

République Algérienne Démocratique et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie - El Harrach-Alger

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة – الحراش - الجزائر

Département de Technologie Alimentaire et de Nutrition Humaine

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en sciences agronomiques

Option : Sciences alimentaires

Thème

Extraits de romarin d'Algérie (*Rosmarinus officinalis* L. et
Rosmarinus tournefortii De Noe): Analyse chimique et
activités antioxydantes et antimicrobiennes

Réalisé par : M^{me} OUTALEB Tydia

JURY :

Président : Mr. HAZZIT M.

Maître de conférences A (ENSA El Harrach).

Directeur de thèse : Mme. FERHAT Z.

Professeur (ENSA El Harrach).

Examineurs : Mr. Ferhat M. A.

Maître de conférences A (ENS Kouba).

Mme. MEKLAT A.

Maître de conférences A (Université de Blida).

Année universitaire 2015- 2016

Remerciements

Je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude et ma reconnaissance à Mme Ferhat Z. professeur à l'ENSA pour m'avoir accordé sa confiance en acceptant de diriger ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma grande considération.

Je remercie Mr Hazzit M. maître de conférences A à l'ENSA pour son entier dévouement, son aide précieuse, sa constante disponibilité et sa gentillesse qui ont contribué largement à la réussite de notre étude. Je le remercie également de m'avoir fait l'honneur de présider le jury d'examination.

Je remercie Mr Ferhat M.A. maître de conférences A à l'ENS de Kouba pour sa disponibilité et pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes plus vifs remerciements vont également Mme Meklat A. maître de conférence A à l'université de Blida pour son soutien constant, et pour avoir accepté de faire partie du jury d'examination.

Je souhaite remercier tout le personnel du Département de Technologie Alimentaire qui m'a aidé dans mon parcours, en l'occurrence : Nadia, Fatma Zohra, Mohamed "analyse", Mohamed "microbio", Laarbi

Sans oublier Said, Khalida, Nihad, Ilham, Ghania et tout le reste du personnel de la Post Graduation.

Enfin, j'exprime ma profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail et que j'ai peut être omis de citer.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

A mon père et ma mère qui m'ont soutenue tout au long de mon parcours.

A la prunelle de mes yeux, mon fils Anis

*A mes très chers frères et sœurs (Fafi, Khalef, Doudou), Fahima et son mari
Mourad*

A mon mari Amine

Sommaire

Introduction	1
Partie 1: Etude bibliographique	5
Chapitre I: Les genre <i>Romarinus</i>	6
1. Taxonomie.....	6
2. Description botanique et répartition.....	6
2.1. <i>R. officinalis</i>	6
2.2. <i>R. tournefortii</i>	7
3. Ecologie et répartition géographique.....	7
4. Composition chimique.....	8
5. Utilisation et propriétés du romarin.....	9
6. Toxicité.....	12
Chapitre II: Les extraits de plantes	14
1. Les méthodes de préparation.....	15
1.1 Préparation des huiles essentielles et extraits végétaux.....	15
1.1.1. Hydrodistillation.....	15
1.1.2. Distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion ou entraînement à la vapeur d'eau.....	16
1.1.3. Expression ou pressage à froid.....	16
1.1.4 Extraction par solvant volatil.....	16
1.1.5 Extraction par solvant fixe.....	17
1.1.6 Extraction au Soxhlet.....	18
1.1.7 Extraction par l'appareil de Likens-Nickerson.....	18
1.1.8 Extraction à l'eau surchauffée.....	18
1.1.9 Extraction par le CO ₂ à l'état supercritique.....	18
1.1.10 Extraction par micro-ondes.....	19
1.1.11 Extraction par ultra-sons.....	20
2. Les méthodes de séparation, d'identification et de quantification.....	20
2.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	20
2.2. Chromatographie Liquide Haute-Performance (HPLC).....	21
2.3. Spectrométrie de masse (SM).....	22
2.4. Chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS et CPG/SM).....	22
2.5. La résonance magnétique nucléaire du carbone-13 (RMN).....	23
3. Composition chimique huiles essentiels et des extraits végétaux.....	24
3.1. Les terpènes et stéroïdes.....	25
3.2. Les composés phénoliques ou polyphénols.....	26
3.3. Alcaloïdes.....	27
4. Facteurs de variation de la composition chimique des extraits végétaux.....	27

5. Domaine d'utilisation.....	28
5.1. Industrie agroalimentaire.....	28
5.2. Phytothérapie.....	29
5.3. Pharmacie	29
5.4. Cosmétique et parfumerie.....	29
6. Toxicité.....	29
6.1. Toxicité par voie orale.....	30
6.2. Toxicité sur cellules animales ou humaines.....	30
6.3. Toxicité dermique.....	30
Chapitre III: Les composés phénoliques	31
1. Généralités.....	31
2. Les classes de composés phénoliques.....	31
2.1. Phénols et acides phénoliques.....	32
2.2. Les tannins.....	32
2.3. Les anthocyane.....	33
2.4. Les coumarines.....	33
2.5. Les flavonoïdes.....	33
2.5.1. Biosynthèse et classification des flavonoïdes.....	34
2.5.2. Propriétés biologiques des flavonoïdes.....	35
3. Activité biologique des composés phénoliques.....	36
Chapitre IV: Mécanismes oxydatifs et antioxydants	38
1. Principaux radicaux libres.....	38
2. Principales cibles radicalaires.....	39
3. Les antioxydants.....	41
3.1. Le mécanisme d'action des antioxydants.....	42
3.2. Les différents types d'antioxydants.....	42
3.2.1. Les antioxydants naturels.....	42
3.2.2. Les antioxydants de synthèse.....	43
3.2.3. Les enzymes comme antioxydants.....	44
4. Mesure de l'état d'oxydation et du pouvoir antioxydant.....	44
4.1. Analyse sensorielle.....	44
4.2. L'indice de peroxyde.....	44
4.3. Le test de SWIFT.....	44
4.4. L'indice TBA.....	44
4.5. L'indice de p-anisidine.....	44

4.6. Le RANCIMAT.....	44
4.7. Mesure des pouvoirs chélateur et réducteur.....	45
4.8. Mesure du pouvoir de piégeage des radicaux libres.....	45
Chapitre V: Activité antimicrobienne	46
1. Activités bactéricide et bactériostatique.....	46
1.1. Grandeurs de mesure.....	46
1.2. Exemples d'activités.....	47
1.3. Souches bactériennes.....	47
1.4. Association d'huiles essentielles ou d'extraits.....	48
2. Activités fongicide et sporocide.....	48
3. Composition chimique et activité.....	49
4. Mode d'action.....	50
Partie 2: Etude expérimentale	52
Chapitre VI: Matériel et méthodes	53
1. Matière végétale.....	54
2. Extraction des huiles essentielles.....	55
2.1. Protocole d'extraction.....	55
2.2. Rendement de l'extraction.....	56
3. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par CPG et CPG/ SM.....	57
3.1. Analyse par chromatographie en phase gazeuse CPG.....	57
3.2. Analyse qualitative et semi quantitative des huiles essentielles par CPG/SM.....	57
4. Préparation d'extraits éthanolique.....	59
5. Dosage des composés phénoliques des extraits de romarin.....	60
5.1. Dosage des polyphénols.....	60
5.1.1. Principe.....	60
5.1.2. Mode opératoire.....	60
5.2. Dosage des flavonoïdes.....	60
5.2.1. Principe.....	61
5.2.2. Mode opératoire.....	61
6. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits obtenus....	61
6.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH.....	61
6.1.1. Principe.....	61
6.1.2. Mode opératoire.....	62
6.2. Mesure du pouvoir de piégeage du radical cation ABTS.....	62
6.3. Mesure du pouvoir réducteur.....	63

6.3.1. Mode opératoire	63
7. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits éthanoliques.....	64
7.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	64
7.2. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB).....	65
7.3. Les germes cibles utilisés.....	65
7.3.1. Bactéries.....	65
7.3.2. Champignons et levures.....	67
8. Analyse de données	68
Chapitre VII: Résultats et discussions	69
1. Rendement en huile essentielle.....	70
2. Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle.....	70
3. Composition chimique des huiles essentielles.....	72
3.1 Composition chimique des huiles essentielles des romarins de l'espèce <i>R. officinalis</i>	72
3.1.1 Description chimique des huiles essentielles étudiées.....	76
3.1.2 Comparaison entre les huiles essentielles.....	78
3.2 Composition chimique des huiles essentielles des romarins de l'espèce <i>R. tournefortii</i>	83
3.2.1 Description chimique des huiles essentielles étudiées.....	86
3.2.2 Comparaison entre les huiles essentielles.....	88
4. Rendement en extraits.....	92
5. Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits obtenus.....	93
6. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits de romarins étudiés.....	96
6.1. Activité de piégeage du radical DPPH et ABTS des différentes huiles essentielles des romarins étudiés.....	96
6.2. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS des différents extraits des romarins étudiés.....	99
6.3. Pouvoir réducteur des différentes huiles essentielles des romarins étudiés.....	104
6.4. Pouvoir réducteur des différents extraits des romarins étudiés.....	106
7. Activités antimicrobienne, antifongique et antilevurienne.....	108
7.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles et des extraits de romarin.....	108
7.1.1. CMI des huiles essentielles.....	109
7.1.2. CMI des extraits.....	112
7.2. Détermination des concentrations minimales bactéricide fongicides et antilevurienne des huiles essentielles et extraits de romarin.....	112
Conclusion	114
Références bibliographiques	119

Liste des tableaux

Tableau 01 : liste non exhaustives d'effets attribuées aux composés de romarins.....	9
Tableau 02 : Principales utilisations du romarin en Algérie.....	11
Tableau 03 : Activités biologiques des composés polyphénoliques	36
Tableau 04 : Caractéristiques de chaque région	54
Tableau 05 : Souches bactériennes testées par les huiles essentielles et les extraits de romarin, leurs caractéristiques et les pathologies engendrées pour l'homme.....	66
Tableau 06 : Rendement en huile essentielle des différents romarins.....	70
Tableau 07 : Composition (%) chimique des huiles essentielles des différents écotypes de <i>R. officinalis</i> étudiés.....	72
Tableau 08 : Partition des classes de composés chimiques définissant les écotypes de <i>R. officinalis</i> tel qu'obtenu par classification ascendante hiérarchique.....	81
Tableau 09 : Composition (%) chimique des huiles essentielles des différents échantillons de <i>R. tournefortii</i> étudiés.....	83
Tableau 10 : Partition des classes de composés chimiques définissant les écotypes de <i>R. tournefortii</i> tel qu'obtenu par la classification ascendante hiérarchique.....	91
Tableau 11 : Rendements en extraits des différents extraits de <i>R. officinalis</i> et <i>R. tournefortii</i>	72
Tableau 12 : Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des différents extraits de <i>R. officinalis</i> et <i>R. tournefortii</i>	94
Tableau 13 : Coefficients de corrélations (r) montrant la relation entre l'intensité du pouvoir de piégeage et la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits de romarins étudiés.....	104
Tableau 14 : Coefficients de corrélations (r) montrant la relation entre l'intensité de la capacité réductrice et la teneur en phénols totaux des extraits de romarins étudiés.....	108
Tableau 15 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentielles et des extraits de <i>R. officinalis</i> et <i>tournefortii</i>	109
Tableau 16 : Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) des huiles essentielles et des extraits des <i>R. officinalis</i> et <i>tournefortii</i>	113

Liste des figures

Figure 01 : Composés phénoliques caractéristiques des extraits de Romarin.....	8
Figure 02 : Voies de Biosynthèse des substances originaires du métabolisme secondaire des végétaux.....	25
Figure 03 : Exemple de structure de composés monoterpéniques.....	25
Figure 04 : Exemple de structure de composés sesquiterpéniques.....	26
Figure 05 : Squelette de base des flavonoïdes.....	33
Figure 06 : Différentes classes de flavonoïdes.....	34
Figure 07 : Oxydation d'un acide gras insaturé.....	41
Figure 08 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.....	42
Figure 09 : Schéma du dispositif de type Clevenger	55
Figure 10 : Schéma d'un extracteur de Soxhlet	59
Figure 11 : Réaction du radical DPPH avec un antioxydant AH.....	62
Figure 12 : Réaction du radical ABTS ^{•+} en présence d'un antioxydant	63
Figure 13 : Procédure de mise en œuvre du test du pouvoir réducteur	64
Figure 14 : Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle du <i>R. officinalis</i> de Mostaganem.	71
Figure 15 : Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle du <i>R. tournefortii</i> de Bouira	71
Figure 16 : Coupes histologiques transversales d'une feuille de <i>R. officinalis</i> mettant en évidence la présence de poils sécréteurs (PS), tecteurs (PT) et glandulaire (PG)	72
Figure 17a : Exemple de chromatogramme CPG obtenu pour l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> de l'ENSA.....	75
Figure 17b : Exemple de chromatogramme GPC/SM obtenu pour l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> de l'ENSA.....	76
Figure 18 : Analyse en Composante Principale (ACP) représentant sur les deux premiers plans (CP1 vs. CP2) les différents échantillons de <i>R. officinalis</i> en fonction de leurs composition chimique.....	79
Figure 19 : Dendrogramme basé sur l'analyse de proximité des différents écotypes de <i>R. officinalis</i> en fonction de leurs compositions.....	80
Figure 20 : Dendrogramme de partition des composés chimiques (classes) définissant les différents échantillons de <i>R. officinalis</i>	81
Figure 21 : Diagramme en étoile représentant les différents échantillons de <i>R. officinalis</i> en fonction des familles de composés qui caractérisent leurs huiles essentielles.....	83
Figure 22a : Exemple de chromatogramme CPG obtenu pour l'huile essentielle de <i>R. tournefortii</i> de Bechar.....	85
Figure 22b : Exemple de chromatogramme GPC-MS obtenu pour l'huile essentielle de <i>R. tournefortii</i> de Bouira.....	86
Figure 23 : Diagramme en étoile représentant les différents échantillons de <i>R. tournefortii</i>	87

en fonction des familles de composés qui caractérisent leurs huiles essentielles.....

Figure 24: Analyse en Composante Principale (ACP) représentant sur les deux premiers plans (CP1 vs. CP2) les différents échantillons de <i>R. tournefortii</i> en fonction de leurs compositions chimiques.....	88
Figure 25: Dendrogramme basé sur l'analyse de proximité des différents échantillons de <i>R. tournefortii</i> en fonction de leurs compositions.....	89
Figure 26: Dendrogramme de partition des composés chimiques (classes) définissant les différents écotypes de <i>R. tournefortii</i>	90
Figure 27: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique utilisée pour le dosage des phénols totaux	93
Figure 28: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoides	94
Figure 29: Activité de piégeage du radical DPPH par les différentes huiles essentielles de <i>R. officinalis</i> (A) et <i>tournefortii</i> (B) comparée au BHT.....	97
Figure 30: Activité de piégeage du radical ABTS par les différentes huiles essentielles de <i>R. officinalis</i> (A) et <i>tournefortii</i> (B) comparé au BHT.....	98
Figure 31: Activité de piégeage du radical DPPH par les différents extraits de <i>R. officinalis</i> (A) et <i>tournefortii</i> (B) comparé au BHT.....	100
Figure 32: IC _{50-DPPH} des différents extraits de <i>R. officinalis</i> (A) et <i>tournefortii</i> (B) et du BHT.....	101
Figure 33: Activité de piégeage du radical ABTS par les différents extraits de <i>R. officinalis</i> (A) et <i>tournefortii</i> (B) comparé au BHT.....	102
Figure 34: IC _{50-ABTS} des différents extraits de <i>R. officinalis</i> (A) et <i>tournefortii</i> (B) et du BHT.....	103
Figure 35: Pouvoir réducteur des différentes huiles essentielles de <i>R. officinalis</i> (A) et <i>tournefortii</i> (B) comparé au BHT.....	105
Figure 36: Pouvoir réducteur des différents extraits de <i>R. officinalis</i> (A) et <i>tournefortii</i> (B) comparé au BHT.....	107

Liste des abréviations

ω	Oméga
°C	Degré Celsius
μg	Microgramme
μl	Microlitre
ABTS	2,2- azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFNOR	Association Française de Normalisation
ag	Acide gallique
AlCl ₃	Chlorure d'aluminium
ATP	Adinosine Triphosphate
BHA	Butyl Hydroxy Anisol
BHT	Butyl Hydroxy Toluène
cm	centimètre
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale inhibitrice
CML	Concentration Minimale Létale
CO ₂	Dioxyde de Carbone
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CPG/SM	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse
Da	Dalton
DL ₅₀	Dose létale pour 50% de la population
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ENSA	Ecole Nationale Supérieure Agronomique
EOR	Espèces Oxygénées Réactives
eq	Equivalent
FID	Détecteur à ionisation de flamme
g	Gramme
Gr	Grossissement
H	Humidité
ha	Hectares
HCl	Acide Chlorhydrique
I(%)	Pourcentage d'inhibition ou activité antioxydante

IC ₅₀	Concentration inhibitrice de 50% des radicaux
IK	Indice de rétention
ENSA	Ecole Nationale Supérieure Agronomique
ISP2	International streptomycetes medium II
Kg	Kilogramme
L	Litre
m	Mètre
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
nm	Nanomètre
O ₂	Oxygène
p	Poids en grammes
pH	Potentiel d'hydrogène
qr	Quercitine
R.	Romarin
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SM	Spectroscopie de masse
TBA	Acide thiobarbiturique
TBHP	Trihydroxybutyrophénone
TBHQ	Ter-Butyl-hydroxy-quinone
tr/mn	Tour par minute
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultra Violet

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 (**Paradiso et al., 2009**).

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.

Les effets bioactifs des extraits se sont largement avérés être liés à leurs grande richesse en composés terpéniques et aromatiques (phénoliques) dont les structures chimiques sont très diversifiées (**Croteau et al., 2000**). L'organisme produit quotidiennement des radicaux libres, composés très réactifs comportant un électron célibataire nécessaire à des mécanismes vitaux. Il est établi que ces radicaux libres appelés aussi espèces oxygénées réactives (EOR) peuvent en cas de surproduction, donner lieu au stress oxydant, lui-même impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies comme le diabète, le cancer, la maladie de parkinson ou encore la maladie d'Alzheimer et que les composés phénoliques ont prouvé leur rôle préventif dans l'incidence de telles maladies (**Liu et al., 2008**).

La surproduction d'EOR peut être prévenue ou limitée par l'emploi d'antioxydants. Ces derniers ajoutés dans les formulations alimentaires font l'objet de nombreuses recherches à cause de leur intérêt certain sur la préservation des qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments ainsi que dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquelles le stress oxydant est incriminé.

L'emploi des extraits de plantes comme agents antimicrobiens a largement prouvé leur grand spectre d'action (bactéries, champignons et les levures) (**Alzoreky et Nakahara, 2002**). A l'heure actuelle le recours aux huiles essentielles et autres extraits paraît comme une alternative pour la réduction des risques de développement d'antibiorésistance liée à l'émergence de microorganismes pathogènes mutants.

En effet, l'usage généralisé et abusif des antibiotiques en thérapeutique humaine et animale conduit de plus en plus à la sélection de germes résistants, qui paradoxalement ont plus de mal à développer des résistances aux mélanges complexes de composés que représentent les huiles essentielles et les extraits (**Daferera et al., 2003**).

Ainsi, les extraits incorporés dans les formulations alimentaires permettent, en plus de leur pouvoir antioxydant, de contribuer à la réduction de certaines infections communes généralement liées à une contamination microbienne dans les aliments consommés.

De part leurs fort pouvoir antioxydant et antimicrobien, les plantes de la famille des lamiacées, à laquelle le romarin appartient, en fait l'une des familles botaniques les plus fréquemment utilisées au niveau mondial (**Bouhdid et al., 2006**). En Algérie, cette famille est considérée comme l'une des plus importantes de la flore locale du point de vu de sa diversité et sa représentation (**Quezel et Santa, 1962**)

En ce qui concerne le genre *Rosmarinus*, trois espèces du genre y ont été décrites : *Rosmarinus officinalis* L, *Rosmanirus tournefortii* De Noé. et *Rosmanirus tomentosus* (Hub.-Mor. & Maire). L'espèce *R. tournefortii*, aussi connue sous le nom de *R. eriocalyx*, est actuellement définie comme une plante endémique du Nord-Ouest de l'Afrique et du Sud de l'Espagne.

Le romarin de plusieurs régions du monde, particulièrement ceux appartenant à l'espèce *Rosmarinus officinalis*, a montré de multiples propriétés bioactives qui seraient intéressantes de comparer à celles des romarins d'Algérie. De plus, du fait de sa spécificité régionale, l'espèce *R. tournefortii* reste mal connue et très peu investiguée du point de vu de sa composition et ses propriétés.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une meilleure connaissance des romarins d'Algérie (*R. officinalis* et *tournefortii*) du point de vue de leurs composition chimique, par l'étude de sa variabilité inter et intra spécifique, et de l'activité biologique par l'étude *in vitro* de l'activité antioxydante et antimicrobienne.

La première partie de ce travail sera consacrée à l'extraction et à l'analyse par CPG et CPG/SM des huiles essentielles ainsi qu'à l'évaluation de la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits de *R. (officinalis* et *tournefortii*) collectées de différentes régions d'Algérie.

Dans la seconde partie les différents extraits ainsi caractérisés seront évalués du point de vu de leurs activités antioxydante et antimicrobienne.

PARTIE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Les genre *Rosmarinus*

Le genre *Rosmarinus* ne comprend que trois espèces d'arbustes ligneux indigènes à la région méditerranéenne (**Upson 2000; Harley et al., 2004**): il s'agit de *R. officinalis* Linné, de loin l'espèce la plus importante et connue (**Bärtels, 1997**), largement cultivée depuis l'antiquité comme une plante herbacée et de jardin, de *R. tournefortii* de Noé et de *R. tomentosus* Huber-Morath Maire, morphologiquement très proches, considérés comme moins aromatiques que *R. officinalis* (**Bärtels, 1997**) et d'introduction plus récente en culture.

1. 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 (**Boelens, 1985**).

La systématique du romarin est la suivante (**Quezel et Santa, 1963**):

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 révolutée, 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. (**Quezel et Santa, 1963**).

2. Description botanique et répartition

2.1. *R. officinalis*

Arbrisseau qui peut atteindre 2m de hauteur. Cette espèce se distingue par une inflorescence et calice à pilosité pruinuse très courte constituée par des poils étroitement

appliqués. Inflorescences en épis très courts, à bractées squamiformes de 1-2 mm, rapidement caduques. (Quezel et Santa, 1963).

2.2. *R. tournefortii*

Dénoté également *R. eriocalyx* Jord. & Fourr et dont l'épithète signifie calices laineux, se réfère à la frappante couverture de poils dense. En effet cette espèce se distingue par une inflorescence et calice à pilosité double, l'une courte et visibles à l'œil nu, l'autre constituée par de longs poils dressés glanduleux au sommet. Inflorescences plus longues que chez *R. officinalis*, à bractées amples cordiformes, longues de 3-4 mm (Quezel et Santa, 1963).

De plus, *R. Tournefortii* possède des feuilles plus petites (5 à 15 mm de long et moins de 2 mm de large) avec des pédoncules floraux à poils denses. cette espèce est également connue pour avoir une croissance lente avec des hauteurs généralement de 25cm et qui n'excèdent jamais 1m donnant ainsi à la plante un aspect prostré.

3. Ecologie et répartition géographique

Le romarin possède une aire géographique très vaste, il pousse sur tous types de terrains avec une préférence pour les sols calcaires, argileux, argileux-limoneux, situé dans les endroits ensoleillés, chauds, secs et abrités du vent. *R. officinalis* est répandu sur la plupart des maquis, garrigues et rivages marins alors que le *R. tournefortii* est plus apte à se développer sur les rocailles jusqu'à 1500m d'altitude. Il accompagne souvent le pin d'Alep, la sauge, le thym (Quezel et Santa, 1963; Gilly, 2005).

Le romarin officinal est spontané dans toute la région méditerranéenne (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, France, Espagne, Portugal, Grèce, Turquie et Italie). cependant, étant donné qu'il est cultivé depuis l'antiquité, on le retrouve dans de nombreux pays d'Europe et d'Asie notamment l'Inde, les Philippines, les Antilles, l'Australie, les Etats-Unis et le Mexique (Pelikan, 1986 ; Teuscher *et al.*, 2005).

Contrairement au *R. officinalis*, le *R. tournefortii* est seulement répandu en Afrique du Nord et au sud de l'Espagne où il est considéré comme endémique.

En Algérie les différentes espèces de romarin s'étalent sur une superficie excédant 100 000 hectares (Bensebia *et al.*, 2009) sur la bande littorale et hauts plateaux et est dénoté généralement "Klil" ou "M'zir" dans les régions Berbérophones. Le *R. tournefortii* semble être plus rare dans les régions littorales et Atlas Tellien Algérois et Oranais ainsi que les hauts plateaux centre et ouest (Quezel et Santa, 1963).

4. Composition chimique

- **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 (Teuscher *et al.*, 2005)
- **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.
- **Dérivés de l'acide cinnamique (tannins)**: représentent environ 3,5% et sont constitués principalement d'acide rosmarinique (1,1 à 2,5%).
- **Flavonoïdes** : présents sous forme d'aglycones et d'hétérosides comme la cirsimarine, la diosmine, l'hespéridine, l'homoplantiginine (figure 01) (Manach *et al.*, 2004).

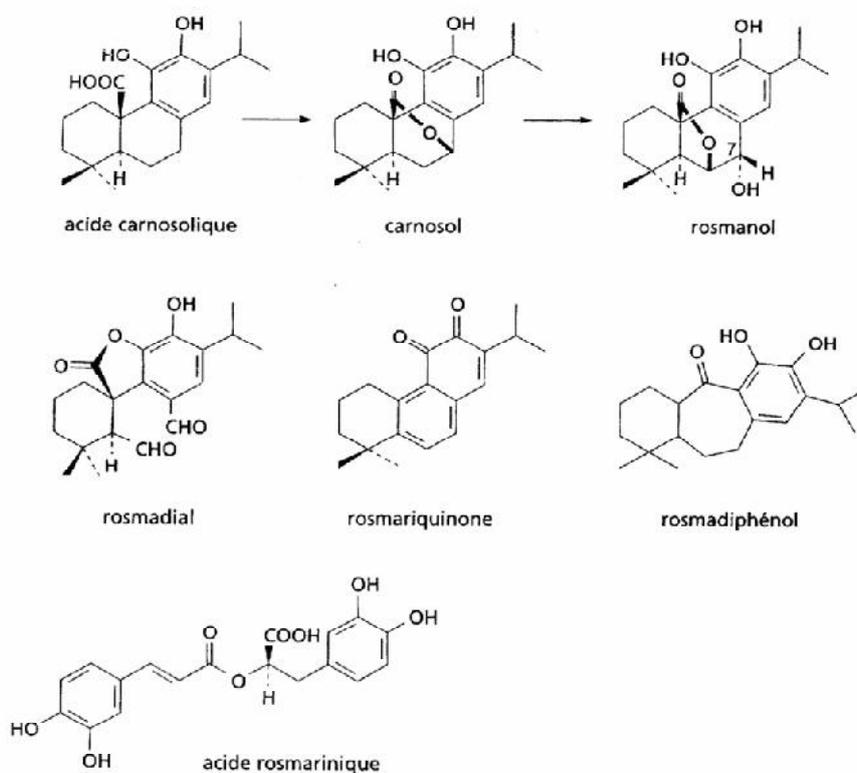


Figure 01 : Composés phénoliques caractéristiques des extraits de Romarin

5. Utilisation et propriétés du romarin

De part sa vaste aire de répartition géographique et facilité de culture, le *R. officinalis* via son huile essentielle, est largement utilisé dans l'industrie alimentaire (boissons alcoolisées, desserts, bonbons, etc.). Cette plante agit comme agent aromatisant et conservateur du fait de ses propriétés antioxydante, antimicrobienne et antiradicalaire (**Gachkar et al., 2007**). Elle est aussi utilisée comme composant aromatique dans l'industrie des cosmétiques (savons, parfums, crèmes, etc.).

Les extraits de romarin contribuent à l'augmentation des sécrétions biliaires, agissent dans les affections du système nerveux et se révèlent un excellent cicatrisant des plaies et brûlures

L'activité antivirale d'extraits observée in vitro est due essentiellement à leur teneur en acide rosmarinique (**Aruoma et al., 1996**).

Les carnosols et l'acide carnosique ont le potentiel d'augmenter la détoxification d'importants carcinogènes humains, les rendant ainsi de promettants candidats pour les programmes chémopréventifs (**Cheung et Tai, 2007**).

Des extraits éthanoliques ont montré une importante activité dose-dépendante cholérétique ainsi qu'une importante activité hépatoprotective (**Fahim, 1999**).

L'effet antispasmodique des extraits éthanoliques a été mis en évidence après administration d'acétylcholine ou d'histamine (**Forster et al., 1980**).

L'application dermique d'un extrait de romarin réduit de façon conséquente la formation de tumeurs cutanées. (**Willem, 2002**).

De façon générale, selon la nature des composés et leurs concentrations une multitude d'effets bioactifs est attribué aux extraits de romarins (tableau 01).

Tableau 01 : Liste non exhaustives d'effets attribués aux composés de romarins

Effet bioactif	Composé	Effet bioactif	Composé
Acaricide	α -terpinene Gamma-terpinene Limonene	Expectorant	1,8-cineole α -pinene Bornyl-acetate Camphene Camphor Limonene
Analgésique	Borneol Camphor Myrcene P-cymene	Arôme	1,8-cineole Alpha-phellandrene Alpha-pinene Alpha-terpinene Alpha-terpineol Beta-pinene Borneol

			Bornyl-acetate Camphene Delta-3-carene Gamma-terpinene Limonene Myrcene P-cymene Terpinolene
Anesthésique	1,8-cineole Camphor	Fongicide	1,8-cineole Alpha-phellandrene Borneol Camphor Caryophyllene-oxide Myrcene P-cymene Terpinen-4-ol Terpinolene Gastroprotective 1,8-cineole
Antiallergique	1,8-cineole Terpinen-4-ol	Hépatoprotectif/ Hépatotonic	Borneol 1,8-cineole
Antiasthmatique	Limonene Terpinen-4-ol	Herbicide	1,8-cineole Alpha-pinene Beta-pinene Borneol Camphor Limonene P-cymene Terpinen-4-ol Hypotensive 1,8-cineole
Antibactérien	1,8-cineole Alpha-phellandrene Alpha-pinene Alpha-terpineol Borneol Bornyl-acetate Delta-3-carene Delta-cadinene Limonene Myrcene P-cymene Sabinene Terpinen-4-ol	Insecticide	Alpha-pinene Alpha-terpinene Alpha-terpineol Caryophyllene-oxide Limonene
Antiinflammatoire	1,8-cineole Alpha-pinene Alpha-terpineol Beta-pinene Borneol Caryophyllene-oxide Delta-3-carene Limonene	Laxatif	Alpha-phellandrene P-cymene Lipolytic Limonene Nematicide 1,8-cineole Alpha-terpineol Borneol Camphor Limonene Terpinen-4-ol
Antioxydant	Camphene Gamma-terpinene	Stimulant	Camphor

	Myrcene Terpinen-4-ol Terpinolene		
Diurétique	Terpinen-4-ol	Sédatif	1,8-cineole Alpha-pinene Alpha-terpineol Borneol Bornyl-acetate Limonene P-cymene
Sédatif	1,8-cineole Alpha-pinene Alpha-terpineol Borneol Bornyl-acetate Limonene P-cymene	Tranquillisant	Alpha-pinene Borneol
Tranquillisant	Alpha-pinene Borneol		

Source : <http://www.naturalmedicinefacts.info/>

En Algérie, le romarin est traditionnellement utilisé comme antispasmodique, antirhumatisme, stimulant et antiseptique (tableau 02).

Tableau 02: Principales utilisations du romarin en Algérie.

Wilaya	Partie utilisée	Utilisation en médecine traditionnelle	Mode d'emploi
Biskra	Toute la partie aérienne	Rhumatisme-Douleurs stomacales – Défaillance de foie	Tisane
Khenchela	Feuilles	Maladies du cœur – Estomac – jaunisse	Infusion
Bouira	Feuilles	Douleurs stomacales	Infusion
Ain – Temouchent	Toute la partie aérienne	Asthénie – Cellulite – Frigidité – Migraine – Œdème – Surmenage – Dépression nerveuse – Entorse – Foie – Impuissance	Infusion Inhalation Massage Embrocation
Nâama	Rameaux et fleurs	Antispasmodique et antiseptique	Infusion et bain
El-bayadh	Feuilles	Insomnie – Fonction biliaire – Troubles intestinaux – Tonique pour le foie	Tisane

Mila	Feuilles	Antispasmodique et antiseptique – Plante fourragère – Mélangée au bain contre les peaux sensibles.	Infusion
Mascara	Feuille	Antispasmodique – Carminatif – Stomachique – Cholagogue – Emmenagogue – Cosmétique (parfums)	Extrait sec et liquide – Eau distillée – Sirop – Infusion – Collyre.
Médéa	Feuille	Douleurs rhumatismales – circulation du sang – Excitation de digestion – Relève le tonus des surmenés et des convalescents – Stimulation de la fonction biliaire – Effet tonifiant sur le foie – Inflammation de la fonction biliaire – Paresse d'estomac – Recherchée par les abeilles – Préparations antimaigrissantes - Cosmétique	Infusion Essence Teinture Sirop Extrait sec Extrait liquide Eau distillée Collyre
M'sila	Feuille	Toux – Conjonctivite – Graines consommées par les ovins – Appréciée par les abeilles	Infusion Collyre
Sétif	Feuilles et fleurs	Douleurs gastriques et coliques – Condimentaires	Infusion
Souk ahras	Feuilles	Estomac – Cuir chevelu	Infusion
Sidi Belabes	ND	Estomac – Grippe	ND
Oran	Feuilles	Antispasmodique et antirhumatisme	Infusion
Mostaganem	Feuilles	Rhumatisme	ND

ND : non déterminé

6. Toxicité

Aucune étude ne mentionne des effets secondaires lorsque les extraits de romarin sont utilisés aux doses thérapeutiques de prescription, cependant à forte dose une certaine toxicité peut être observée. A titre d'exemple, l'ingestion de doses élevées d'huile essentielle de romarin provoque des hémorragies gastriques, de l'albuminurie, une dégénérescence graisseuse du foie et du rein, occasionnellement des allergies de contact et peut aussi être fortement épiléptisante (Teuscher *et al.*, 2005). De plus, l'utilisation durant la grossesse ou

l'allaitement serait déconseillée. Toutefois en utilisation culinaire de quelques feuilles sont sans danger (**Baba Aissa, 2000**).

Chapitre II : Les extraits de plantes

La connaissance des huiles essentielles et autres extraits de plantes remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes. Il plongeait, dans un même récipient rempli d'eau, des plantes odorantes et des pierres brûlantes, la vapeur dégagée entraînait les molécules volatiles, puis le tout était recueilli à l'aide d'une peau d'animal dont l'essorage donnait quelques gouttes d'huile essentielle (**Robert, 2000**).

Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes se sont développés, notamment par les civilisations arabes et égyptiennes, qui leurs attribuent avant tout un usage religieux (**Sell, 2006**). Puis progressivement, ces huiles essentielles se sont fait connaître pour leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants des médecines traditionnelles. En guise d'exemple, à l'époque des grandes épidémies dans la Grèce Antique, les principes odorants de certaines plantes aromatiques étaient répandus par fumigation dans les rues des villes pour combattre la propagation des maladies infectieuses. La fumigation des personnes malades est en effet l'une des plus anciennes techniques thérapeutiques. Plus tard en France, il a été remarqué que les ouvriers parfumeurs et tanneurs, qui étaient en contact quotidiennement avec des huiles essentielles, résistaient de manière quasi-absolue aux épidémies de toutes sortes (**Vanier, 1994**).

Actuellement, l'usage des huiles est très large dans les domaines de la pharmacologie, la cosmétologie, l'agroalimentaire, et récemment l'agrophytosanitaire. De nos jours, les huiles essentielles et autres extraits de plantes et leurs propriétés thérapeutiques font l'objet de nombreuses recherches scientifiques.

Malgré l'usage courant de ce terme « huile essentielle », il est très difficile de lui attribuer une seule définition, car ses domaines d'applications sont tellement divers que l'on ne peut avoir une seule définition qui englobe et qui reflète toutes ses caractéristiques.

Selon **Conner (1993)**, « les huiles essentielles sont des produits odorants, volatils du métabolisme secondaire d'une plante aromatique, normalement formés dans des cellules spécialisées ou groupe de cellules ».

Selon la **Pharmacopée Européenne (1997)**, les huiles essentielles sont des produits de composition assez complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation.

D'après **Teuscher *et al.* (2005)**, les huiles essentielles sont des mélanges de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante.

Les huiles essentielles sont des composés aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation par la vapeur ou des solvants (**Smallfield, 2001**).

L'association française de normalisation **AFNOR 2000** définit l'huile essentielle comme: «Un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ». Cette définition est restrictive car elle exclut aussi bien les produits extraits à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé (gaz sous pression, enfleurage).

1. Les méthodes de préparation

L'étape de préparation de l'échantillon est au moins aussi fondamentale que celle de l'identification proprement dite des constituants (**Marriott *et al.*, 2001; Augusto *et al.*, 2003; MuñozOlivas 2004**).

Les méthodes de préparation des fractions volatiles, des huiles essentielles et des extraits aux solvants d'un végétal ont fait l'objet de nombreux articles et revues qui décrivent les potentialités et les limites des procédés mis en œuvre pour l'étude des métabolites secondaires issus de plantes ou de produits agroalimentaires (**Jimenez-Carmona *et al.*, 1999; Kataoka *et al.*, 2000; Sides *et al.*, 2000; Wilkes *et al.*, 2000; Lang et Wai, 2001; Augusto et Valente, 2002; Buldini *et al.*, 2002; Diaz-Maroto *et al.*, 2002; Pillonel *et al.*, 2002; Lucchesi *et al.*, 2004a; Mendiola *et al.*, 2007; Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007; Ridgway *et al.*, 2007**). Ainsi, les procédures de préparation des échantillons doivent être adaptées à la nature des constituants étudiés et à celle de la matrice support.

1.1. Préparation des huiles essentielles et extraits végétaux

1.1.1. 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 (**Willem, 2002**).

Le principe de cette méthode consiste à immerger la matière végétale à traiter dans un ballon avec de l'eau et quelques morceaux de pierre ponce pour assurer le brassage de la

solution. En chauffant, l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques, passant dans un réfrigérant, l'eau se condense. Elle est ensuite récupérée dans une ampoule à décanter où il est possible de distinguer deux phases: l'huile essentielle et l'hydrolat chargée d'espèces volatiles contenues dans la plante et ayant une densité plus élevée (**Bachelot *et al.*, 2006**).

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, et peut atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. Cette durée de distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'huile (**Lucchesi, 2005**).

1.1.2. Distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion ou entraînement à la vapeur d'eau

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats, le procédé de l'entraînement à la vapeur a été mis au point.

Cette méthode est similaire à la précédente sauf que la matière végétale ne macère pas directement dans l'eau. Elle consiste à introduire la masse végétale dans une colonne d'extraction à travers laquelle passe la vapeur. Cette dernière endommage la structure des cellules libère les particules d'huiles essentielles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant où elles seront condensées.

Les phénomènes intervenant lors de l'entraînement à la vapeur seraient des phénomènes d'osmose et de diffusion libre.

Cette méthode est supposée apporter une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques car la matière végétale ne baigne pas dans l'eau bouillante (**Franchomme et Péroël, 1990; Lucchesi, 2005**).

1.1.3. Expression ou pressage à froid

Cette technique est utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes de la famille des Rutacées (citron, orange, mandarine, ainsi que la bergamote qui est issue d'un greffon de citronnier et de bigaradier). C'est une méthode assez simple qui consiste à briser mécaniquement (abrasion, compression, incision, perforation, ...) les poches à essence (souvent au niveau de l'écorce ou péricarpe du fruit) pour recueillir un mélange d'essences odorantes et d'eau (**Richard, 1992; Werner, 2002**).

1.1.4. Extraction par solvant volatil

Certains organes de végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation. C'est le cas des

fleurs de jasmin, d'œillet, de tubéreuse, ...etc. Il faut donc, pour ces végétaux, recourir à d'autres méthodes d'extraction des composés odorants volatils comme celle utilisant des solvants (**Garnero, 1996**).

L'extraction par solvant volatil est utilisée pour les plantes fragiles qui sont plongées dans une préparation chimique provoquant la dissolution des substances aromatiques. Après séparation du solvant par distillation, on obtient un produit cireux qui doit être dissout dans l'alcool. Ce dernier est ensuite éliminé par évaporation. L'huile essentielle ainsi obtenue est dite «absolue» (**Lardry et Haberkorn, 2007**).

L'extraction à l'aide de solvants organiques pose un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutique et agro-alimentaire (**Bruneton, 1999**).

1.1.5. Extraction par solvant fixe

Les solvants utilisés sont principalement des matières grasses. L'extraction peut être effectuée à froid (enfleurage) ou à chaud (macération).

▪ L'enfleurage

L'enfleurage est une méthode ancienne utilisée uniquement pour les fleurs fragiles. Elle consiste à pratiquer une diffusion des composés odorants dans une masse de matière grasse. Cette dernière absorbant ainsi les molécules odorantes. On remplace régulièrement les fleurs pour gorger au maximum les graisses (on estime qu'un kilo de graisse absorbe trois kilos de fleurs). La graisse est ensuite lavée à l'alcool dans des batteuses, l'alcool s'évapore et on obtient ainsi une absolue de pommade (**Telphon, 2003**).

▪ Macération (digestion)

A l'inverse de l'enfleurage qui se fait à température ambiante, la macération utilise les mêmes graisses mais chaudes, ce qui a pour effet d'augmenter le pouvoir adsorbant.

