biologique de la plante *Rosmarinus officinalis L.* Mémoire de Master. Biochimie appliquée. Université L'Arbi Ben Mhidi Oum El Bouaghi. P 34.