Le principe est basé sur l'immersion des fleurs dans une graisse préalablement portée à une température comprise entre 50-70°C. La durée du contact varie de 12 à 48 heures et la charge de fleurs est constamment renouvelée jusqu'à ce que la graisse soit saturée de parfum. Puis le tout est filtré à travers plusieurs couches de tissu (lin et coton) afin de séparer la graisse inutile de la pommade. Cette pommade peut être utilisée telle quelle ou traitée par la même méthode que pour l'enfleurage à froid afin d'obtenir une absolue (**Telphon, 2003**).

1.1.6. Extraction au Soxhlet

L'appareillage Soxhlet, tel qu'utilisé dans notre étude (cf chapitre matériel et méthodes), permet l'extraction aux solvants « en continu » d'espèces chimiques contenues dans une matrice solide. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt. Par comparaison avec les macérations classiques, cette technique permet de réduire le temps d'extraction, d'une part, et requiert nettement moins de solvant et d'échantillon pour une efficacité d'extraction supérieure, d'autre part (**Luque de Castro et Priego-Capote, 2010; Bimakr *et al.*, 2011**). De par la diversité des familles chimiques pouvant être extraites, ce procédé offre de nombreuses applications dans le domaine de l'agroalimentaire (**Jadhav *et al.*, 2009**).

1.1.7. Extraction par l'appareil de Likens-Nickerson

Le mode d'extraction Likens-Nickerson (1964) est basé sur une utilisation combinée de l'hydrodistillation et de l'extraction aux solvants. Les composés volatils entraînés par la vapeur d'eau sont extraits par des vapeurs de solvant que l'on condense ensuite dans un réfrigérant. Le solvant est recyclé en continu (**Vermin, 1982**). Cette technique est généralement utilisée en agroalimentaire pour l'extraction des parfums et arômes contenus dans des échantillons solides (fruits, légumes, graines, etc.) (**Núñez *et al.*, 1984; Sinyinda et Gramshaw, 1998**) ou liquides (miels, vins, liqueurs, etc.) (**Bouseta et Collin, 1995; BoschFusté *et al.*, 2007**). Sur de telles matrices, elle permet d'obtenir des rendements d'extraction en volatils bien supérieurs à ceux de l'hydrodistillation (**Bosch-Fusté *et al.*, 2007**).

1.1.8. Extraction à l'eau surchauffée

Ce mode d'extraction utilise l'eau surchauffée sous pression entre 125 et 175°C. Il utilise l'eau désoxygénée qui traverse une cellule où se trouve la matière végétale. Cette cellule est maintenue à une pression d'environ 20 bars et à température constante dans une étuve. Ce procédé appliqué au romarin donne un rendement plus élevé en composés oxygénés que lors de l'entraînement à la vapeur (**Basil *et al.*, 1998**).

1.1.9. Extraction par le CO₂ à l'état supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO₂ supercritique qui possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles

des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression.

La matière végétale est chargée dans l'extracteur où est ensuite introduit le CO₂ supercritique sous pression et réfrigéré. Le mélange est ensuite recueilli dans un vase d'expansion où la pression est considérablement réduite. Le CO₂ s'évapore et il ne reste plus que l'huile essentielle (**Bachelot *et al.*, 2006**).

Avec les techniques d'extraction à la vapeur d'eau, cette méthode est l'une des rares technologies compatible avec le cahier des charges de l'agriculture biologique pour l'obtention des huiles essentielles. Contrairement aux solvants organiques, les fluides supercritiques présentent l'avantage de ne laisser aucun résidu dans l'extrait et dans la matière première. L'utilisation d'un gaz inerte, non toxique, insipide et inodore tel que le CO₂ permet une extraction à température ambiante (30°C), à l'abri de l'oxygène, minimisant les risques de dégradations thermiques et les risques d'oxydation. De plus, le fluide est recyclé à l'état gazeux en fin d'extraction, ce qui permet de concevoir des processus respectueux de l'environnement.

1.1.10. Extraction par micro-ondes

L'utilisation des fours à micro-ondes, avec ou sans solvant, a été appliquée à l'extraction des métabolites secondaires dans le milieu des années quatre-vingts (**Lane et Jenkins, 1984; Ganzler *et al.*, 1986**). Les micro-ondes interagissent simultanément et sélectivement par rotation dipolaire et conduction ionique avec les molécules présentes dans les tissus végétaux entraînant un échauffement localisé suivi d'une expansion puis d'une rupture des membranes cellulaires (**Ferhat *et al.*, 2007; Vian *et al.*, 2008**). D'une manière générale, par rapport aux modes d'extraction classiques, les avantages de cette méthode sont la rapidité et l'atténuation des risques d'altération thermique. Aujourd'hui, différentes techniques sont disponibles (**Stashenko *et al.*, 2004; Lucchesi, 2005**) notamment : - l'extraction assistée par micro-ondes (MAE : Microwave Assisted Extraction) (**Ganzler *et al.*, 1986; Paré *et al.*, 1990; Letellier *et al.*, 1999**) présentant un intérêt particulier pour l'extraction des composés non volatils et thermosensibles par des solvants de faible constante diélectrique ; - l'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide pulsé (VMHD : Vacuum Microwave HydroDistillation) (**Mengal et Mompon, 1996**) plus rapide que l'hydrodistillation pour un rendement similaire en composés volatils ; - l'extraction par micro-ondes sans ajout de solvants organiques (SFME : Solvant Free Microwave Extraction) (**Chemat *et al.*, 2004**) qui s'avère être une combinaison entre un chauffage par micro-ondes et une distillation à sec sous pression atmosphérique. Les

principaux avantages résident dans la faible durée d'extraction (15-30 minutes) et dans le caractère respectueux de l'environnement (pas de solvant, faible consommation d'eau) (**Lucchesi et al., 2004b**).

1.1.11. Extraction par ultra-sons

Le principe de l'extraction assistée par ultra-sons est analogue à celui d'une extraction aux solvants ; toutefois, les vibrations provoquées par les ultrasons permettent d'extraire plus rapidement les constituants. Selon **Lee et Lin (2007)**, qui ont comparé les rendements d'extraction aux ultrasons et aux solvants des isoflavones des racines de *Radix puerariae*, cette méthode permet d'obtenir de meilleurs rendements que les extractions classiques aux solvants (avec et sans pression) avec un temps d'extraction plus court et une consommation en énergie plus faible.

2. Les méthodes de séparation, d'identification et de quantification

La fraction volatile, les huiles essentielles et les extraits aux solvants d'un végétal sont des mélanges complexes constitués de dizaines, voire de centaines de molécules présentes à des concentrations parfois extrêmement faibles. La valorisation de ces mélanges passe obligatoirement par une étape de caractérisation de la composition chimique, ce qui nécessite des techniques analytiques fiables et efficaces (**Joulain, 1994**).

L'analyse d'un mélange complexe s'effectue classiquement par le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour la fraction légère et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour la fraction lourde, avec une technique d'identification spectrale, généralement la spectrométrie de masse (SM) (**Joulain, 1994; Marriott et al., 2001**). En routine, l'analyse se fait sur l'huile essentielle globale ou sur l'extrait brut.

2.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Actuellement, la méthode de dosage et d'identification, la plus couramment employée dans l'étude des huiles essentielles, fait appel à la chromatographie en phase gazeuse. Cette technique est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (**Arpino et al., 1995**). Elle permet l'identification (au moins en principe) des constituants et l'obtention d'une valeur approximative des concentrations respectives. Cette méthode permet également de séparer de faibles quantités des différents composants de l'huile essentielle.

Le principe de cette méthode est basé sur le partage de l'analyte entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte (**Skoog *et al.*, 2003**). Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé (**Tranchant *et al.*, 1995**).

La CPG associée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-DIF) permet une analyse semi-quantitative sur la base de l'aire de chaque pic chromatographique par rapport à l'aire totale des signaux et une analyse qualitative sur la base des temps de rétention. Ainsi, pour une colonne donnée, chaque composé est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) (**Kováts, 1965**) ou en programmation de température (indices de rétention) (**Van den Dool et Kratz, 1963**).

2.2. Chromatographie Liquide Haute-Performance (HPLC)

La chromatographie liquide haute-performance (CLHP) est une puissante technique de séparation utilisée pour l'identification, la quantification et/ou la purification (chromatographie semi-préparative ou préparative) des molécules telles que les composés phénoliques dans un mélange. L'extrait végétal est mis en solution dans la phase mobile (solvants) puis est injecté sous haute pression en tête de la colonne (tube en acier inoxydable contenant la phase stationnaire) (**Neue, 1997; Dong, 2006; Snyder *et al.*, 2009**). Il existe plusieurs types de phases stationnaires mettant en jeu des mécanismes de rétention variés : chromatographie d'adsorption, -de partage, - d'échange d'ions, -d'exclusion, etc.

La chromatographie de partage est la technique la plus couramment utilisée ; la phase stationnaire est typiquement composée de micro particules de silice greffée avec divers motifs organiques. Dans la plus part des cas, la phase mobile est polaire et aqueuse ; les temps de rétention diminuent avec la polarité des analytes (**Rosset *et al.*, 1991**) et peuvent être ajustés en utilisant un gradient d'élution combinant l'eau et un solvant organique (notamment le méthanol et l'acétonitrile) comme phase mobile. Cette dernière méthode s'est considérablement développée depuis les années 70 au détriment de la phase normale du fait d'une meilleure reproductibilité des temps de rétention. Ceux-ci, spécifiques de chaque

constituant, sont fortement dépendants de la nature de la phase stationnaire, de la composition de la phase mobile et des conditions opératoires (débit, pression et température).

A l'instar de la CPG, les molécules sont identifiées en sortie de colonne grâce à un détecteur spectrophotométrie ou spectrométrique ; il enregistre un signal qui est ensuite transformé par l'ordinateur en un chromatogramme (**Rosset *et al.*, 1991**).

L'association de la station de HPLC avec un détecteur à barrettes diode (Diode Array Detector, DAD) permet une analyse qualitative d'un mélange par l'enregistrement des spectres UV des constituants individualisés, d'une part et permet une analyse quantitative sur la base de l'aire de chaque pic chromatographique rapportée sur une courbe d'étalonnage externe, d'autre part.

2.3. Spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse est utilisée depuis de nombreuses années pour l'élucidation de la structure de composés organiques volatiles. C'est une technique très sensible et très rapide, elle est sans doute, parmi toutes les techniques analytiques, celle dont le domaine d'application est le plus étendu. En effet, elle peut fournir des informations concernant la composition élémentaire d'un échantillon : la structure de molécules inorganiques, organiques, la composition qualitative et quantitative de mélanges complexes, ... etc (**Skoog *et al.*, 2003**).

Vue sa capacité à identifier un très grand nombre de composés présents dans le mélange à analyser, elle représente le couplage le plus utilisé dans divers secteurs notamment avec la chromatographie phase gazeuse.

2.4. Chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS et CPG/SM)

Ces techniques permettent d'obtenir à la fois les temps de rétention des constituants volatils ou soluble (CPG/SM et HPLC/MS, respectivement) de l'échantillon pour un programme donné et leurs spectres de masse. Les systèmes modernes sont par ailleurs généralement pilotés par un logiciel, qui peut prendre en charge la comparaison automatique des spectres obtenus avec des bibliothèques de spectres contenant des informations sur des milliers de composés (**Richard et Multon, 1992**).

Le développement important de la spectrométrie de masse (SM) dans l'identification des constituants des huiles essentielles et des composés phénoliques est rendu possible grâce au couplage du CPG et de l'HPLC directement à la spectrométrie de masse.

Lors du couplage, la chromatographie permet dans un premier temps de séparer et d'isoler chacun des constituants du mélange qui est injecté séparément dans la chambre d'ionisation de la spectrométrie de masse (deuxième temps). Grâce à cette innovation importante, cette technique est devenue la plus sensible pour obtenir des données importantes sur la structure de composés organiques inconnus.

Le principe consiste à soumettre un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes (**Richard et Multon, 1992**) :

- **Ionisation** : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de départ.
- **Accélération** : les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.
- **Séparation** : les ions seront distribués suivant leur rapport masse /charge.
- **Détection** : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées.
- **Traitement du signal** : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse / charge.

2.5. La résonance magnétique nucléaire du carbone-13 (RMN)

La résonance magnétique nucléaire est un outil exceptionnel pour déterminer la structure d'une molécule naturelle ou synthétique. L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de fournir la possibilité d'identifier les connexions entre atomes des diverses entités, squelette, groupes fonctionnels et finalement de permettre de les situer dans l'espace les uns par rapport aux autres.

La RMN étant une technique non destructive, l'échantillon peut être récupéré pour être éventuellement soumis à d'autres analyses.

Les spectres sont réalisés à température ambiante, ce qui évite la dégradation ou la transformation éventuelle des molécules thermosensibles.

Enfin, l'étude de produits « lourds » ne pose pas de problèmes particuliers alors que leur faible volatilité rend souvent leur analyse difficile (**Cavalli, 2005**).

3. Composition chimique des huiles essentielles et des extraits végétaux

Sur le plan biologique, il est intéressant de constater que les molécules végétales ayant donné origine aux produits synthétiques, ou étant elles-mêmes des produits actifs de plantes médicinales, proviennent de diverses voies métaboliques. Ces molécules peuvent être soit communes à plusieurs organismes vivants, soit très spécifiques au niveau du métabolisme végétal. La base principale de ce métabolisme est la production par photosynthèse des hydrates de carbone de faible masse moléculaire, les «oses». C'est à partir de ces «oses» que le métabolisme végétal peut suivre deux voies: le métabolisme primaire, qui donne origine aux métabolites nécessaires à la survie de la plante (hydrates de carbones, lipides, protéines et acides nucléiques), et le métabolisme secondaire, qui donne naissance à une variété infinie de substances (Figure 02) dont les rôles dans la plante sont assez variés (**Santos, 1999**). Les métabolites secondaires sont surtout importants pour la survie individuelle du végétal et sa perpétuation dans l'écosystème. Ils peuvent, par exemple, lui servir de mécanisme d'attraction et/ou de défense. Toutefois, à l'image même de la grande biodiversité végétale, plusieurs de ces substances présentent différentes activités biologiques qui peuvent varier entre les familles de plantes ou entre les espèces de la même famille. Outre leurs fonctions pour les végétaux, un grand nombre de ces métabolites présentent des propriétés pharmacologiques extrêmement prometteuses, justifiant par là les grands efforts de recherche dirigés vers les substances médicinales dans les plantes (**Santos, 1999**).

Les métabolites secondaires peuvent être classifiés en prenant comme base soit leur structure chimique (par exemple, la présence d'anneaux ou sucre), soit leur composition (contenant ou non de l'azote), leur solubilité dans divers solvants ou encore la voie par laquelle ils sont synthétisés (ex.: dérivé de l'acétate par la voie de l'acide citrique). Une simple classification peut comprendre trois groupes principaux: les terpènes et stéroïdes, les polyphénols et les alcaloïdes (**Simoes et al., 1999**).

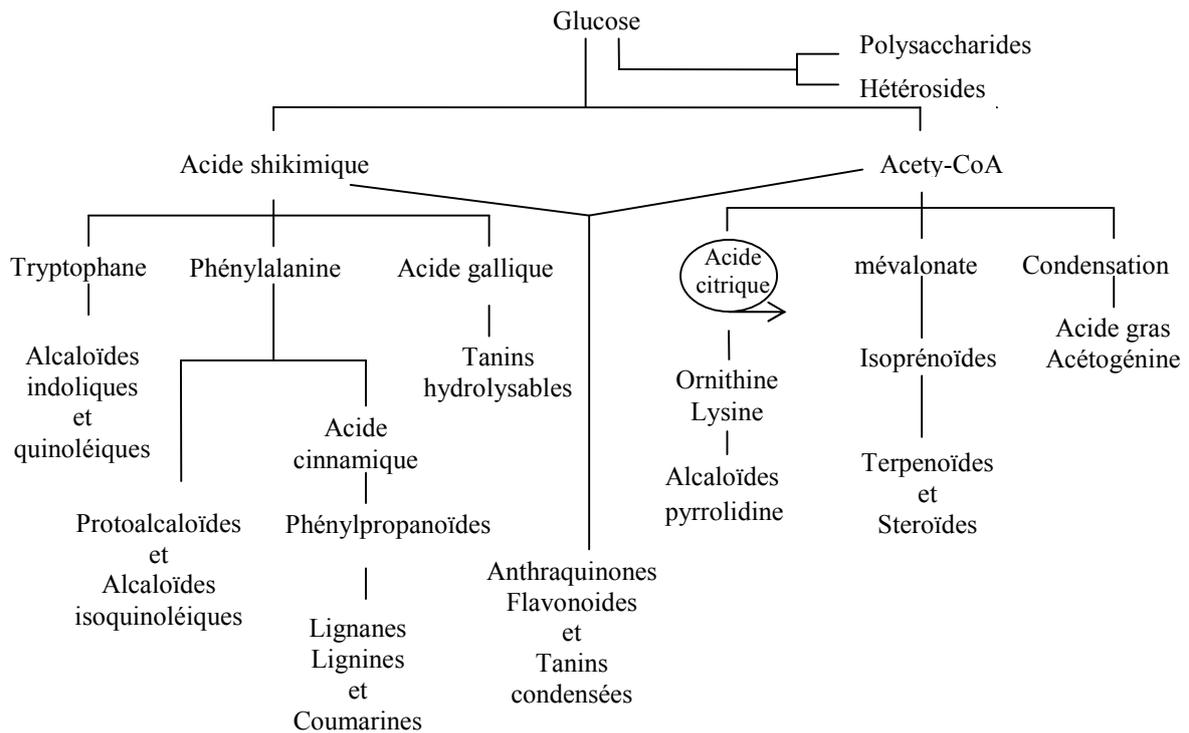


Figure 02 : Voies de Biosynthèse des substances originaires du métabolisme secondaire des végétaux. (Adaptée de Santos, 1999).

3.1. Les terpènes et stéroïdes

- Les composés terpéniques** sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Et ils sont formés du couplage de plusieurs unités isopréniques (C_5H_8), soit deux unités pour les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$) (myrcène, β -pinène, γ -terpinène, etc...) (Figure 03) et trois pour les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène, etc...) (Figure 04). Exceptionnellement, quelques diterpènes ($C_{20}H_{32}$) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles (Sharma *et al.*, 2003). Ces terpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques.

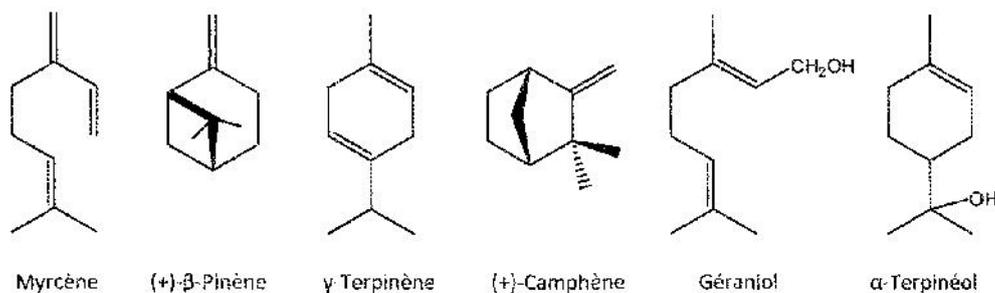


Figure 03 : Exemple de structure de composés monoterpéniques

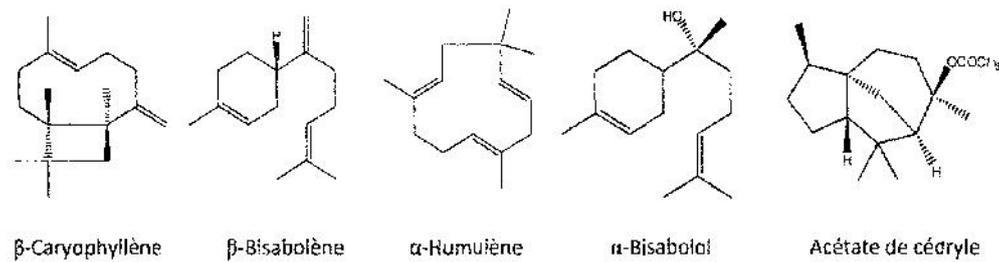


Figure 04 : Exemple de structure de composés sesquiterpéniques

- **Les stéroïdes** sont des métabolites dont la structure se compare à celle des triterpénoïdes. Une grande variété de ces substances est produite par les plantes et selon **Dinan *et al.* (2001)**, les stéroïdes peuvent être regroupés en trois catégories principales: 1) phéromones végétales (ex.: brassinostéroïdes); 2) substances allélochimiques homologues aux hormones trouvées chez les animaux vertébrés (ex.: androgènes, œstrogènes, progestagènes, corticoïdes et cholécalciférol); 3) substances allélochimiques ayant une action répulsive ou toxique spécifique aux plantes (ex.: cucurbitacines, cardénolides, etc.).

3.2. Les composés phénoliques ou polyphénols

Les composés phénoliques, qui sont des substances très recherchées par l'industrie feront l'objet d'une description plus détaillée dans le chapitre suivant. Les principales raisons de cette popularité sont leur propriété antioxydante, leur abondance dans les aliments et leur rôle probable dans la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif, telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires et dégénératives (**Middleton *et al.*, 2000**). Les composés phénoliques sont des molécules contenant plusieurs groupes hydroxyles dans un benzène de sorte qu'ils peuvent être classifiés en différents groupements en fonction du nombre de benzènes et des structures qui lient ces benzènes. Quatre groupes (eux-mêmes formés de sous-groupes) sont connus: les acides phénoliques (sous-groupes: phénols simples, acides-phénols dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique), les flavonoïdes (sous-groupes: isoflavonoïdes et anthocyanes), les stilbenes et les lignanes (sous-groupes: lignanes, lignines, tanins condensés) (**Manach *et al.*, 2004**).

3.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes (de l'arabe *al-qali*=nom de la plante d'où le soda a été isolé) constituent un groupe d'une diversité structurelle remarquable. Depuis le premier alcaloïde isolé, la morphine, en 1806 par Sertürner, plus de 12 000 alcaloïdes ont été décrits et environ 20% des plantes accumulent ces substances (**De Luca et St. Pierre, 2000**). Les alcaloïdes sont des composés azotés de faible poids moléculaire dérivés du métabolisme des acides aminés comme la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, la lysine et l'ornitine (**Kutchan, 1995**).

Dans la nature, on croit que les alcaloïdes servent à stocker l'azote, réguler la croissance et le métabolisme interne végétaux, désintoxiquer et transformer les substances nocives au végétal, ainsi qu'à protéger contre les rayons ultraviolets (**Henriques et al., 1999**). Comme produits utiles à l'homme, les alcaloïdes sont soit extraits des plantes, purifiés et utilisés sous forme thérapeutique (morphine, codéine, vincristine, vinblastine) soit simplement présents dans les aliments (caféine et théine) (**Kutchan, 1995; Henriques et al., 1999**).

4. Facteurs de variation de la composition chimique des extraits végétaux

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique d'une huile essentielle ou de toute autre extrait végétal. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol sont des facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'exercer des modifications chimiques. L'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le moment dans l'année sont ainsi des facteurs non négligeables. A titre d'exemple, Chez la *Mentha piperita*, les nuits froides favorisent la formation de menthol alors que les nuits tempérées favorisent celle du menthofuranne (**Bruneton, 1999**).

Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en composés produits. Les *Citrus* par exemple ont une teneur plus importante en huile essentielle lorsque la température est élevée (**Alvarez-Castellanos et al., 2003**).

Cependant, les changements les plus importants sont liés au procédé d'extraction sous l'influence des conditions opératoires ; notamment du milieu (pH, température) et de la durée d'extraction. Les traitements auxquels la matière végétale est soumise avant ou pendant l'extraction (broyage, dilacération, dégradation chimique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle (**Angioni et al., 2004**).

Des facteurs intrinsèques peuvent aussi influencer la composition chimique :

- l'organe utilisé pendant l'extraction : En effet la teneur en composés de certaines espèces varie selon l'organe utilisé. Ce facteur dépend également de la nature des

glandes sécrétrices ; les poches situées dans l'exocarpe ou dans l'endocarpe des fruits génèrent des essences qui diffèrent en monoterpènes et sesquiterpènes.

- Au cours du cycle végétatif, un autre facteur intervient. La biosynthèse des composés odorants évolue lors de la maturation de la plante. Elle est prédominante pendant les périodes de forte croissance ou au cours des activités métaboliques intenses, telle que la floraison et la maturation du fruit (**Yesil Celiktas et al., 2007 b; Hazzit et Baaliouamer, 2009**).

L'ensemble de ces facteurs influencent la composition chimique de l'huile avec des variations dans la concentration des molécules principales ont conduit à admettre l'existence de la notion de chémotypes ou races chimiques. En effet, au sein d'une même espèce végétale, la nature ainsi que la teneur en composés de divers individus peut présenter des profils chimiques ou chémotypes différents. L'exemple le plus marquant est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris*. Il existe en effet six chémotypes différents pour cette seule espèce. Ces différences sont au niveau de la nature du monoterpène majoritaire de l'huile essentielle qui peut être soit le géraniol, l' α -terpinéol, le thuyanol-4, le linalool, le carvacrol ou le thymol (**Thompson et al., 2003**).

Cette notion de chémotypes est fondamentale en aromathérapie car les indications thérapeutiques qui découlent de ces divers éléments chimiques spécifiques peuvent être très différentes étant donné que des chémotypes différents présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables.

5. Domaine d'utilisation

5.1. Industrie agroalimentaire

En industrie alimentaire, le consommateur cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure. Une technique pour réduire la prolifération des micro-organismes réside dans l'utilisation d'extraits végétaux (**Lachowicz et al. 1998**).

L'origan, le thym, la sauge, le romarin, les clous de girofle sont des plantes aromatiques fréquemment utilisées comme ingrédients alimentaires. Les huiles et extraits de ces plantes ont toutes une particularité commune: elles sont riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est reconnu comme étant l'un des composés non toxiques le plus actif de tous. Il est utilisé comme agent de conservation et aussi comme arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations (**Zambonelli et al., 2004**).

Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles de romarin, thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires (**Bilgrami et al., 1992**).

5.2. Phytothérapie

Les huiles essentielles sont utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite et ainsi pour traiter certaines maladies internes et externes ; infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux (**Maruyama 2005**).

Plusieurs études ont, par exemple, mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (**Koh et al., 2002; Caldefie-Chézet et al., 2006**) et de son composé principal, l' α terpinéol (**Hart et al., 2000**).

Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation. Les huiles essentielles de thym et de romarin ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête, les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoires.

Le potentiel thérapeutique très varié des huiles essentielles a attiré, ces dernières années, l'attention de chercheurs quant à leur possible activité contre le cancer. De ce fait, les huiles essentielles et leurs constituants volatils font actuellement l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux (**Edris, 2007**).

5.3. Pharmacie

Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques (**Zambonelli et al., 2004**).

5.4. Cosmétique et parfumerie

L'utilisation d'extraits végétaux dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leurs activités antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable (**Vargas et al., 1999**). Elles sont utilisées aussi dans l'industrie des produits de beauté, parfums, articles de toilette et produits d'hygiène (**Porter, 2001**).

6. Toxicité

Les huiles essentielles et autres extraits végétaux ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels: "ce n'est pas parce que c'est naturel que

c'est sans danger pour l'organisme". Cet aspect des extraits de plantes est d'autant plus important que leur utilisation, surtout en ce qui concerne les huiles essentielles, tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques de plus en plus populaire telle que l'aromathérapie (Smith *et al.*, 2000).

6.1. Toxicité par voie orale

En règle générale, les extraits végétaux d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL_{50} supérieures à 5 g/Kg. cependant il existe des exception, tel que la sarriette et l'origan la toxicité est un peu plus élevée avec des DL_{50} autour de 1.4 g/Kg (donnée observée chez l'animal) (Bruneton, 1999).

En raison de leur caractère lipophile, les huiles essentielles présentent souvent un impact au niveau du système nerveux central (Teuscher *et al.*, 2005), les accidents graves, le plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importantes d'huile essentielle : girofle (eugénol), eucalyptus, gaulthérie (salicylate de méthyle) (Pibiri, 2005).

6.2. Toxicité sur cellules animales ou humaines

Certains extraits se révèlent cytotoxiques. Les huiles essentielles de thym et de lavande selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (la toxicité du thym est augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour la lavande), sont cytotoxiques pour des cellules de hamster chinois (Inouye, 2003). Par ailleurs, des extraits de différentes variétés d'origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaines dérivées de cancers (Sivropoulou *et al.*, 1996).

6.3. Toxicité dermique

Certains extraits sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (tel que ceux riches en thymol), allergène (tel que ceux riches en cinnamaldéhyde) (Smith *et al.*, 2000) ou phototoxique (tel que ceux des citrus contenant des furocoumarines) (Teuscher *et al.*, 2005).

Chapitre III : Les composés phénoliques

1. Généralités

Au vu regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels, les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, on trouve les polyphénols qui ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques sur la santé.

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules. Ce sont des métabolites dite secondaires, car elles n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction. Ils sont présents dans tous les organes de la plante (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

D'un point de vue structural, les polyphénols se caractérisent par la présence d'un noyau aromatique contenant un ou plusieurs substituants hydroxyles, incluant différents groupes fonctionnels dérivés (esters, glycosides, etc.) (**Bruneton, 2002**). Ces composés peuvent être divisés en 10 classes différentes au moins selon leur structure chimique de base. Le classement s'étend de molécules simples, telles que les acides phénoliques, aux composés fortement polymérisés, tels que les tannins (**Lugasi et al., 2003**). Ainsi, les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidines) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important du règne végétale (**Ren et al., 2003 ; Rodrego et Bosco, 2006**).

Au vu de leurs propriétés antioxydantes, mais aussi antibactériennes, antifongiques, antivirales, ..., démontrées *in vitro* et des résultats de diverses études épidémiologiques ayant établi une relation entre la consommation d'aliments contenant des polyphénols, et l'incidence sur certaines pathologies comme les affections cardiovasculaires, microbiennes, inflammatoires, ostéoporose et les cancers; on assiste ces dernière années à une augmentation très importante des études biologiques portant sur ces composés (**Ren et al., 2003**).

2. Les classes de composés phénoliques

Il existe de nombreuses classes de polyphénols : phloroglucinols, quinones, stilbénoides, coumarines, acides phénoliques, flavonoïdes, athocyanes, tannins,...ces structures peuvent

également être acylées, glycosylées, ce qui donne une grande variété de structures et de polarités. Leurs origines biosynthétiques sont proches, car tous dérivent de l'acide shikimique.

2.1. Phénols et acides phénoliques

Les phénols simples sont rares dans la nature (catéchol, phloroglucinol ...) (**Cheyrier, 2005**).

Les acides phénoliques sont tous des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (**Manach et al., 2004**). Deux classes d'acides phénoliques peuvent être distinguées: les dérivés de l'acide benzoïque (composés en C₆-C₁) tels que l'acide gallique élément constitutif des tanins hydrolysables ou les dérivés de l'acide cinnamique (composés en C₆-C₃) comme l'acide caféique qui sont souvent estérifiés (**Cheyrier, 2005**).

Ils sont incolores et se subdivisent en deux groupes : les acides benzoïques et les acides cinnamiques

- **Les acides benzoïques** : sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides *p*-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, syringiques, salicyliques et gentisiques.
- **Les acides cinnamiques** : Ces acides possèdent une structure du type C₆-C₃. Les composés les plus fréquents sont l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique, l'acide fertarique et l'acide sinapique (**Cheyrier, 2005**).

2.2. Les tannins

Les tannins sont des composés polyphénoliques que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, dattes, café, cacao...), ils sont solubles dans l'eau, avec des poids moléculaires très élevés (500-3000 Da) (**Cowan, 1999**).

Les tanins sont divisés en deux groupes :

- **Tannins hydrolysables**

Les tannins hydrolysables sont des esters de glucose, c'est-à-dire un noyau central de glucose sur lequel se fixent au moyen d'une liaison ester, des acides : acide gallique pour le groupe des gallotannins, l'acide hexahydroxydiphénique (ou ellagique) pour le groupe des ellagitannins. Leurs hydrolyses par des acides, des bases ou certains enzymes libèrent le glucose ainsi que les acides galliques ou phénoliques.

▪ Tannins condensés

Les tannins condensés sont des polymères de flavan-3-ols (appelés aussi catéchines) et de flavan-3,4-diols (appelés leucoanthoyanidines), ou un mélange des deux. Ils sont largement répandus dans l'alimentation humaine (fruits, légumes, thé, dattes, etc ...) (**Harzfeld *et al.*, 2002**).

2.3. Les anthocyanes

La structure de base des anthocyanes est caractérisée par un noyau « flavone » généralement glucosylé en position C-3. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment. On distingue entre autres cinq anthocyanidines: la cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine. Les anthocyanes jouent un rôle prépondérant dans la coloration du raisin rouge (**Middleton *et al.*, 2000**).

2.4. Les coumarines

Les coumarines sont dérivées des acides cinnamiques ortho-hydroxylés. Les coumarines les plus fréquentes sont l'umbelliférone ou ombelliférone, l'aesculétine, la scopolétine (**Bruneton, 2002**).

2.5. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Présentes dans tout le règne végétal, les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, présentent le même élément structural de base, à savoir quinze atomes de carbone constitués de deux cycles aromatiques (cycle A et cycle B) de 7 carbones chacun interconnecté par un autre cycle (cycle C) de 3 carbones (figure 05) (**Bruneton, 1999**).

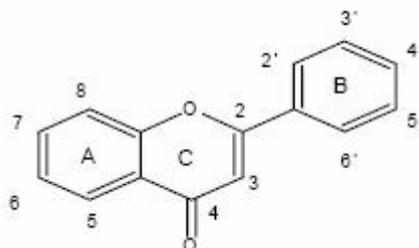


Figure 05 : Squelette de base des flavonoïdes

D'une manière générale, on trouve les flavonoïdes, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : dans les feuilles (dans l'épiderme ou entre l'épiderme et le mésophylle), dans les fleurs (cellules épidermiques) ou encore dans les fruits (tégument externe), racines et tiges (**Bruneton, 1999**). Au niveau cellulaire, les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux et leurs teneur est fortement influencée par des facteurs tels que la variation du type et la croissance, la saison, le climat, et le degré de maturité (**Lugasi et al., 2003**).

2.5.1. Biosynthèse et classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune dérivant de la voie de l'acide shikimique. Le précurseur de ces molécules est le 4-hydroxycinnamate coenzyme A synthétisé à partir de la phénylalanine. Ainsi, tous les flavonoïdes sont formés via un intermédiaire commun: la 2',4,4',6'- tétrahydroxychalcone. Ce précurseur dérive de la condensation de trois molécules d'acétylcoenzyme A, qui correspondront au cycle A, et d'une molécule de 4 hydroxycinnamatecoenzyme A, permettant la formation des cycles B et C. Ce mécanisme est catalysé par la chalcone synthase. La cyclisation de cette chalcone stéréospécifique par la chalcone isomérase forme la (S)-4', 5, 7-trihydroxyflavanone conduisant au squelette de base des flavonoïdes. Plusieurs enzymes (synthase, réductase, hydroxylase) contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïdes. Dans chaque classe de flavonoïde, les molécules sont ensuite diversifiées par hydroxylation (flavonoïde 3'-hydroxylase, flavonoïde 3',5'-hydroxylase), méthylation (O-méthyltransférase), glycosylation (rhamnosyl transférase, flavonoid glycosyl transférase), acylation (acyl-CoA transférase) ou polymérisation.

De ce fait, les flavonoïdes existent sous différentes classes et ceci en fonction du degré d'oxydation et d'insaturation du cycle C (figure 06) (**Forkmann et Martens, 2001**).

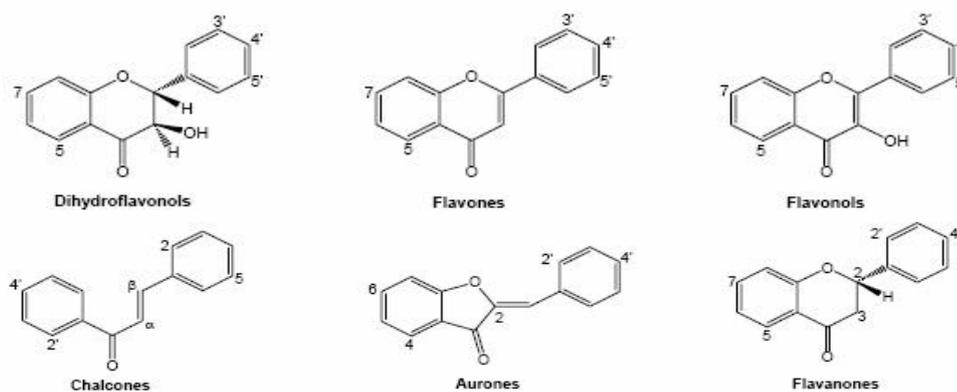


Figure 06: Différentes classes de flavonoïdes

2.5.2. Propriétés biologiques des flavonoïdes

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans différents domaines, où on leur reconnaît des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancéreuses.

▪ Propriétés antioxydantes

Les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces de nombreuses espèces oxydatives comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le radical peroxy (ROO^{\cdot}) ou encore l'oxygène singulet (1O_2) (Harborne and Williams 2000; Woodman *et al.*, 2005).

Ils sont aussi de puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique, ce qui est un élément important pour la protection des membranes cellulaires et qui complète les systèmes enzymatiques de défense cellulaire (Galvez *et al.*, 1995). De plus, ils pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer, inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases et activer les enzymes antioxydantes (Lin et Weng, 2006).

Les flavonoïdes auraient aussi la capacité d'interagir avec les radicaux libres empêchant ainsi la dégradation des antioxydants endogènes (Nègre-Salvayre et Salvayre, 1992).

L'ensemble de capacités antioxydantes des flavonoïdes sont reliées à différents facteurs qui sont : La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol), la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C, la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 (Aliaga et Lissi, 2004).

▪ Propriétés antimicrobiennes

Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase (Ohemeng *et al.*, 1993). Une étude a montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *staphylococcus aureus* (Sato *et al.*, 1995).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, il faut citer :

- l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes,
- la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer,
- l'inhibition du métabolisme microbien (Ultee *et al.*, 2000).

Harikrishna *et al.* (2004), ont démontré le pouvoir antimicrobien d'un flavonoïde glycoside " prunine-6"-O-p-coumarate" contre deux souches de bactéries gram+ (*Bacillus*

subtilis et *Staphylococcus albus*) et deux bactéries gram- (*Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*).

▪ Propriétés anti-inflammatoires et anticancéreux

De nombreux travaux montrent que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Read, 1995) et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Middleton, 1996). Ils sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Namgoong *et al.*, 1994).

L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) (Namgoong *et al.*, 1994). Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes (Middleton *et al.*, 2000).

Les flavonoïdes ont la capacité d'inactiver le t-PA (tissue-type plasminogen activator) en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones (Larocca *et al.*, 1994).

3. Activité biologique des composés phénoliques

Les principales activités biologiques, reconnues et recensées, des composés phénoliques sont résumées dans le tableau 03.

Tableau 03: Activités biologiques des composés polyphénoliques (Frankel *et al.*, 1995).

Polyphénols	Activités
Acides phénols (cinnamique et benzoïque)	Antibactériens Antifongiques Antioxydants
Coumarines	Vasoprotectrices et antioœdémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydants

Anthocyanes

Protection des veines et capillaires

Proanthocyanidines

Effets stabilisants sur le collagène

Antioxydants

Antitumorales

Antifongiques

Anti-inflammatoires

Tanins galliques et catéchiques

Antioxydants

Chapitre IV : Mécanismes oxydatifs et antioxydants

Au cours du métabolisme oxydatifs des organismes aérobies l'oxygène moléculaire peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces oxygénées réactives (EOR).

Ces radicaux libre sont des espèces, atomes ou molécules, contenant un électron célibataire (ou non apparié), ce qui le rend extrêmement réactif. Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron à partir d'un composé non radical (**Kocchilin-Ramonatxo, 2006**).

Aux doses excessives, ces espèces deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme. La surproduction des espèces oxygénées réactives au delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant (**Favier, 2003**). Ce stress se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre la production des espèces oxygénées réactives et les systèmes de défenses antioxydantes, en faveur des premières. Il est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement. Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver l'homéostasie cellulaire de l'organisme.

1. Principaux radicaux libres

Les principaux radicaux libres dérivés de l'oxygène sont les suivants :

- **L'anion-radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)**

Il est issu de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire souvent au niveau de la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale. Une telle réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial. Ce radical peut également se former lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase présente dans la membrane plasmique des phagocytes (**Cohen, 2002**).

- **Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)**

Le peroxyde d'hydrogène provient d'une réaction entre deux anions superoxyde. Il s'agit d'un oxydant beaucoup moins puissant, mais il peut néanmoins être considéré comme un dérivé réactif de l'oxygène potentiellement toxique car sa faible réactivité associée à sa capacité de traverser les membranes biologiques, fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son

lieu de synthèse, il peut alors participer à la biosynthèse du radical hydroxyle (**Cash et al., 2007**).

- **Le radical hydroxyle (OH^\bullet)**

C'est le produit de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec des ions métalliques comme par exemple le Fe^{2+} (réaction de Fenton). C'est l'espèce chimique la plus réactive et par conséquent joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique (**Cohen, 2002**).

- **L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)**

C'est une forme excitée de l'oxygène. Il est formé par action de la lumière, photosensibilisateur sur l'oxygène. Il est à l'origine du vieillissement cutané, de la cataracte et certains cancers de la peau (**Cohen, 2002**).

2. Principales cibles radicalaires

Les espèces réactives de l'oxygène induisent des dommages oxydatifs souvent irréversibles au niveau d'un grand nombre de substrats biologiques (protéines, lipides, ADN).

- **Les protéines**

Les acides aminés des protéines sont la cible des espèces réactives de l'oxygène, soit au niveau de leur chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydations, soit au niveau de la liaison peptidique, entraînant la fragmentation de la chaîne (**Berlett et Stadtman, 1997**). Même si la majorité des acides aminés peuvent être oxydés par ces espèces, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles.

L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements, leurs antigénicités et leurs activités (**Lehucher-Michel et al., 2001 ; Valko et al., 2007**). Les protéines modifiées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome (**Jung et al., 2007**).

- **Les acides nucléiques**

Les modifications induites par des processus oxydatifs dans le matériel génétique appartiennent à quatre catégories : modification des bases (possibilité de dimérisation), cassure simple et doubles de la chaîne d'ADN, sites abasiques et pontage avec des protéines. Ces lésions sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques (léthalité cellulaire,

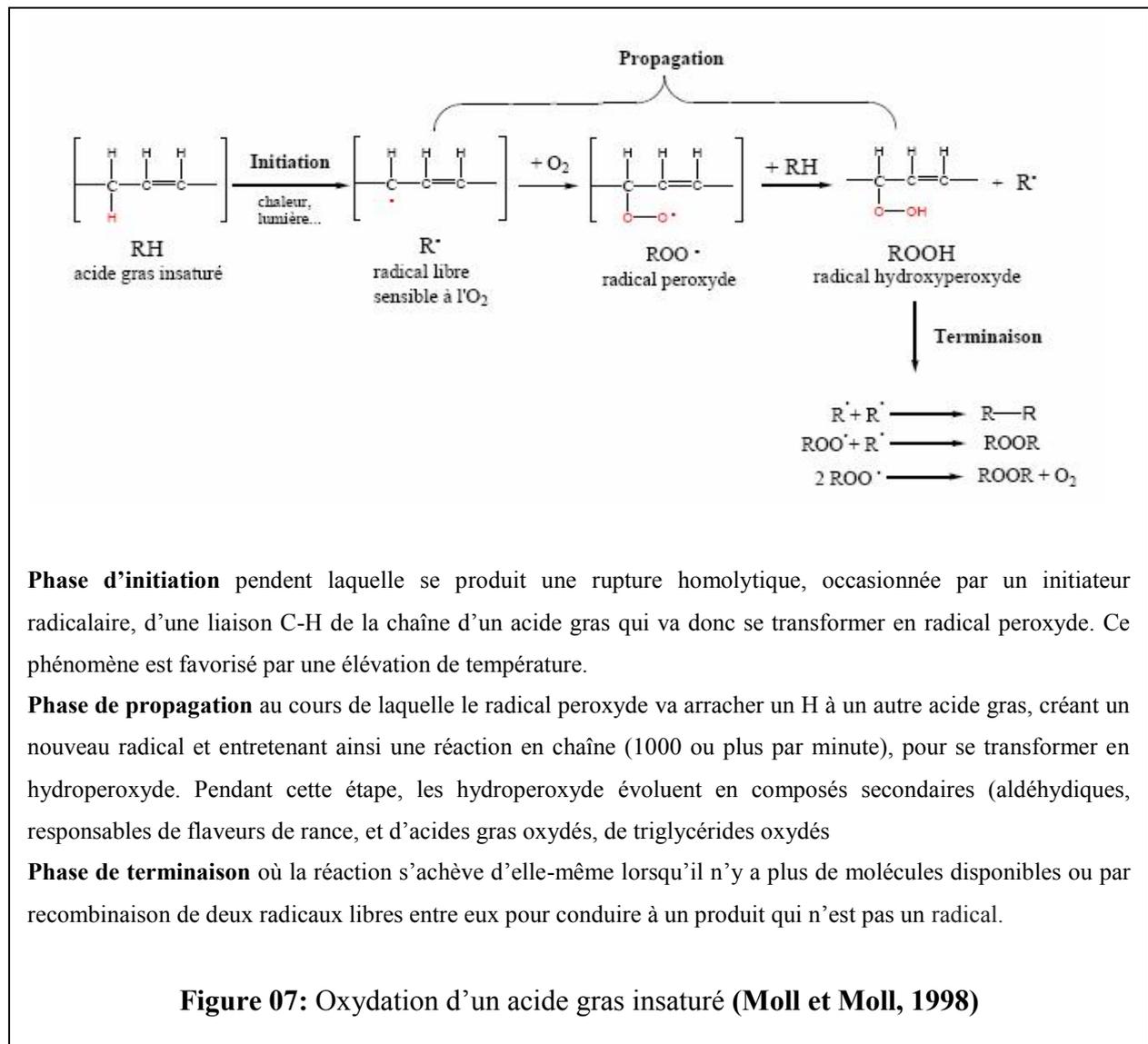
mutagenèse, cancérogenèse) et dans le vieillissement cellulaire. Dans la cellule l'ADN est en interaction avec de nombreuses protéines. Ces interactions sont non covalentes et réversibles. La formation de pontages covalents entre l'ADN et les protéines peut modifier l'expression des gènes et avoir ainsi de lourdes conséquences biologiques pour la cellule (**Hochberg *et al.*, 2006**).

- **Les lipides**

Comme toutes les molécules organiques, les lipides sont sensibles à un ensemble de réactions de dégradation, notamment oxydative, et ce d'autant plus qu'ils contiennent beaucoup de doubles liaisons.

Les phénomènes d'oxydation des lipides est l'un des phénomène le plus redouté par l'industrie agroalimentaire pour la maîtrise de la conservation des aliments, car les dégradations oxydantes des lipide conduisent à une perte en vitamines, une diminution de la valeur nutritionnelle (acides gras essentiels), une détérioration du goût (composés volatils à flaveur caractéristique, rancissement) et même parfois à l'apparition de substances toxiques (aldéhydes, hydrocarbures, cétones,...) (**Pokorny *et al.*, 2000**).

L'oxydation des lipides ou peroxydation lipidique (figure 07) résulte de l'action directe de l'oxygène sur les acides gras et survient dans les huiles alimentaires comme dans les tissus biologiques *in vivo*. Il est important de noter que les acides gras polyinsaturés, s'ils sont aujourd'hui unanimement considérés comme meilleurs pour la santé (cas des $\omega 3$ et 6), sont également les plus sensibles à l'oxydation. En outre, les isomères cis s'oxydent plus facilement que les trans ; les doubles liaisons conjuguées sont plus réactives (**Croguennec *et al.*, 2006**).



3. Les antioxydants

Un antioxydant est défini comme étant toute substance présente en faible concentration par rapport à un substrat oxydable et qui est capable de ralentir ou inhiber l'oxydation de ce substrat (Favier, 2003). Ce sont des substances intervenant dans les processus d'oxydation des produits alimentaires dans le but d'empêcher ou de freiner l'action de l'oxygène moléculaire (Moll et Moll, 1998).

Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, et aussi de petites molécules hydro ou liposolubles.

3.1. Le mécanisme d'action des antioxydants

Le processus d'oxydation est de type radicalaire : les antioxydants vont intervenir comme "capteurs" de radicaux libres. En effet certains antioxydants de type phénolique réagissent selon un mécanisme proposé dès 1976 par **Sherwin** décrit comme suit : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de protons, pour donner un intermédiaire radical stabilisé par ses structures mésomères conjuguées (figure 08).

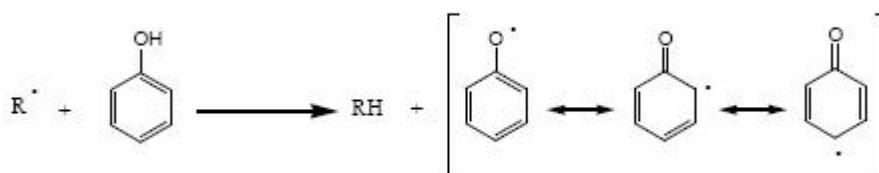


Figure 08: Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques

3.2. Les différents types d'antioxydants

3.2.1. Les antioxydants naturels

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont pour la plupart des composés polyphénoliques, parmi ces composés, les plus importants sont les flavonoïdes, les tocophérols et les acides phénoliques (**Pokorny et al., 2000**).

- **Les caroténoïdes**

Les caroténoïdes, pigments rouges (lycopène de la tomate), oranges (β -carotène des carottes) ou jaune (lutéine et zéaxanthine du maïs) d'origine végétale, sont particulièrement efficaces dans la neutralisation de l'oxygène singulet et joue le rôle de bouclier contre la photoinitiation de réactions radicalaires par les rayonnements UV. Le β -carotène (provitamine A), diffusant mieux que les tocophérols dans les lipides, protège les graisses profondes (**Cohen, 2002**).

- **Vitamine C (acide ascorbique)**

La vitamine C est un micronutriment qui n'est pas synthétisé par l'organisme humain et doit être apporté dans les aliments, on le trouve en grande quantité dans les agrumes, le kiwi, le persil.

Selon le pH et la présence de métaux de transition, la vitamine C peut prendre une forme réduite ou oxydée. Le passage de l'une à l'autre se fait par l'intermédiaire d'un radical libre, radical ascorbyle, et en présence de glutathion/glutathion-réductase. La vitamine C forme donc un couple redox avec une forme intermédiaire radicalaire capable de capter l'oxygène singulet et certaines espèces radicalaires (**Pokorny et al., 2000**).

- **Vitamine E (α -tocophérol)**

C'est une molécule liposoluble protège les graisses circulantes contre l'oxydation, ce qui constitue la première défense contre l'athérosclérose et en fait un protecteur cardiovasculaire. Elle limite également la formation d'aldéhydes génotoxiques. Elle est présente dans les huiles végétales tels que l'huile de colza ainsi que les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs, et les légumes à feuilles vertes (**Cohen, 2002**).

- **Les huiles essentielles**

Les huiles essentielles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, romarin, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants (**Edris, 2007**). Le thymol et le carvacrol sont encore une fois les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes (**Braga et al., 2006**).

- **Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques regroupent une grande variété de composés comprenant entre autre les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins qui peuvent agir comme des antioxydants par piégeage des radicaux libres.

Parmi les extraits naturels qui sont susceptibles d'être utilisés industriellement, les extraits de romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) possèdent une activité antioxydante caractérisée par la capacité à inhiber les radicaux libres (**Vareltzis et al., 1997**). Les molécules responsables de cette activité sont des molécules phénoliques et les acides carnosique, romarinique et carnosol.

3.2.2. Les antioxydants de synthèse

Les antioxydants de synthèse habituellement utilisés sont les composés phénoliques comme le Butyl Hydroxy Anisole (BHA), Butyl Hydroxy Toluène (BHT) et le Ter-Butyl-Hydroxy-Quinone (TBHQ), et les esters de l'acide gallique.

3.2.3. Les enzymes comme antioxydants

Ce sont des enzymes qui participent à la neutralisation excédentaire en radicaux libres tel l'enzyme superoxyde dismutase (SOD), le glutathion peroxydase, certaines protéines de transport comme la ferritine et la ceruloplasmine.

4. Mesure de l'état d'oxydation et du pouvoir antioxydant

De nombreuses méthodes analytiques sont employées dans les tests d'évaluation de l'efficacité des antioxydants ; on distingue :

- Ceux utilisés dans l'évaluation de la peroxydation des lipides et dans lesquels le substrat utilisé est un lipide ou une lipoprotéine sous des conditions standard et où l'inhibition de l'oxydation est mesurée (**Sanchez-Moreno, 2002**).
- Ceux utilisés dans la mesure du pouvoir de piégeage des radicaux libres.

On rencontre parfois aussi, des tests de mesure des pouvoirs chélateur et réducteur de métaux qui sont des initiateurs de l'oxydation lipidique.

4.1. Analyse sensorielle

L'évaluation sensorielle est souvent considérée comme une bonne méthode d'évaluation d'oxydation des produits. En général, une élévation du niveau de l'oxydation se traduit par une modification de l'odeur ou de l'arôme du produit. De nouvelles notes odorantes apparaissent parmi lesquelles les odeurs qualifiées de rance (**Jacobsen, 1999**).

4.2. L'indice de peroxyde : la méthode AFNOR T60-220 consiste à réduire les peroxydes à l'aide de l'iodure de potassium, qui s'oxyde lui-même en iode que l'on détermine.

4.3. Le test de SWIFT ou AOM (*active oxygen method*) : est un test accéléré qui consiste à faire barboter de l'air dans la matière grasse à 98 °C. On détermine ensuite l'indice de peroxyde.

4.4. L'indice TBA – IUPAC 2.531 : le test de l'acide thiobarbiturique est l'un des plus utilisés Cet acide réagit avec les produits de l'oxydation en donnant un pigment qui absorbe à 532 nm.

4.5. L'indice de p-anisidine (IpA) – IUPAC 2.504 : les composés aldéhydiques α -insaturés oxydés réagissent avec la p-anisidine pour former un complexe coloré qui absorbe à 530 nm ; ce test est souvent associé à l'indice de peroxyde.

4.6. Le RANCIMAT : ce test consiste à mesurer la dégradation d'un corps gras face à une auto oxydation accélérée, dans un appareil automatisé qui chauffe les solutions à 100°C avec

un apport d'air constant de 20 L.h⁻¹. Cet appareil détecte les composés volatils libérés, indiquant indirectement le degré d'oxydation des huiles.

4.7. Mesure des pouvoirs chélateur et réducteur

Les principaux métaux de transition présents au sein des tissus biologiques sont le fer et le cuivre. Ces derniers catalysent l'oxydation des lipides par des voies enzymatiques et non enzymatiques. Ainsi, parmi les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante on rencontre la mesure des pouvoirs chélateur et réducteur des métaux.

4.8. Mesure du pouvoir de piégeage des radicaux libres

Le piégeage des radicaux libres est le mécanisme d'action principal des antioxydants dans les aliments.

Différentes méthodes ont été développées avec lesquelles l'activité antioxydante est évaluée par le piégeage des radicaux libres synthétiques dans un solvant organique polaire. Ces radicaux incluent le radical 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl DPPH et le radical cation 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) ABTS.

Chapitre V : Activité antimicrobienne

Il a fallu attendre la fin de XIX siècle et le début du XX siècle pour voir la confirmation scientifique de l'activité bactérienne des huiles essentielles et des extraits dont les vertus antiseptiques sont empiriquement connues et utilisées en médecine traditionnelle depuis l'antiquité (**Hala et al., 2000**). A titre d'exemple Gatte Fosse avait déjà montré en 1919 que le bacille de Koch pouvait être détruit en 5 minutes par une émulsion à 1% d'huile de pin.

Une fois cet effet antimicrobien prouvé scientifiquement, l'engouement pour les huiles essentielles et les extraits n'a cessé de croître jusqu'à devenir depuis une vingtaine d'années une alternative à la médecine des antibiotiques aux pathologies infectieuses. Cette médecine dite alternative n'a pas été le seul domaine d'application puisque divers procédés industriels ont mis aussi en application ces propriétés. Il s'agit par exemple d'une utilisation pour la conservation des produits alimentaires ou encore le traitement de l'air ambiant à l'intérieur des bâtiments (**Pibiri, 2005**).

1. Activités bactéricide et bactériostatique

Comme cela est le cas pour les agents chimiques on distingue, pour les huiles essentielles et les extraits, deux sortes d'effets ; un effet bactéricide c'est-à-dire létal et un effet inhibiteur de croissance mais non létal dit bactériostatique.

1.1. Grandeurs de mesure

L'efficacité de l'huile essentielle testée est évaluée par la mesure de deux concentrations CMI et CMB.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice: concentration minimale d'agent antimicrobien qui inhibe la croissance bactérienne, après incubation en conditions standards, par comparaison avec un contrôle de croissance ne contenant pas l'agent testé. Les microorganismes restent cependant viables (**Klaric et al., 2006**).

CMB: Concentration Minimale Bactéricide : concentration minimale d'agent antimicrobien nécessaire pour détruire l'inoculum initial après incubation en conditions standards. Les microorganismes ne sont plus viables. La CMB est aussi connue sous le nom de CML : Concentration Minimale Létale (**Pfaller et al., 2004**).

La CMI et la CMB sont aussi utilisées lors d'études sur les effets antifongiques (**Pinto et al., 2006 ; Klaric et al., 2006**).

Ces deux concentrations peuvent être exprimées en $\mu\text{g/ml}$ ou en $\mu\text{l/ml}$ ou encore en % (vol/vol).

De façon générale, ces grandeurs sont utilisées pour évaluer la résistance des microorganismes à un agent antimicrobien, ou encore pour évaluer *in vitro* l'efficacité d'un nouveau produit désinfectant.

1.2. Exemples d'activités

On estime souvent l'activité des huiles essentielles et des extraits à une activité bactériostatique, cependant plusieurs études ont montré que certains constituants chimiques de ces huiles et/ou extraits ont des propriétés bactéricides (**Lambert *et al.*, 2001 ; Walsh *et al.*, 2003**) et fongicide (**Hammer *et al.*, 2003**).

L'effet microbicide de certaines huiles essentielles et extraits a même été trouvé supérieur à celui des antibiotiques (**Valnet *et al.*, 1978**) et ont, de plus, un champ d'action très large. Plusieurs travaux montrent que les huiles essentielles et leurs composés majoritaires ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (**Lis-Balchin, 2000 ; Karaman *et al.*, 2001 ; Lis-Balchin, 2001**).

Juven *et al.* (1994) ont obtenu une diminution importante des cellules vivantes de *Salmonella thyphimirum* en les traitants par l'huile de thym et ses constituants actifs.

Une étude sur les actions de l'huile essentielle de l'arbre à the (*Melaleuca alternifolia* ou Tee tree oil= TTO) a montré une sensibilité importante des bactéries telles que *Echerichia coli*, *Staphylocoques aureus*, *Bacillus cereus* à des concentrations inférieures à 1% (CMI <1%, CMB < 1%) (**Carson *et al.*, 2006**).

Ultée *et al.* (1995) ; Ultée *et al.* (2000) ont montré l'effet bactéricide du carvacrol sur *Bacillus cereus* dans les aliments. **Didry *et al.* (1993)** ont prouvé l'effet antimicrobien du thymol et du carvacrol, utilisé individuellement ou en combinaison sur des germes d'infections respiratoires.

Une revue des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) pour 4 variétés de Thym portant sur 14 souches bactériennes (dont *Staphylococcus aureus*) a montré que dans la majorité des expériences, les valeurs des CMI sont identiques aux CMB. Ceci indique que les huiles essentielles incriminées sont bactéricides (**Cosentino *et al.*, 1999**).

1.3. Souches bactériennes

La sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'une huile essentielle ou d'un extrait donné peut être biocide, biostatique, ou bien sans aucun effet selon la nature du germe testé

(Hermal, 1993). C'est pour cela qu'il est important de mentionner la dénomination complète du germe de manière précise ainsi que l'espèce botanique et chémotype d'essence végétale utilisée (Pibiri, 2005).

D'une façon générale, il est possible que les bactéries à Gram négatif soient plus résistantes aux huiles essentielles. Ces résultats sont confirmés par de nombreuses expériences (Burt, 2004).

1.4. Association d'huiles essentielles ou d'extraits

Comme pour les antibiotiques, les interactions lors d'associations définissent quatre types d'actions :

- **Indifférence** : l'activité d'une huile essentielle n'est pas affectée par l'autre.
- **Addition** : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.
- **Synergie** : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration.
- **Antagonisme** : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des huiles essentielles. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque huile essentielle prise séparément.

Quelques exemples

- Bactéries à Gram positif : des associations d'huiles essentielles de Cannelle et de Thym sont synergiques ou indifférentes sur *Staphylococcus aureus*. En revanche elles sont indifférentes sur le genre *Bacillus* (Hermal, 1993).
- Bactéries à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* : des associations ne sont pas plus efficaces que les huiles essentielles pures et sont souvent indifférentes. En revanche une prédominance de Cannelle est plus efficace que celle de Thym, contrairement aux bactéries à Gram positif (Hermal, 1993).

2. Activités fongicide et sporocide

Tout autant que l'effet bactéricide ou bactériostatique, diverses études portant sur des huiles essentielles ou d'extraits démontrent des activités antifongiques inhibitrices ou carrément fongicides. On note par exemple que l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) sous forme gazeuse présente une activité antifongique sur *Aspergillus*, *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Trichoderma* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp ... (Klaric et al., 2006).

Les résultats de l'étude de **Su *et al.* (2006)**, obtenus pour les champignons présents naturellement dans l'air sont identiques à ceux obtenus pour les bactéries. La concentration en champignons dans l'air diminue seulement pendant les 30 à 60 premières minutes d'évaporation des huiles. De même que l'effet antibactérien, l'effet antifongique est donc limité dans le temps.

De plus, un effet suppresseur du développement d'organe de fructification et de sporulation (sporocide) est observé à l'égard de plusieurs souches fongiques tel que *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. au contact d'huile essentielle de *thymus vulgaris* (**Klaric *et al.*, 2006**).

3. Composition chimique et activité

Les activités bactéricides des huiles essentielles et des extraits dépendent directement de la nature des groupes fonctionnels portés par les composés majoritaires et à la proportion de ces différents composés (**Pibiri, 2005**). Autrement dit l'activité d'une huile essentielle ou d'un extrait se réduit le plus souvent à l'activité de ses composés majoritaires. Il est cependant probable que des composés minoritaires agissent de façon synergique de manière à ce que la valeur antibactérienne résulte de l'intégralité des composés (**Lahlou, 2004**).

Les molécules réputées à forte activité antimicrobienne sont, pour la plus grande part, des terpenoïdes (**Griffin *et al.*, 1999**).

L'effet des terpenoïdes sur la membrane bactérienne isolée suggère que leurs activités est fonction de leurs propriétés lipophiles, de leurs solubilités en phase aqueuse ainsi que de leurs stéréochimie (**Dorman et Deans., 2000**).

Les composés tels que les phénols (thymol, carvacrol, eugénol), les alcools (α -terpineol, terpinen-4-ol, linalool), les aldehydes, les cétones, et plus rarement les terpènes sont considérés comme les composés les plus efficaces et à plus large spectre (**Cosentino *et al.*, 1999 ; Dorman et Deans., 2000**).

Il est actuellement admis que l'activité antimicrobienne des principaux composés d'huile essentielle et des extraits se classe dans l'ordre décroissant suivant la nature de leurs composés majoritaires : Phénol > alcool > aldéhyde > cétone > oxyde > hydrocarbures > esters. L'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable (**Tantaoui-Elaraki *et al.*, 1993**).

- Les **alcools** sont bactériostatiques ; ils agissent en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation (**Dorman et Deans, 2000**).

- Les **aldéhydes** sont de puissants agents antimicrobiens ; un groupe aldéhydique conjugué à une double liaison est fortement électronégatif. Les composés électronégatifs peuvent induire des réactions de transfert d'électrons et réagir avec des composés nitrés vitaux pour la bactérie : protéines et acides nucléiques (**Franchomme et Pénéol, 1990; Dorman et Deans, 2000**).
- Les **phénols** sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Parmi les phénols les plus étudiés on peut citer le **thymol** et l'**eugénol** responsables de l'activité fongicide (**Bennis et al., 2004**) et bactéricide des huiles essentielles qui en contiennent (**Cox et al., 2000 ; Lambert et al., 2001; Walsh et al., 2003**). La molécule de thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches, dont *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium. En revanche elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa* (**Walsh et al., 2003**). Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces (**Cosentino et al., 1999**).

Cependant ces composés ne sont pas les seuls responsables de l'intégralité de l'activité ; le carvacol , le *p*-cymene, le γ -terpinene et le 1-8 cineole montrent une activité antifongique moindre que le thymol à l'égard d'*Aspergillus* spp. et de *Penicillium* spp. (**Klaric et al., 2006**).

4. Mode d'action

Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'action des huiles essentielles et des extraits varie en fonction de leurs constituants majoritaires. Le mode d'action est donc principalement lié au profil chimique de ces constituants (**Harkenthal et al., 1999 ; Cox et al., 2000**).

La majorité des travaux cités dans les publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne mais étant donné la complexité de composition chimique de l'ensemble des extraits de plantes, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des huiles essentielles ait son propre mécanisme d'action.

Les quelques investigations menées par différents auteurs peuvent résumer, de manière schématique, le mode d'action des constituants d'huile essentielle ou d'extrait en trois grande catégories :

- Attaque des parois cellulaires bactériennes et membranes cytoplasmiques grâce à leurs hautes propriétés de diffusion qui provoquent une désorganisation des échanges

transmembranaires créant une augmentation de la perméabilité et à terme la perte des constituants cellulaires (**Boochird et Flegel, 1982**).

- Une acidification du milieu qui provoque une réduction du potentiel membranaire entraînant une diminution de l'ATP intracellulaire et du flux de potassium.
- Une destruction du matériel génétique qui serait due à l'affinité des composés de certaines huiles essentielles et extraits pour les groupements SH impliqués dans la division cellulaire (**Ultée *et al.*, 1999**).

PARTIE II
ETUDE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE VI
MATÉRIEL ET MÉTHODES

Chapitre VI : Matériel et méthodes

1. Matière végétale

Le matériel végétal est constitué de cinq écotypes de *Rosmarinus officinalis*, et de cinq écotypes de *Rosmarinus tournefortii* collectés durant le printemps dans différentes régions d'Algérie (tableau 04). L'authentification de la plante et de l'espèce a été réalisée au département de botanique de l'ENSA par comparaison avec les spécimens de l'herbier et la confirmation des professeurs du département.

Tableau 04: Caractéristiques de chaque région

Région	Secteur*	Coordonnées		Altitude (m)	Bioclimat/ Pluviométrie*	Espèce de romarin
ENSA	Littoral centre	36°43'N	3°08'E	48	Sub-humide 600 à 800mm/an	<i>R. officinalis</i> (C)
Tablat	Atlas Tellien	36°24'N	3°19'E	450	Sub-humide et humide 500 à 850mm/an	<i>R. officinalis</i> (S)
Beni yenni	Numidien	36°39'N	4°24'E	835	Sub-humide à humide >700mm/an	<i>R. officinalis</i> (S)
Cherchell	Littoral centre	36°32'N	2°10'E	460	Sub-humide 600à 800mm/an	<i>R. officinalis</i> (S)
Mostaganem	Littoral ouest	36°00'N	0°08'E	219	Sub-humide 600 à 800mm/an	<i>R. officinalis</i> (S) <i>R. tournefortii</i> (S)
Bouira	Atlas Tellien	36°17'N	3°59'E	584	Sub-humide et humide/ 500 à 850mm	<i>R. tournefortii</i> (S)
Djelfa	Atlas saharien central	34°41'N	3°13'E	1143	Sub-aride 250 à 300mm/an	<i>R. tournefortii</i> (S)
Bechar	saharien	31°37'N	2°12'W	804	Saharien <100mm/an	<i>R. tournefortii</i> (S)
M'sila	Atlas saharien central	35°40'N	2°12'E	457	Sub-aride 250 à 300mm/an	<i>R. tournefortii</i> (S)

*Tel que défini par l'Institut National de la Recherche Forestière d'Algérie (2011).

C, Cultivé; S, Spontané

2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles des différents romarins a été effectuée par hydrodistillation grâce à un dispositif de type Clevenger (figure 09) au niveau du laboratoire de chimie de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

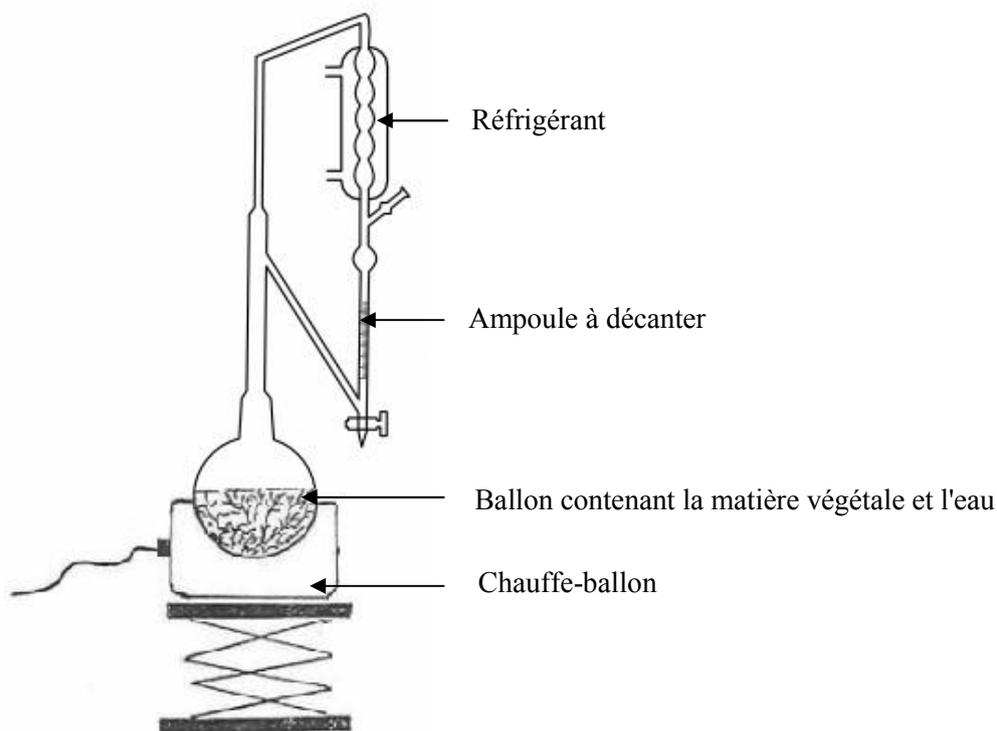


Figure 09: Schéma du dispositif de type Clevenger

2.1. Protocole d'extraction

Le procédé consiste à immerger la matière végétale (100g) dans un bain d'eau (ballon de 2 litres rempli d'eau jusqu'au 2/3 de sa capacité), l'ensemble est ensuite porté à ébullition pendant 3 heures, à pression atmosphérique. Sous l'effet de la chaleur, les molécules volatiles contenues dans les glandes sécrétrices des végétaux sont libérées. Bien que la plupart des constituants aient des températures d'ébullition supérieures à 100°C, ils sont entraînés mécaniquement avec la vapeur d'eau puis passent par le réfrigérant où ils se condensent. Le condensat est recueilli dans une ampoule à décanter, où s'effectue la séparation par différence de densité des deux phases non miscibles : une phase aqueuse et une phase organique qui constitue l'huile essentielle.

Le dispositif de type Clevenger tel que préconisé par la pharmacopée européenne (**Pharmacopée Européenne, 1997**), permet le recyclage de la phase aqueuse du distillat dans le bouilleur par cohobage.

L'huile essentielle recueillie est déshydratée à l'aide de sulfate de Sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer toutes traces d'eau puis conservée au réfrigérateur dans des flacons en verre brun hermétiquement fermés à l'abri de la lumière et à une température de 4°C en vue de leurs utilisations.

2.2. Rendement de l'extraction

Plusieurs manières d'exprimer le rendement en huile essentielle sont utilisées dans la littérature. Soit en rapportant en pour cent (%) la masse de l'huile récupérée à la masse de la matière végétale sèche ou humide utilisée, soit en rapportant le volume d'huile essentielle recueilli pour 100 g de matière végétale sèche ou humide utilisée.

Dans notre étude nous avons exprimé les rendements en grammes (g) pour 100g de la matière végétale humide et sèche comme suit :

$$R\% = M_1 / M_0 * 100$$

Avec :

M₁. Masse d'huile essentielle récupérée (g).

M₀. Masse de la matière végétale utilisée (g) (fraîche ou humide).

Afin d'étudier l'influence du séchage (à l'habit de la lumière et à température ambiante) sur le rendement, nous avons réalisé des extractions à des intervalles d'une semaine à partir d'un même échantillon frais séché jusqu'à un mois et ceci pour l'ensemble des écotypes. En même temps, une détermination du taux d'humidité résiduelle a été effectuée sur ces mêmes échantillons à ces mêmes intervalles de temps comme suit :

La quantité d'eau contenue dans la matière végétale est calculée après évaporation de toute la quantité d'eau contenue dans l'échantillon après étuvage à 100°C à poids constant.

La détermination du taux d'humidité de la matière végétale s'effectue par gravimétrie selon la relation suivante :

$$H(\%) = P_2 - P_3 / P_E * 100$$

Avec :

P₁. Poids de la capsule vide

P₂. Poids de la capsule pleine

P₃. Poids de la capsule pleine après étuvage

P_E. Prise d'essai ($P_2 - P_1$)

3. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par CPG et CPG/ SM

3.1. Analyse par chromatographie en phase gazeuse CPG

L'analyse des huiles essentielles des romarins étudiés a été effectuée au laboratoire d'analyse instrumentale du département de technologie alimentaire à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, selon les conditions opératoires suivantes :

- Appareil de type CP. Chrompack 9002
- Les huiles de *R. officinalis* ont été analysés sur colonne capillaire Stabilwax de phase stationnaire polyéthylenglycol (PEG) de Longueur : 30 m ; et de diamètre interne : 0.32 mm ; épaisseur du film de la phase 0,25 μm .
- Températures de l'injecteur et du détecteur (FID), 250 et 280°C respectivement
- Programmation de la température : 50°C pendant 3 min puis augmentation de la température à raison de 2 °C/min jusqu'à 220 °C ; maintenue en isotherme pendant 15 min.
- Gaz vecteur : Azote
- Débit du gaz vecteur : 1 ml/min
- Volume injecté : 0,2 μl dans le mode d'injection split avec un rapport de division de 1/20.

Les échantillons de *R. tounefortii* ont été analysés sur colonne HP5MS dans les mêmes conditions et le même appareil que ceux de *R. officinalis*.

3.2. Analyse qualitative et semi quantitative des huiles essentielles par CPG/SM

Cette analyse à été effectuée au laboratoire de chromatographie (CRAPC) de la faculté de Chimie à l'Université Houari Boumediene (Bab Ezzouar), selon les conditions opératoires suivantes :

❖ Chromatographie phase gazeuse (CPG)

- Appareil du type GC 6890 séries GC systèmes (HP Agilent technologies)
- Deux types de colonnes apolaires et une colonne polaire ont été utilisés :
 - Colonne DB1-MS (100% diméthylpolysiloxane); longueur : 30 m; diamètre interne : 0,25 mm ; épaisseur du film de la phase : 0,25 μm .
 - Colonne HP5-MS (5% phenyl methyl siloxane); longueur : 30 m; diamètre interne : 0,25 mm ; épaisseur du film de la phase : 0,25 μm
 - Colonne Stabilwax citée ci-dessus.

- Programmation de la température : 60°C en isotherme pendant 8 min puis augmentation de la température à raison de 2°C/min jusqu'à 280 °C puis laissée en isotherme pendant 15 et 30 min pour la colonne HP5-MS et DB1-MS, respectivement.
- Volume injecté : 0,2 µl ; mode d'injection : Split à T= 250 °C
- Température de détection : 280 °C (interface)
- Gaz vecteur : hélium ; Débit du gaz vecteur : 0.5 ml/ min

❖ Spectrométrie de masse (SM)

- Appareil : HP-5973 (HP Agilent Technologies)
- Mode de détection : Scan
- Potentiel d'ionisation : 70 eV
- Pression (Source, analyseur) : 6,75 Psi

❖ Mode d'identification

L'identification des constituants des huiles essentielles extraites est basée sur la comparaison des spectres de masse des molécules inconnues à ceux des composés purs cités par la littérature et ceux des bibliothèques Wiley 7N et NIST 2002 ainsi que de leurs indices de rétentions (indices de Kovats) en programmation de température, à ceux cités par la littérature ainsi qu'à ceux d'étalons injectés dans les mêmes conditions. Pour le calcul de ces indices, un mélange d'alcane (C₉ – C₂₃) est injecté dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon. Les indices de Kovats sont désignés par IK et calculés selon la formule suivante :

$$IK = 100z + 100n (t_{Rc} - t_{Rz} / t_{Rz+n} - t_{Rz})$$

Avec : t_{Rc} .Temps de rétention du composé étudié (min)

t_{Rz} . Temps de rétention de l'alcane à z atomes de carbones qui précède le composé étudié (min)

t_{Rz+n} . Temps de rétention de l'alcane à z + n atomes de carbones qui suit le composé (min)

n : Différence des nombres d'atomes de carbone

La quantification a été obtenue par GC-FID.

4. Préparation d'extraits éthanoliques

Les extraits éthanoliques ont été obtenus en utilisant l'appareil de Soxhlet (extraction solide-liquide) au niveau du laboratoire de chimie de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique. L'appareillage Soxhlet (Figure 10) permet l'extraction aux solvants en continu d'espèces chimiques contenues dans une matrice solide. L'échantillon, placé dans une cartouche poreuse à l'intérieur de l'extracteur, est traversé par les vapeurs de solvant. Celles-ci passent du ballon chauffé au tube adducteur puis se condensent dans le réfrigérant. Le condensât s'accumule dans le corps de l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du siphon, entraînant alors le retour du liquide dans le ballon. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon.

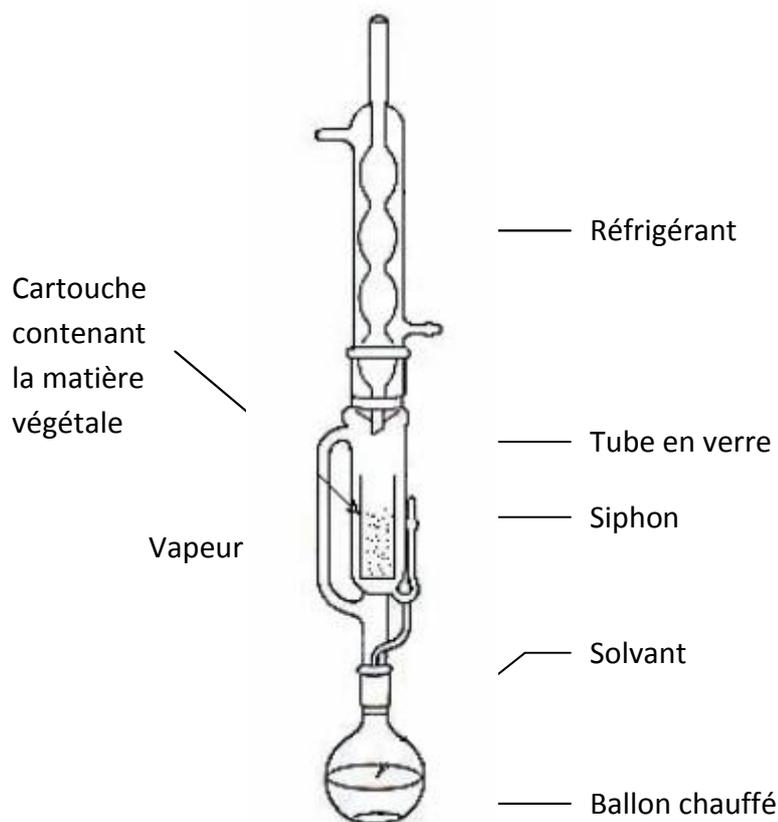


Figure 10: Schéma d'un extracteur de Soxhlet

Les feuilles des échantillons étudiés ont été broyées et réduites en poudre fine. 20g de la poudre obtenue ont été placés dans une cartouche et ont été extraits avec 300 ml d'éthanol à 95% sous réfrigérant à reflux (pendant 6 heures). L'expérience est répétée jusqu'à ce que le solvant obtenu soit incolore.

Après l'extraction, le solvant riche en substances extraites, a été récupéré dans un ballon et passé au rotavapor afin d'évaporer le maximum de solvant. L'extrait concentré est ensuite lyophilisé afin d'obtenir une poudre.

5. Dosage des composés phénoliques des extraits de romarin

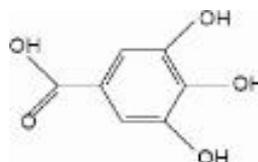
5.1. Dosage des polyphénols

La teneur en composés phénoliques est évaluée selon la méthode Folin-ciocalteu décrite par Singleton *et al.* (1999) utilisant l'acide gallique comme standard.

5.1.1. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune, constitué de polyheterocycles acides contenant l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), dont la réaction est :

Oxydation des phénolates \rightarrow réduction des polyheterocycles \rightarrow formation d'un complexe molybdène(Mo_8O_{23})-tungstène (W_8O_{23}) stable bleu qui absorbe fortement à une longueur d'onde de l'ordre 765 nm. Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique dont la formule chimique est la suivante :



Acide gallique (Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque)

5.1.2. Mode opératoire

Un volume de 0,25ml d'extrait dilué est mélangé à 1,25 ml de réactif de Folin-ciocalteu. Après 3 minutes de temps de réaction du mélange, 1ml de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à une concentration de 75g/l est ajouté. Après 30 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante, l'absorbance est lue à 765 nm. L'expérience est répétée trois fois pour chaque concentration d'extrait.

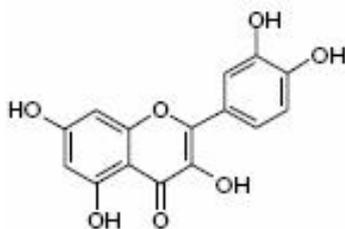
La même procédure est appliquée au standard d'acide gallique. Ainsi la concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et sera exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

5.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est estimée selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) modifiée (Lamaison et Carnet, 1990).

5.2.1. Principe

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe avec les flavonoïdes dont on dose l'absorbance à 420 nm. Le flavonoïde standard utilisé dans cette méthode est la quercétine dont la formule chimique est la suivante :



Quercétine

5.2.2. Mode opératoire

1ml de l'extrait dilué est ajouté à 1ml de la solution de chlorure d'aluminium. Après 1heure d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 420 nm. Cette expérience est répétée trois fois.

La teneur en flavonoïdes est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine et sera exprimée en mg d'équivalent quercétine par g d'extrait.

6. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits obtenus

L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par trois méthodes de référence citées dans la littérature : le pouvoir réducteur et l'activité d'inhibition du radical DPPH (2-2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) et ABTS [2,2 -Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)]. Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits éthanoliques a été comparé à un antioxydant de synthèse qui est le Butyl Hydroxy Toluène (BHT)

6.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH

6.1.1. Principe

La capacité de céder des hydrogènes par les huiles essentielles, extraits ou par certains composés purs, est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution éthanolique contenant le radical libre DPPH (2-2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) (figure 11).

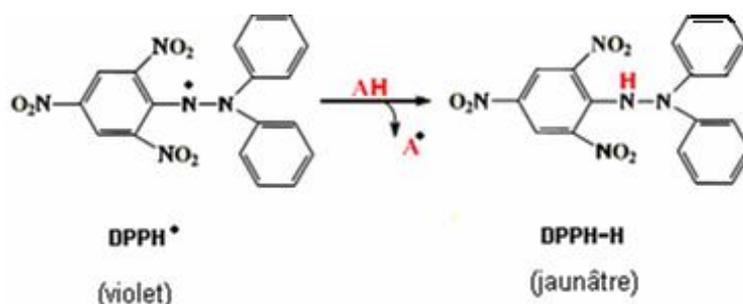


Figure 11: Réaction du radical DPPH avec un antioxydant AH.

6.1.2. Mode opératoire

Le test du radical DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par **Burits et Bucar (2000)** et **Sahin et al. (2004)**, où 25 μl de chacune des dilutions des huiles essentielles testées et de certains composés purs tels que le BHT sont mélangés dans la cellule placée dans la cuvette du spectrophotomètre avec 975 μl d'une solution éthanolique de DPPH (60 μM). Après une période d'incubation de 30 mn à l'abri de la lumière et de l'oxygène atmosphérique, et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm. Les expériences sont réalisées en 3 répétitions pour chaque concentration.

Le BHT a été utilisé comme témoin (référence de comparaison).

Le pourcentage d'activité antioxydante (I%) est calculé selon la formule suivante :

$$I (\%) = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{éch.}}) / A_{\text{blanc}}] \times 100$$

Avec : A_{blanc} . Absorbance du témoin (nm), il représente l'absorbance du DPPH au temps zéro avant l'addition de l'échantillon (huile essentielle, extrait ou témoin) à une concentration donnée.

$A_{\text{éch.}}$. Absorbance de l'échantillon testé après 30mn

❖ Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC_{50})

Elle est définie comme étant la quantité ou la concentration d'antioxydants (huile essentielle ou toute autre substance utilisée comme antioxydant) nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50% des radicaux. En d'autres termes, c'est la concentration nécessaire pour obtenir une activité en % égale à 50. Elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant.

6.2. Mesure du pouvoir de piégeage du radical cation ABTS

L'évaluation du degré de la réduction du radical cation de l'ABTS [2,2 -Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] a été réalisée selon la méthode de **Re et al. (1999)**. Le

radical cation de l'ABTS ($ABTS^{+\bullet}$) est obtenu par oxydation de l'ATBS avec du persulfate de potassium pendant 12-16 h à 4° C et à l'abri de la lumière tel qu'illustré en Figure 12.

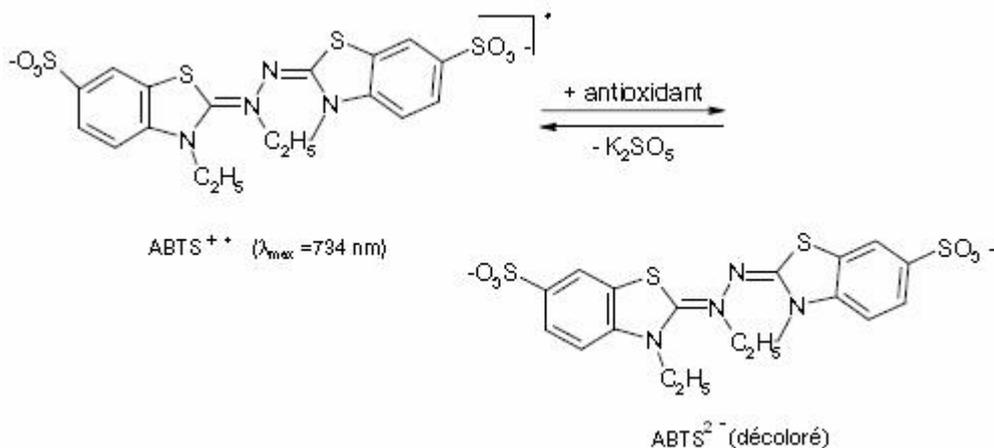


Figure 12: Réaction du radical $ABTS^{+\bullet}$ en présence d'un antioxydant (Scalzo, 2005)

Ainsi l' $ABTS^{+\bullet}$ est préparé en faisant réagir à l'abri de la lumière 7.4 mM ABTS et 2.45 mM de persulfate de potassiums à température ambiante pendant 12 à 16 heures avant utilisation. La solution d' $ABTS^{+\bullet}$ est ensuite diluée dans l'éthanol de manière à obtenir une absorbance $0.7 \pm 0,02$ à 734 nm. Après addition de 25 μl de l'échantillon à tester à 1 ml d'ABTS, la diminution de l'absorbance est mesurée après 7 min d'incubation à 734 nm. L'expérience est répétée 3 fois pour chaque concentration et le BHT a été utilisé comme référence de comparaison.

L'inhibition (I) du radical ABTS ainsi que la concentration inhibitrice de 50% des radicaux ABTS (IC_{50}) ont été calculée de la même manière que celle effectuée pour le radical DPPH.

6.3. Mesure du pouvoir réducteur

L'aptitude des huiles essentielles et de certains composés à réduire le fer ferrique est évaluée par la méthode décrite par Oyaizu (1986).

6.3.1. Mode opératoire

L'estimation du pouvoir réducteur des échantillons étudiés (huiles essentielles, extraits, BHT et l'acide ascorbique) est obtenue selon le protocole expérimental de la figure 13.

L'augmentation de l'absorbance indiquera une augmentation du pouvoir réducteur. Le test a été répété 3 fois pour chaque concentration de chaque échantillon étudié.

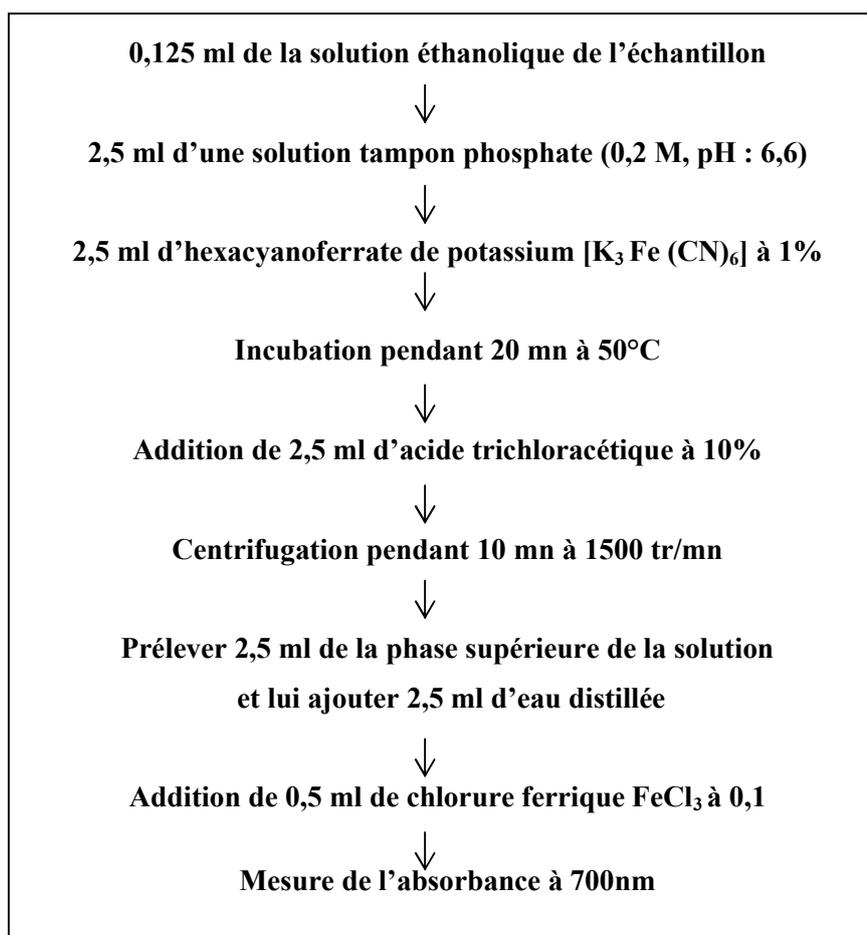


Figure 13: Procédure de mise en œuvre du test du pouvoir réducteur

7. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits éthanoliques

7.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Elles sont déterminées selon la méthode de diffusion dans l'agar comme précédemment décrite (Sokmen *et al.* 2004, Zitouni *et al.* 2004). Pour chaque huile et extrait, une solution mère à raison de 1 µg/ml est préparée dans du méthanol et servira à préparer les dilutions finales dans le milieu de culture. Pour cela, les volumes correspondants aux concentrations finales de 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 et 20 µg/ml sont ajoutées de manière aseptique à 3 ml de gélose nutritive en surfusion contenant du tween 80 (0,5 % V/V) comme agent de dispersion. Il faut noter que nous avons considéré qu'un 1 µg d'huile est équivalent à 1 µl.

Après homogénéisation, la gélose est immédiatement coulée dans des boîtes de pétri de 3 cm de diamètre et laissées à refroidir jusqu'à solidification puis les germes cibles, en suspensions préalablement calibrées à environ 10⁶ UFC/ml, sont disposés en surface en double spots à

raison de 1µl chacun. L'incubation se fait à 30°C pendant 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour les champignons.

Les lectures sont effectuées en comparaison avec des boîtes témoins contenant la même quantité de méthanol mais sans l'huile ou l'extrait. Pour chaque germe les valeurs de la CMI correspondent à la plus faible concentration d'huile ou d'extrait qui enregistre une absence de croissance.

7.2. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)

Après avoir mis en évidence un effet inhibiteur de nos huiles et extraits nous avons essayé d'approfondir l'étude de l'effet antimicrobien afin de voir au-delà de cet effet inhibiteur l'existence d'effet bactéricide. Pour cela nous avons procédé comme suit :

L'ensemble des germes qui n'ont pas enregistré de croissance visible, c'est-à-dire en dessus de leurs CMI, sont repiqués par grattage à partir des spots dans des tubes contenant du milieu ISP2 liquide. Après incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures, les lectures sont effectuées en enregistrant pour chaque germe le premier tube non trouble correspondant à la plus faible concentration d'huile ou extrait ayant l'effet bactéricide (CMB), les tubes présentant une croissance correspondent par contre à une activité bactériostatique.

7.3. Les germes cibles utilisés

Les germes cibles permettant d'évaluer le pouvoir bactériostatique et bactéricide de nos huiles et extraits font partis de la collection de microorganismes du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Nationale Supérieure de Kouba.

L'ensemble des germes utilisés sont des bactéries (Gram + et Gram -), des levures et des champignons filamenteux conservés à 4°C. Plusieurs de ces germes sont des agents pathogènes pour l'homme ou les animaux ou bien phytopathogènes.

7.3.1. Bactéries

Les souches bactériennes testées par les huiles essentielles et les extraits de romarin ainsi que leurs caractéristiques et les pathologies engendrées pour l'homme sont représentées dans le tableau 05.

Tableau 05 : Souches bactériennes testées par les huiles essentielles et les extraits de romarin, leurs caractéristiques et les pathologies engendrées pour l'homme.

Bactérie	Famille	Caractéristique, pathologie ou trouble engendrés pour l'homme	Isolat utilisé
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> Gram négatif	Cette bactérie est un important pathogène nosocomial, opportuniste, provoque des infections au niveau de la peau, des voies respiratoires et urinaires. Composant naturel de la flore intestinale de l'homme et des animaux, elle est aussi trouvée dans les selles, les eaux usées, le sol et les produits laitiers.	E13
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> Gram négatif	Bactérie commensale du tractus digestif, mais sa capacité à acquérir des gènes de résistance rend certaines souches associées à des pathologies (intoxication alimentaire) : diarrhées, gastroentérites, infections extra intestinale, septicémies, infection des voies urinaires et gynécologiques, etc...	E195
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> Gram négatif	Bactérie commensale, saprophyte, ubiquitaire du tube digestif et l'appareil respiratoire, fréquente dans les selles. Elle est un bon indicateur de contamination fécale.	E40
		La capsule lui confère un fort pouvoir invasif qui détermine des : infections respiratoires (pneumonies, abcès respiratoires, pleurésies), infections intestinales, infections nosocomiales.	KP19
<i>Salmonella enterica</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> Gram négatif	Bactérie fréquemment retrouvée dans les milieux aquatiques. Les vertébrés aquatiques tels que les oiseaux sont d'importants vecteurs, les bovins et ovins ainsi que la volaille sont fréquemment contaminés, ce qui rend les viandes, les œufs crus et les produits laitiers susceptibles d'être contaminés. Elle provoque des toxi-infections, intoxications alimentaires en pénétrant par voie digestive entraînant des inflammations intestinales avec diarrhées.	E32
<i>Pseudomonase aeruginosa</i>	<i>Pseudomonadaceae</i> Gram négatif	Bactérie ubiquitaire, avec des bacilles très mobiles. Très contagieuse car elle se trouve partout dans la nature : l'eau, sol, plantes,	CIPA22

		animaux. Facilement véhiculée par l'eau, l'air ou surfaces contaminées.	
		Elle présente une grande capacité pathogène et de plus en plus responsables opportunistes. Les pathologies engendrées sont très diverses : infections des plaies, infections gastro-intestinales chez les sujets ayant une maladie hématologique.	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacilliaceae</i> Gram positif	C'est une bactérie ubiquitaire, n'est pas considérée comme pathogène pour l'homme, mais elle peut contaminer les aliments et provoquer exceptionnellement des intoxications alimentaires.	ATCC6633
<i>Listeria monocytogenese</i>	<i>Listeriaceae</i> Gram positif	C'est la seule espèce du genre <i>listeria</i> qui est pathogène pour l'homme. Ubiquitaire, responsable d'infections sporadiques sévères. La capacité de <i>L. monocytogenese</i> de se développer à des températures proches de 0°C pose un véritable problème pour les aliments réfrigérés même si la population microbienne de départ est faible. Les bactéries ingérées avec la nourriture contaminée (viandes, légumes, fromages, etc...) traversent la paroi intestinale et induisent une listériose dans un cas extrême à une septicémie chez les patients immunodéprimés.	CIP82110

7.3.2. Champignons et levures

- Champignons mycotoxinogènes

Aspergillus carbonarius (M333), *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium glabrum* et *P. expansum*.

Ces champignons se développent sur de nombreuses denrées alimentaires dont les plus importantes sont les céréales, les fruits secs et les épices. Ces champignons produisent des métabolites secondaires toxiques : les mycotoxines. Les principales mycotoxines sont les aflatoxines, les ochratoxines, les fumonisines, certaines trichothécènes, la zéaralénone et la patuline. Ces substances peuvent occasionner des effets cancérogènes, mutagènes, tératogènes, immunosuppresseurs, allergiques, oestrogéniques, nécrosants, neurotoxiques et néphrotoxiques (Riba et al. 2008).

- Champignons phytopathogènes

Fusarium oxysporum lini+

Ce champignon provoque un flétrissement vasculaire chez le lin. Les tiges deviennent brunes et les racines noires, nécrosées.

Le lin attaqué donne des fibres courtes qui ne sont pas utilisables pour la production industrielle.

Les sources de contamination peuvent être le sol, les débris végétaux et les graines.

- Levures

Candidat albicans (IPA 200)

Candidat albicans est un pathogène opportuniste présent à l'état naturel sur la peau et les muqueuses, dans la bouche et le tube digestif de l'être humain. Il provoque des infections fongiques, essentiellement au niveau des couches superficielles de la peau ou des muqueuses digestive et gynécologique.

8. Analyse de données

L'ensemble des données générées lors de la caractérisation des huiles et extraits ont été traitées par différents types d'analyses:

- Analyse en composantes principales (ACP) considérant des matrices de corrélation basé sur le coefficient de Pearson.
- Classification ascendante hiérarchique (CAH) ou cluster analyse considérant la mesure de proximité par distance Euclidienne et une agrégation par la méthode UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean).

Pour l'ensemble des données, la significativité a été admise avec une erreur de 5% ($P \leq 0,05$).

CHAPITRE VII
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. Rendement en huile essentielle

Les rendements (valeurs moyennes) en huile essentielle reportés dans le tableau 06 montrent des différences notables aussi bien inter qu'intraspécifiques.

Tableau 06: Rendement en huile essentielle des différents romarins

Espèces	Origine géographique	Rendement (g/100g MV*)
<i>R. officinalis</i>	ENSA	1,02
	Tablat	0,96
	Beni Yenni	1,8
	Cherchell	1.6
	Mostaganem	1.9
<i>R. tournefortii</i>	Mostaganem	1,06
	Bouira	1,3
	Bechar	1
	Djelfa	0,9
	M'sila	0,8

*MV : matière végétale sèche.

On remarque d'après le tableau 06 que de façon générale, mise à part les rendements obtenus pour les échantillons de Beni yenni, Cherchell et Mostaganem, les rendements en huiles essentielles obtenus par tous les autres échantillons de *R. officinalis* et *R. tournefortii* sont plus ou moins proches de 1. Cette différence de rendements semble être dans le même ordre de grandeur que ceux enregistrés dans plusieurs études effectuées sur *R. officinalis* et *R. tournefortii* d'Afrique du nord et de Sardaigne (**Makhlouf 2002; Angioni et al., 2004; Bousbia et al., 2009; Dahmane et al., 2010; Bendeddouche et al., 2011**).

Il faut également noter que la méthode d'extraction joue un rôle non négligeable pour l'appréciation des rendements obtenus. Ainsi la méthode d'hydrodistillation utilisée lors de notre étude est reconnue pour tirer le meilleur profit en termes de quantité d'huile extraite (**Bousbia et al., 2009**).

2. Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle

Afin de maximiser les quantités d'huiles essentielles récoltées, nous avons étudié les effets du temps de séchage (25 °C, HR= 75%) de la matière première (feuilles de romarin) sur la variation du rendement en huiles essentielles.

Tel que l'illustrent les figures 14 et 15, les extractions de *R. officinalis* et *tournefortii* présentent un rendement maximum pour une matière végétale ayant subi un séchage de trois semaines et sont ainsi inversement proportionnelles aux taux d'humidité de la matière.

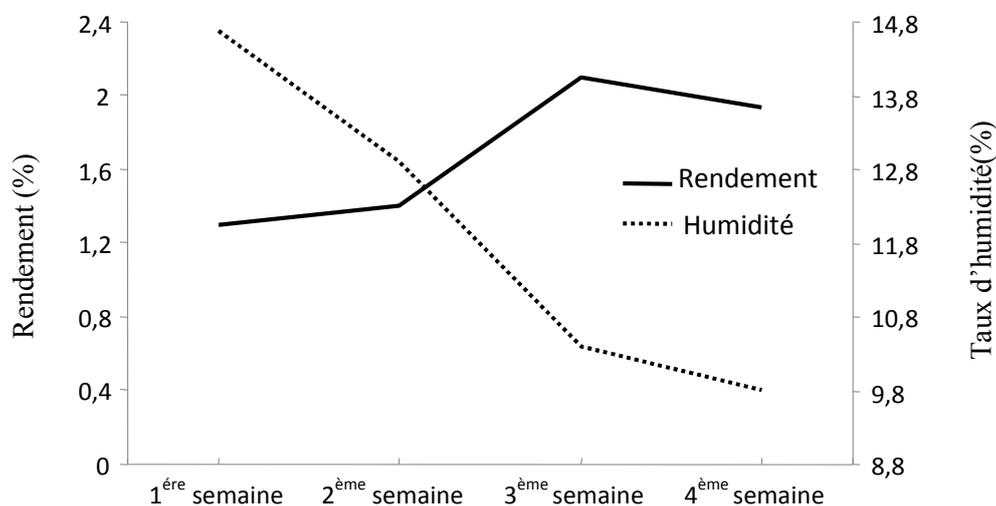


Figure 14: Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle du *R. officinalis* de Mostaganem.

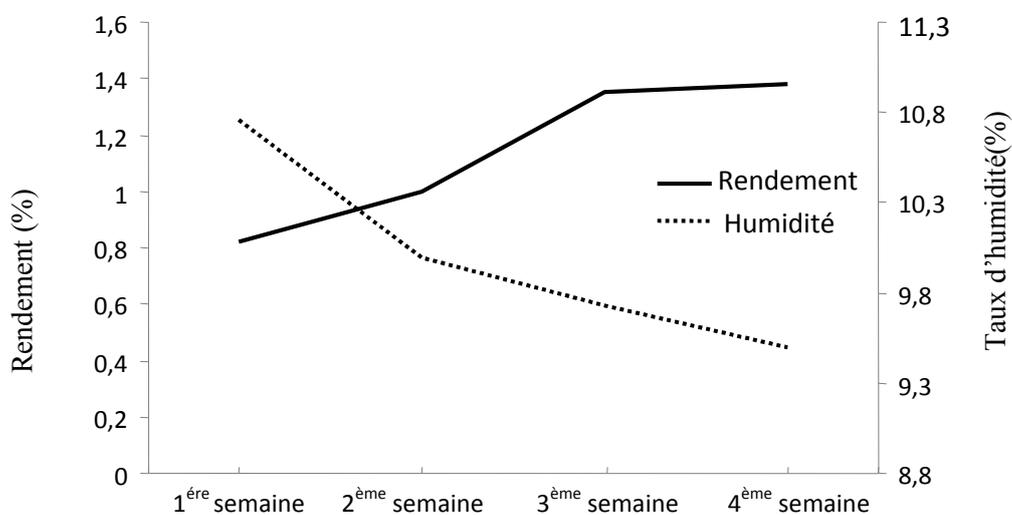


Figure 15: Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle du *R. tournefortii* de Bouira

Cette augmentation de rendement en huile essentielle durant les trois premières semaines de séchage s'expliquerait par la continuité et l'accélération de la biosynthèse des substances terpéniques en faveur du métabolisme glucidique stocké dans le végétal, cette fonction particulière des cellules sécrétrices (figure 16) est appelée respiration terpénique (Gueorguiev, 1980; Silou *et al.*, 2002).

Après la troisième semaine, on remarque une baisse de rendement en huile essentielle pour les trois romarins. Ceci serait dû à la réduction ou l'arrêt de la respiration terpénique, causant la mort des cellules sécrétrices suite à une forte déshydratation.

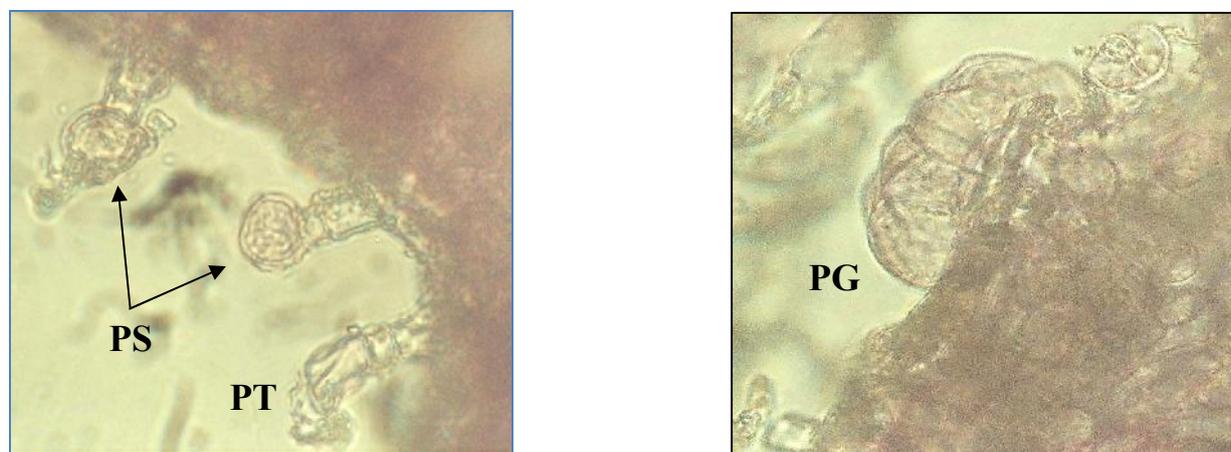


Figure 16: Coupes histologiques transversales d'une feuille de *R. officinalis* mettant en évidence la présence de poils sécréteurs (PS), tecteurs (PT) et glandulaire (PG) (Gr. : X 160).

Seuls les poils glandulaires et sécréteurs ont l'aptitude de biosynthétiser, sécréter et séquestrer les huiles essentielles en quantité significative (Wagner *et al.* 2004). Coupes histologiques réalisées au niveau du département de Botanique de l'ENSA selon la méthode de Deysson (1954).

3. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles des *R. officinalis* et *tournefortii* étudiés a été établie par chromatographie en phase gazeuse seule (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

3.1 Composition chimique des huiles essentielles des romarins de l'espèce *R. officinalis*

Le tableau 07 résume l'ensemble des composés identifiés ainsi que leurs proportions pour chacune des huiles des *R. officinalis* étudiés.

Tableau 07: Composition (%) chimique des huiles essentielles des différents écotypes de *R. officinalis* étudiés

N°	Composés ¹	IR		ENSA	Tablat	Beni Yenni	Cherchell	Mostaganem	Identification ³
		DB1 ²	PEG						
1	Tricyclene	913	1017	0,1	0,2	0,1	0.3	0.3	SM-IR
2	α -Thujene	921	1029	t	t	-	0.1	0.1	SM-IR-E
3	α -Pinene	926	1026	51,8	21	24,7	12.0	12.4	SM-IR-E
4	α -Fenchene	946	1046	-	-	t	-	-	SM-IR
5	Camphene	957	1072	6,2	22	4,5	6.3	6.8	SM-IR-E

6	Verbenene	958	1121	0,2	-	0,4	0.2	0.2	SM-IR
7	1-Octen-3-Ol	962	1411	-	t	-	t	t	SM-IR
8	Sabinene	970	1132	t	t	-	t	t	SM-IR
9	3-Octanone	980	1225	-	-	t	-	-	SM-IR
10	β -Pinene	985	1119	2,3	6,6	0,2	1.9	2.0	SM-IR-E
11	β -Myrcene	990	1173	1,1	0,2	0,6	1.0	1.3	SM-IR
12	α -phellandrene	1005	1177	0,1	0,1	0,1	0.2	0.2	SM-IR-E
13	δ -3-carene	1009	1163	t	-	0,3	0.7	0.7	SM-IR-E
14	α -terpinene	1020	1192	0,2	0,1	0,1	0.2	0.3	SM-IR-E
15	p-cymene	1025	1290	1,1	0,2	3,8	0.9	0.9	SM-IR-E
16	1-8 cineole	1034	1223	t	9,5	t	14.9	12.9	SM-IR-E
17	β - phellandrene	1044	1222	t	-	-	-	-	SM-IR
18	Limonene	1045	1212	4,5	-	14,3	t	t	SM-IR-E
19	β -Ocimene	1052	1246	t	t	-	t	t	SM-IR
20	γ -terpinene	1057	1261	0,8	0,1	0,1	0.3	0.3	SM-IR-E
21	cis-sabinene hydrate	1058	1567	t	t	-	0.1	0.1	SM-IR
22	Fencholenic aldehyde	1063	-	t	-	-	-	-	SM-IR
23	α -Fenchone	1070	1389	-	-	0,1	-	-	SM-IR
24	p-Cymenyl	1087	1452	-	-	0,4	0.8	0.8	SM-IR
25	Terpinolene	1093	1300	0,3	0,1	0,2	-	-	SM-IR-E
26	Filifolone	1097	1423	-	-	0,7	0.8	0.9	SM-IR
27	Linalool	1104	1558	1,1	-	-	-	-	SM-IR-E
28	trans-sabinene Hydrate	1101	1482	-	t	-	1.5	1.3	SM-IR
29	β -Thujone	1105	1412	-	-	t	-	-	SM-IR
30	Chrysantenone	1106	1493	0,2	-	0,1	-	-	SM-IR
31	α -Campholene aldehyde	1108	1401	0,3	-	0,7	-	-	SM-IR
32	Fenchyl alcohol	1118	-	-	t	-	-	-	SM-IR
33	Camphor	1122	1556	7,8	32	13,8	41.6	40.7	SM-IR-E
34	Exo-Methyl camphelinol	1144	-	-	-	0.2	-	-	SM-IR
35	Pinocarvone	1162	1586	0,3	t	1,6	1.2	0.3	SM-IR
36	Pinocamphone	1164	1507	-	-	0,3	-	-	SM-IR
37	Borneol	1167	1732	-	0,3	-	4.0	6.4	SM-IR
38	isoBorneol	1177	-	0,9	-	-	-	-	SM-IR-E
39	4-Terpineol	1182	1613	0,3	0,2	1,2	1.7	1.4	SM-IR
40	α -Terpineol	1190	1723	0,2	0,2	2,2	1.5	1.6	SM-IR-E
41	Verbenone	1210	1734	4,1	-	6,3	-	-	SM-IR
42	Endo-Borneol	1216	-	1,9	-	-	-	-	SM-IR
43	Carveol	1226	1845	0,1	-	-	-	-	SM-IR
44	Thymol methylether	1255	1611	-	-	t	-	-	SM-IR
45	Carvone	1260	1755	0,1	-	0,1	-	-	SM-IR
46	Carvacrol methyl ether	1263	1976	-	-	t	-	-	SM-IR
47	Piperitone	1264	-	-	-	t	-	-	SM-IR
48	Geraniol	1272	1820	0,1	-	-	-	-	SM-IR-E
49	Thymol	1280	2212	-	-	0,2	-	-	SM-IR-E
50	Bornyl acetate	1285	1608	1,3	0,3	0,6	0.4	0.5	SM-IR-E

51	Carvacrol	1297	2238	t	-	1,3	-	-	SM-IR
52	α -Cubebene	1328	-	-	t	-	-	-	SM-IR
53	Piperitenone	1335	-	-	-	0,3	-	-	SM-IR
54	α -Ylangene	1350	-	-	t	-	-	-	SM-IR
55	Eugenol	1351	2172	t	-	0,1	-	-	SM-IR
56	Methyleugenol	1352	-	-	-	0,2	-	-	SM-IR
57	α -Copaene	1353	1509	-	0,2	0,2	-	-	SM-IR
58	α -Bourbonene	1380	1536	-	t	-	-	-	SM-IR
59	β -Cubebene	1386	1549	-	t	-	-	-	SM-IR
60	β -Caryophyllene	1438	1620	6,8	3,3	2,5	0,8	1,0	SM-IR-E
61	Geranyl acetone	1440	1769	t	-	0,4	-	-	SM-IR
62	α -Bergamotene	1442	1563	t	-	-	-	-	SM-IR
63	α -Farnesene	1442	-	-	-	0,2	-	-	SM-IR
64	β -Farnesene	1449	1641	0,1	0,1	0,2	-	-	SM-IR
65	Aromadendrene	1449	1625	-	-	0,2	-	-	SM-IR
66	α -Humulene	1450	1687	0,8	0,3	1,2	0,3	0,8	SM-IR
67	α -Curcumene	1460	1790	0,1	-	1	-	-	SM-IR
68	Zingiberene	1471	-	t	-	-	-	-	SM-IR
69	γ -Muurolene	1472	1690	-	0,3	-	-	-	SM-IR
70	Ledene	1477	1713	-	t	-	-	-	SM-IR
71	Germacrene	1486	1726	-	0,1	-	-	-	SM-IR
72	α -Muurolene	1500	1690	-	0,1	-	-	-	SM-IR
73	β -Bisabolene	1505	1776	1,2	0,1	2	0,7	-	SM-IR
74	γ -Cadinene	1511	1776	-	0,2	0,5	-	-	SM-IR
75	cis-Calamenene	1516	1835	-	t	0,3	-	-	SM-IR
76	δ -Cadinene	1519	1772	-	0,8	0,2	-	-	SM-IR
77	β -Sesquiphellandrene	1525	1770	0,1	-	-	-	-	SM-IR
78	Cadina-1-4-diene	1526	1757	-	t	t	-	-	SM-IR
79	α -Bisabolene	1540	1776	-	0,1	-	-	-	SM-IR
80	Caryophyllene oxide	1600	2014	0,3	0,1	-	0,2	0,4	SM-IR
81	Spathulenol	1602	2154	-	-	0,1	-	-	SM-IR
82	Methyl jasmonate	1636	-	-	-	0,2	-	-	SM
83	α -Cadinol	1650	2259	-	t	-	-	-	SM-IR
84	β -Eudesmol	1654	2255	-	t	-	-	-	SM-IR
85	Cadalene	1659	2200	-	-	0,1	-	-	SM-IR
86	α -Bisabolol	1686	-	0,1	0,1	0,3	-	-	SM-IR
Composés identifiés %				96,9	98,8	94,2	94,6	94,6	
Monoterpenes				68,7	51	49,8	39,7	40,3	
Monoterpenes oxygénés				18,7	43	35,2	53,6	52,6	
Sesquiterpene				9,1	5,6	8,6	1,8	1,8	
Sesquiterpene oxygénés				0,4	0,2	0,6	0,2	0,4	

¹composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne apolaire DB1 ; ²indice de rétention relatif aux n-alcane C9-C 23 ; ³Identification : SM, comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; E,

comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; IR, comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique à celle que nous avons utilisé; t : trace (<0,05%).

L'analyse par CPG et CPG/SM nous a permis d'identifier la quasi totalité des composés présents dans les huiles des *R. officinalis* étudiés, soit un minimum de 94% des composés identifiés (figure 17a et 17b).

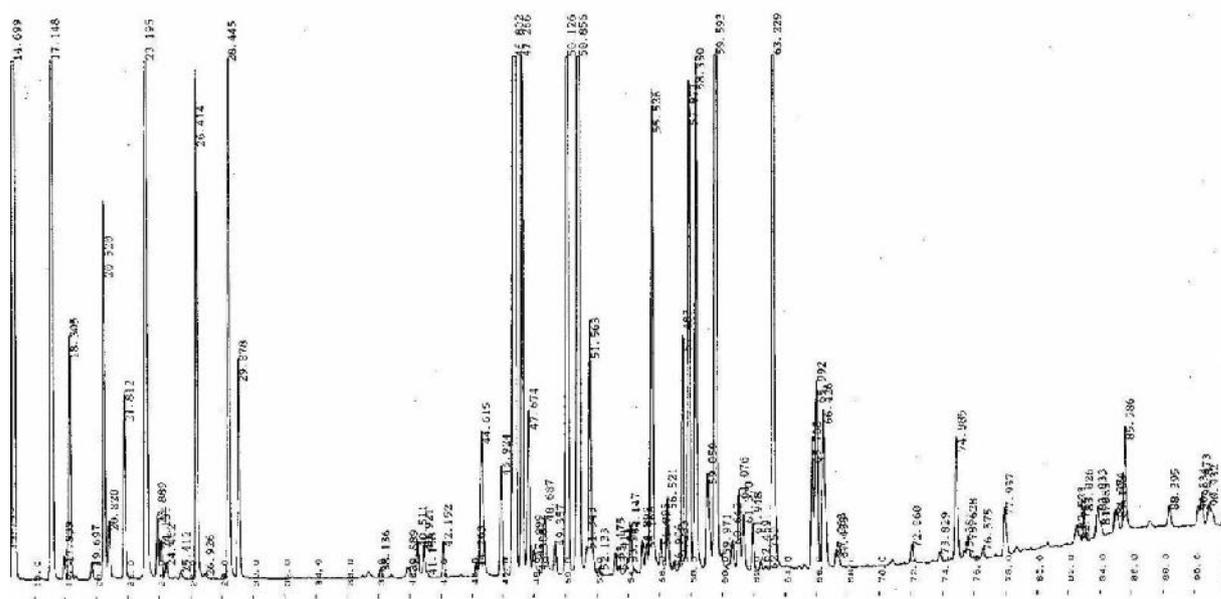


Figure 17a: Exemple de chromatogramme CPG obtenu pour l'huile essentielle de *R. officinalis* de l'ENSA.

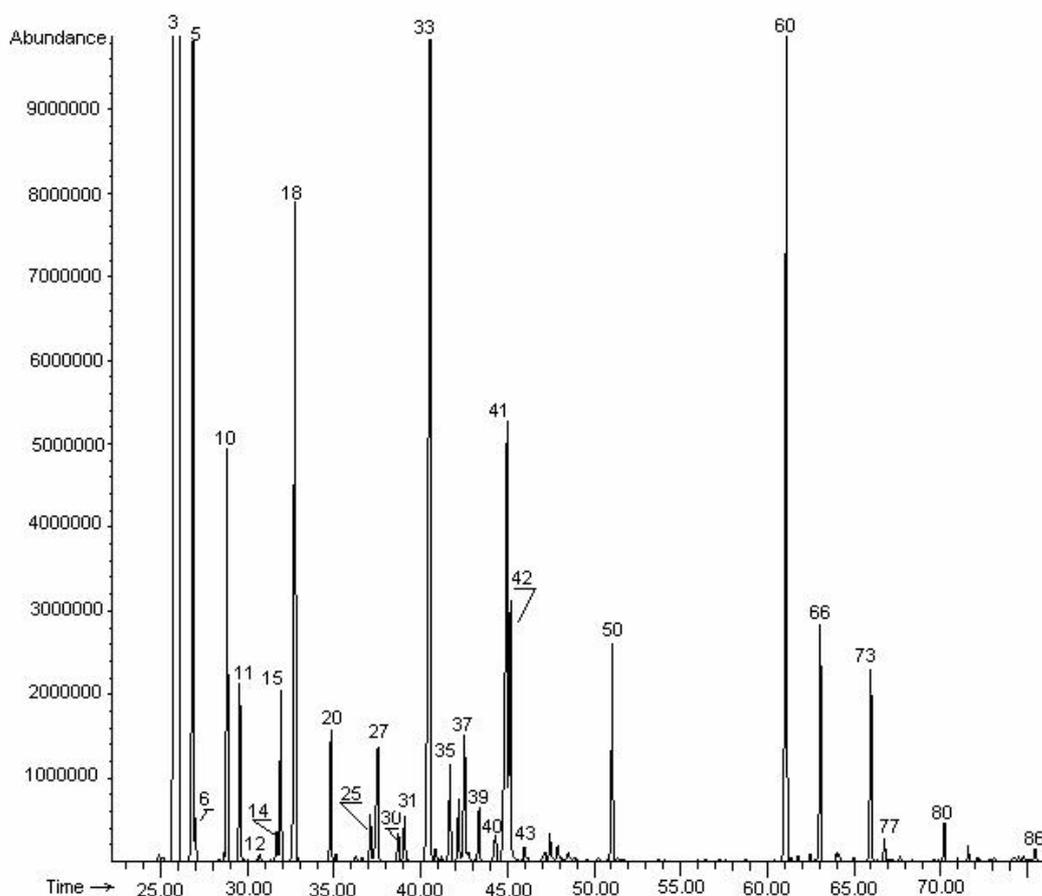


Figure 17b: Exemple de chromatogramme CPG/SM obtenu pour l'huile essentielle de *R. officinalis* de l'ENSA. Les numéros sur les pics correspondent aux numéros d'ordre des composés du tableau de la composition chimique.

3.1.1 Description chimique des huiles essentielles étudiées

A- Huile essentielle extraite du romarin de l'ENSA

L'analyse par CPG et CPG/SM nous a permis d'identifier 48 composés (Tableau 07) représentant 96,9% de la somme totale des aires de pics des chromatogrammes.

En ce qui concerne la composition chimique par familles de composés, les monoterpènes semblent représenter la majorité des pics identifiés avec 68,7%, suivis par les monoterpènes oxygénés (18,7%) puis les sesquiterpènes (9,1%) et les sesquiterpènes oxygénés (0,4%).

L'huile essentielle du romarin de l'ENSA se caractérise par l' α pinène comme composé le plus important et qui représente à lui seul plus de la moitié des composés identifiés (51,8%), suivi par les autres composés majoritaires ; camphor (7,8%), β -caryophyllène (6,8%), limonène (4,5%) et la verbenone (4,1%). La nature ainsi que les proportions des composés identifiés lors de notre analyse sont proches de celles précédemment obtenues pour ce même

romarin de l'ENSA, étudié par différents auteurs (**Makhlouf, 2002 ; Sahraoui *et al.*, 2007 ; Bousbia *et al.*, 2009**).

B- Huile essentielle extraite du romarin de Tablat

L'analyse par CPG et CPG/SM a permis d'identifier 47 composés (Tableau 07) représentant 98,8% de l'information fournie par les chromatogrammes, où les proportions des composés regroupés par famille révèlent que la moitié des pics identifiés (51%) correspondent aux monoterpènes. L'autre moitié regroupe les monoterpènes oxygénés (43%) suivis par les sesquiterpènes (5,6%) et les sesquiterpènes oxygénés (0,2%). D'après le Tableau 07, la prédominance combinée du camphor (32%), camphène (22%), α -pinène (21%), 1-8 cinéole (9,5%) et β -pinène avec 6,6% caractérise la composition chimique de cette huile.

C- Huile essentielle extraite du romarin de Beni Yenni

L'analyse par CPG et CPG/MS a révélé une plus grande diversité de composés avec l'identification de 57 composés (Tableau 07) correspondant à 94,2% de l'ensemble des pics enregistrés par les chromatogrammes. Selon le Tableau 07, les monoterpènes représentent à eux seuls 49,8% des composés identifiés suivis par les monoterpènes oxygénés (35,2%) et par les sesquiterpènes et sesquiterpènes oxygénés (8,6% et 0,6% respectivement).

L'huile essentielle de Beni Yenni se caractérise par six composés majoritaires : l' α -pinène avec 24,7%, le limonène et le camphor avec 14,3% et 13,8% respectivement, puis le verbenone, le linalool, le camphène et le p-cymène avec 6,3%, 4,5%, 3,8% respectivement. Même si l' α -pinène demeure le composé majoritaire (24,7%), la concentration importante du limonène (14,3%) fait que cette huile se distingue des autres huiles essentielles analysées et publiées dans diverses investigations ; excepté l'étude de **Bozin *et al.* (2007)** sur l'huile essentielle de romarin de Serbie qui relève la présence de limonène comme composé majoritaire à côté du camphor (21,7% et 21,6% respectivement).

D- Huile essentielle extraite du romarin de Cherchell

L'analyse par CPG et CPG/SM a permis d'identifier 32 composés (Tableau 07) représentant 94,6% de l'information fournie par les chromatogrammes, où les proportions des composés regroupés par famille révèlent que plus de la moitié des pics identifiés (53,6%) correspondent aux monoterpènes oxygénés. L'autre moitié regroupe les monoterpènes (39,7%) suivis par les sesquiterpènes (1,8%) et les sesquiterpènes oxygénés (0,2%). D'autre

part le Tableau 07, montre la prédominance du camphor (41,6%), 1-8 cinéole (14,6%), α -pinène (12%), et Borneol avec 4%.

E- Huile essentielle extraite du romarin de Mostaganem

L'analyse par CPG et CPG/SM a permis d'identifier 31 composés (Tableau 07) représentant 94,6% de l'information fournie par les chromatogrammes, où les proportions des composés regroupés par famille révèlent que plus de la moitié des pics identifiés (52,6%) correspondent aux monoterpènes oxygénés. L'autre moitié regroupe les monoterpènes (40,3%) suivis par les sesquiterpènes (1,8%) et les sesquiterpènes oxygénés (0,4%). Au regard de la nature et des proportions des composés majoritaire de l'huile de Mostaganem, celle-ci semble très proche de l'huile Cherchell (Tableau 07) avec la prédominance du camphor (40,7%), 1-8 cinéole (12,9%), α -pinène (12,4%), et Borneol avec 6,4%

De manière générale, on remarque une grande similitude en composés majoritaires entre l'huile essentielle du *R. officinalis* d'Espagne (**Bannour et al., 2006**) et de Cuba (**Pino, 1998**) avec celle de Tablat, Cherchelle et Mostaganem. D'une part l'ensemble de ces huiles se caractérisent par la prédominance du camphor (plus de 30%) et d'autre part elles se distinguent par leurs fortes proportions en 1-8 cinéole (plus de 10%).

De plus, il semblerait que les huiles de *R. officinalis* des cinq régions étudiées sont différentes des huiles des Bibans (**Boutekdjiret et al., 1998 ; Sahraoui et al., 2007**), du Maroc (**Chalchat et al., 1993 ; Lamiri et al., 2001**), de Turquie (**Orhan et al., 2008**), de Tunisie, de Grèce, de Yougoslavie, d'Italie et de France (**Pintore et al., 2002**) qui contiennent plus de 40% de 1-8 cinéole.

3.1.2 Comparaison entre les huiles essentielles

En premier lieu, afin d'avoir une vue globale des différences entre les huiles en fonction de leurs compositions chimiques, une analyse en composante principale (figure 18) a été réalisée.

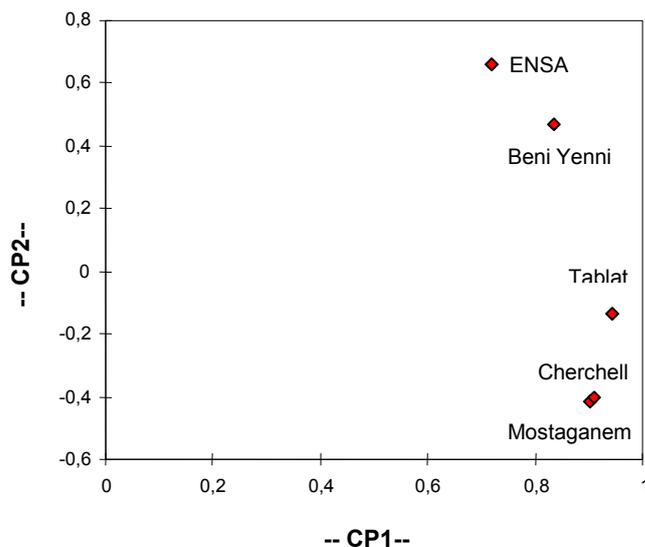


Figure 18: Analyse en Composante Principale (ACP) représentant sur les deux premiers plans (CP1 vs. CP2) les différents échantillons de *R. officinalis* en fonction de leurs composition chimiques.

Les deux premiers plans de l'ACP, CP1 et CP2, ont permis d'expliquer 95% des différences entre les huiles étudiés (75% pour PC1 et 20% pour PC2).

L'ACP a également permis de regrouper les huiles qui semblent les plus ressemblantes au vue de leurs compositions. Ainsi les huiles de romarin de Cherchell et de Mostaganem semblent quasiment identiques, alors que les huiles de romarin de Tablat, Beni Yenni et ENSA sont éloignées l'une de l'autre.

En deuxième lieu, afin de classer les huiles selon leur degré de ressemblance de composition chimique, une classification ascendante hiérarchique (figure 19) a également été réalisée.

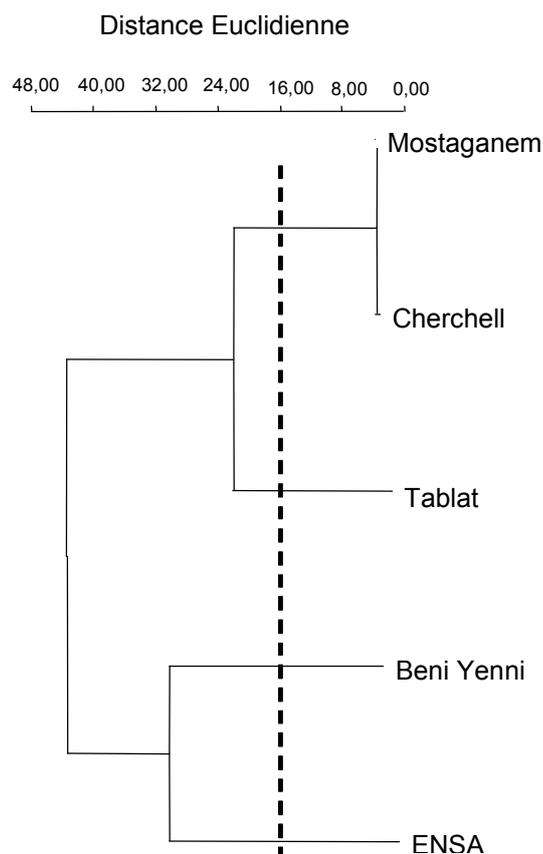


Figure 19: Dendrogramme basé sur l'analyse de proximité des différents écotypes de *R. officinalis* en fonction de leurs compositions. L'analyse a été effectuée par Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) considérant la mesure de proximité par distance Euclidienne et une agrégation par la méthode UPGMA. La ligne hachurée représente le seuil de définition des clusters (troncature).

Comme suggéré par les résultats de l'ACP, la CHA a permis de regrouper les huiles de Cherchell et de Mostaganem dans le même cluster. En d'autre terme ces deux huiles semblent très proches au vu de leurs compositions.

De plus, la CHA nous informe que c'est l'huile de Tablat qui semble chimiquement la plus proche des huiles de Cherchell et de Mostaganem, alors que les huiles de l'ENSA et de Beni Yenni sont plus éloignées.

Afin d'évaluer le rôle de chaque composé dans l'estimation du degré de ressemblance de composition chimique des huiles de *R. officinalis* étudiées, une CAH de partition de classe de composés chimiques définissant les échantillons de *R. officinalis* a été effectuée (figure 20 et Tableau 08).

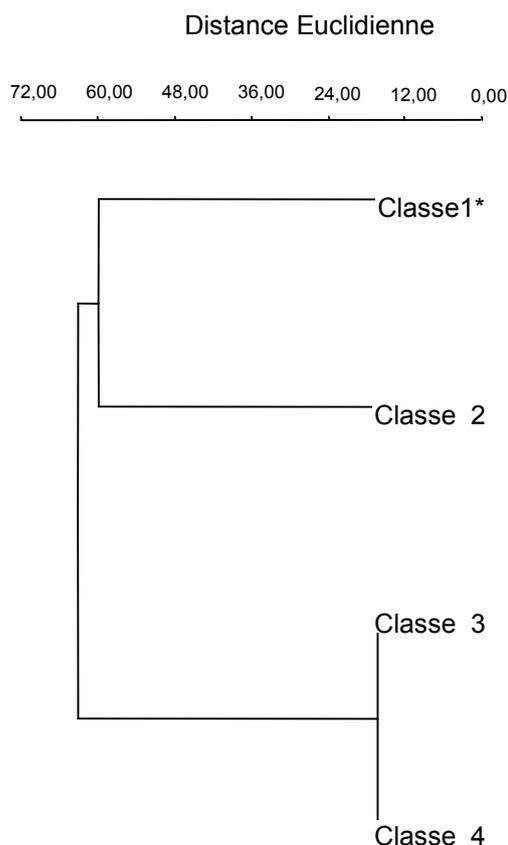


Figure 20: Dendrogramme de partition des composés chimiques (classes) définissant les différents échantillons de *R. officinalis*. *La composition de chaque classe est représentée dans le Tableau 08. L'analyse a été effectuée par classification ascendante hiérarchique considérant la mesure de proximité par distance Euclidienne et une agrégation par la méthode UPGMA.

D'après la figure 20 et le Tableau 08, les proportions en α -pinène, camphor, camphène et 1-8 cinéole jouent un rôle de première importance dans la définition chimique de chacune des huiles de *R. officinalis* étudiées. L' α -pinène et le camphor représentent chacun d'entre eux une classe, c'est à dire un critère majeur dans la définition de l'identité chimique des huiles de *R. officinalis* étudiées. Le camphène et le 1-8 cinéole ont à eux seuls le même poids statistique dans la définition du degré de ressemblance des huiles (figure 19) que les 83 autres composés regroupés dans la classe 4.

Tableau 08: Partition des classes de composés chimiques définissant les écotypes de *R. officinalis* telles qu'obtenues par classification ascendante hiérarchique.

Classe 1 [1]*	Classe 2 [1]	Classe 3 [2]	Classe 4 [83]
α -Pinène	Camphor	Camphène 1-8 cinéole	Tricyclène α -Thujène α -Fenchène
			α -Ylangène Eugénol Méthyleugénol

Verbenene	α -Copaene
1-Octen-3-ol	α -Bourbonene
Sabinene	β -Cubebene
3-Octanone	β -Caryophyllene
β -Pinene	Geranyl acetone
β -Myrcene	α -Bergamotene
α -phellandrene	α -Farnesene
δ -3-carene	β -Farnesene
α -terpinene	Aromadendrene
p-cymene	α -Humulene
β - phellandrene	α -Curcumene
Limonene	Zingiberene
β -Ocimene	γ -Muurolene
γ -terpinene	Ledene
cis-sabinene hydrate	Germacrene
Fencholenic aldehyde	α -Muurolene
α -Fenchone	β -Bisabolene
Fenchol	γ -Cadinene
p-Cymenyl	cis-Calamenene
Terpinolene	δ -Cadinene
Filifolone	β -Sesquiphellandrene
Linalool	Cadina-1-4-diene
trans-sabinene Hydrate	α -Bisabolene
β -Thujone	Caryophyllene oxide
Chrysantenone	Spathulenol
α -Campholene aldehyde	Methyl jasmonate
Fenchyl alcohol	α -Cadinol
Exo-Methyl camphelinol	β -Eudesmol
Pinocarvone	Cadalene
Pinocamphone	α -Bisabolol
Borneol	
isoBorneol	
4-Terpineol	
α -Terpineol	
Verbenone	
endo-Borneol	
Carveol	
Thymol methylether	
Carvone	
Carvacrol methyl ether	
Piperitone	
Geraniol	
Thymol	
Bornyl acetate	
Carvacrol	
α -Cubebene	
Piperitenone	

*nombre de composés par classe

Lorsque nous comparons ces mêmes huiles entre elles en fonction des familles de composés qui les caractérisent (figure 21), l'huile essentielle de l'ENSA semble posséder en proportion moins de composés monoterpènes oxygénés que les autres huiles et plus de

monoterpènes dont principalement l' α -pinène (tableau 07). Ainsi au vue de la teneur particulièrement élevée en l' α pinène présent dans l'huile essentielle de l'ENSA (51,8%), cette huile correspond à un chémotype à α -pinène (Rosuaj et Garcia-Granados, 1987). On remarque également sur la figure 21 une superposition des profils des huiles de romarin de Cherrhell et de Mostaganem et confirme ainsi les résultats de l'ACP et de la CHA.

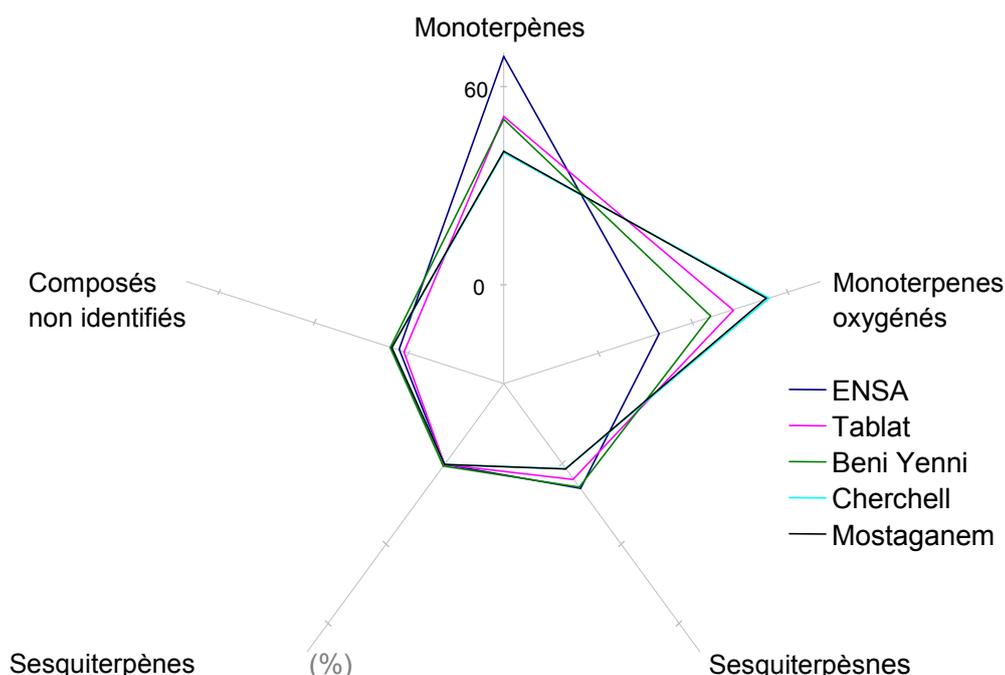


Figure 21: Diagramme en étoile représentant les différents échantillons de *R. officinalis* en fonction des familles de composés qui caractérisent leurs huiles essentielles.

3.2 Composition chimique des huiles essentielles des romarins de l'espèce *R. tournefortii*

Le tableau 09 résume l'ensemble des composés identifiés ainsi que leurs proportions pour chacune des huiles essentielles des *R. tournefortii* étudiés.

Tableau 09: Composition (%) chimique des huiles essentielles des différents échantillons de *R. tournefortii* étudiés

N°	Composés ¹	IR(HP5 ²)	Mostaganem	Bouira	Bechar	Djelfa	M'sila	Identification ³
1	Tricyclene	925	0.7	0.9	1.0	1.0	1.2	SM-IR
2	α -Thujene	930	-	0.2	-	0.1	-	SM-IR-E
3	α -Pinene	937	26.3	22.2	22.8	23.0	27.7	SM-IR-E
4	Camphene	952	25.2	21.4	22.4	22.5	26.1	SM-IR-E
5	Verbenene	967	t	t	0.1	-	-	SM-IR

6	b-Pinene	979	0.4	8.3	0.1	7.7	1.3	SM-IR-E
7	1-Octen-3-ol	980	t	t	-	-	-	SM-IR
8	b-Myrcene	991	0.5	0.8	0.7	0.7	0.8	SM-IR
9	α -Phellandrene	1004	0.2	0.6	0.2	0.5	0.3	SM-IR-E
10	δ -3-Carene	1011	t	t	-	t	t	SM-IR-E
11	α -Terpinene	1017	0.4	0.5	0.3	0.4	0.6	SM-IR-E
12	p-Cymene	1025	3.3	1.2	2.0	1.9	3.1	SM-IR-E
13	Limonene	1030	11.1	9.6	10.0	7.9	11.8	SM-IR-E
14	1-8 cineole	1032	1.9	1.9	3.1	t	t	SM-IR-E
15	cis-b-Ocimene	1038	t	0.3	t	-	t	SM-IR
16	trans-b-Ocimene	1049	t	0.1	-	t	t	SM-IR
17	γ -Terpinene	1060	0.1	0.9	0.1	0.5	0.2	SM-IR-E
18	cis-Sabinene Hydrate	1068	-	0.1	-	t	-	SM-IR
19	Terpinolene	1088	0.2	0.4	0.1	0.3	0.3	SM-IR-E
20	p-Cymenyl	1090	t	t	-	t	t	SM-IR
21	trans-Sabinene Hydrate	1097	-	0.1	-	-	-	SM-IR
22	Linalool	1099	0.1	t	-	0.1	-	SM-IR-E
23	Fenchyl alcohol	1114	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	SM-IR
24	Camphor	1144	21.7	21.9	28.5	24.9	19.8	SM-IR-E
25	Methyl-camphelinol	1145	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	SM-IR
26	Pinocarvone	1162	t	t	t	t	t	SM-IR
26	Borneol	1166	0.9	1.1	1.2	1.3	1.1	SM-IR
27	4-Terpineol	1177	0.5	0.5	0.7	0.7	0.5	SM-IR
28	p-Cymen-8-ol	1183	t	t	t	t	-	SM-IR
29	α -Terpineol	1189	0.5	0.5	0.9	0.5	0.5	SM-IR-E
30	Myrtenol	1194	0.1	t	-	t	t	SM-IR
31	trans-Carveol	1217	t	-	-	-	-	SM-IR
32	Carvone	1242	0.2	-	0.1	t	-	SM-IR
33	Bornyl acetate	1285	0.3	0.4	0.2	0.4	0.4	SM-IR-E
34	Thymol	1291	0.1	t	t	t	t	SM-IR-E
35	Carvacrol	1299	0.3	t	0.2	0.1	0.1	SM-IR-E
36	α -Cubebene	1351	-	0.1	-	t	-	SM-IR
37	Eugenol	1357	0.2	t	0.1	0.1	t	SM-IR
38	α -Ylangene	1372	0.1	0.1	0.1	t	t	SM-IR
39	α -Copaene	1376	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1	SM-IR
40	b-Bourbonene	1384	-	t	-	-	-	SM-IR
41	b-Caryophyllene	1419	0.6	1.6	0.6	1.1	0.5	SM-IR-E
42	b-Gurjunene	1432	-	0.1	-	0.1	-	SM-IR-E
43	α -Humulene	1454	0.3	0.4	0.1	0.2	0.1	SM-IR
44	(E)- b-farnesene	1457	-	t	-	-	-	SM-IR
45	γ -Muurolene	1477	0.5	0.4	0.2	0.2	0.1	SM-IR
46	Ar-Curcumene	1483	0.1	-	0.1	t	0.1	SM-IR
47	α -Muurolene	1499	0.1	0.2	0.1	0.1	t	SM-IR
48	b-Bisabolene	1509	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	SM-IR
49	γ -Cadinene	1513	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1	SM-IR

50	δ -Cadinene	1524	0.4	0.7	0.5	0.4	0.1	SM-IR
51	Cadina-1,4-diene	1532	t	0.1	t	t	t	SM-IR
52	α -Cadinene	1537	t	0.1	t	t	t	SM-IR
53	α -Calacorene	1542	0.1	0.1	0.1	0.1	t	SM-IR
54	Caryophyllene oxide	1581	0.1	0.2	0.1	0.3	0.2	SM-IR
55	Methyl jasmonate	1647	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	SM
56	α -Bisabolol	1684	0.5	0.6	0.5	0.8	1.0	SM-IR
Composés identifiés %			98.8	99.7	98.1	98.4	95.7	
Monoterpenes			68,4	67,4	59,8	66,5	73,4	
Monoterpenes oxygénés			27	26,7	35,2	28,3	22,6	
Sesquiterpene			2,7	4,7	2,3	2,7	1,2	
Sesquiterpene oxygénés			0,7	0,9	0,7	1,2	1,3	

¹composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne apolaire HP5 ; ²indice de rétention relatif aux n-alcanes C9-C17 ; ³Identification : SM, comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; E, comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; IR, comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique à celle que nous avons utilisé; t : trace (<0,05%).

L'analyse par CPG et CPG/SM nous a permit d'identifier la quasi totalité des composés présents dans les huiles des *R. tournefortii* étudiés, soit un minimum de 95,7% de composés identifiés (figure 22a et 22b).

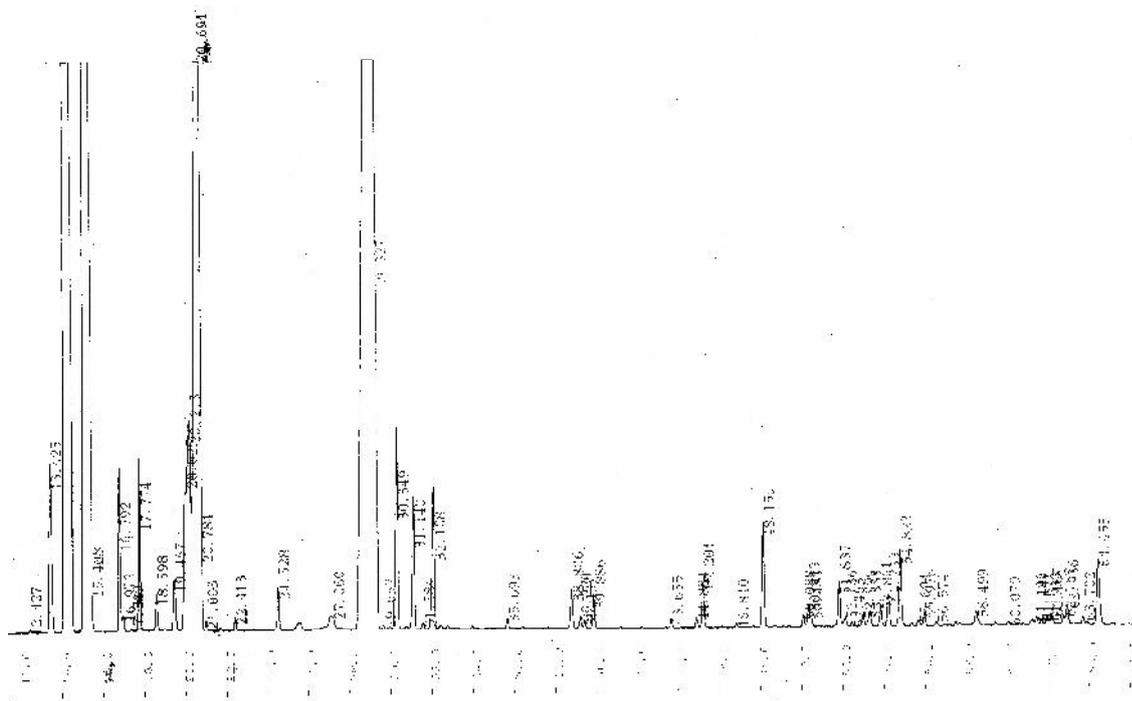


Figure 22a: Exemple de chromatogramme CPG obtenu pour l'huile essentielle de *R. tournefortii* de Bechar.

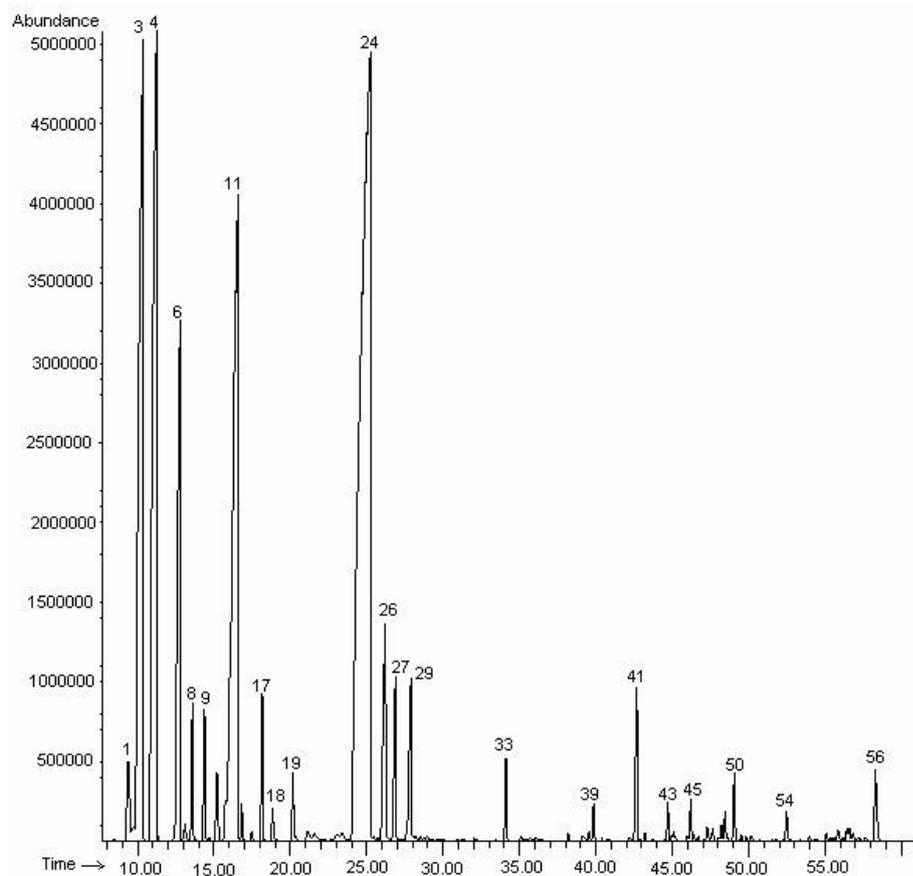


Figure 22b: Exemple de chromatogramme GPC-MS obtenu pour l'huile essentielle de *R. tournefortii* de Bouira. Les numéros sur les pics correspondent aux numéros d'ordres des composés du tableau de la composition chimique.

3.2.1 Description chimique des huiles essentielles étudiées

D'après le tableau 09, l'huile qui possède la plus grande diversité de composés est l'huile de Bouira avec 53 composés identifiés, alors que les huiles de Mostaganem, Bechar, Djelfa et M'sila se composent de 49, 42, 49 et 43 composés respectivement.

L'ensemble des huiles possèdent les mêmes composés majoritaires avec des proportions relativement variables. Il s'agit de l' α pinène (22 à 27%), le camphor (20 à 28%), le camphène (21 à 26%), et le limonène (8 à 11%). Par conséquent, ceci se reflète sur le profil des huiles qui semble très proches lorsqu'elles sont comparées en fonction des familles de composés qui les caractérisent (figure 23).

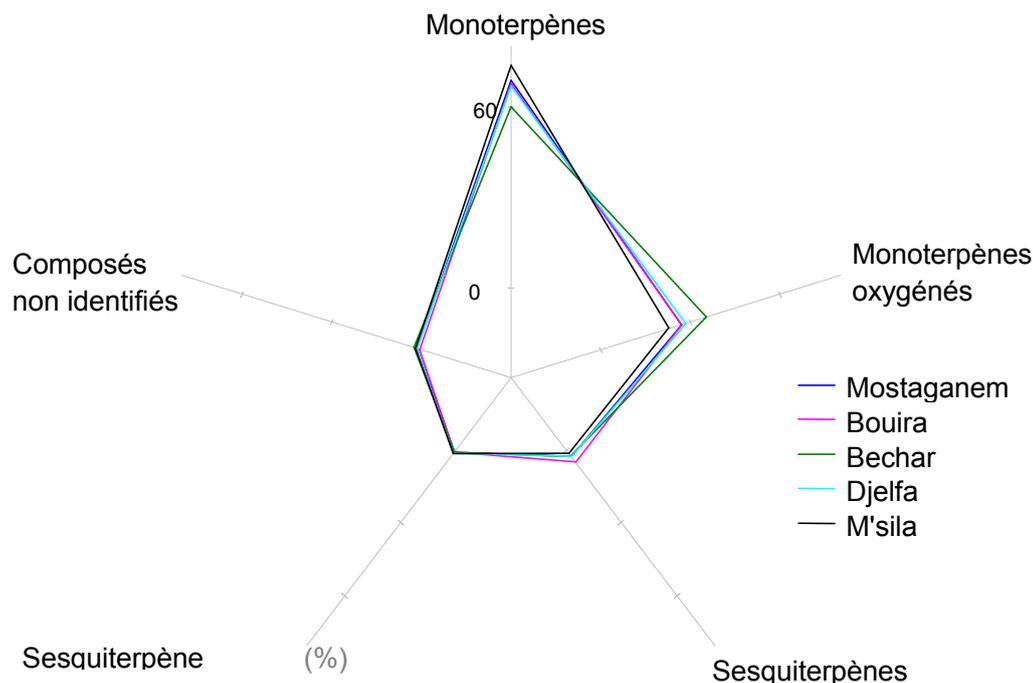


Figure 23: Diagramme en étoile représentant les différents échantillons de *R. tournefortii* en fonction des familles de composés qui caractérisent leurs huiles essentielles.

Même si les rares études effectuées en Algérie occidentale et au Maroc ont déjà identifiées ces même composés comme majoritaires dans les huiles *R. tournefortii*, leurs compositions demeurent, contrairement à nos échantillons, globalement caractérisées par une très forte proportion de camphor (environ 40%), une faible teneur en α -pinène et une absence totale de limonène (**Beneddouche et al., 2011 ; Tahri et al., 2014; 2015; Bendelaid et al., 2016**).

De plus, ces même auteurs signalent la présence du 1-8 cineole comme composé majoritaire (>10%) alors que ce dernier ne semble présent qu'en très faible proportion ou à l'état de traces dans nos échantillons.

Tel qu'il a déjà été observé chez certaines huiles de *R. officinalis* originaires du nord de la méditerranées, de Tunisie et du Maroc, on remarque que les huiles de *R. tournefortii* étudiées appartiennent à un type d'huile qui se caractérise par une proportion approximativement égale (20–30%) d' α -pinène et de camphor par opposition au type d'huile de romarin à forte teneur en 1-8 cineole (**Beneddouche et al., 2011**).

On note également que lorsque **Tahri et al. (2015)** comparent la composition chimique de *R. tournefortii* récoltés au Maroc à l'état spontané et cultivé, ces auteurs remarquent chez les

échantillons cultivés une augmentation importante de la proportion en α -pinene au détriment du camphor et du camphene avec des différences de contribution à la composition chimique totale de l'ordre de 30%. Ainsi, en comparaison aux huiles décrites par **Tahri *et al.* (2015)**, les échantillons de *R. tournefortii* semblent chimiquement intermédiaires malgré que ces derniers ont tous été récoltés à l'état spontanés.

3.2.2 Comparaison entre les huiles essentielles

En premier lieu, afin d'avoir une vue globale des différences entre les huiles en fonction de leurs compositions chimiques, une Analyse en Composante Principale (figure 24) a été réalisée.

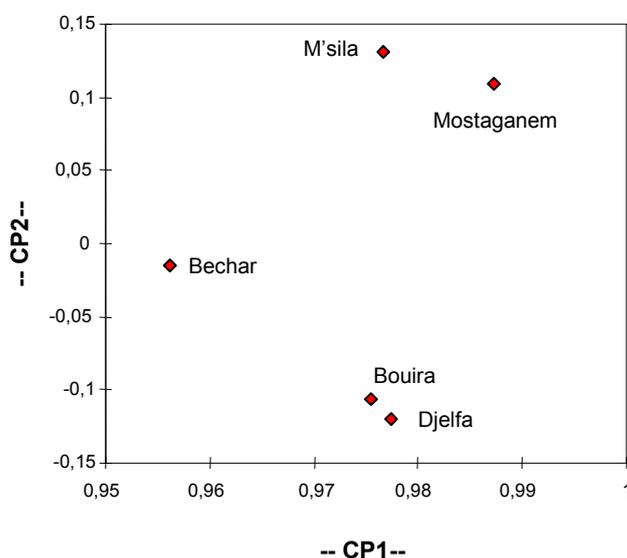


Figure 24: Analyse en Composante Principale (ACP) représentant sur les deux premiers plans (CP1 vs. CP2) les différents échantillons de *R. tournefortii* en fonction de leurs compositions chimiques.

Les deux premiers plans de l'ACP, CP1 et CP2, ont permis d'expliquer 97% des différences entre les huiles étudiées (88% pour PC1 et 9% pour PC2).

L'ACP a également permis de regrouper les huiles qui semblent les plus ressemblantes au vue de leurs compositions. De sorte que les huiles de Bouira et de Djelfa ainsi que les huiles de Mostaganem, M'sila semblent relativement proches l'une de l'autre, et que l'huile de Bechar se distingue des autres huiles.

Afin d'évaluer le degré de proximité des huiles observées par l'ACP, ces dernières ont été classées selon leur degré de ressemblance de composition chimique par une classification ascendante hiérarchique (figure 25).

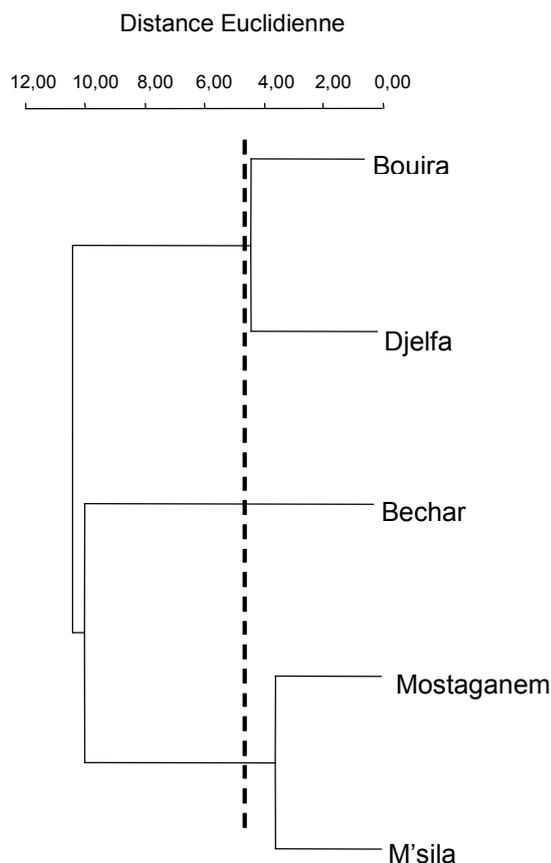


Figure 25: Dendrogramme basé sur l'analyse de proximité des différents échantillons de *R. tournefortii* en fonction de leurs compositions. La ligne hachurée représente le seuil de définition des clusters (troncature). L'analyse a été effectuée par classification ascendante hiérarchique considérant la mesure de proximité par distance Euclidienne et une agrégation par la méthode UPGMA .

Comme suggéré par les résultats de l'ACP, la CHA a permis de regrouper les huiles de *R. tournefortii* en trois cluster; le premier cluster formé par l'huile de Mostaganem et M'sila, le deuxième cluster contenant uniquement l'huile de Bechar et enfin un troisième cluster formé par l'huile de Bouira et de Djelfa qui semble au vue de leurs compositions chimiques le plus éloigné des deux premiers clusters. En d'autre terme on peut dire que l'huile de Bechar est chimiquement plus proche des l'huiles de Mostaganem /M'sila que des l'huiles de Bouira /Djelfa.

Afin d'évaluer le rôle de chaque composé dans l'estimation du degré de ressemblance de composition chimique des huiles de *R. tournefortii* étudiées, une CAH de partition de classe

de composés chimiques définissant les échantillons de *R. tournefortii* a été effectuée (figure 26 et Tableau 10).

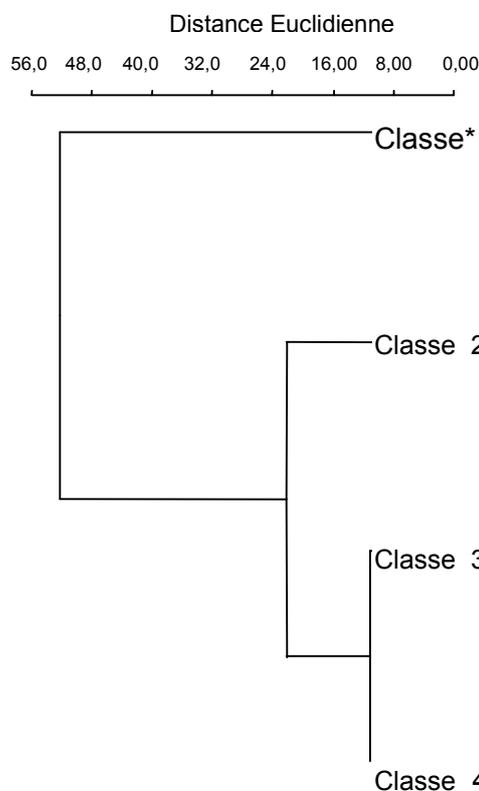


Figure 26: Dendrogramme de partition des composés chimiques (classes) définissant les différents écotypes de *R. tournefortii*. *La composition de chaque classe est représentée dans le tableau 10. L'analyse a été effectuée par classification ascendante hiérarchique considérant la mesure de proximité par distance Euclidienne et une agrégation par la méthode UPGMA.

D'après la figure 26 et le tableau 10, l' α -Pinène, le camphène, le camphor, le limonène et le β -pinène jouent un rôle de première importance dans la définition chimique de chacune des huiles de *R. tournefortii* étudiées. Les proportions des composés regroupés dans la classe 1 formées par l' α -pinène, le camphène et le camphor représentent de loin le critère le plus important dans la définition de l'identité chimique des huiles de *R. tournefortii* étudiées. Le critère de seconde importance est le limonène, alors que le β -pinène a à lui seul le même poids statistique dans la définition du degré de ressemblance des huiles (figure 25) que les 52 autres composés regroupés dans la classe 4.

Tableau 10: Partition des classes de composés chimiques définissant les écotypes de *R. tournefortii* telles qu'obtenues par la classification ascendante hiérarchique.

Classe 1 [3]*	Classe 2 [1]	Classe 3 [1]	Classe 4 [52]
α -Pinene	Limonene	b-Pinene	Tricyclene
Camphene			α -Thujene
Camphor			Verbenene
			1-Octen-3-ol
			b-Myrcene
			α -Phellandrene
			δ -3-Carene
			α -Terpinene
			p-Cymene
			1-8 Cineole
			cis-b-Ocimene
			trans-b-Ocimene
			γ -Terpinene
			cis-Sabinene Hydrate
			Terpinolene
			p-Cymenyl
			trans-Sabinene Hydrate
			Linalool
			Fenchyl alcohol
			Methyl-camphelinol
			Pinocarvone
			Borneol
			4-Terpineol
			p-Cymen-8-ol
			α -Terpineol
			Myrtenol
			trans-Carveol
			Carvone
			Bornyl acetate
			Thymol
			Carvacrol
			α -Cubebene
			Eugenol
			α -Ylangene
			α -Copaene
			b-Bourbonene
			b-Caryophyllene
			b-Gurjunene
			α -Humulene
			(E)- b-farnesene
			γ -Muurolene
			Ar-Curcumene
			α -Muurolene
			b-Bisabolene
			γ -Cadinene
			δ -Cadinene
			Cadina-1,4-diene
			α -Cadinene
			α -Calacorene
			Caryophyllene oxide
			Methyl jasmonate
			α -Bisabolol

*nombre de composés par classe

4. Rendement en extraits

Le tableau 11 représente les rendements en extraits des différents échantillons de *R. officinalis* et *R. tournefortii* étudiés exprimés en pourcentage (g extrait/100g matière végétale).

Tableau 11 : Rendements en extraits des différents échantillons de *R. officinalis* et *R. tournefortii*

Espèce	Origine géographique	Rendement (%)
<i>R. officinalis</i>	ENSA	39,60
	Tablat	20,60
	Beni Yenni	22,60
<i>R. tournefortii</i>	Mostaganem	31,38
	Bouira	29,14
	Bechar	31,90
	Djelfa	26,00
	M'sila	28,63

D'après le tableau 11, l'extraction par soxhlet a permis d'obtenir des quantités appréciables en extraits éthanoliques. On remarque que pour les échantillons de *R. officinalis* c'est le romarin de l'ENSA qui enregistre le plus fort rendement avec environ 40%, alors que pour les échantillons de *R. tournefortii* c'est le romarin de Mostaganem qui permet le plus fort rendement avec 31.4%.

La différence de rendement en extraits des romarins étudiés peut être attribuée à la disponibilité des différents composés extractibles définis d'une part, par la composition chimique des feuilles de romarin, c'est à dire les facteurs génétiques dont l'espèce, et d'autre part par les conditions pédoclimatiques (nature du sol, climat, altitude, exposition, etc...) (**Hsu et al., 2006 ; Sultana et al., 2007 ; Babovic et al., 2010**).

Cependant, il n'existe pas dans la littérature de modèles prédictifs des rendements utilisant la composition chimique d'une plante donnée (**Maisuthisakul et al., 2008**) même si de précédentes études rapportent que les plantes ayant des rendements élevés en extraits contiennent une forte teneur en composés phénoliques (**Lehtinen et Laakso, 1998 ; Borneley et Peyrat-Maillard, 2000**).

5. Teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits obtenus

La teneur en phénols totaux ainsi qu'en flavonoïdes des différents échantillons de *R. officinalis* et *R. tournefortii* a été déterminée par des méthodes colorimétriques utilisant respectivement l'acide gallique (méthode de Folin ciocalteu) et la quercitrine (méthode au trichlorure d'aluminium) comme étalons. Les figures 27 et 28 représentent les courbes d'étalonnages utilisées pour le dosage des phénols totaux et des flavonoïdes, respectivement.

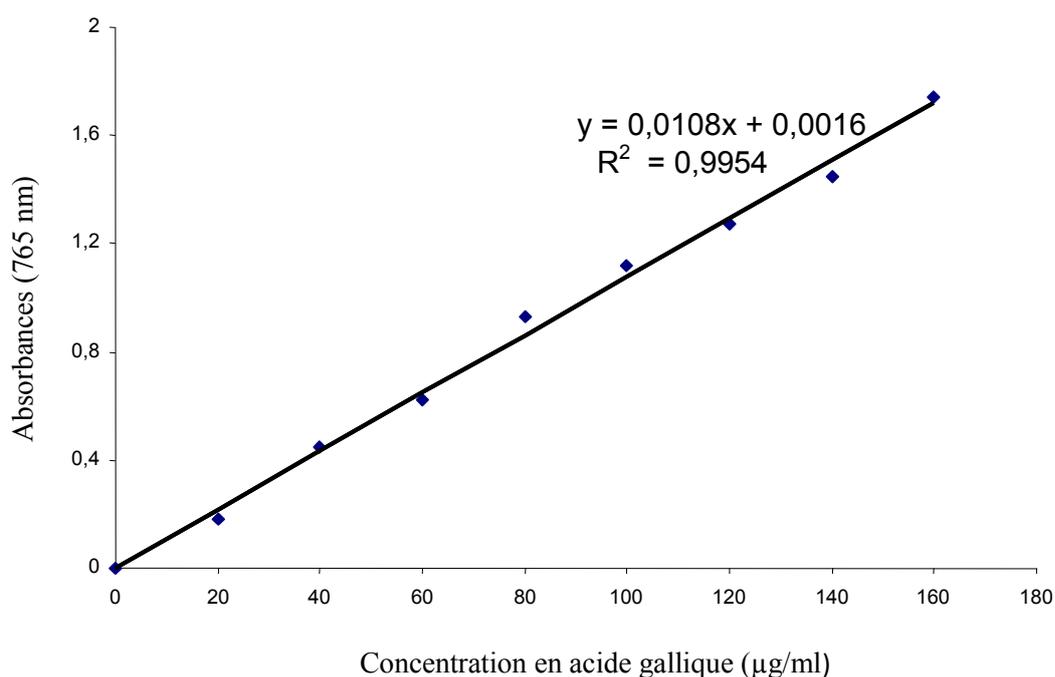


Figure 27: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique utilisé pour le dosage des phénols totaux

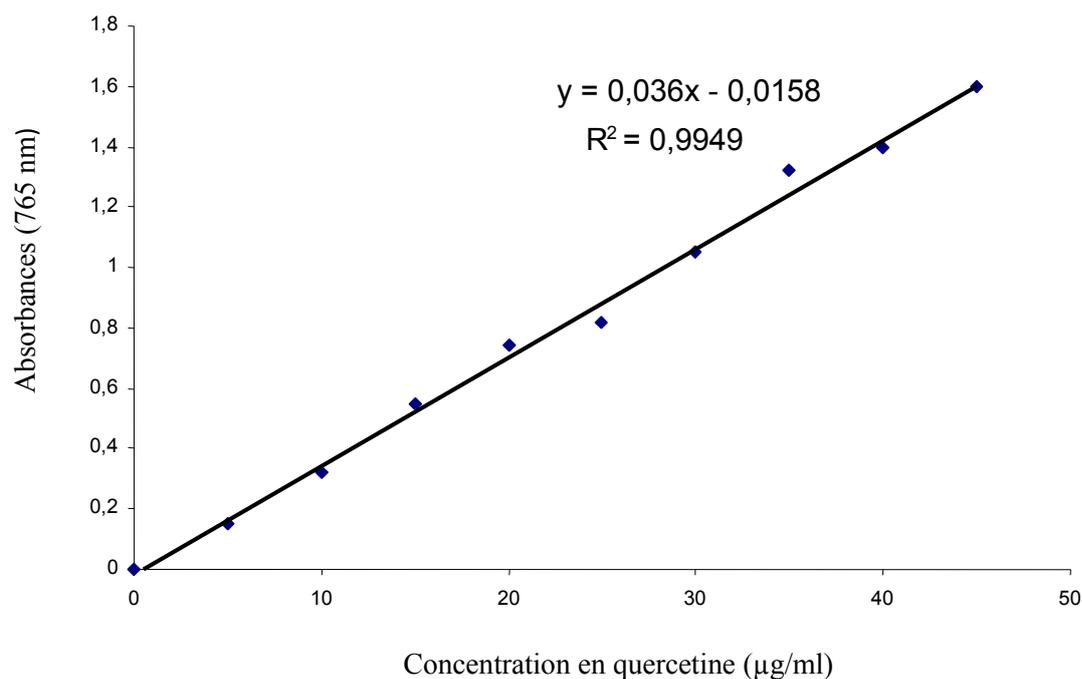


Figure 28: Courbe d'étalonnage de la quercétine utilisé pour le dosage des flavonoïdes

Le tableau 12 représente les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits des différents échantillons de *R. officinalis* et *R. tournefortii* étudiés.

Tableau 12: Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des différents extraits de *R. officinalis* et *R. tournefortii*

Espèce	Origine géographique	Teneur en phénol totaux (mg eq. ag/g) ¹	Teneur en flavonoïdes (mg eq. qr /g extrait) ²
<i>R. officinalis</i>	ENSA	46,27±5,2	5,47±1,2
	Tablat	37,27±3,3	3,81±0,4
	Beni Yenni	40,86±4,0	4,51±0,1
<i>R. tournefortii</i>	Mostghanem	147,77±2,95	27,85±0,31
	Bouira	60,04±1,39	23,98±0,55
	Bechar	96,15±1,15	20,74±0,35
	Djelfa	121,07±2,77	23,61±0,31
	M'sila	65,75±1,27	20,00±0,53

¹Teneurs exprimées en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait de romarin.

²Teneurs exprimées en mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait de romarin.

On remarque d'après le tableau 12 que les teneurs en phénol totaux et en flavonoïdes obtenues chez l'ensemble des échantillons de *R. tournefortii* sont nettement plus élevés que celle obtenues par les échantillons de *R. officinalis*. Cette différence de teneurs semble être dans le même ordre de grandeur que celle enregistrée dans plusieurs études effectuées sur *R. officinalis* et *R. tournefortii* en Algérie et dans le reste de la méditerranée (**Yesil Celiktas et al., 2007a ; Menaceur et Hazzit, 2014 ; Benbelaid et al., 2016**).

Comme cela a été démontré dans diverses études (**Saenz-Lopez et al., 2002 ; Samotyja et Malecka, 2007**), la forte teneur en phénols totaux des extraits de romarin est attribuée aux proportions importantes de certains composés phénoliques de cette plante tels que : l'acide carnosique, le carnosol, l'acide rosmarinique, le rosmanol et l'epirosmanol.

Etant donné que les flavonoïdes sont considérés comme une sous classe des composés phénoliques, il est par conséquent logique que la teneur en phénols totaux des extraits soit directement reliée à leur teneur en flavonoïdes et explique ainsi que nous obtenons quasiment toujours la même hiérarchisation des teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux dans nos échantillons.

On note cependant, que même si les teneurs en phénols totaux obtenues dans notre étude pour le *R. officinalis* sont équivalentes à celles décrite par **Dorman et al. (2003), Chen et al. (2007)**, la proportion en flavonoïdes représente moins de 10% environ des phénols totaux, alors que ces mêmes auteurs enregistrent des proportions supérieures à 50%.

Cependant, les proportions en phénols totaux/flavonoïdes enregistrées chez nos échantillons de *R. tournefortii* sont de même ordre de grandeur que celles obtenues sur les *R. tournefortii* originaires de Tablat et de Tlemcen (**Menaceur et Hazzit, 2014 ; Benbelaid et al., 2016**).

En plus des facteurs purement génétique liées à l'espèce, les teneurs en phénols totaux du romarin de différentes provenances s'expliqueraient, par des facteurs environnementaux tels que le climat, l'altitude, l'exposition etc...., qui influenceraient directement sur le métabolisme de la production des composés phénoliques (métabolites secondaires) cité précédemment (**Wojdyło et al., 2007 ; Yesil Celiktas et al., 2007 a**).

Il faut cependant noter, qu'en plus des facteurs intrinsèques à la plante influençant la teneur en phénols totaux, les conditions et les méthodes d'extraction affectent directement la concentration finale en composés phénoliques (**Albu et al., 2004 ; Wada et al., 2004**). A titre d'exemples, les extraits méthanoliques obtenus avec des feuilles séchées dont les extraits bruts sont prétraités avec un procédé incluant l'acide chlorhydrique ont des teneurs en phénols

totaux de 185 mg eq.ag /g (Kosar *et al.*, 2005), alors que la teneur en phénols totaux des extraits de romarin obtenus à partir des feuilles fraîches est la plus faible enregistrée avec environ 2,19 mg eq.ag /g (Zheng et Wang, 2001).

6. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits de romarins étudiés

Les capacités antioxydantes des différents huiles et extraits obtenus à partir des romarins *officinalis* et *tournefortii* ont été évaluées par trois méthodes complémentaires largement utilisées pour leurs fiabilités et répétabilités. Il s'agit de la capacité de piégeage des radicaux DPPH et ABTS ainsi que le pouvoir réducteur du fer ferrique (Benchabane *et al.*, 2015).

6.1. Activité de piégeage des radicaux DPPH et ABTS des différentes huiles essentielles des romarins étudiés

Les résultats de l'évaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH et ABTS par les différentes huiles essentielles de *R. officinalis* et *tournefortii* étudiées sont résumés dans les (figures 29 et 30), respectivement.

D'après la figure 29, on remarque que l'activité de piégeage du radical DPPH des différentes huiles essentielles augmente proportionnellement avec l'augmentation des concentrations en huiles mises en présence.

On observe, que l'activité de piégeage du radical DPPH par le BHT est nettement plus importante que celle des différentes huiles essentielles quelque soit les concentrations considérées ; même si ces huiles montrent des activités observables. En effet, à faibles concentrations, les huiles des *R. tournefortii* semblent présenter une activité de piégeage nettement plus faible que les huiles du *R. officinalis* étant donné que la première concentration d'huile de *R. tournefortii* permettant de remarquer une activité est de 800 mg/l (figure 29 B). Ce n'est qu'aux concentrations plus fortes (≥ 1000 mg/l) que les activités de piégeage deviennent équivalentes à celles enregistrées par *R. officinalis*.

De plus, l'évaluation de la capacité de piégeage du radical DPPH par la détermination de la concentration minimale inhibant 50% des radicaux libres (IC_{50}), montre qu'aucune des huiles n'a pu atteindre un seuil d'inhibition de 50% des radicaux; et ceci même à de très fortes concentrations (1000 et 2000 mg/l).

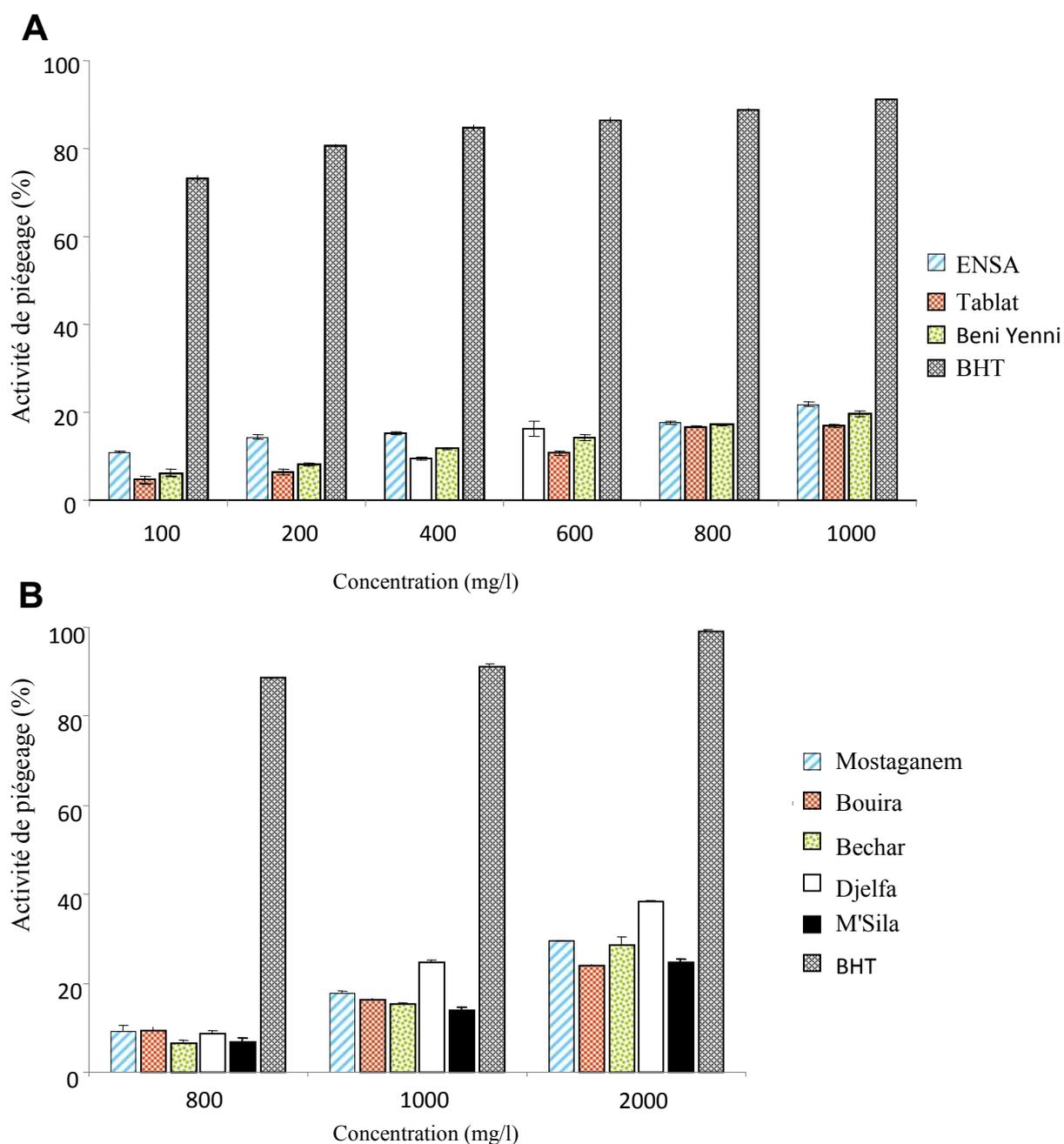


Figure 29: Activité de piégeage du radical DPPH par les différentes huiles essentielles de *R. officinalis* (A) et *turnefortii* (B) comparée au BHT.

L'ensemble des conclusions tirées après l'évaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH ont pu également être confirmées par l'évaluation de l'activité de piégeage du radical ABTS (figure 30) de telle sorte qu'aucune des huiles n'a pu atteindre un seuil d'inhibition de 50% des radicaux; même si les huiles des *R. officinalis* semblent présenter, à faibles

concentrations, une activité de piégeage relativement plus intéressante que les huiles de *R. tournefortii*.

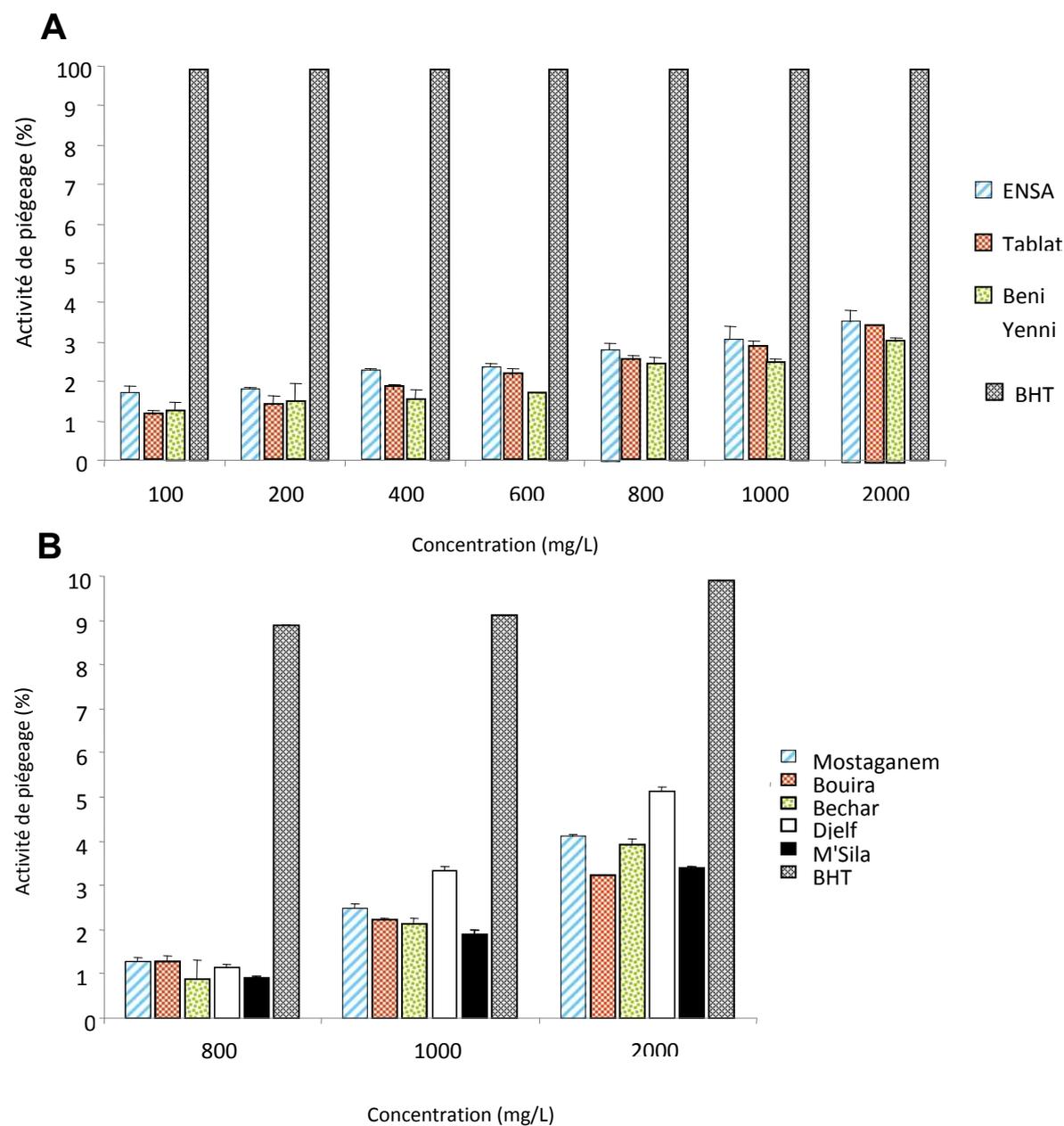


Figure 30: Activité de piégeage du radical ABTS par les différentes huiles essentielles de *R. officinalis* (A) et *tournefortii* (B) comparé au BHT.

Les résultats obtenus dans cette partie de notre étude semblent confirmer les observations de différents auteurs qui reportent que la capacité d'une huile essentielle pour réduire le DPPH ou l'ABTS dépend essentiellement de sa capacité donneur d'hydrogène, elle même directement liée à l'abondance de composés monoterpènes et monoterpènes oxygénés (**Tahri et al., 2015**). De ce fait, la teneur ainsi que la nature des composés majoritaires est déterminantes de l'intensité de piégeage. **Wang et al. (2008)**, remarquent une corrélation de l'activité de piégeage du radical DPPH de l'huile essentielle de romarin avec la teneur de certains composés tels que l' α -pinène, β -pinène et la 1-8 cinéole. Par conséquent, la relative meilleure activité de piégeage du radical DPPH et ABTS de l'huile essentielle du *R. officinalis* de l'ENSA, pourrait être liée à sa très forte teneur en α -pinène (51,8%).

Cependant, la teneur de quelques composés majoritaires ne peut expliquer à elle seule ces différences d'activités, car chaque huile contient un mélange complexe de différents composés. De plus les composés présents en faible concentration pourraient contribuer significativement à l'activité de l'huile essentielle (**Wang et al., 2008**).

6.2. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS des différents extraits des romarins étudiés

Les résultats de l'évaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH et ABTS par les différents extraits de *R. officinalis* et *tournefortii* étudiés sont résumés dans les figures 31 et 33, respectivement.

D'après la figure 31, les mêmes tendances observées lors de l'évaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH des différentes huiles sont observées pour les extraits (augmentation proportionnelle des activités de piégeage avec l'augmentation des concentrations en extraits) ; avec cependant une différence nette de supériorité des intensités de piégeage des extraits.

On remarque également que l'activité de piégeage des extraits du *R. tournefortii* est globalement plus forte que celle du *R. officinalis*.

Aux concentrations inférieures ou égales à 20 mg/l, les activités de piégeages du radical DPPH de l'extrait du *R. officinalis* de l'ENSA ainsi que celui de Mostaganem sont les plus importantes. Cependant, aux fortes concentrations (supérieures 50 mg/l) on remarque que ces écarts s'amenuisent.

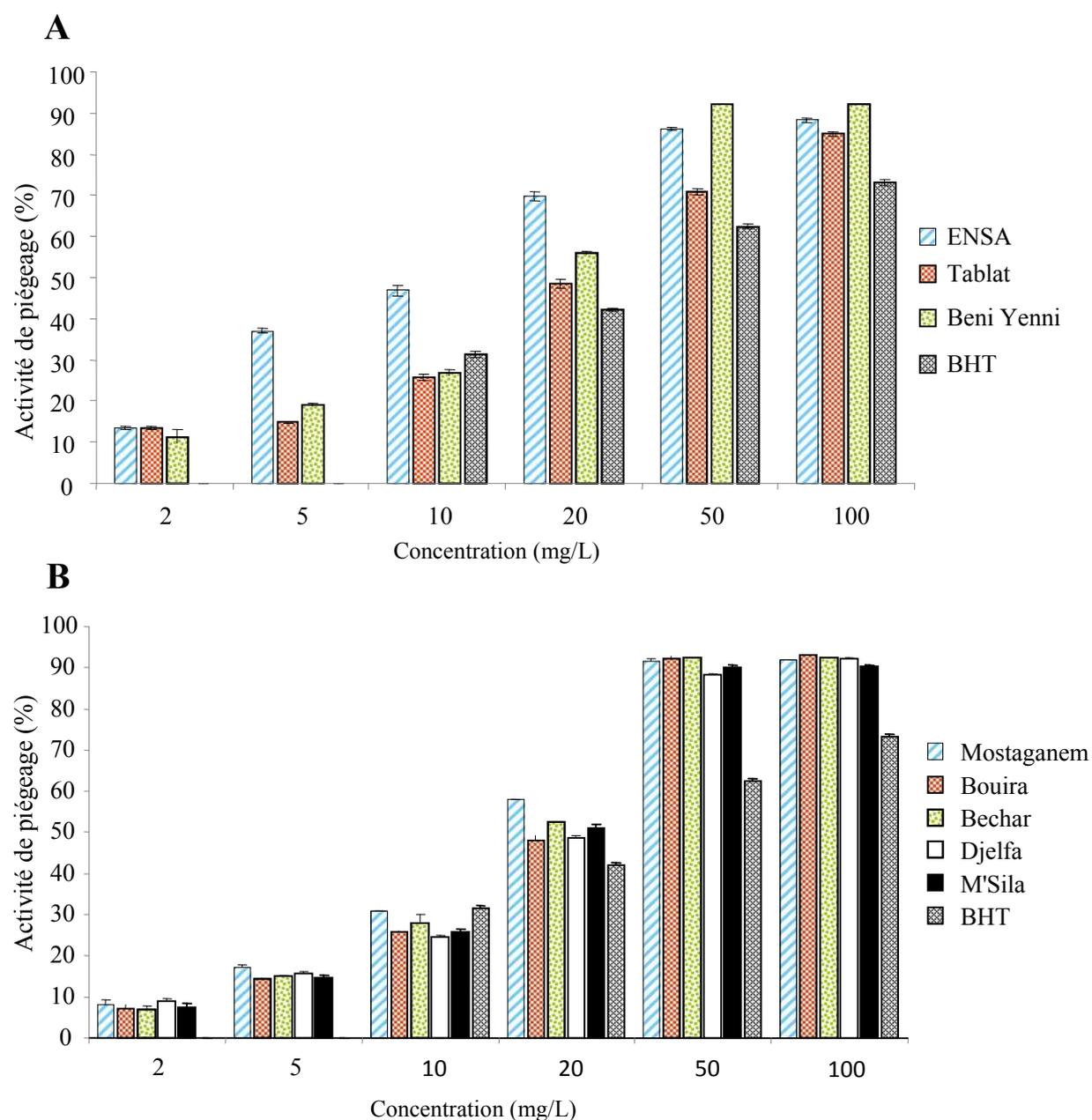


Figure 31: Activité de piégeage du radical DPPH par les différents extraits de *R. officinalis* (A) et *turnefortii* (B) comparé au BHT.

De manière générale, pour l'ensemble des extraits étudiés, une activité de piégeage plus élevée que celle du BHT a été observée, avec une large supériorité de l'extrait du *R. officinalis* de l'ENSA, alors que le pouvoir de piégeage des extraits du *R. tournefortii* semble globalement équivalent.

La détermination des $IC_{50-DPPH}$ des différents extraits et du BHT (figure 32), permet de conforter l'ensemble de nos observations. Etant donné que les plus faibles valeurs d' $IC_{50-DPPH}$

indiquent les plus grandes activités antioxydantes, on conclut d'une part que les extraits du *R. officinalis* de l'ENSA et de *tournefortii* de Mostaganem possèdent de loin les plus fortes activités ($IC_{50-DPPH} = 10,4$ et $14,9$ mg/l respectivement), et que hormis le *R. officinallis* de l'ENSA, les *R. tournefortii* ont des activités globalement plus intéressantes que les extraits de *R. officinalis* étudiés; et d'autre part que l'ensemble des extraits étudiés disposent d'une plus grande activité antioxydante par rapport à celle du BHT ($IC_{50-DPPH} = 28$ mg/l).

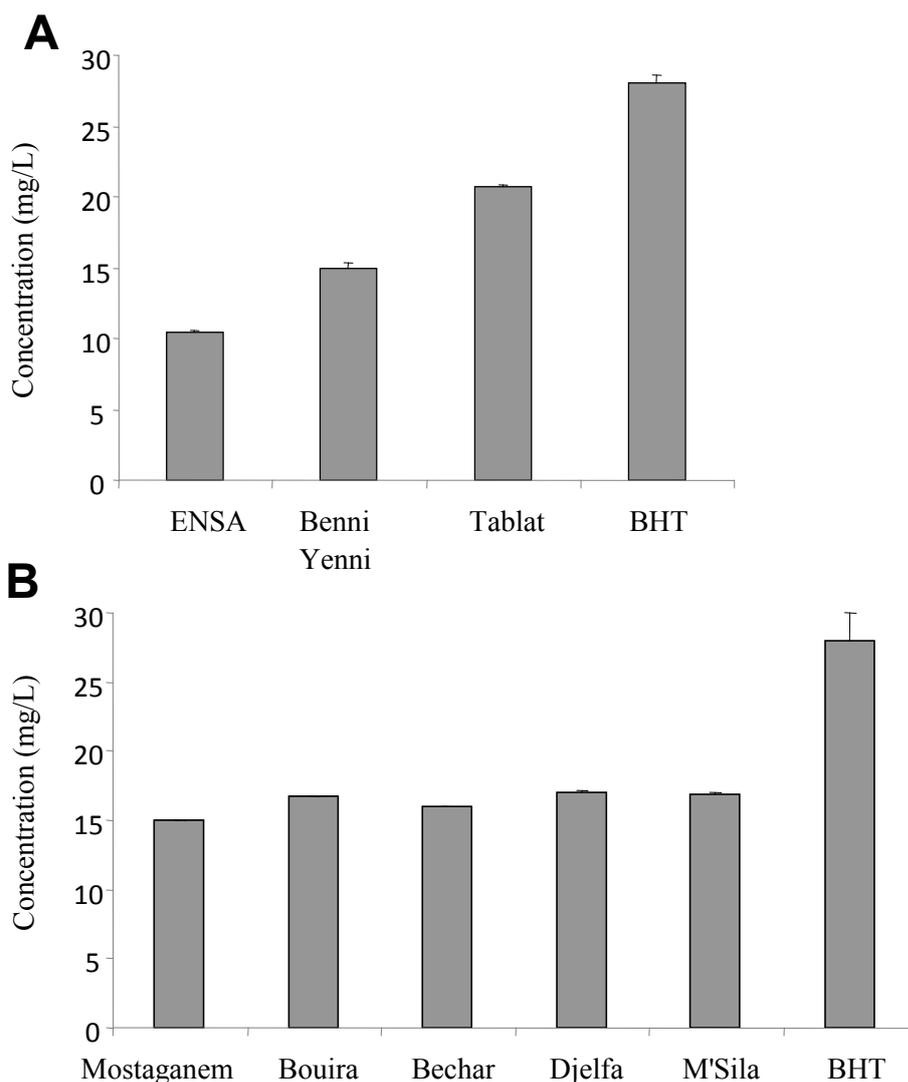


Figure 32: $IC_{50-DPPH}$ des différents extraits de *R. officinalis* (A) et *tournefortii* (B) et du BHT

L'ensemble des conclusions tirées après l'évaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH, ont pu également être confirmées par l'évaluation de l'activité de piégeage du radical ABTS (figure 33), de tel sorte que l'ensemble des extraits étudiés ont une activité de piégeage du radical ABTS plus élevée que celle du BHT avec une supériorité de l'extrait du *R.*

officinalis de l'ENSA et de l'extrait de *R. tournefortii* de Mostaganem, et que les activités de piégeage du radical ABTS des différents extraits de *R. tournefortii* semblent globalement proches.

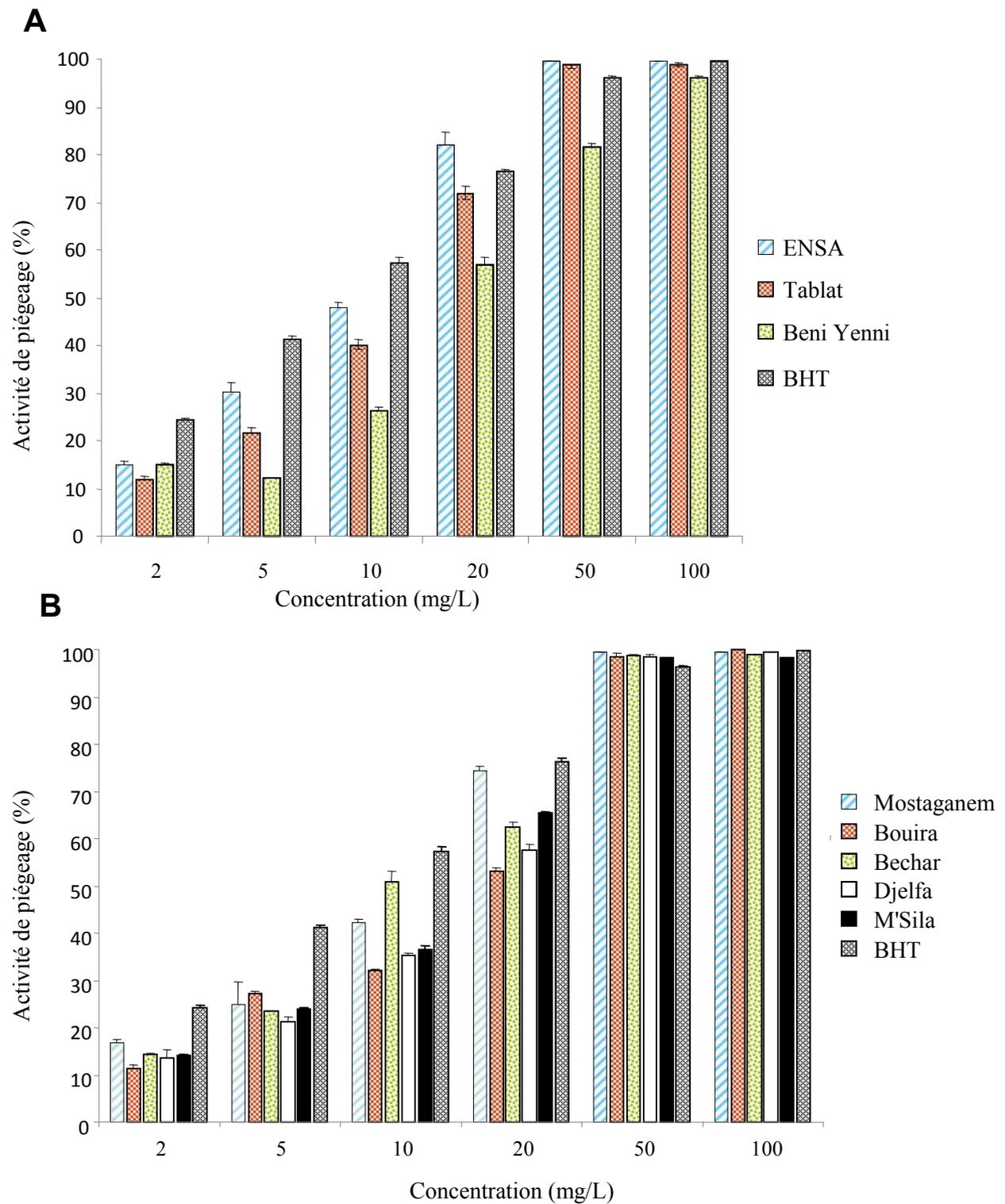


Figure 33: Activité de piégeage du radical ABTS par les différents extraits de *R. officinalis* (A) et *tournefortii* (B) comparé au BHT.

Dans le même sens, la détermination des $IC_{50-ABTS}$ des différents extraits et du BHT (figure 34), conforte l'ensemble de nos observations précédentes. Ainsi, les extraits de *R. officinalis* de l'ENSA et de *tournefortii* de Mostaganem possèdent de loin les plus fortes activités ($IC_{50-ABTS} = 8,8$ et $9,9$ mg/l respectivement) et que les *R. tournefortii* ont des activités de piégeage ABTS voisines ($IC_{50-ABTS}$ entre 10 et 12.5 mg/l). De plus, l'ensemble des extraits étudiés disposent d'une plus grande activité antioxydante par rapport à celle du BHT ($IC_{50-ABTS} = 18.5$ mg/l).

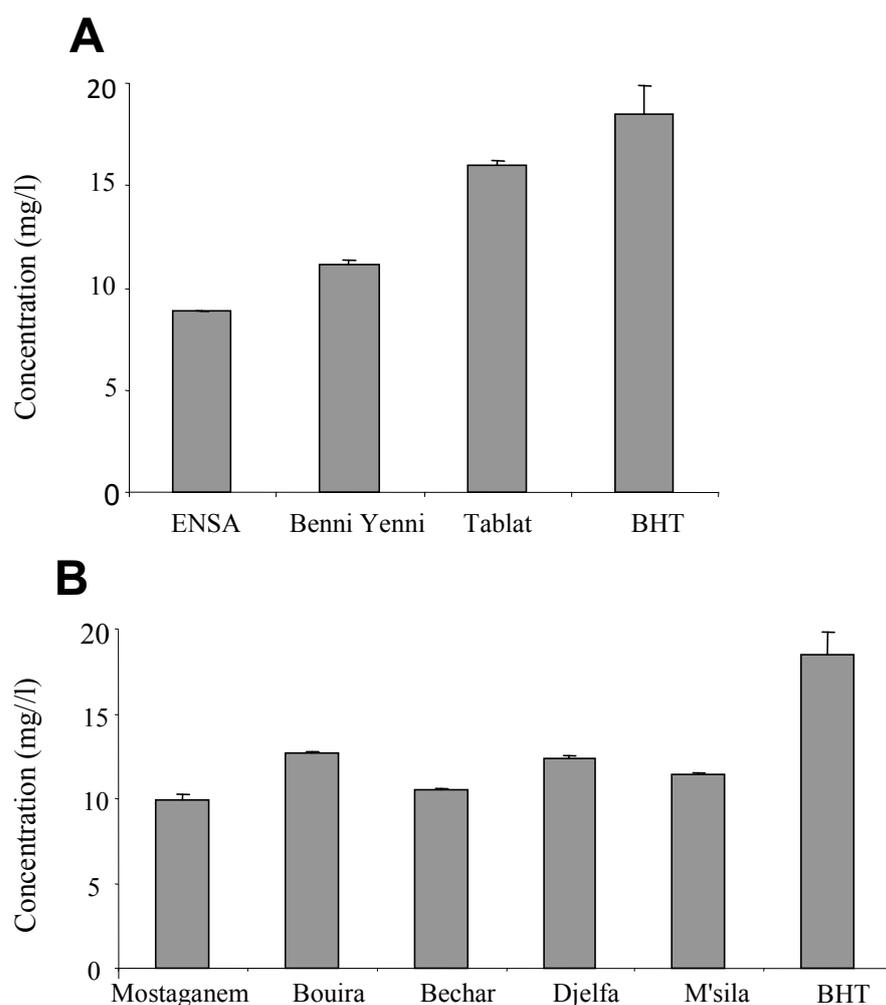


Figure 34: $IC_{50-ABTS}$ des différents extraits de *R. officinalis* (A) et *tournefortii* (B) et du BHT.

Tel que nous l'avons constaté dans notre étude, divers travaux montrent le fort pouvoir antioxydant des extraits des *R. officinalis* et *tournefortii*, et lient ce pouvoir à leur forte teneur en phénols totaux et en flavonoïdes (Zheng et Wang, 2001 ; Caillet *et al.*, 2007 ; Erkan *et al.*, 2008 ; Babovic *et al.*, 2010, Menaceur et Hazzit, 2014). En effet, on enregistre une

corrélation significative à hautement significative (Tableau 13) entre l'augmentation de l'intensité du pouvoir de piégeage (exprimée par la baisse des IC_{50}) et l'augmentation de la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes de chaque extrait.

Tableau 13: Coefficients de corrélations (r) montrant la relation entre l'intensité du pouvoir de piégeage et la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits de romarins étudiés

	Teneur en phénols totaux	Teneur en flavonoïdes
$IC_{50-DPPH}$ extrait <i>R. officinalis</i>	-0.97**	-0.98**
$IC_{50-DPPH}$ extrait <i>R. tournefortii</i>	-0.71*	-0.68*

*Hautement significatif

**Très hautement significatif

La capacité des flavonoïdes ainsi que des phénols totaux à piéger les radicaux libres s'explique par leurs structures chimiques comportant un nombre important d'atomes d'hydrogène, des groupements hydroxylés, des noyaux phényles qui seraient capables de capter les radicaux libres en démobilisant leurs électrons célibataires (Calliste *et al.*, 2001, Torres de Pinedo *et al.*, 2007 ; Wojdyło *et al.*, 2007).

Tawaha *et al.* (2007) ; Torres de Pinedo *et al.* (2007) Erkan *et al.* (2008), expliquent que le pouvoir antioxydant des extraits dépend du nombre et de la nature des groupements phénoliques présents dans l'extrait. Les flavonoïdes et les autres phénols totaux tels que le carnosol, l'acide rosmarinique et l'acide carnosique, sont les principaux composés dont la teneur a été directement liée au pouvoir antioxydant (Schwarz *et al.*, 2001 ; Saenz-Lopez *et al.*, 2002 ; Cosio *et al.*, 2006 ; Wei et Ho, 2006 ; Romano *et al.*, 2009).

Les travaux de Cuvelier *et al.* (1996), ont révélé que 90% de l'activité antioxydante des extraits de romarin serait due à sa teneur en acide carnosique et au carnosol.

La variabilité des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes, déterminante du pouvoir de piégeage, est elle-même liée à la variabilité relative des écotypes dont les extraits sont issus (Yesil Celiktas *et al.*, 2007 a). Cette variabilité en composition chimique des écotypes (et donc du pouvoir de piégeage du radical DPPH et ABTS) est dépendante des facteurs génétiques et environnementaux (climat, altitude, latitude, etc...) dans lesquels évolue la plante (Shan *et al.*, 2005 ; Wojdyło *et al.*, 2007).

6.3. Pouvoir réducteur des différentes huiles essentielles des romarins étudiés

Le pouvoir réducteur mesure la capacité de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}), donc la mesure de l'aptitude d'une huile essentielle ou d'un extrait à interagir avec les

espèces chimiques réactives en tant que donneur d'électrons tels que les radicaux libres. Ces radicaux ainsi réduits deviennent plus stables.

L'ensemble des estimations du pouvoir réducteur des différentes huiles essentielles de *R. officinalis* et *tournefortii* étudiées sont représentées dans la figure 35.

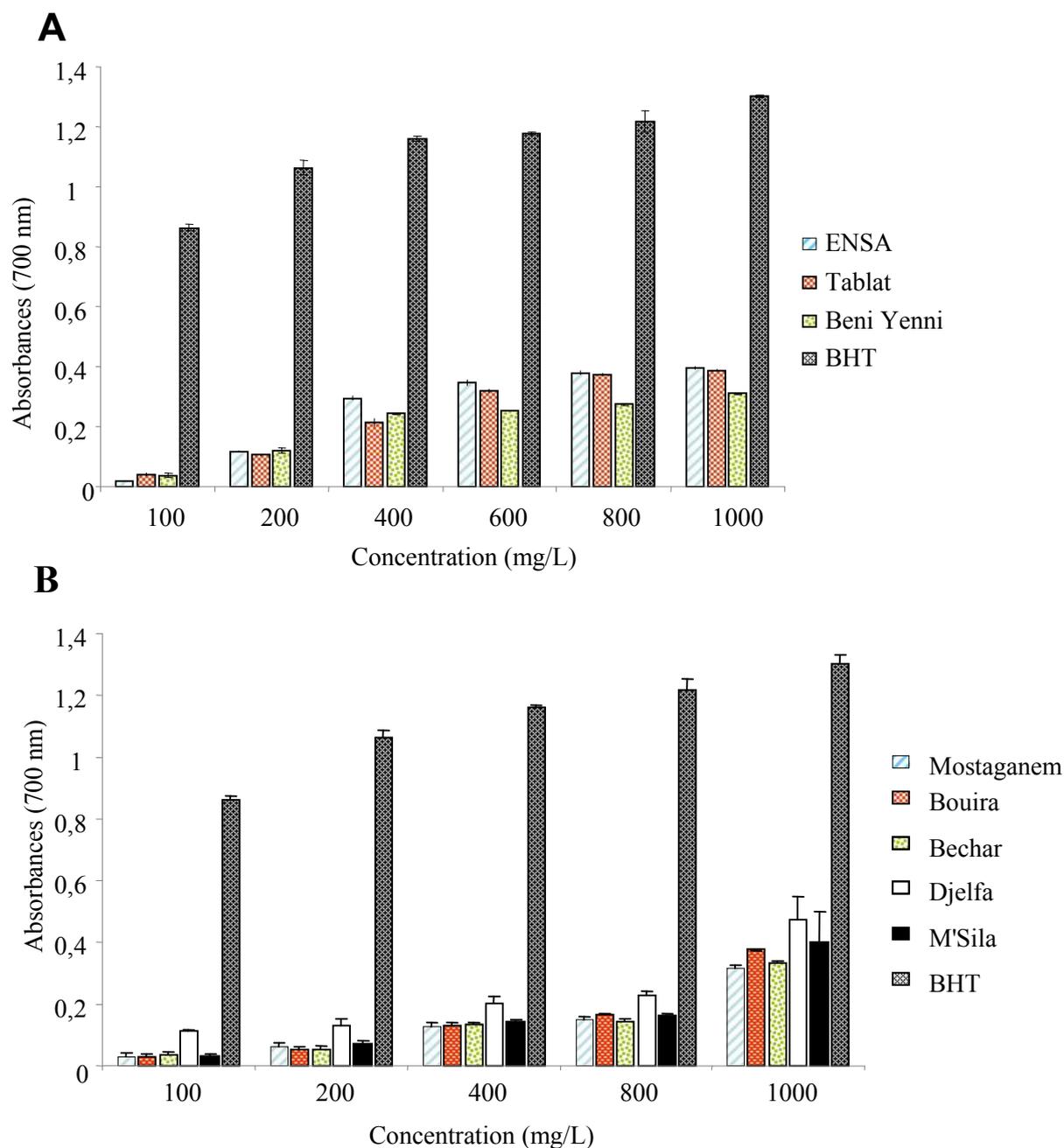


Figure 35: Pouvoir réducteur des différentes huiles essentielles de *R. officinalis* (A) et *tournefortii* (B) comparé au BHT.

D'après la figure 35, on remarque que le pouvoir réducteur de l'ensemble des huiles essentielles augmente proportionnellement avec leurs concentrations, de même que pour le BHT.

A première vue, le BHT apparaît comme ayant un pouvoir réducteur largement plus élevé que les différentes huiles essentielles étudiées quelles que soient leurs concentrations.

Cependant, hormis pour la concentration de 100mg/l où le pouvoir réducteur de l'ensemble des huiles essentielles semble faible au regard du pouvoir réducteur du BHT, aux valeurs supérieures, ces huiles montrent des activités notables.

De plus, même si les huiles des *R. tournefortii* semblent présenter à très fortes concentrations (1000mg/l) un pouvoir réducteur légèrement supérieur à celui enregistré par les *R. officinalis*, ces huiles demeurent moins performantes aux concentrations plus faibles. En effet, à partir de la concentration de 600mg/l, les huiles des *R. officinalis* semblent avoir déjà atteint leur pouvoir réducteur maximum (figure 35A), alors que les huiles des *R. tournefortii* n'atteignent ces mêmes seuils qu'à une concentration de 1000mg/l (figure 35B). On note cependant que l'huile de *R. tournefortii* de M'sila se distingue des autres huiles de la même espèce par un pouvoir réducteur équivalent à celui des *R. officinalis* étudiés.

Plusieurs auteurs attribuent le pouvoir réducteur des huiles essentielles à la présence de composés phénoliques (donneurs d'électrons) dans ces dernières (**Dorman et al., 2003**). Le faible pouvoir de nos huiles pourrait donc être partiellement expliqué par leurs faibles teneurs en composés phénoliques. Cependant la capacité réductrice enregistrée pourrait être attribuée à d'autres types de composés ayant l'aptitude de céder des électrons appelés reductones (**Duh, 1998**). Ces dernières correspondent à l'ensemble des substances dont la structure chimique contient des fonctions énols issues de l'enolisation des composés cétoniques.

6.4. Pouvoir réducteur des différents extraits des romarins étudiés

Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur des différents extraits rapportés dans la figure 36.

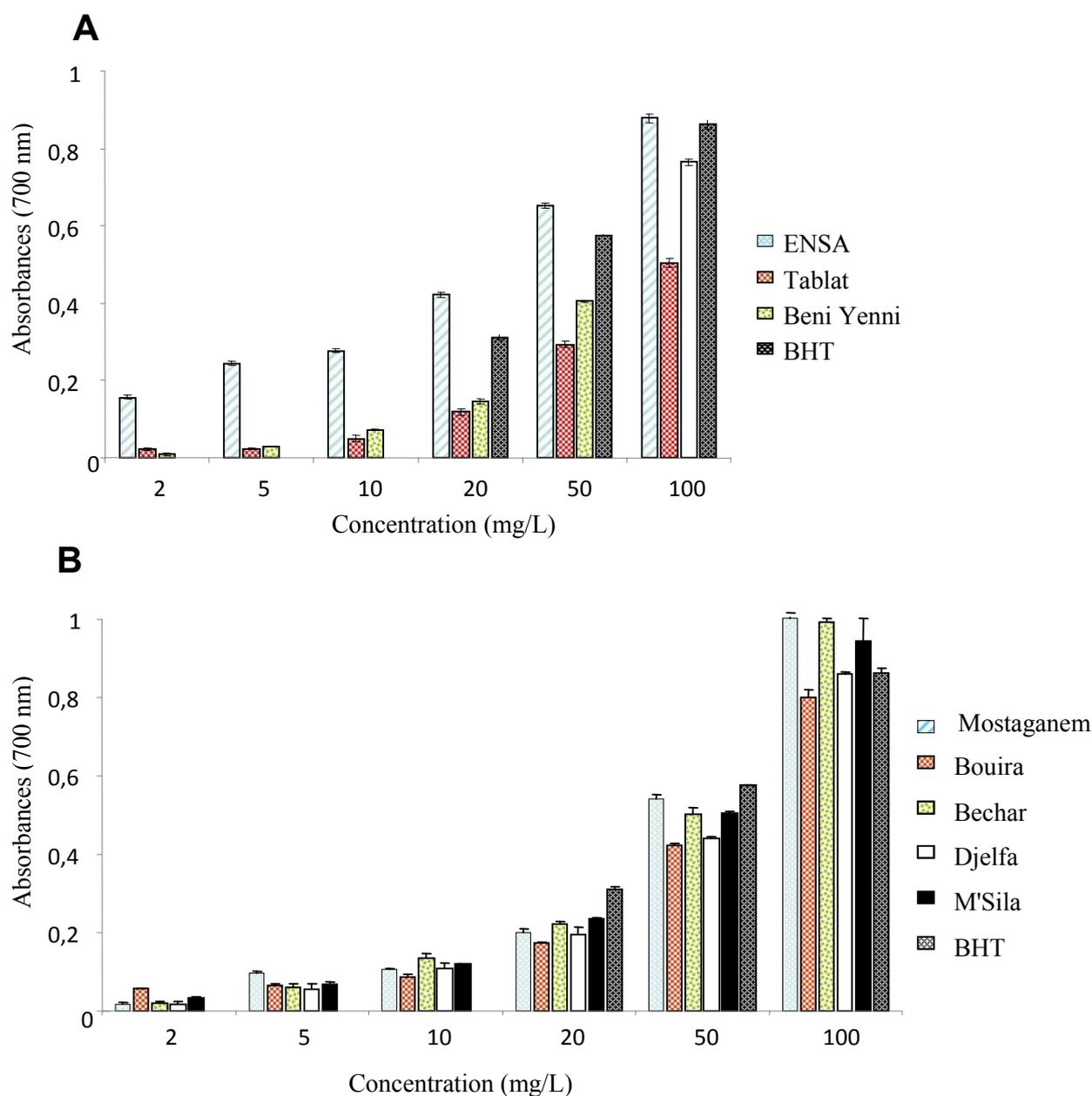


Figure 36: Pouvoir réducteur des différents extraits de *R. officinalis* (A) et *tournefortii* (B) comparé au BHT.

D'après la figure 36, les mêmes tendances observées lors de l'évaluation du pouvoir réducteur des différentes huiles sont observées pour les extraits (augmentation proportionnelle du pouvoir réducteur à l'augmentation des concentrations en extraits) ; avec cependant une différence nette de supériorité des intensités réductrices des extraits. Ceci devient d'autant plus prononcé aux concentrations supérieures à 20mg/l.

On remarque également que le pouvoir réducteur des extraits du *R. tournefortii* est globalement plus fort que celui des extraits de *R. officinalis*, à l'exception de l'extrait du *R. officinalis* de l'ENSA qui semble être plus performant à faibles concentrations ($\leq 50\text{mg/l}$). De plus, quelque soit la concentration, l'extrait du *R. officinalis* de l'ENSA possède un pouvoir réducteur supérieur à celui du BHT.

En ce qui concerne les *R. tournefortii*, même si leurs capacités réductrices semblent globalement équivalentes, les extraits de Mostaganem et de Bechar semblent être les plus performants, surtout à fortes concentrations ($\geq 50\text{mg/l}$).

De plus, on observe clairement des corrélations significatives ($>70\%$) entre la capacité réductrice de nos extraits et leurs teneurs en phénols totaux (tableau 14). En effet, **Shimada *et al.*, (1992)** expliquent que le pouvoir réducteur des phénols est dû à leurs aptitudes aux substitutions de groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques.

Tableau 14: Coefficients de corrélations (r) montrant la relation entre l'intensité de la capacité réductrice et la teneur en phénols totaux des extraits de romarins étudiés

	Teneur en phénols totaux
Pouvoir réducteur extrait <i>R. officinalis</i> à 100 mg/l	-0.98**
Pouvoir réducteur extrait <i>R. tournefortii</i> à 100 mg/l	-0.74*

*Hautement significatif

**Très hautement significatif

7. Activités antimicrobienne, antifongique et antilevurienne

7.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles et des extraits de romarin

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ($\mu\text{l/ml}$) des différents huiles et extraits de *R. officinalis* et *tournefortii* vis-à-vis de certains microorganismes pathogènes, mycotoxinogènes et phytopathogènes est représentée dans le tableau 15.

Tableau 15: Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentielles et des extraits de *R. officinalis* et *tournefortii*.

Microorganismes	Huile essentielle (µl/ml)				Extrait (µg/ml)			
	<i>R. officinalis</i>		<i>R. tournefortii</i>		<i>R. officinalis</i>		<i>R. tournefortii</i>	
	ENSA	Tablat	Mostaganem	Djelfa	ENSA	Tablat	Mostaganem	Djelfa
<i>En. cloacae</i> E13-	10	>20	20	20	2	4	2	2
<i>E. coli</i> E195-	20	>20	15	20	4	6	2	4
<i>K. pneumoniae</i> E 40-	20	20	20	20	2	2	2	2
<i>K. pneumoniae</i> KP19-	>20	>20	20	>20	4	4	4	2
<i>S. enterica</i> E32-	>20	>20	20	>20	2	4	2	4
<i>Ps. aeruginosa</i> -	15	>20	10	20	4	4	2	2
<i>B. subtilis</i> +	8	>20	6	8	2	2	2	2
<i>L. monocytogenes</i> +	15	>20	10	20	2	2	2	2
<i>A. carbonarius</i>	4	>20	6	15	6	8	4	4
<i>A. niger</i>	8	>20	4	15	8	10	6	8
<i>A. flavus</i>	8	>20	6	20	20	20	8	10
<i>F.O.L</i>	6	20	15	15	6	10	6	6
<i>P. glabrum</i>	15	>20	10	20	20	20	10	15
<i>P. expansum</i>	6	>20	6	10	6	8	6	10
<i>C. albicans</i>	10	>20	8	8	8	20	6	6

En. Enterobacter ; *E. Escherichia* ; *K. Klebsiella* ; *S. Salmonella* ; *B. Bacillus* ; *Ps. Pseudomonas* ; *L. Listeria* ; *A. Aspergillus* ; *FOL. Fusarium oxysporum lini* ; *P. Penicillium* ; *C. Candida*.

7.1.1. CMI des huiles essentielles

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des *R. officinalis* (ENSA et Tablat) et *tournefortii* (Mostaganem et Djelfa) représentée dans le tableau 15 confirme l'existence d'un effet antimicrobien des huiles de romarins étudiés sur un large spectre de microorganismes (pathogènes, mycotoxinogènes, phytopatogènes). Même si l'huile essentielle du *R. officinalis* de l'ENSA possède des activités inhibitrices très appréciables, on note

cependant une meilleure efficacité générale des huiles des *R. tournefortii* confirmant ainsi les précédents résultats obtenus sur ces deux différentes espèces (**Gachkar et al., 2007; Dahmane et al., 2010; Okoh et al., 2010; Bendeddouche et al., 2011; Monika Sienkiewicz et al., 2013; Takia Lograda et al., 2014; Tahri et al., 2015**). Ces mêmes auteurs attribuent ces différences d'activités d'huiles essentielles à leurs différences de teneurs en composés majoritaires actifs.

La teneur des principaux composés joueraient un rôle primordial dans la détermination du pouvoir antimicrobien d'une huile. La quasi-totalité des auteurs s'accordent à dire que les huiles essentielles qui possèdent de fortes teneurs en composés phénoliques et terpénoides, sont celles qui manifestent la plus forte activité (**Chaibi et al. 1997, Benchaar et al., 2008 ; Oussalah et al., 2008**).

Daferera et al. (2003), expliquent que le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de romarin serait dose-dépendante de leurs teneurs en composés tels que α -pinène, le 1-8 cinéole et le camphor.

On ne peut cependant attribuer l'effet antimicrobien d'une huile essentielle à sa seule teneur en composés majoritaires, car une huile essentielle doit être considérée comme un mélange de composés (majoritaires et minoritaires), pouvant avoir un effet synergique ou autre (**Burt, 2004**).

Ainsi, la forte activité de l'huile essentielle du *R. officinalis* de l'ENSA pourrait donc être liée à sa forte teneur en α -pinène (51,8%) alors que le plus fort pouvoir antimicrobien des *R. tournefortii* est principalement attribué à l'existence d'un effet synergique entre deux composés majoritaires (>20%) en présence; α -pinène, et camphor (**Sivropoulou et al., 1997; Dahmane et al., 2010; Zaouali et al., 2010; Bendeddouche et al., 2011**).

On note cependant, que les huiles essentielles des deux espèces *officinalis* et *turnefortii* expriment une activité inhibitrice beaucoup plus importante vis-à-vis des bactéries gram positif comparée à celle enregistrée contre les bactéries gram négatif. *B. subtilis* paraît être la bactérie la plus sensible (CMI entre 6 et 8 μ l/ml), alors que *K. pneumoniae* et *S. enterica* semblent beaucoup moins sensibles (tableau 15).

Sikkema et al. (1994) ; Okoh et al. (2010), expliquent que la caractéristique hydrophobe des huiles essentielles permet à ces dernières de se dissoudre dans les lipides des membranes cellulaires et mitochondriales, ce qui provoqueraient des perturbations de la structure cellulaire qui aboutiraient en définitif à la fuite du contenu intracellulaire du microorganisme.

La plus grande résistance des bactéries gram négatif par rapport aux bactéries gram positif serait expliquée par la différence d'hydrophobicité des surfaces cellulaires. La présence d'une enveloppe cellulaire externe composé entre autres de lipopolysaccharides chez les bactéries gram négatif empêcherait les composés lipophiles de l'huile d'atteindre la membrane cellulaire bicouche phospholipidique. L'absence de cette enveloppe externe protectrice chez les bactéries gram positif, les rendraient directement accessibles aux composés lipophiles capables de traverser passivement leurs membranes cellulaires à travers les phospholipides (**Holley et Patel, 2005**).

Cependant, la présence d'une action appréciable des huiles des *R. tournefortii*, particulièrement l'huile de Mostaganem, vis-à-vis des bactéries gram négatif, tel *E. coli* et *P. aeruginosa* suggère que certains composés arrivent à atteindre la double membrane phospholipidique. Ainsi **Beneddouch et al. (2011)**, expliquent le rôle déterminant du fort taux de camphor présent dans les huiles de *R. tournefortii* pour l'expression de l'activité antimicrobienne contre les bactéries par sa plus grande propriété de pénétration des cellules bactériennes.

En ce qui concerne les activités fongistatiques, on remarque la même tendance que celle observée contre les bactéries : supériorité des huiles essentielles des *R. tournefortii* avec une action appréciable de l'huile du *R. officinalis* de l'ENSA (tableau 15). En effet, certains travaux constatent un fort effet fongistatique de l'huile essentielle de *R. officinalis* et *tournefortii* contre les champignons aflatoxinogènes et les *Fusariums* (**Duru et al., 2003**).

Quant aux levures, et tel qu'il a précédemment été signalé par **Dahmane et al. (2010)**, *C. albicans* semble très sensible aux huiles essentielles de *R. tournefortii* même s'il faut souligner que l'huile de *R. officinalis* de l'ENSA possède une activité inhibitrice appréciable (tableau 15).

Il faut cependant noter que, la perte de la perméabilité sélective de la membrane bactérienne identifiée comme la cause principale de l'action de l'huile essentielle n'est pas le seul phénomène répertorié dans la littérature (**Holley et Patel, 2005**). A titre d'exemple, **Cox et al. (2000)**, montrent que l'huile essentielle de l'arbre à thé contenant du terpinène 4-ol (monoterpène oxygéné), inhibe la respiration oxydative par interférence avec la genèse d'ATP chez *E. coli*, *Staphylococcus* et levures.

Ultee et al. (2002), rapportent un effet de dépolarisation de la membrane et une inhibition d'enzymes liées à l'utilisation de substrats pour la croissance cellulaire.

7.1.2. CMI des extraits

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de *R. officinalis* (ENSA et Tablat) et *tournefortii* (Mostaganem et Djelfa) représentée dans le tableau 15 montre le fort pouvoir inhibiteur de ces derniers par rapport à celui des huiles essentielles avec une supériorité des extraits de *R. tournefortii*.

Plusieurs auteurs rapportent cette forte action des extraits de romarin sur la croissance microbienne (Georgantelis *et al.*, 2007 ; Tsai *et al.*, 2007; Benbelaid *et al.*, 2016).

Del campo *et al.* (2000) ; Benbelaid *et al.* (2016), attribuent la forte action des extraits de romarin à leurs richesses en phénols totaux et en flavonoïdes. **Tsai *et al.* (2007)**, lient la forte activité des extraits de romarin à leurs fortes teneurs en acide carnosique, acide rosmarinique et rosmanol. Ainsi la plus forte teneur en phénols totaux et en flavonoïdes (tableau 12) des extraits de *R. tournefortii* pourrait expliquer leurs plus grande activité par rapport à l'action des extraits de romarin *officinalis*.

On remarque également, que de façon identique aux huiles essentielles, les extraits ont une plus grande capacité inhibitrice sur les bactéries gram positif que sur les bactéries gram négatif. Ceci serait lié à la plus grande sensibilité aux composés apolaires tels que les phénols totaux et les flavonoïdes, dont le mode d'action semblerait être similaire à l'action des composés présents dans les huiles essentielles (Ultee *et al.*, 2002 ; Fernandez-Lopez *et al.*, 2005; Pérez-Fons *et al.*, 2006).

Del campo *et al.* (2000), remarquent une action importante des extraits de romarin sur les bactéries gram négatif lorsqu'on les combine avec un pH acide car un milieu acide augmenterait l'hydrophobicité des composés phénoliques.

7.2. Détermination des concentrations minimales bactéricide fongicides et antilevurienne des huiles essentielles et extraits de romarin

L'évaluation du pouvoir biocide des huiles et extraits de *R. officinalis* et *tournefortii* présentée dans le tableau 16, montre clairement que ces derniers ne possèdent pas un grand pouvoir létal vis-à-vis des microorganismes considérés aux concentrations utilisées.

Tableau 16: Concentrations Minimales Bactéricides des huiles essentielles et des extraits des *R. officinalis* et *tournefortii*.

Microorganismes	Huile essentielle (µl/ml)				Extrait (µg/ml)			
	<i>R. officinalis</i>		<i>R. tournefortii</i>		<i>R. officinalis</i>		<i>R. tournefortii</i>	
	ENSA	Tablat	Mostaganem	Djelfa	ENSA	Tablat	Mostaganem	Djelfa
<i>En. cloacae</i> E13	15	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>E. coli</i> E195	>20	>20	20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>K. pneumoniae</i> E 40	20	>20	>20	>20	>20	>20	20	>20
<i>K. pneumoniae</i> KP19	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>S. enterica</i> E32	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>Ps. aeruginosa</i>	>20	>20	20	>20	15	>20	>20	20
<i>B. subtilis</i>	>20	>20	15	20	20	>20	15	20
<i>L. monocytogenes</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>A. carbonarius</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>A. niger</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>A. flavus</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>F.O.L</i>	15	>20	20	20	>20	>20	>20	>20
<i>P. glabrum</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>P. expansum</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>C. albicans</i>	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20

En. Enterobacter ; *E. Escherichia* ; *K. Klebsiella* ; *S. Salmonella* ; *B. Bacillus* ; *Ps. Pseudomonas* ; *L. Listeria* ; *A. Aspergillus* ; *FOL. Fusarium oxysporum lini* ; *P. Penicillium* ; *C. Candida*.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

Le romarin *R. officinalis* L, et *R. tournefortii* De Noé sont des espèces largement répandues et abondantes dans notre pays. Contrairement à l'espèce *R. officinalis*, *R. tournefortii*, est endémique du Nord-Ouest de l'Afrique et du Sud de l'Espagne. Une meilleure connaissance de ces deux espèces du point de vue de leur composition chimique et des éventuelles propriétés contribuerait à leurs valorisations dans les secteurs agro-industriels et pharmaceutiques. A cet effet et afin d'évaluer l'influence de l'origine géographique, nous nous sommes intéressés à la détermination de la composition chimique ainsi qu'à l'évaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien de différents extraits issus de plusieurs échantillons de *R. officinalis* et *R. tournefortii* collectés dans divers régions d'Algérie.

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation a fourni des rendements plus au moins proches de 1g/100g MV mise à part pour les échantillons de Beni yenni, Cherchell et Mostaganem pour *R. officinalis* qui ont enregistré des rendements plus élevés.

L'influence de la durée de séchage sur les rendements en huiles essentielles des échantillons des deux espèces a montré un optimum atteint à la troisième semaine de séchage avant d'amorcer une diminution.

En ce qui concerne les rendements en extraits éthanoliques, on remarque que pour les échantillons de *R. officinalis* c'est le romarin de l'ENSA qui enregistre le plus fort rendement ($\approx 40\%$) tandis que pour les échantillons de *R. tournefortii* c'est l'échantillon de Mostaganem qui a fourni le rendement le plus élevé (31.4%).

la caractérisation chimique des huiles essentielles et des extraits éthanoliques obtenues à partir des différents romarins a été réalisée via l'étude des compositions par CPG et CPG/MS ainsi qu'à l'évaluation des teneurs en phénols totaux et flavonoïdes.

La caractérisation des différents huiles de *R. officinalis* et *R. tournefortii* étudiés, nous a permis de constater une plus grande variabilité chimique en terme qualitatif chez les huiles des *R. officinalis* alors que les huiles de *R. tournefortii* semblent plus homogènes.

Ainsi les huiles du *R. officinalis* étudiées se sont définie comme suit:

Huile de ENSA : 48 composés identifiées dont les majoritaires sont l' α pinène (51,8%), le camphor (7,8%), le β -caryophyllene (6,8%), le limonène (4,5%) et la verbenone (4,1%).

Huile de Tablat : 47 composés identifiées dont les majoritaires sont le camphor (32%), le camphene (22%), l' α -pinène (21%), le 1-8 cinéole (9,5%) et le β -pinène (6,6%).

Huiles de Beni Yenni: 57 composés identifiées dont les majoritaires sont l' α -pinène (24,7%), le limonène (14,3%), le camphor (13,8%), le verbenone (6,3%), le camphene (4,5%), et le p-cymene (3,8%).

Huile de Cherchell: 32 composés identifiées dont les majoritaires sont le camphor (41,6%), le 1-8 cinéole (14,6%), l' α -pinène (12%), et Borneol (4%).

Huile de Mostaganem: 31 composés identifiées dont les majoritaires sont le camphor (40,7%), le 1-8 cinéole (12,9%), l' α -pinène (12,4%), et le Borneol (6,4%).

De manière générale, les huiles de *R. officinalis* des cinq régions étudiées semblent différentes des huiles caractéristiques de Turquie (**Orhan et al., 2008**), de Tunisie, de Grèce, de Yougoslavie, d'Italie et de France qui contiennent plus de 40% de 1-8 cinéole. Cependant, au vu de la prédominance du camphor (plus de 30%) et la forte proportion en 1-8 cinéole (>10%), les huiles de Tablat, Cherchell et Mostaganem montrent une grande similitude avec le huiles de *R. officinalis* d'Espagne et de Cuba.

De plus, Le classement des huiles selon leurs degré de ressemblance effectué par classification ascendante hiérarchique (CAH) à permis de comparer et donc de regrouper les huiles de Cherchell et de Mostaganem des *R. officinalis* dans le même cluster. En d'autres termes, ces deux huiles semblent très proches au vu de leur composition.

Chez les huiles du *R. tournefortii*, l'huile qui possède la plus grande diversité de composés est l'huile de Bouira avec 53 composés identifiés, alors que les huiles de Mostaganem, Bechar, Djelfa et M'sila se composent de 49, 42, 49 et 43 composés, respectivement. Globalement l'ensemble des ces huiles possèdent les mêmes composés majoritaires avec des proportions relativement variables. Il s'agit de l' α pinène (22 à 27%), le camphor (20 à 28%), le camphene (21 à 26%), et le limonene (8 à 11%).

La CHA à permis d'identifier trois cluster chez les huiles issues de *R. tournefortii*, le premier cluster formé par l'huile de Mostaganem et M'sila, le deuxième cluster contient uniquement l'huile de Bechar et enfin un troisième cluster formé par l'huile de Bouira et de Djelfa qui semble au vu de leurs compositions chimiques le plus éloigné des deux premiers clusters.

On ce qui concerne la teneur des extraits en phénols totaux et en flavonoïdes évaluée par les méthodes spectrométriques, les échantillons les *R. tournefortii* enregistrent des teneurs nettement plus élevées que celles obtenues avec les échantillons de *R. officinalis* (2 à 4 fois plus).

Les capacités antioxydantes des différents huiles et extraits obtenus à partir des romarins *officinalis* et *tourenfortii* ont été évaluées par trois méthodes complémentaires largement

utilisées pour leurs fiabilité et reproductibilité. Il s'agit de la capacité de piégeage des radicaux DPPH[•] et ABTS^{•+} ainsi que le pouvoir réducteur du fer ferrique. Cette étude révèle que les extraits éthanoliques ont un pouvoir antioxydant bien supérieur que celui des huiles essentielles, qui serait lié à leur forte teneur en composés phénoliques de même que ces huiles restent globalement moins actifs que l'additif de synthèse BHT.

De façon générale, les activités antioxydantes des extraits de *R. tournefortii* semblent relativement plus importantes que celles obtenues par les échantillons *R. officinalis*, excepté pour l'échantillon de l'ENSA qui enregistre une activité aussi intéressante que celle des échantillons de *R. tournefortii*. La détermination des concentrations inhibitrices de 50% des radicaux DPPH et ABTS (IC_{50-DPPH} et IC_{50-ABTS}) permet de conforter l'ensemble de ces constatations. Ainsi l'extrait de *R. tournefortii* de *Mostaganem* fournit des IC_{50-DPPH} et IC_{50-ABTS} = 14,9 et 9.90 mg/l, respectivement; alors que l'extrait du *R. officinallis* de l'ENSA fournit des IC_{50-DPPH}=10.2 et IC_{50-ABTS} = 8.80 mg/l, respectivement; avec un référentiel d'IC_{50-DPPH}=28 et IC_{50-ABTS} =18.50 mg/l pour le BHT.

L'estimation de l'activité antimicrobienne des huiles et des extraits de *R. officinalis* et *tournefortii* évaluée sur un ensemble de bactéries (gram positif et gram négatif), champignon (mycotoxinogènes et phytopathogènes) et une levure confirme l'existence d'un effet antimicrobien des huiles et des extraits éthanoliques de romarins étudiés sur un large spectre de microorganismes (pathogènes, mycotoxinogènes, phytopatogènes). Cependant cette étude révèle que nos huiles et extraits possèdent beaucoup plus un pouvoir inhibiteur que létal.

Même si l'huile essentielle du *R. officinalis* de l'ENSA possède des activités inhibitrices très appréciables, on note cependant une meilleure efficacité générale des huiles des *R. tournefortii*.

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de *R. officinalis* (ENSA et Tablat) et *tournefortii* (Mostaganem et Djelfa) montre le fort pouvoir inhibiteur de ces derniers par rapport à celui des huiles essentielles avec une supériorité des extraits de *R. tournefortii*. Ce fort pouvoir est attribué à la plus forte teneur des extraits en composés phénoliques. Cependant, la présence d'une action appréciable des huiles des *R. tournefortii*, particulièrement l'huile de Mostaganem, vis-à-vis des bactéries gram négatif, tel *E. coli* et *P. aeruginosa* suggère que certains composés arrivent à atteindre la double membrane phospholipidique.

Nous remarquons également une plus grande activité inhibitrice des huiles et extraits sur la croissance des bactéries gram positif, champignon et levure par rapport aux bactéries gram

négatif. Ce phénomène serait en partie lié à la plus grande difficulté de diffusion des composés actifs lipophiles à travers la membrane des bactéries gram négatif.

L'ensemble des paramètres considérés pour les huiles essentielles et les extraits de romarin lors de notre étude, démontrent leur grande dépendance vis-à-vis de l'espèce et de leur milieu d'origine et par conséquent des facteurs environnementaux, pédoclimatiques et autres facteurs intrinsèques à la plante (génétique, âge et stade physiologique).

Dans la continuité de ce travail, il serait intéressant d'approfondir l'investigation des compositions chimiques des différents extraits obtenus, afin d'identifier les espèces chimiques responsables de leurs fortes activités antioxydante et antimicrobienne.

Il serait très utile de confirmer le potentiel d'activité antioxydante des extraits par l'application d'autres tests supplémentaires tels que : mesure du pouvoir de piégeage du radical hydroxyle (OH^\bullet), du radical superoxyde (O_2^\bullet) et du radical mono-oxyde d'azote (NO^\bullet).

Le recours à d'autres méthodes d'extraction permettrait d'évaluer leurs influences sur la composition chimique et les capacités biologiques.

L'étude des effets de la combinaison des huiles essentielles ou extraits de romarins avec ceux d'autres huiles essentielles ou extraits, pourrait mettre en lumière d'éventuelles interactions synergiques entre les composés.

Les fortes activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de romarin suggèrent qu'il faudrait dorénavant se concentrer sur ces derniers, pour de futures applications alimentaires en prenant en considération l'aspect organoleptique lors de l'incorporation.

L'étude de l'influence de facteurs tels que le pH sur le pouvoir antimicrobien serait également un point non négligeable à éclaircir afin de mieux cibler les applications alimentaires possibles étant donné qu'un milieu acide est connu pour augmenter l'hydrophobicité des composés phénoliques et donc augmente l'action antimicrobienne.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR, 2000.** Normes française : huile essentielle. Paris, Association Française de Normalisation.
- Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J. P., Mason T. J., 2004.** Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol.11, p.p. 261–265.
- Aliaga C., Lissi A.E., 2004.** Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin an experimental and theoretical study. *Canadian Journal of Chemistry*, Vol. 82, p.p. 1668 – 1673.
- Alvarez-Castellanos P.P., Pascual-Viilalobos M.J., 2003.** Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum caronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. *Indian Crops Products*, Vol. 17, p.p. 77 – 81.
- Alzoreky N.S., Nakahara K., 2002.** Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 80, p.p. 223–230.
- Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson J. D., Arlorio M., 2004.** Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, N°1, p.p. 3530–3535.
- Anonyme, 2011.** Note synthétique sur les ressources forestières et les peuplements porte graines. Institut National de la Recherche Forestière-Edition 2011.
- Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4ème éd. Paris : Masson, 700 p.
- Aruoma O.I., Spencer J.P., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Muñoz A., Murcia A., Butler J., Halliwell B., 1996.** An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of Rosemary and Provençal herbs. *Food Chemistry Toxicology*, Vol. 34, p.p. 449 – 456.
- Augusto F., Leite e Lopes A., Zini C.A., 2003.** Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22, p.p. 160-169.
- Augusto F., Valente A.L.P., 2002.** Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 21, p.p. 428-438.
- Baba Aissa F., 2000.** Encyclopédie des plantes utiles. Ed. EDAS, 368 p.
- Babovic N., Djilas S., Jadrantin M., Vajs V., Ivanovic J, Petrovic S., Zizovic I., 2010.** Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Vol. 11, p.p. 98–107.
- Bachelot C., Blaise A., Corbel T., Le Guernic A., 2006.** Les huiles essentielles. Licence 2 Biologie, Université Catholique de l'Ouest Bretagne Nord, France, 26 p.
- Bannour F., Chéraïf I., El Gazzah M., Farhat F., Hammami M., Chemli R., 2006.** Seasonal variation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L.. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, Vol.8, p.p. 63-68.
- Bärtels A., 1997.** Guide des Plantes du Bassin méditerranéen. Ed. Ulmer.
- Basil A., Jimenez-Carmona M.M., Clifford A.A., 1998.** Extraction of rosemary by super heated water. *Food Chemistry*, Vol. 46, p.p. 5205 – 5209.
- Benbelaïd F., Khadir A., Bendahou M., Zenati F., Bellahsene C., Muselli A., Costa J., 2016.** Antimicrobial activity of *Rosmarinus eriocalyx* essential oil and polyphenols: An endemic medicinal plant from Algeria. *Journal of Coastal Life Medicine*, Vol. 4, N°1, p.p. 39-44.
- Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser a G.R., Colombatto D., McAllister T.A., Beauchemin K.A., 2008.** A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, Vol. 145, p.p.209–228.
- Benchabane O., Hazzit M., Mouhouche F., Baaliouamer, A., 2015.** Influence of extraction duration on the chemical composition and biological activities of essential oil of *Thymus pallescens* De Noé. *Arabian Journal for Science and Engineering*, Vol 40, p.p. 1855-1865.
- Bendeddouche M. S., Benhassaini H., Hazem Z.,Romane A., 2011.** Essential oil analysis and antibacterial activity of *Rosmarinus tournefortii* from Algeria, *Natural Product Communications*, Vol. 6, p.p. 1511 – 1514.
- Bennis S., Chami F., Chami S.N., Bouchikhi, Remmal, 2004.** Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Litter in Applied Microbiology*, Vol.38, p.p. 454 – 458.

- Bensebia O., Barth D., Bensebia B., Dahmani A., 2009.** Supercritical CO₂ extraction of rosemary: Effect of extraction parameters and modelling. *The Journal of supercritical fluids*, vol. 49, p.p.161–166.
- Berlette B.S., Stadtman E.R., 1997.** Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 272, p.p. 20313 – 20316.
- Bilgrami K.S., Sinha K.K., Sinha A.K., 1992.** Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion, and garlic extracts. *Indian Journal of Medical Reserch*, Vol. 96, p.p. 171 – 175.
- Bimokr M., Rahman R.A., Taip F.S., Ganjloo A., Salleh L.M., Selamat J., Hamid A., Zaidul I.S.M., 2011.** Comparison of different extraction method of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts Processing*, Vol. 89, p.p. 67-72.
- Boelens M.H., 1985.** The essential oil from *rosmarinus officinalis* L. *Perfumes Flavours*, Vol. 5, N°. 10, p.p. 21–37.
- Boochird C., Flegel M.W., 1982.** In vitro antifungal activity of Eugenol and Vanillin against *candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 28, p.p. 1235 – 1241.
- Borneley S., Peyrat-Maillard M., 2000.** Antioxidant activity of malt rootlet extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.48, p.p. 2785–2792.
- Bosch-Fusté J., Riu-Aumatell M., Guadayol J.M., Caixach J., López-Tamames E., Buxaderas S., 2007.** Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis. *Food Chemistry*, Vol. 105, p.p. 428-435.
- Bouhdid S., Idaomar M.; Zhiri A.; Baudoux D.; Skali N.S. Abrini J., 2006** *Thymus* essential oil : chemical composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities. Congrès International de Biochimie, Agadir, Maroc, 09-12 Mai.
- Bousbia N., Vian M.A., Ferhat M.A., Petitcolas E., Meklati B.Y., Chemat F., 2009.** Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*, Vol. 114, p.p. 355-362.
- Bouseta A., Collin S., 1995.** Optimized Likens-Nickerson methodology for quantifying honey flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 43, p.p.1890-1897.
- Boutekdjiret C., Bentahar F., Belebbes R., Bessiere J.M., 1998.** The Essential Oil from Rosmarinus Officinalis L. in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 10, p.p. 680-683.
- Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Jovin E., 2007.** Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 55, p.p.7879–7885.
- Braga P.C., Dal Sasso M., Culici M., GaSastri L., Marceca M.X., Guffanti E.E., 2006.** Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology*, Vol. 76, p.p. 61 – 68.
- Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plante médicinale. Tech & doc-Lavoisier, Paris, 585 p.
- Bruneton J., 2002.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Tech & doc-Lavoisier, Paris, 1095 p.
- Buldini P.L., Ricci L., Sharma J.L., 2002.** Recent applications of sample preparation techniques in food analysis, *Journal of Chromatography A*, Vol. 975, p.p. 47-70.
- Burits M., Bucar F., 2000.** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*, Vol. 14, p.p. 323 – 328.
- Burt S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International journal of Food Microbiology*, Vol. 94, p.p. 223– 253.
- Caillet S., Yu H., Lessard S., Lamoureux G., Ajdukovic D., Lacroix M., 2007.** Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chemistry*, Vol. 100, p.p. 542–552.
- Caldefie-Chézet F., Fusillier C., Jarde T., Laroye H., Damez M., Vasson M.P., 2006.** Potential anti-inflammatory effects of *Malaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytotherapy Research*, Vol. 20, p.p. 364 – 370.

- Calliste C. A., Trouillas P., Allais D. P., Simon A., Duroux, J. L., 2001.** Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 49, p.p.3321–3327.
- Carson C.F., Hammer K.A., Rilley T.V., 2006.** Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a Review of Antimicrobial and other Medicinal Properties. *Clinical microbiology reviews*, Vol.19, N° 1, p.p. 50 – 62.
- Cash T., Pan Y., Simon M.C., 2007.** Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free radical biology & medicine*, Vol. 43, p.p. 1219 – 1225.
- Cavalli J. F., 2002.** Caractérisation par C.P.G. /K., C.P.G. /S.M. et R.M.N. du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de doctorat, Université de Corse, France, p. 261.
- Chaibi A., Ababouch L. H., Belasri K., Boucetta S., Busta. F. F., 1997.** Inhibition of germination and vegetative growth of Bacillus cereus T and Clostridium botulinum 62A spores by essential oils. *Food Microbiology*, Vol. 14, p.p.161–174.
- Chalchat J.C., Carry R.P., Michet A., Benjilali B., Chabart J.L., 1993.** Essential Oils of Rosemary, the Chemical Composition between Hydrodistillation and Supercritical CO2 Extraction. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 41 p.p. 613-618.
- Chemat F., Lucchesi M.E., Smadja J., 2004.** Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances. *Brevet Américain*, US 2004/0187340 A1. (a)
- Chen H.Y., Lin Y.C., Hsieh C.L., 2007.** Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chemistry*, Vol. 104, p.p. 1418–1424.
- Cheung S., Tai J., 2007.** Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary Rosmarinus officinalis. *Oncology Report*, Vol. 17, p.p. 1525–1531.
- Cheyrier V., 2005.** Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinicalical Nutrition*, Vol. 81, p.p. 223 – 229.
- Cohen M., 2002.** Stress oxydant, glycation protéique, vieillissement et maladies liées à l'âge. *La phytothérapie européenne*, Vol. 6, p.p. 18 – 26.
- Conner D.E., 1993.** Naturally occurring compounds: antimicrobials in foods. Ed. Davidson, New York, 468p.
- Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F., 1999.** In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Letter Applied Microbiology*, Vol. 29, N° 2, p.p. 130 – 135.
- Cosio M.S., Buratti S., Mannino S., Benedetti S., 2006.** Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. *Food Chemistry*, Vol. 97, p.p. 725–731.
- Cowan M.M., 1999.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 12, N° 4, p.p. 564 – 582.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington T.R., Wyllie S.G., 2000.** The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 88, p.p.170–175.
- Croguennec T., Jeantet R., Schuck P., Brulé G., 2006.** Science des aliments : Stabilisation biologique et physico-chimique. Tech & doc-Lavoisier, Paris, 382 p.
- Croteau R., Kutchan T.M., Norman G.L., 2000.** Natural products (secondary metabolites). *American society of plant physiologists*, vol. 24, p.p. 1250 -1318.
- Cuvelier M. E., Richard H., Berset, C., 1996.** Antioxidant activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of American Oil Chemists Society*, Vol. 73, p.p. 645–652.
- Daferera D.J., Ziogas B N., Polissiou M.G., 2003.** The effectiveness of plant essential oils on the growth of Botrytis cinerea, Fusarium sp. and Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis. *Crop Protection*, Vol. 22, p.p.39–44.
- Dahmane E. M., Eddarir S., Aubert G., Bouamama H., Taourirte M., 2010.** Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of Rosmarinus tournefortii De Noe., an Endemic Species in Morocco. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, Vol. 13, N° 3, p.p. 336 – 339.

- De Luca V., St Pierre B., 2000.** The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. *trends in plant science*, Vol. 5, N° 4, p.p. 168-173.
- Del Campo J., Amiot M.-J., Nguyen-The C., 2000.** Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, Vol. 63, p.p. 1359–1368.
- Deysson G., 1954.** *Eléments d'anatomie des plantes vasculaires*. Ed. Société d'édition d'enseignement supérieur. Paris, 266p.
- Diaz-Maroto M.C., Perez-Coello M.S., Cabezudo M.D., 2002.** Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices. Comparison with simultaneous distillation-extraction. *Journal of Chromatography A*, Vol. 947, p.p. 23-29.
- Didry N., Dubreuil L., Pinkas M., 1993.** Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Pharmazie*, Vol. 48, N° 4, p.p. 301 – 304.
- Dinan L., Harmatha J., Lafont R., 2001.** Chromatographie procedures for the isolation of plant steroids. *Journal of Chromatography A*, Vol. 935, N° 1-2, p.p. 105-123.
- Dong M.W., 2006.** *Modern HPLC for practicing scientists*. 1ère éd. Wiley, 304 p.
- Dorman H. J. D., Peltoketo A., Hiltunen R., Tikkanen M. J., 2003.** Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, Vol. 83, p.p. 255–262.
- Dorman H.J.D., Deans S.G., 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 88, N° 2, p.p. 308 – 316.
- Duh P. D., 1998.** Antioxidant activity of Budrock (*Arctium lappa* Linn): its scavenging effect on free radical and active oxygen. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, Vol.75, p.p. 455–461.
- Duru M.E., Cakir A., Kordali S., Zengin H., Harmandar M., Izumi S., Hirata T., 2003.** Chemical composition and anti-fungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Phytotherapy*, Vol. 74, p.p.170–176.
- Edris A.E., 2007.** Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Reserch*, Vol. 21, p.p. 308 – 323.
- Erkan N., Ayranci G., Ayranci E., 2008.** Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, Vol. 110, p.p. 76–82.
- Fahim F. A., 1999.** Allied on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. *International Journal of Food Science and Nutrition*, Vol. 50, N° 6, p.p. 413 – 427.
- Favier A., 2003.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, p.p. 108 – 115.
- Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F., 2007.** Comparison of different isolation methods of essential oil from *Citrus* fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 22, N°6, p.p. 494-504.
- Fernandez-Lopez J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Perez-Alvarez J.A., Kuri V., 2005.** Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, Vol. 69, p.p.371–380.
- Forkmann G., Martens S., 2001.** Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 12, p.p. 155 – 160.
- Forster H.B., Niklas H., Lutz S., 1980.** Antispasmodic effects of some medicinal plants. *Plant Medicinal*, N° 40, p.p. 309 – 319.
- Franchomme P., Pénoël D., 1990.** *L'aromathérapie exactement*. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Ed. Roger Jallois. Limoges. 445 p.
- Frankel E.N., Waterhouse A.L., Teissedre P.L., 1995.** Principal phenolic phytochemicals in selected Californian wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Vol. 43, N° 4, p. 890.

- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh ghizadeh M., Alipoor A.S., Rasooli I., 2007.** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, Vol. 102, p.p. 898 – 904.
- Galvez J., De La Cruz J. P., Zarzuelo A., Sanchez De La Cuesta F., 1995.** Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. *Pharmacology*, Vol. 51, N°. 2, p.p. 127 – 33.
- Ganzler K., Salgó A., Valkó K., 1986.** Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography*, Vol. 371, p.p. 299-306.
- Garnero J., 1996.** Huiles essentielles. Ed. Techniques de l'ingénieur, p.p. 1 – 45.
- Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G., Georgakis S.A., 2007.** Effect of rosemary extract, chitosan and a-tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 C°. *Meat Science*, Vol. 76, p.p. 172–181.
- Gilly G., 2005.** Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse: botanique, culture, chimie, production et marché. Ed. L'Harmattan, Paris, 405 p.
- Griffin S.G., Wyllie S. G., Markham J.L., Leach D. N., 1999.** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 14, p.p. 322 – 332.
- Gueorgiev E., 1980.** Technologie de l'industrie des huiles essentielles. Ed. Institut supérieur de technologie alimentaire, Plovdiv, Bulgarie.
- Hala G.M., Christ H., Carla K., 2000.** Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 71, N°. 3, p.p. 513 – 520.
- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V., 2003.** Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 95, N°. 4, p.p. 853 – 860.
- Harborne J.B., Williams C.A., 2000.** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, Vol. 55, N°. 6, p.p. 481 – 504.
- Harikrishna D., Appa Rao A.V.N., Prabhakar M.C., 2004.** Pharmacological investigation of prunin-6"-O-p-coumarate: A flavonoid glycoside. *Indian Journal of Pharmacology*, Vol. 36, N°. 4, p.p. 244 – 250.
- Harkenthal M., Reichling J., Geiss H.K., Saller R., 1999.** Comparative study on the in vitro antibacterial activity of Australian tea tree oil, cajuput, oil, niaouli oil, manuka oil, Kanuka oil, and eucalyptus oil. *Pharmazie*, Vol. 54, N°. 6, p.p. 460 – 463.
- Harley R.M., Atkins S., Budantsev A.L., Cantino P.D., Conn B.J., Grayer R., Harley M.M., De Kok R., Krestovskaja T., Morales R., Paton A.J., Ryding O., Upson T., 2004.** Labiatae. In: Kadereit JW (ed) The families and genera of vascular plants VII. Flowering plantsdicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae). Springer, Berlin, p.p. 167–275.
- Hart P.H., Brand C., Carson CF., Riley T.V., Prager R.H., Finlay-Jones J.J., 2000.** Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Malaleuca altemifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research*, Vol. 49, p.p. 619 – 626.
- Harzfeld P.W., Forkner R., Hunter M.D., Hagerman A.E., 2002.** Determination of hydrolysable Tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, N°. 50, p.p. 1785 – 1790.
- Hazzit M, Baaliouamer A., 2009.** Variation of essential oil yield and composition of *Thymus palleescens* de Noé from Algeria. *Journal of Essential oil Research*, Vol. 21, p.p. 162-165.
- Henriques AT., Kerber V.A., Moreno P.RH., 1999.** Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: *Farmacognosia -Da Planta Ao Medicamento*, Simoes, et al. Ed. Porto Alegre/Florianopolis: Ed. UFRGSIED. UFCS, p.p. 641-656.
- Hermal C., 1993.** Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles. *Faculté de Pharmacie*, Université de Montpellier I, 87 p.
- Hochberg M., Kohen R., Enk C.D., 2006.** Role of antioxidants in prevention of pyrimidine dimmer formation in UVB irradiated human HaCaT keratinocyte. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol. 60, p.p. 233 – 237.

- Holley R.A., Patel D., 2005.** Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, Vol. 22, p.p. 273–292.
- Hsu B., Coupar I. M., Ng K., 2006.** Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chemistry*, Vol. 98, p.p. 317–328.
- Inouye S., 2003.** Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). *International Journal of Aromatherapy*, Vol. 13, p.p. 95 – 107.
- Jacobsen C., 1999.** Sensory impact of lipid oxidation in a complex food system. *Fetties & Lipids*, Vol. 101, p.p. 484 – 492.
- Jadhav D., Rekha B.N., Gogate P.R., Rathod V.K., 2009.** Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*, Vol. 93, p.p. 421-426.
- Jimenez-Carmona M.M., Ubeira J.L., Luque de Castro M.D., 1999.** Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil. *Journal of Chromatography A*, Vol. 855, p.p.625-632.
- Joulain D., 1994.** Method for analysing essential oil. Modern analysis methodologies : use and abuse. *Perfumer & Flavorist*, Vol. 19, p.p. 5-17.
- Jung T., Bader N., Grune T., 2007.** Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 462, p.p. 231 – 237.
- Juven B.J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H., 1994.** Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 76, p.p. 626 – 631.
- Karaman S., Digrak M., Ravid U., Ilcim A., 2001.** Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.76, N° 2, p.p. 183 – 186.
- Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J., 2000.** Applications of solid-phase micro-extraction and gas chromatography in food analysis. *Journal of Chromatography A*, Vol. 880, p.p. 35-62.
- Klaric M.S., Kosalec I., Mastelic J., Pieckova E., Pepeljnak S., 2006.** Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwelling. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 44, N° 1, p.p. 36 – 42.
- Koehilin-Ramonatxo C., 2006.** Oxygen oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*, Vol. 20, p.p. 165–177.
- Koh K.J., Pearce A.L., Marshman G., Finlay-Jones J.J., Hart P.H., 2002.** Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation, *British Journal of Dermatology*, N° 147, p.p. 1212 – 1217.
- Kosar M., Dorman H. J. D., Hiltunen R., 2005.** Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*, Vol. 91, p.p. 525–533.
- Kováts E., 1965.** Gas Chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advances in Chromatography*, ed. Par Giddings J.C. et Keller R.A. New-York : M. Decker Inc, p.p. 229-247.
- Kutchan T.M. 1995.** Alkaloid biosynthesis [mdash] the basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*, Vol. 7, N° 7, p.p. 1059-1070.
- Lachowicz K.J., Jones G.P., Briggs D.R., Bienvenu F.E., Wan J., Wilcock A., Coventry M.J., 1998.** The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L) against acid-tolerant food microflora. *Letter Applied Microbiology*, Vol. 26, N° 3, p.p. 209 – 214.
- Lahlou M., 2004.** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, Vol.18, p.p. 435 – 448.
- Lamaison J.L.C., et Carnet A., 1990.** Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la végétation. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, Vol. 65, p.p. 315 – 320.
- Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J., Nychas G.J. E., 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 91, N° 3, p.p. 453 – 462.

- Lamiri A., Lhaloui S., Benjilali B., Berrada M., 2001.** Insecticidal effect of essential oil against Hessian fly mayetiola destructor (Say). *Field crops research*, Vol.71, p.p.9-15.
- Lane D., Jenkins S.W.D., 1984.** 9th International Symposium on Polynuclear aromatic hydrocarbons, Columbus, Ohio, USA, p.p. 437-449.
- Lang Q., Wai C.M., 2001.** Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – a practical review. *Talanta*, Vol. 53, p.p. 771-782.
- Lardy J.M., Haberkorn V., 2007.** Les huiles essentielles : principes d'utilisation. *Kinesither Review*, N°. 61, p.p. 18 – 23.
- Larocca L.M., Giustacchini M., Maggiano N., Ranelletti F.O., Piantelli M., Alcini E., Capelli A., 1994.** Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type II estrogen binding sites in primary human transitional cell carcinomas. *Journal of Urology*, Vol. 152, p.p. 1029 – 1033.
- Lee M.H., Lin C.C., 2007.** Comparison of techniques for extraction of isoflavones from the root of *Radix Puerariae*: ultrasonic and pressurized solvent extractions. *Food Chemistry*, Vol. 105, p.p. 223-228.
- Lehtinen P., Laakso S., 1998.** Effect of extraction conditions on the recovery and potency of antioxidants in O at fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 46, p.p. 4842–4845.
- Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., 2001.** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*, Vol. 30, p.p. 1076 – 1081.
- Letellier M., Budzinski H., Bellocq J., Connan J., 1999.** Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes from sediments and source rocks. *Organic Geochemistry*, Vol. 30, p.p. 1353-1365.
- Likens, S.T., Nickerson, G.B., 1964.** Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, Vol. 22, p.p. 5-13.
- Lin J.K., Weng M.S., 2006.** Flavonoids as Nutraceuticals. In: *The science of flavonoids*. Ed. Springer, Grotewold, 217 p.
- Lis-Balchin M., Hart S., Simpson E., 2001.** Buchu (*Agathosma betulina* and *A.crenulata*, Rutaceae) essential oils: their pharmacological action on guinea-pig ileum and antimicrobial activity on microorganisms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 53, N°. 4, p.p. 579 – 582.
- Lis-Balchin M., Hart S.L., Deans S.G., 2000.** Pharmacological and antimicrobial studies on different tea- (*Melaleuca alternifolia*, *Leptospermum scoparium* or *Manuka Kunzea ericoides* or *Knuka*), originating in Australia and New Zealand. *Phytotherapy Research*, Vol. 14, N°. 8, p.p. 623 – 629.
- Liu L., O'Conner P., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. 2008.** Controlling *Listeria monocytogenes* in cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 104, p.p. 1059-1066.
- LogradaT., Ramdani M., Chalard P., Figueredo G., 2014.** Antibacterial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* from eastern Algeria. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, Vol. 3, p.p. 232–242.
- Lucchesi E.M., 2005.** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes: Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat, Université de la Réunion. 143 p.
- Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J., 2004a.** Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1043, p.p. 323-327.
- Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J., 2004b.** An original solvent free microwave extraction of essential oil from spices. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 19, 134-138.
- Lugasi A., Hóvári J., Sági K.V., Bíró L., 2003.** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, Vol. 47, N°. 1 – 4, p.p. 119 – 125.
- Luque de Castro M.D., Priego-Capote F., 2010.** Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1217, p.p. 2383-2389.
- Maisuthisakul P., Pasuk S., Ritthiruangdej P., 2008.** Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 21, p.p. 229–240.

- Makhlouf H., 2002.** Les huiles essentielles du romarin et du clou de girofle : approche analytique et activité antioxydante sur une huile alimentaire. Mem. Ing., INA. El- Harrach, 70 p.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 79, N°. 5, p.p. 727-747.
- Marriott P., Shellie R., Cornwell C., 2001.** Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, Vol. 936, p.p. 1-22.
- Maruyama N., Sekimoto N., Ishibashi H., 2005.** Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of inflammation*, Vol. 2, p.p. 1 – 11.
- Menaceur F., Hazzit M., 2014.** Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of ethanolic extracts from Algerian *Lavandula stoechas* l. and *Rosmarinus tournefortii* de noé. *International Journal of Agricultural*. Vol. 4, p.p. 139-146.
- Mendiola J.A., Herrero M., Cifuentes A., Ibañez E., 2007.** Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1152, p.p. 234-246.
- Mengal P., Mompon B., 1996.** Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. *Brevet Européen*, EP 698 076 B1.
- Middleton E. J., 1996.** Biological properties of plant flavonoids. *International Journal of Pharmacology*, Vol. 34, N°. 5, p.p. 344 – 348.
- Middleton E.Jr., Kandaswami C., Theoharides T.C., 2000.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacology reviews*, Vol. 52, p.p. 673 – 751.
- Moll M., Moll N., 1998.** Les additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Ed. Dunod, Paris, 218 p.
- Muñoz-Olivas R., 2004.** Screening analysis: an overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 23, p.p. 203-216.
- Namgoong S.Y., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S., Kim H.P., 1994.** Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Science*, Vol. 54, N°. 5, p.p. 20 – 313.
- Nègre-Salvayre A., Salvayre R., 1992.** Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Radical Biology & Medicine* Vol. 12, N°. 2, p.p. 6 – 101.
- Neue U.D., 1997.** HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice. New-York : éd. Wiley-VCH, 416 p.
- Núñez A.J., Bemelmans M.H., Maarse H., 1984.** Isolation methods for the volatile components of grapefruit juice: Distillation and solvent extraction methods. *Chromatographia*, Vol. 18, p.p. 153-158.
- Ohemeng K.A., Schwender C.F., Fu K.P., Barrett J.F., 1993.** DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 3, N°. 2, p.p. 30 – 225.
- Okoh O.O., Sadimenko A.P., Afolayan A.J., 2010.** Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, Vol. 120, p.p.308–312.
- Orhan I., Aslan S., Kartal M, Sener B., Hu"snu" Can Baser K., 2008.** Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chemistry*, Vol.108, p.p. 663–668.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M., 2008.** Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, Vol 73, p.p. 236–244.
- Oyaizu M., 1986.** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, Vol. 44, p.p. 307 – 315.
- Paradiso M. V., Summo C., Pasqualone A., Caponio F., 2009.** Evaluation of different natural antioxidants as affecting volatile lipid oxidation products related to off-flavours in corn flakes. *Food Chemistry*, Vol. 113, p.p. 543-549.
- Paré J.R.J., Sigouin M., Lapointe J., 1990.** Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. *Brevet européen*, EP 398798.
- Pelikan J., 1986.** Matière première du règne végétal. Ed. Masson Et Cie, Tome 2, paris, 2343 p.

- Pérez-Fons L., Aranda F. J., Guillén J., Villalain J., Micol V., 2006.** Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 453, N° 2, p.p. 224–236.
- Pfaller M.A., Sheehan D.J., Rex J.H., 2004.** Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds : Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for standardization. *American Society for Microbiology*, Vol. 17, p.p. 268 – 280.
- Pharmacopée Européenne, 1997.** 3^{ème} édition, Conseil de l'Europe. ed. Maisonneuve S.A, Sainte Ruffine, 1918 p.
- Pibiri M.C., 2005.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse, 161 p.
- Pillonel L., Bosset J.O., Tabacchi R., 2002.** Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A review. *Food Science and Technology*, Vol. 35, p.p. 1-14.
- Pino J.A., Estrarron M., Fuentes V., 1998.** Essential Oil of Rosemary (*Rosemary Officinalis* L.) from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 10, p.p. 111-114.
- Pinto E., Pina-Vaz C., Salgueiro L., Gonçalves M.J., Costa-de Oliveira S., Cavaleiro C., Palmeira A., Rodrigues A., Martínez-de-Oliveira J., 2006.** Antifungal activity of the essential oil of thymus pulegioides on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of medical microbiology*, Vol. 55, p.p. 1367 – 1373.
- Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., 2002.** Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol.17, p.p.15–19.
- Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., 2000.** Antioxydants in food: practical applications. Ed. Woodhead, 388 p.
- Porter N., 2001.** Essential oils and their production. *Crop & Food Research*, N° 39.
- Pourmortazavi S.M., Hajimirsadeghi S.S., 2007.** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1163, p.p. 2-24.
- Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris, CNRS, Tome 1 et 2, 1170 p.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicin.*, 26, 1231–1237
- Read M. A., 1995.** Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents vascular. *American Journal of Pathology*, Vol. 147, N° 2, p.p. 7 – 235.
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L., 2003.** Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research reviews*, Vol. 23, p.p. 519 – 534.
- Riba A., Mokrane S., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N., 2008.** Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 122, p.p. 85-92.
- Richard H., 1992.** Epices et aromates. Ed. Tec & Doc-Lavoisier, paris, 339 p.
- Richard H., Multon J. L., 1992.** Les arômes alimentaires. Ed. Tec & Doc-Lavoisier, Paris, 439 p.
- Ridgway K., Lalljie S.P.D., Smith R.M., 2007.** Sample preparation for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1153, p.p. 36-53.
- Robert G., 2000.** Les Sens du Parfum. Ed. Osman Eroylles, Paris, 224 p.
- Rodrigo R., Bosco C., 2006.** Oxidative stress and protective effects of polyphenols : Comparative studies in human and rodent kidney. *Compounds Biochemistry And Physiology Part C*, Vol. 142, p.p. 317 – 327.
- Romano C. S., Abadi K., Repetto V., Vojnov A.A., Moreno S., 2009.** Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chemistry*, Vol. 115, p.p. 456–461.
- Rosset R., Caude M., Jardy A., 1991.** Chromatographie en phase liquide et supercritique. Paris : éd. Masson, 919 p.

- Rosuaj L., Garcia-Granados A., 1987.** Analyse des huiles essentielles d'espèce du genre *Rosmarinus L.* et leur intérêt en tant que caractère taxonomique. *Plantes médicinales et phytothérapie* 21, 138p.
- Saenz-Lopez R., Fernandez-Zurbano P., Tena M. T., 2002.** Capillary electrophoretic separation of phenolic dieterpenes from rosemary. *Journal of Chromatography A*, Vol. 953, p.p.156–251.
- Sahin F., Güllüce M., Daferera D., Sökmen A., Polissiou M., Agar G., Özer H., 2004.** Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the eastern Anatolia region of Turkey. *Food Chemistry*, Vol. 15, p.p. 549 – 557.
- Sahraoui N., Hellal A., Boutekedjiret C., Bentahar F., Bessière J.M., 2007.** Antimicrobial activities of essential oil of some Algerian aromatic plants. *International Journal of essential Oil Therapeutics*, Vol. 1, p.p. 83-90.
- Samotyja U., Malecka M., 2007.** Effects of blackcurrant seeds and rosemary extracts on oxidative stability of bulk and emulsified lipid substrates. *Food Chemistry*, Vol. 104, p.p.317–323.
- Sanchez-Moreno C., 2002.** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Science Technology International*, Vol. 08, N°. 3, p.p. 121 – 137.
- Santos R.I., 1999.** Metabolismo Basico E Origem Dos Metabólitos Secundarios. In: *Farmacognosia Da Planta Ao Medicamento*, Simoes et al. (Ed.). Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/Ed. UFCS, p.p. 323-354.
- Sarni-Manchado P., Cheynier V., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Tec & Doc- Lavoisier, 398 p.
- Sato M., Tsuchiya H., Takase I., Kureshiro H., Tanigaki S., Iinuma M., 1995.** Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytotherapy Research*, Vol. 9, N°. 7, p.p. 12 – 509.
- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., Battino, M. 2005.** Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, Vol. 21, p.p. 207–213.
- Schwarz K., Bertelsen G., Nissen L. R., Gardner P. T., Heinonen M. I., Hopia A., 2001.** Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research Technology*, Vol. 212, p.p.319–328.
- Sell C.S., 2006.** The chemistry of fragrance. From perfumer to consumer. Ed. Royal society of chemistry. Cambridge, 329 p.
- Shan B., Cai Y. Z., Sun M., Corke, H., 2005.** Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, p.p.7749–7759.
- Sharma S., Sangwan N.S. et Sangwan R.S., 2003.** Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current science*, Vol. 84, N°. 25, p.p. 544 – 550.
- Sherwin E.R., 1976.** Antioxidants for vegetable oils. *Journal of American Oil Chemical Society*, Vol. 53, p.p. 430 – 436.
- Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., Nakamura T., 1992.** Antioxidative properties of xanthan on the autooxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 40, p.p.945–948.
- Sides A., Robards K., Helliwell S., 2000.** Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 19, p.p. 322-329.
- Sienkiewicz M., Lysakowska M., Pastuszka M., Bienias W., Kowalczyk E., 2013.** The Potential of Use Basil and Rosemary Essential Oils as Effective Antibacterial Agents. *Molecule*, Vol.18, p.p. 9334-9351.
- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B., 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, N°. 11, p.p. 8022–8028.
- Silou T., Taty-Loumbou F., Chalchat J.-C., 2002.** Etude de l'effet du séchage solaire sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles extraites des feuilles d'*Eucalyptus citriodora*. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, N° 960. p.p. 287-301.
- Simoes C.M.O., Schenkel E.P., Gosman G., Mello Ae.P., Mentz L.A., Petrovick P.R., 1999.** *Farmacognosia -Da Planta Ao Medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 809 p.

- Singleton V.L., Ortofer R., Lamuela-Raventos R.M., 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. In : Packer L. (ed). *Methods in Enzymology*. Orlando. Academic Press. p.p. 152 – 178.
- Sinyinda S., Gramshaw J.W., 1998.** Volatiles of avocado fruit. *Food Chemistry*, Vol. 62, p.p. 483-487.
- Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikoulaou C., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M., 1996.** Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *Food Chemistry*, Vol. 44, p.p. 1011 – 1022.
- Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., 2003.** Principe d'analyse instrumentale. Ed. De Boeck université, Paris, 945 p.
- Smallfield B., 2001.** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*, N°. 45, 4 p.
- Smith C.K., Moore C.A., Alahi E.N., Smart Â.T., Hotchkiss S.A., 2000.** Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicology & applied Pharmacology*, Vol. 168, p.p. 189 – 199.
- Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W., 2009.** Introduction to modern liquid chromatography, 3ème édition. New-York : éd. John Wiley & Sons, 960 p.
- Sokmen A., Gulluce M., Akpulat H.A., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., 2004.** The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, Vol.15, N°. 8, p.p. 627 – 634.
- Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martínez J.R., 2004.** Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1025, p.p. 93-103.
- Su H.J., Chao C.J., Chang H.Y., Wu P.C., 2006.** The effects of evaporating essential oils on indoor air quality. *Atmospheric environment*, Vol. 41, p.p. 1230 – 1236.
- Sultana B., Anwar F., Przybylski R., 2007.** Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry*, Vol. 104, p.p. 1106–1114.
- Tahri M., Imelouane B., Aouinti F., Amhamdi H., Elbachiri A., 2014.** The organic and mineral compounds of the medicinal aromatics, *Rosmarinus tournefortii* and *Rosmarinus officinalis*, growing in eastern Morocco. *Research on Chemical Intermediates*, Vol. 40, N°.8, p.p. 2651–2658.
- Tahri M., Imelouane B., Amhamdi H., Fauconnier M.L., Elbachiri A., 2015.** The Chemical compositions and the Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oil of *Rosemary* Leaves from Eastern Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*. Vol.6, N°.3, p.p. 666-672.
- Tantaoui-Elaraki A., Ferhout H., Errifi A., 1993.** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus Broussonettii*, *T.zygis* and *T.satureioides*. *Journal of Essential Oil Research*, Vol.5, p.p. 45 – 53.
- Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El-Elimat T., 2007.** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, Vol. 104, p.p.1372–1378.
- Telphon T., 2003.** ABC des huiles essentielles. Ed. Grancher, 358 p.
- Teuscher E., Anton R., Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Lavoisier, Paris, 522p.
- Thompson J.D., Chalchat J.C., Michet A., Linhart Y.B., Ehlers B., 2003.** Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 29, p.p. 859 – 880.
- Torres de Pinedo A., Penalver P., Morales J.C., 2007.** Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure–activity relationship. *Food Chemistry*, Vol. 103, p.p. 55–61.
- Tranchant J., Arpinaud P., Prevote A., Serpinet J., Vergnol A., Witier P., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. Masson., Paris, 700 p.
- Tsai P.J., Tsai T.H., Hoa T-H., 2007.** In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chemistry*, Vol. 05, p.p.311–316.

- Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R., 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, Vol. 68, p.p.1561–1568.
- Ultée A., Gorris L.M.G., Smid E.J., 1995.** Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.85, p.p. 211 – 218.
- Ultee A., Kets E.P.W., Alberda M., Hoekstra F.A., Smid E.J., 2000.** Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*, Vol. 174, N°4, p.p. 233–238.
- Ultée A., Kets E.P.W., Smid E.J., 1999.** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 65, N° 10, p.p. 4606 – 4610.
- Upson TM (2000).** 1. *Rosmarinus L.* In: J. Cullen et al. (eds.). *The European Garden Flora*. Vol. VI. Cambridge University Press, Cambridge.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J., 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell*, Vol. 39, p.p. 44 – 84.
- Valnet J., Duraffourd C.H., Duraffourd P., Cilapraz J., 1978.** L'aromatogramme : nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plants & Medicine Phytotherapy*, Vol. 12, p.p. 43 – 52.
- Van den Dool H., Kratz P.D., 1963.** A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, Vol. 11, p.p. 463–471.
- Vanier P., 1994.** Les huiles essentielles et la thérapie par les huiles essentielles. *Guide Ressources*, Vol. 9, p.p. 69 – 73.
- Vareltzis K., Koufidis D., Gavriilidou E., Papavergou E., Vasiliadou S., 1997.** Effectiveness of a natural Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. *Z Lebensm Unters Forsch A*, Vol. 205, p.p. 93 – 96.
- Vargas I., Sanz I., Prima-Yuferá E., 1999.** Antimicrobial and Antioxidant compounds in the nonvolatile fraction of expressed range essential oil. *Journal of Food Protection*, Vol. 62, N° 8, p.p. 929 – 932.
- Vermin G., 1982.** Arômes alimentaires et développement récent. Ed. Apria, 308p.
- Vian M.A., Fernandez X., Visinoni F., Chemat F., 2008.** Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1190, p.p. 14-17.
- Wada M., Kido H., Ohyama K., Kishikawa N., Ohba Y., Kuroda N., 2004.** Evaluation of quenching effects of nonwater- soluble and water-soluble rosemary extracts against active oxygen species by chemiluminiscent assay. *Food Chemistry*, Vol. 87, p.p.261–267.
- Wagner G.J., Wang E., Shepherd R.W., 2004.** New approaches for studying and exploiting an old protuberance: the plant trichome. *Annals Botany*, Vol. 93, N° 01, p. p. 3-11.
- Walsh S.E., Maillard J.-Y., Russell A.D., Catrenich C.E., Charbonneau D.L., Bartolo R.G., 2003.** Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 94, N° 2, p.p. 240 – 247.
- Wang W.; Wu N.; Zu Y.G.; Fu Y.J., 2008.** Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*, vol. 108, p.1019-1022.
- Wei G.J., Ho C.T., 2006.** A stable quinone identified in the reaction of carnosol, a major antioxidant in rosemary, with 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Food Chemistry*, Vol. 96, p.p. 471–476.
- Werner M., 2002.** Les huiles essentielles: réveil du corps et de l'esprit. Ed. Vigot, Collection Santé Bien-être, 95 p.
- Wilkes J.G., Conte E.D., Kim Y., Holcomb M., Sutherland J.B., Miller D.W., 2000.** Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *Journal of Chromatography A*, Vol. 880, p.p. 3-33.
- Willem J.P., 2002.** Les huiles essentielles : médecine d'avenir. Ed. Dauphin, Paris, 311 p.
- Wojdylo A., Oszmian'ski J., Czemerzys R., 2007.** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, Vol. 105, p.p. 940–949.
- Woodman O.L., Meeker W.F., and Boujaoude M., 2005.** Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones: structure-activity relationships. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, Vol. 46, N° 3, p.p. 302 – 309.

- Yesil Celiktas O., Bedir E., Vardar Sukan F., 2007a.** In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, Vol.101, p.p. 1457–1464.
- Yesil Celiktas O., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., Baser K.H.C., 2007b.** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, Vol. 100, p.p. 553–559.
- Zambonelli A., D'Aurelio A.Z., Severi A., Benvenuti E., Maggi L., Bianchi A., 2004.** Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *thymus vulgaris* L. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 16, N°. 1, p.p. 69 – 74.
- Zaouali Y., Bouzaine T., Boussaid M., 2010.** Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 48 p.p.3144–3152.
- Zheng W., Wang, S. Y., 2001.** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 49, N°.11, p.p.5165–5170.
- Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A., 2004.** Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *Journal of Antibiotics*, Vol. 57, N°. 6, p.p. 367 – 372.

Résumé

Les huiles essentielles et les extraits éthanoliques de deux espèces de romarin (*Rosmarinus officinalis* et *R. tournefortii*) issues de plusieurs régions d'Algérie (centre, Est, Ouest et Sud) ont été obtenus, respectivement, par hydrodistillation et soxhlet avec des rendements plus au moins proches. La durée de séchage a conduit à un optimum du rendement atteint à la troisième semaine de séchage. L'analyse par CPG et CPG/SM des huiles a révélé une plus grande variabilité chimique en terme qualitatif chez les huiles des romarins *officinalis* alors que les huiles de *R. tournefortii* semblent plus homogènes. Ainsi le classement des huiles selon leur degré de ressemblance effectué par classification ascendante hiérarchique (CAH) a permis de regrouper les huiles de *R. officinalis* de L'ENSA et de Beni Yenni dans un même cluster (composé majoritaire α pinène avec 51,8 et 24,7%, respectivement), et les huiles de Cherchell et de Mostaganem dans un autre cluster (composé majoritaire camphor avec 41,6 et 40,7%, respectivement). Une seule huile (de Tablat) se distingue dans un cluster unique même si elle semble plus proche des huiles du cluster de Cherchell et de Mostaganem (composé majoritaire camphor avec 32%). Pour *R. tournefortii*, l'ensemble de ses huiles possèdent globalement les mêmes composés majoritaires avec des proportions relativement variables avec l' α pinène (22 à 27%), le camphor (20 à 28%), le camphène (21 à 26%), et le limonène (8 à 11%). La CHA a permis d'identifier trois clusters, le premier formé par l'huile de Mostaganem et M'sila, le deuxième cluster contenant uniquement l'huile de Bechar et enfin un troisième formé par l'huile de Bouira et de Djelfa qui semble au vu de sa composition chimique le plus éloigné des deux premiers clusters.

On ce qui concerne la teneur des extraits éthanoliques en phénol totaux et en flavonoïdes les échantillons de *R. tournefortii* ont des teneurs nettement plus élevées que ceux obtenues avec les échantillons de *R. officinalis* (2 à 4 fois plus).

L'évaluation de l'activité antioxydante par différentes méthodes (DPPH, ABTS et pouvoir réducteur du fer ferrique) a révélé que de façon générale, les extraits de *R. tournefortii* sont relativement les plus actifs, à l'exception de l'échantillon de L'ENSA.

L'estimation de l'activité antimicrobienne par la détermination des CMI et CMB des différentes huiles et extraits de romarin *officinalis* et *tournefortii* sur un large panel de germe: bactéries (gram positif et gram négatif), champignons (mycotoxinogènes et phytopathogènes) et une levure révèle une plus grande aptitude biostatique que biocide avec une nette supériorité des extraits.

On note une plus grande activité inhibitrice des huiles et extraits sur la croissance des bactéries gram positif, champignons et levure par rapport aux bactéries gram négatif; phénomène qui serait en partie lié à la plus grande difficulté de diffusion des composés actifs lipophiles à travers la membrane des bactéries gram négatif.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis*, *Rosmarinus tournefortii*, huiles essentielles, extraits éthanoliques, composés phénoliques, activités antioxydante, activités antimicrobienne.

Abstract

Essential oils and ethanol extracts of two species of rosemary (*Rosmarinus officinalis* and *R. tournefortii*) harvested in several regions of Algeria were respectively obtained by steam distillation and Soxhlet with equivalents yields. The influence of the drying time on the essential oil yield obtained for the different samples of both considered species showed optimum reached at the third week of drying. GC and GC / MS Analysis of these oils showed higher chemical variability in terms of oil composition for *R. officinalis* while *R. tournefortii* oils seemed more homogeneous. Thus the classification of oils according to their degree of similarity performed by hierarchical clustering analysis (AHC) gathered oils of *R. officinalis* from ENSA and Beni Yenni in the same cluster (main compound α -pinene with 51, 8 and 24.7%, respectively), and oils of Cherchell and Mostaganem in another cluster (main compound camphor with 41.6 and 40.7%, respectively). As for oil from Tablat, it differs in a single cluster, closer to the Cherchell and Mostaganem oils cluster (main compound camphor 32%). For *R. tournefortii* oils, all of these oils generally have the same main compounds with relative varying proportions. Its include the α -pinene (22-27%), the camphor (20 to 28%), camphene (21 to 26%) and the limonene (8 to 11%). The CHA has identified three cluster, the first cluster formed by Mostaganem/M'sila oils, the second cluster containing only Bechar oil and a third cluster formed by oils of Bouira and Djelfa which seems with regard to its chemical compositions given the farthest from the two first clusters.

Concerning the total phenol and flavonoids content of ethanolic extracts, which were evaluated by spectrometric methods, samples of *R. tournefortii* recorded significantly higher levels than those obtained with the samples of *R. officinalis* (2 to 4 fold).

The evaluation by different methods (DPPH, ABTS and reducing power of ferric iron) of the antioxidant capacity of the sets oils and extracts obtained from rosemary *officinalis* *tournefortii* and found that in general, the antioxidant activity of the extracts *R. tournefortii* appear relatively larger than that obtained by *R. officinalis* samples except for the sample of ENSA which recorded as interesting as that of the samples of *R. tournefortii* activity.

Through

The evaluation of the antioxidant capacity (DPPH, ABTS and reducing power of ferric iron) of the obtained essential oils and ethanol extracts permitted to highlight the greater antioxidant activity of the *R. tournefortii* samples except for the sample of ENSA which recorded an activity equivalent to *R. tournefortii* samples.

The estimation of the antimicrobial activity by determining the MIC and MBC for all the obtained oils and extracts towards a broad panel of target microorganisms: bacteria (gram positive and gram negative), fungi (mycotoxinogen and phytopathogen) and yeast reveals greater inhibiting ability then lethal, with a clear greater capacity of ethanol extracts.

Although the ENSA essential oil of *R. officinalis* exhibited interesting inhibitory activities, a better overall efficiency of oils and extracts of *R. tournefortii* were recorded.

We also note greater inhibitory activity of the oils and extracts on the growth of gram positive bacteria, fungi and yeast compared to gram-negative bacteria; a phenomenon partly attributed to the greater difficulty of diffusion of the lipophilic active compounds through the membrane of gram negative bacteria.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, *Rosmarinus tournefortii*, essential oils, ethanol extracts, phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity.

ملخص

الزيوت العطرية وكذلك مستخلصات الايثانول من نوعين من إكليل الجبل (الطبي): *Rosmarinus officinalis* و الوبري: *R. tournefortii* المجني في عدة مناطق من الجزائر (وسط وشرق وغرب وجنوب) تم الحصول عليها عن طريق التقطير المائي بالبخار وسوكسلت على التوالي بمرودية متقاربة. أظهر تأثير وقت التجفيف على محاصيل الزيوت الأساسية من عينات مختلفة من كلا النوعين بأن المحصول الأمثل تم التوصل إليه في الأسبوع الثالث من التجفيف. أظهر تحليل الكروماتوغرافيا الحالة الغازية (CPG) و (CPG / MS) المرفق بطيف الكتلة لهذه الزيوت أعلى تنوع كيميائي من حيث جودة الزيوت في إكليل الجبل *officinalis* بينما الزيوت الاكليل *R. tournefortii* فبدت أكثر تجانسا. و بالتالي فان تصنيف زيوت وفقا لدرجة التشابه المجري وفق المجموعات الهرمية التصاعدية (CHA) بالاعتماد على تجميع زيوت *R. officinalis* من المدرسة الوطنية العليا للفلاحة (ENSA) وبني يني في نفس المجموعة (مركب رئيسي α -بينين مع 51.8 و 24.7% على التوالي)، والزيوت من شرشال ومستغانم في مجموعة أخرى (مركب الكافور مع 41.6 و 40.7% على التوالي). أما بالنسبة لزيت منطقة تابلط، فإنها تبرز لوحدها في مجموعة واحدة على الرغم من أنها تبدو أقرب لمجموعة زيوت شرشال ومستغانم (المركب الرئيسي هو الكافور بنسبة 32%). في زيوت *R. tournefortii*، كل هذه الزيوت بشكل عام تحتوي على نفس المركبات الرئيسية بنسب متفاوتة نسبيا. مثل α -بينين (22-27%)، الكافور (20-28%)، الكمفين (21-26%)، والليمونين (8-11%). سمحت المجموعات الهرمية التصاعدية (CHA) بتحديد ثلاث مجموعات، المجموعة الأولى تتكون من زيوت مستغانم والمسيلة، المجموعة الثانية تحتوي على زيت بشار فقط والمجموعة الثالثة التي شكلتها زيوت البويرة والحلفة، هذه الأخيرة تبدو نظرا لتراكيبها الكيميائية أبعد من المجموعتين الأوليين.

فيما يخص محتوى مستخلصات الايثانول من إجمالي الفينول ومركبات الفلافونويد المقدر بالوسائل الطيفية، سجلت عينات *R. tournefortii* مستويات أعلى بكثير من تلك التي تم الحصول عليها مع عينات *R. officinalis* (من 2 إلى 4 مرات أكثر).

تقييم القدرة المضادة للأكسدة تم بطرق مختلفة (DPPH، ABTS، و قوة إرجاع حديد الحديدك)، وأظهر بشكل عام، نشاط مضاد للأكسدة لمستخلصات *R. tournefortii* أكبر نسبيته باستثناء عينة من ENSA.

تقدير نشاط المضاد للميكروبات من خلال تحديد التراكيز الدنيا: سواء المثبطة أو القاتلة لمختلف الزيوت و مستخلصات الإكليل *officinalis* و *tournefortii* على هيئة واسعة الجراثيم: البكتيريا (إيجابية وسلبية الغرام)، والفطريات (المنتجة للسموم ومسببات الأمراض النباتية) والخميرة يكشف عن قدرة للتثبيات الحيوي أكبر من أن تكون كمبيد بيولوجي مع تفوق واضح للمستخلصات.

على الرغم من أن الزيت العطري لـ *R. officinalis* لمدرسة الفلاحة (ENSA) لديها أنشطة مثبطة كبيرة جدا، لاحظنا، مع ذلك، أن الكفاءة الكلية أفضل لزيوت ومستخلصات الـ *R. tournefortii*.

ونلاحظ أيضا المزيد من النشاط المثبط للزيوت والمستخلصات على نمو البكتيريا إيجابية الجرام، الفطريات والخمائر مقارنة للجراثيم سلبية الغرام

كلمات مفتاحية: إكليل الجبل الطبي *Rosmarinus officinalis*، إكليل الجبل الوبري *Rosmarinus tournefortii*، الزيوت الأساسية، المستخلصات، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات.