

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

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en sciences agronomiques
Option : Sciences alimentaires

Thème

Huiles essentielles et extraits de romarin : composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne

Réalisé par : M^{elle} OUTALEB Tydia

JURY:

Président : Mr. ASSAMI M.K.

Maître de conférences (ENSA El Harrach).

Directeur de thèse : Mme. FERHAT Z.

Maître de conférences (ENSA El Harrach).

Examineurs : Mr. HAZZIT M.

Maître de conférences (ENSA El Harrach).

Mr. ZITOUNI A.

Maître de conférences (ENS Kouba).

Mr. MEKIMENE L.

Maître-assistant (ENSA El Harrach).

Année universitaire 2009- 2010

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

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en sciences agronomiques
Option : Sciences alimentaires

Thème

Huiles essentielles et extraits de romarin : composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne

Réalisé par : M^{elle} OUTALEB Tydia

JURY :

Président : Mr. ASSAMI M.K.

Maître de conférences (ENSA El Harrach).

Directeur de thèse : Mme. FERHAT Z.

Maître de conférences (ENSA El Harrach).

Examineurs : Mr. HAZZIT M.

Maître de conférences (ENSA El Harrach).

Mr. ZITOUNI A.

Maître de conférences (ENS Kouba).

Mr. MEKIMENE L.

Maître-assistant (ENSA El Harrach).

Année universitaire 2009- 2010

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. maître de conférences 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 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 d'avoir accepté d'examiner ce travail. Soyez assuré Monsieur de toute mon estime et mon profond respect.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à Mr Assami M.K. maître de conférences à l'ENSA, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury, ainsi que pour les précieux conseils qu'il n'a jamais hésité à me donner.

Je remercie Mr Zitouni A. maître de conférences à l'ENS pour son aide, sa disponibilité et pour m'avoir initiée aux méthodes d'évaluation d'activité antimicrobienne, ainsi que pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes plus vifs remerciements vont aussi à Mr Mekimene L. chargé de cours à l'ENSA pour son soutien constant, son aide et pour avoir accepté de faire partie du jury d'examination.

Mes sentiments de reconnaissance vont également au Pr. Sabaou N. pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de microbiologie de l'ENS (Kouba).

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

Sans oublier Said, Naima et Ghania de la Post Graduation, Fatma-Zohra technicienne au laboratoire de botanique et Hamid du tirage pour leurs aides et leurs sympathies.

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 :

Mes deux grand-mères que dieu leurs prête longue vie ;

Aux deux êtres les plus chers au monde ; mon père et ma mère qui m'ont soutenue tout au long de mon parcours. Je ne les remercierai jamais assez.

A mes très chers frères et sœurs (Fafi, Khalef, Fahima, Doudou) ;

A ma tante Rosa et ses deux fils (Ghiles et Youba) ;

Au reste de ma famille ;

A tout mes amis (es)

Sommaire

Introduction	1
Partie 1 : Etude bibliographique	
Chapitre I : Les huiles essentielles	
1. Définition.....	3
2. Répartition botanique et localisation des huiles essentielles.....	4
3. Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	5
3.1. Extraction à froid	5
3.2. Extraction à la vapeur d'eau	5
3.3. Extraction par le CO ₂ à l'état supercritique.....	7
3.4. Extraction au moyen de solvant.....	7
4. Méthode d'analyse des huiles essentielles.....	9
4.1. L'analyse chromatographique.....	9
5. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	11
6. Composition chimique des huiles essentielles	12
7. Facteurs de variation de la composition chimique des huiles essentielles.....	14
7.1. Chémotype.....	15
8. Domaine d'utilisation des huiles essentielles	15
8.1. Industrie agroalimentaire.....	15
8.2. Phytothérapie.....	16
8.3. Pharmacie.....	16
8.4. Cosmétique et parfumerie.....	16
9. Conservation.....	17
10. Toxicité des huiles essentielles.....	17

10.1. Toxicité par voie orale.....	17
10.2. Toxicité sur cellules animales ou humaines.....	17
10.3. Toxicité dermique.....	18

Chapitre II : Les composés phénoliques

1. Généralités.....	19
2. Classification des composés phénoliques.....	20
2.1. Phénols et acides phénoliques.....	20
2.2. Les tannins.....	20
2.3. Les anthocyanes	21
2.4. Les coumarines.....	21
2.5. Les flavonoïdes.....	22
3. Activité biologique des composés phénolique.....	26

Chapitre III : Monographie de la plante étudiée

1. Taxonomie.....	27
2. Description botanique.....	28
3. Ecologie.....	29
4. Répartition géographique.....	29
5. Composition chimique du romarin.....	31
6. Propriétés du romarin.....	32
7. Toxicité.....	33

Chapitre IV : Phénomènes oxydatifs et implications

1. Définition d'un radical libre.....	34
2. Principaux radicaux libres.....	34
3. Principales cibles radicalaires.....	35

3.1. Les lipides.....	35
3.2. Les acides nucléiques	37
3.3. Les protéines	38
4. Les antioxydants.....	38
4.1. Définition.....	38
4.2. Le mécanisme d'action des antioxydants.....	38
4.3. Classification des antioxydants.....	39
5. Mesure de l'état d'oxydation et du pouvoir antioxydant.....	40
5.1. Analyse sensorielle.....	41
5.2. L'indice de peroxyde.....	41
5.3. Le test de SWIFT.....	41
5.4. L'indice TBA.....	41
5.5. L'indice de p-anisidine.....	41
5.6. Le RANCIMAT.....	41
5.7. Mesure des pouvoirs chélateur et réducteur.....	41
5.8. Mesure du pouvoir de piégeage des radicaux libres.....	42

Chapitre V : Activité antimicrobienne

1. Activités bactéricide et bactériostatique.....	43
1.1. Grandeurs de mesure.....	43
1.2. Expérimentation <i>in vitro</i>	44
1.3. Souches bactériennes.....	45
1.4. Association d'huiles essentielles ou d'extraits.....	45
2. Activités fongicide et sporocide.....	46
3. Composition chimique et activité.....	46
4. Mode d'action.....	48

Partie 2 : Etude expérimentale

Chapitre VI : Matériels et méthodes

1. Matière végétale.....	49
2. Coupes anatomiques et localisation de sites producteurs d'huile essentielle.....	50
3. Extraction des huiles essentielles.....	51
3.1. Protocole d'extraction.....	52
3.2. Rendement de l'extraction.....	52
3.3. Cinétique des extractions.....	53
4. Détermination des caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques des huiles essentielles des trois écotypes.....	53
4.1. Caractéristiques organoleptiques.....	53
4.2. Caractéristiques physico-chimiques.....	53
4.3. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par CPG et CPG/SM.....	54
5. Préparation d'extraits éthanoliques des trois écotypes.....	56
5.1. Mode opératoire.....	56
6. Dosage des composés phénoliques des extraits de romarin.....	57
6.1. Dosage des polyphénols.....	57
6.2. Dosage des flavonoïdes.....	58
7. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits obtenus....	58
7.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH.....	58
7.2. Mesure du pouvoir réducteur.....	60
8. Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits éthanoliques.....	61

8.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	61
8.2. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB).....	61
8.3. Les germes cibles utilisés.....	61
9. Analyse de données.....	64

Chapitre VII : Résultats et discussions

1. Localisation de sites producteurs de l'huile essentielle de romarin.....	65
2. Rendement en huile essentielle.....	66
3. Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle.....	68
4. Cinétique d'extraction des huiles essentielles.....	70
5. Propriétés physiques et organoleptiques des huiles essentielles.....	72
6. Composition chimique des huiles essentielles.....	72
6.1. Composition chimique de l'huile essentielle du romarin de l'INA.....	75
6.2. Composition chimique de l'huile essentielle du romarin de Tablat.....	79
6.3. Composition chimique de l'huile essentielle du romarin de Beni Yenni.....	82
6.4. Comparaison des compositions des huiles essentielles étudiées.....	86
7. Rendement en extraits.....	88
7.1. Teneur en phénols totaux.....	89
7.2. Teneur en flavonoïdes.....	91
8. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits de romarin étudiés.....	93
8.1. Activité de piégeage du radical DPPH.....	93
8.2. Pouvoir réducteur.....	99

9. Activités antimicrobienne, antifongique et antilevurienne.....	104
9.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles et des extraits de romarin.....	104
9.2. Détermination des concentrations minimales bactéricide fongicides et antilevurienne des huiles essentielles et extraits de romarin.....	108
Conclusion	110

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

d_{20}^{20}	Densité relative à 20°C
%	Pourcentage
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
BY	Beni Yenni
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	Heure
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
INA	Institut National Agronomique
ISP2	International streptomycetes medium II
J-C	Jésus Christ
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
T	Température
TBA	Acide thiobarbiturique
TBHP	Trihydroxybutyrophénone
TBHQ	Ter-Butyl-hydroxy-quinone
tr/mn	Tour par minute
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultra Violet
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
ρ	para

Liste des tableaux

Tableau 01 : Activités biologiques des composés polyphénoliques.....	26
Tableau 02 : Principales localisations géographiques, appellations et utilisations du romarin en Algérie.....	29
Tableau 03 : Caractéristiques de chaque région.....	49
Tableau 04 : Souches bactériennes testées par les huiles essentielles et les extraits de romarin, leurs caractéristiques et les pathologies engendrées pour l'homme	62
Tableau 05 : Rendement en huile essentielle des trois romarins.....	66
Tableau 06 : Variation du rendement en huile essentielle des romarins étudiés en fonction du temps d'extraction.....	70
Tableau 07 : Caractéristiques physiques et organoleptiques des huiles essentielles.....	72
Tableau 08 : Composition (%) chimique des huiles essentielles des différents romarins étudiés.....	73
Tableau 09 : Rendements en extrait des trois romarins étudiés.....	88
Tableau 10 : Teneurs en phénols totaux des différents extraits.....	90
Tableau 11 : Teneur en flavonoïdes des différents extraits de romarin.....	92
Tableau 12 : Activité de piégeage du radical DPPH des différentes huiles essentielles de romarin comparée à celle du BHT.....	93
Tableau 13 : Récapitulatif de l'ANOVA des activités de piégeage du radical DPPH exprimées par les huiles des trois écotypes.....	94
Tableau 14 : Résultats d'activité de piégeage du radical DPPH des différents extraits de romarin comparée à l'activité du standard BHT.....	96
Tableau 15 : Récapitulatif de l'ANOVA des activités de piégeage du radical DPPH exprimées par les extraits des trois écotypes.....	96

Tableau 16 : Valeurs d'IC ₅₀ , phénols totaux et flavonoïdes des différents extraits.....	99
Tableau 17 : Pouvoir réducteur des différentes huiles essentielles de romarin et du BHT.....	100
Tableau 18 : Récapitulatif de l'ANOVA des pouvoirs réducteurs exprimés par les huiles essentielle des trois écotypes.....	100
Tableau 19 : Pouvoir réducteur des différents extraits de romarin comparé au pouvoir réducteur du BHT et de l'acide ascorbique.....	102
Tableau 20 : Récapitulatif de l'ANOVA des pouvoirs réducteurs exprimés par les extraits des trois écotypes.....	102
Tableau 21 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentielles et des extraits.....	104
Tableau 22 : Concentrations Minimales Bactéricides des huiles essentielles et des extraits.....	109

Liste des figures

Figure 01 : exemple de structure de composés monoterpéniques	12
Figure 02 : exemple de structure de composés sesquiterpéniques	13
Figure 03 : exemple de structure de composés aromatiques	13
Figure 04 : Squelette de base des flavonoïdes	22
Figure 05 : Différentes classes de flavonoïdes.....	23
Figure 06 : Le romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	28
Figure 07 : Composés phénoliques caractéristiques des extraits de Romarin	31
Figure 08 : Oxydation d'un acide gras insaturé.....	37
Figure 09 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.....	39
Figure 10 : Localisation des trois régions de récolte.....	50
Figure 11 : Microscope photonique équipé d'un appareil photo.....	51
Figure 12 : Montage du procédé de l'entraînement à la vapeur.....	51
Figure 13 : Réaction du radical DPPH avec un antioxydant AH.....	59
Figure 14 : Procédure de mise en œuvre du test du pouvoir réducteur.....	60
Figure15 : Coupe transversale de la feuille de romarin mettant en évidence la présence de poils sécréteurs (PS) et tecteurs (PT).....	65
Figure 16 : Schéma d'un poil sécréteur et tecteur.....	65
Figure 17 : Coupe transversale de la feuille de romarin mettant en évidence la présence d'un poil glandulaire (PG)	65
Figure 18 : Schéma d'un poil glandulaire.....	65
Figure 19 : Coupe transversale de la tige de romarin mettant en évidence la présence d'un poil tecteur, sécréteur et glandulaire.....	66

Figure 20 : Rendement en huiles essentielles des trois romarins.....	67
Figure 21 : Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle du romarin de l'INA.....	68
Figure 22 : Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle du romarin de Tablat.....	68
Figure 23 : Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle du romarin de Beni Yenni.....	69
Figure 24 : Cinétique d'extraction des huiles essentielles des romarins étudiés.....	71
Figure 25 : Composition chimique de l'huile essentielle du romarin de l'INA.....	76
Figure 26 : Familles de composés identifiés du romarin de l'INA	76
Figure 27 : Proportion de composés majoritaires du romarin de l'INA.....	76
Figure 28a : Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle du romarin de l'INA.....	77
Figure 28b : Chromatogramme CPG de l'huile essentielle du romarin de l'INA.....	78
Figure 29 : Composition chimique de l'huile essentielle du romarin de Tablat.....	80
Figure 30 : Familles de composés identifiés du romarin de Tablat.....	80
Figure 31 : Proportion de composés majoritaires du romarin de Tablat.....	80
Figure 32a : Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle du romarin de Tablat.....	81
Figure 32b : Chromatogramme CPG de l'huile essentielle du romarin de Tablat.....	82
Figure 33 : Composition chimique de l'huile essentielle du romarin de Beni Yenni.....	83
Figure 34 : Familles de composés identifiés du romarin de Beni Yenni	83
Figure 35 : Proportion de composés majoritaires du romarin de Beni Yenni	83
Figure 36a : Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle du romarin de Beni Yenni.....	84
Figure 36b : Chromatogramme CPG de l'huile essentielle du romarin de Beni Yenni.....	85
Figure 37 : Proportion des familles de composés identifiés du romarin des trois régions étudiée.....	87
Figure 38 : Spectres de masse du filifolone. A : Spectre de masse du composé détecté dans l'huile essentielle. B : Spectre de masse du filifolone fourni par la banque de donnée.....	87
Figure 39 : Rendements en extraits.....	88

Figure 40 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	89
Figure 41 : Teneur en phénols totaux.....	90
Figure 42 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	91
Figure 43 : Teneur en flavonoïdes des extraits	92
Figure 44 : Activité de piégeage du radical DPPH par les différentes huiles essentielles de romarin et du BHT.....	94
Figure 45 : Activité de piégeage du radical DPPH par les différents extraits de romarin et du BHT.	97
Figure 46 : IC ₅₀ des différents extraits et du BHT.....	98
Figure 47 : Pouvoir réducteur des différentes huiles de romarin et du BHT.....	101
Figure 48 : Pouvoir réducteur des différents extraits de romarin, du BHT et de l'acide ascorbique..	103
Figure 49 : Représentation schématique de la Structure de la membrane des bactéries Gram négatif.....	107

Introduction

Introduction

La nature cache une multitude de merveilles auxquelles, trop souvent, aucune attention n'est portée.

Grâce à leurs propriétés biologiques, les huiles essentielles ainsi que les extraits de plantes médicinales et aromatiques constituent l'une de ces merveilles. Ces plantes représentent donc 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 huiles essentielles et 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**). Ainsi, le fort pouvoir antioxydant et antimicrobien des 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**).

L'engouement actuel du grand public pour les produits d'origine naturelle, accentué par les effets controversés des additifs alimentaires de synthèse sur la santé, oblige les secteurs agroalimentaire et pharmaceutique au recours à de tels produits en remplacement de produits purement synthétiques à l'instar des additifs antioxydants BHT, BHA et TBHQ (**Paradiso *et al.*, 2008**).

L'organisme produit quotidiennement des radicaux libres, composés très réactifs comportant un électron célibataire nécessaires 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 huiles essentielles et 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 aux extraits paraît comme une alternative pour la réduction des risques de développement d'antibiorésistance liée à l'émergence de microorganismes pathogènes mutants.

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 huiles essentielles et 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.

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*), de plusieurs régions du monde a montré de multiples propriétés bioactives qui seraient intéressantes de comparer à celles du romarin d'Algérie.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une meilleure connaissance du romarin d'Algérie du point de vue de la composition chimique, par l'étude de sa variabilité 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 romarin de trois régions d'Algérie (Alger, Tizi-Ouzou et Médéa).

Dans la seconde partie les extraits, qui n'ont pas fait l'objet de travaux antérieurs, ainsi que les huiles essentielles seront testés pour leurs éventuelles activités antioxydante et antimicrobienne.

Partie I

Etude bibliographique

Chapitre I

Les huiles essentielles

Chapitre I : Les huiles essentielles

La connaissance des huiles essentielles 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 font 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**).

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

1. Définition

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 formées dans des cellules spécialisées ou groupe de cellules ».

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** 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).

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.

2. Répartition botanique et localisation des huiles essentielles

Parmi les espèces végétales (800 000 à 1500 000 selon les botanistes), 10% seulement sont dites aromatiques, c'est-à-dire elles synthétisent et secrètent des infimes quantités d'huiles essentielles (**Bruneton, 1999**).

La synthèse des huiles essentielles revient aux appareils sécréteurs contenus dans les organes végétaux (feuilles, fleurs, écorces, bois racine, fruit et graine). Ces appareils sont souvent situés sur ou à proximité de la surface du végétal et c'est l'espèce à laquelle appartient l'arbre ou la plante qui va déterminer lequel va entrer en action : poils sécréteurs externes dans le cas des Labiées et des Géraniacées, cellules sécrétrices dans le cas des Lauracées, Magnoliacées et des Pipéracées, poches sécrétrices dans le cas des Myrtacées, des Rosacées et Rutacées, et canaux sécréteurs pour les Ombellifères et les conifères (**Bruneton, 1999**).

3. Procédés d'extraction des huiles essentielles

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction des huiles essentielles. Cette dernière est l'une des plus difficiles et des plus délicates, puisqu'elle a pour but de capter les produits les plus fragiles élaborés par le végétal et cela, sans en altérer la qualité (**Lardy et Haberkorn, 2007**).

3.1. Extraction 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**).

Dans le cas des agrumes, on parle d'essence et non d'huiles essentielles car aucune modification chimique liée à des solvants ou à la vapeur n'a eu lieu (contrairement à l'hydrodistillation ou l'extraction par solvants volatils).

3.2. Extraction à la vapeur d'eau

3.2.1. 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.

La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'huile (**Lucchesi, 2005**).

3.2.2. 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 Penoël, 1990 ; Lucchesi, 2005**).

3.2.3. Hydrodistillation par micro-onde sous vide

Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable.

La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par micro-ondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées (**Bendahou et al., 2007; Lucchesi et al., 2007**).

3.2.4. 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**).

3.2.5. Extraction-Distillation Simultanée

C'est une extraction liquide-liquide qui est menée dans un appareil dit de « Likens et Nickerson ». 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**).

3.3. 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**).

Cette méthode est très prometteuse car le produit obtenu est proche du naturel et sans trace de solvant. De plus le CO₂ est non toxique, incolore, inodore et ininflammable, ce qui permet des conditions de sécurité supérieures.

3.4. Extraction au moyen de solvants

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. Ces méthodes sont l'extraction par les solvants fixes c'est-à-dire une extraction par les corps gras (enfleurage) et l'extraction par les solvants volatils (extraction par l'hexane) (**Garnero, 1996**).

3.4.1. Extraction par solvant volatil

Elle 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**).

3.4.2. 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**).

4. Méthode d'analyse des huiles essentielles

Lorsque l'huile essentielle d'une plante est extraite, il est utile d'abord d'en connaître sa composition chimique et ensuite quelques paramètres physico-chimiques qui seront nécessaires à la qualification de la dite huile.

La meilleure carte d'identité d'une huile essentielle reste cependant son profil chromatographique en phase gazeuse. Ce profil permet de connaître avec exactitude la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels les pesticides ou les produits chimiques ajoutés.

4.1. L'analyse chromatographique

En alliant une technique de séparation de haute résolution à une méthode de détection très sensible, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) sont devenues des méthodes de choix pour l'analyse des mélanges aussi complexe que celle des huiles essentielles. Etant donné la gamme très diversifiée des concentrations des composés d'une huile essentielle, seules ces techniques de part leur grande sensibilité (de l'ordre de μg), permettent de contribuer à la résolution de la plupart des problèmes d'identification rencontrés.

4.1.1. 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. 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**).

4.1.2. Spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse est utilisée depuis de nombreuses années pour l'élucidation de la structure de composés organiques. 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 et biologiques, 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.

4.1.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

Cette technique permet d'obtenir à la fois les temps de rétention des constituants volatils 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 est rendu possible grâce au couplage du CPG directement à la spectrométrie de masse.

Lors du couplage, la chromatographie (CPG) 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 étages (**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.

4.1.4. 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).

5. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont généralement incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire. Elles sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1 (sauf les huiles essentielles de cannelle, de girofle et de saffran qui ont densité supérieure à celle de l'eau). Elles ont un indice de réfraction qui varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés ; une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse.

Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques (**Bruneton, 1995**).

6. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents (**Sell, 2006**). Elles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des composés terpéniques, prépondérants dans la plupart des essences, et des dérivés du phénylpropane, retrouvé en tant que composé majoritaire dans quelques unes, telles que les essences d'anis, de cannelle, de girofle, etc... Divers autres constituants minoritaires leurs sont associés.

De nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont également considérés comme des composés terpéniques (**Sharma et al., 2003 ; Wagner et al., 2004**).

- **Les composés terpéniques :** ils 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 01) et trois pour les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène, etc...) (Figure 02). 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.

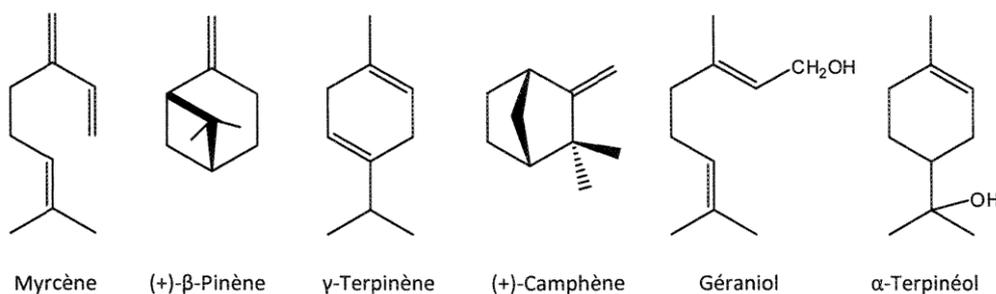


Figure 01 : Exemple de structure de composés monoterpéniques

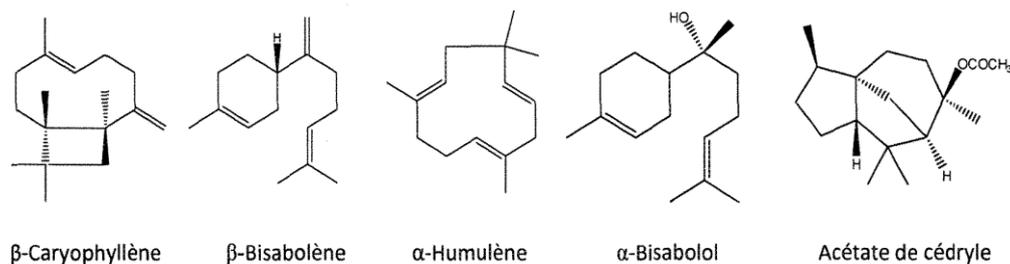


Figure 02 : Exemple de structure de composés sesquiterpéniques

- Les composés aromatiques :** sont moins abondants que les terpénoïdes, ce sont des arènes issues d'une voie métabolique secondaire dite de l'acide shikimique. Ce sont des composants odorants de type « phénylpropanoïdes » (**Kurkin, 2003**). Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole, etc... (figure 03). Ces composés sont caractéristiques des huiles essentielles du clou de girofle, de la vanille, de la cannelle, du basilic, de l'estragon, etc... (**Bruneton, 1999**).

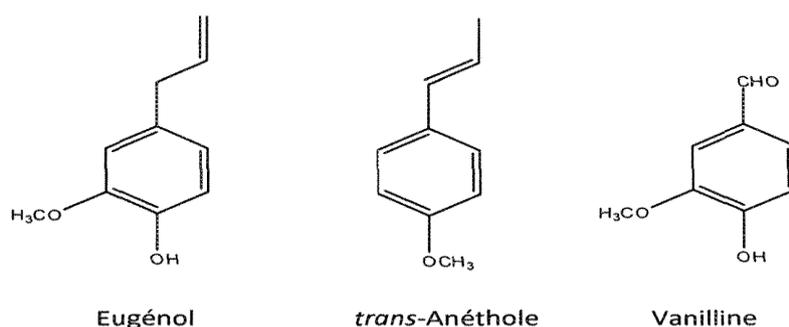


Figure 03 : Exemple de structure de composés aromatiques.

Il existe naturellement d'autres corps qui peuvent entrer en faible proportion dans la constitution de certaines huiles essentielles : acides organiques, cétones de faible poids moléculaire, coumarines volatiles, etc... (**Bernard et al., 1988**).

La structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus au moins longue. Sur ce squelette de base sont souvent présents un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène (O): terpènes (ex : limonène, camphre), alcools (ex : linolool, géraniol), cétone (ex : thuyone,

carvone), phénols (ex : thymol, carvacrol), aldéhyde (ex : aldéhyde cinnamique), éthers (ex : eucalyptol) (**Pibiri, 2005**).

7. Facteurs de variation de la composition chimique des huiles essentielles

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'huile essentielle. 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. Chez la *Mentha piperita* par exemple, les nuits froides favorisent la formation de menthol alors que les nuits tempérées favorisent celle du menthofuranne (**Bruneton, 1999**).

L'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le moment dans l'année sont en effet des facteurs importants.

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

Les changements les plus importants interviennent lors du 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 des huiles essentielles comme :

- l'organe utilisé pendant l'extraction : En effet la teneur en huile essentielle 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**).

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.

7.1. Chémotype

Au sein d'une même espèce de plante, la composition de l'huile essentielle des 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**). Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables.

Cette notion de chémotypes est fondamentale en aromathérapie car les indications thérapeutiques qui découlent de ces divers éléments chimiques spécifiques peuvent être très différentes.

8. Domaine d'utilisation des huiles essentielles

8.1. 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 des huiles essentielles (**Lachowicz et al. 1998**).

L'origan, le thym, la sauge, le romarin, les clous de girofle sont des plantes aromatiques fréquemment utilisés comme ingrédients alimentaires. Les huiles essentielles 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

toxinogène de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires (**Bilgrami et al., 1992**).

8.2. 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**).

8.3. 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**).

8.4. Cosmétique et parfumerie

L'utilisation des huiles essentielles 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**).

9. Conservation

Très volatiles par nature, les huiles essentielles peuvent rapidement perdre leurs propriétés. Très vite, elles commencent à vieillir, généralement au bout de 6 mois. Pour cela, elles doivent être impérativement gardées à l'abri de l'air, de la lumière et de la chaleur, et contenues dans des flacons en verre (les huiles essentielles sont réputées « ronger » les plastiques) opaques ou teintés (en bleu ou brun) hermétiquement clos, entreposés debout. (Abrassart, 1997; Telphon, 2003).

10. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles 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 huiles essentielles est d'autant plus important que leur utilisation, de plus en plus populaire, tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telle que l'aromathérapie (Smith *et al.*, 2000).

10.1. Toxicité par voie orale

En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL₅₀ supérieures à 5 g/Kg. En ce qui concerne la sarriette et l'origan la toxicité est un peu plus élevée avec des DL₅₀ 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).

10.2. Toxicité sur cellules animales ou humaines

Certaines huiles essentielles 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 *et al.*, 2003). Par ailleurs, des huiles essentielles de différentes variétés d'origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaines dérivées de cancers (Sivropoulou *et al.*, 1996).

10.3. Toxicité dermique

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

Chapitre II

Les composés phénoliques

Chapitre II : Les composés phénoliques

Ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que 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.

1. Généralités

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules. Ce sont des métabolites dits « secondaires », ce qui signifie qu'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 Cheyner, 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**).

Les polyphénols 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**).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidines) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes, ces composés phénoliques sont classés dans les antioxydants naturels. Leurs propriétés antioxydantes, mais aussi antibactériennes, antifongiques, antivirales, ..., ont été démontrées *in vitro* (**Ren et al., 2003 ; Rodrego et Bosco, 2006**).

Cette dernière décennie a vu une augmentation des études biologiques de ces composés. Cet intérêt est lié aux résultats de diverses études épidémiologiques ayant établi une relation entre la consommation d'aliments contenant des polyphénols, et la moindre incidence de certaines pathologies comme les affections cardiovasculaires, microbiennes, inflammatoires, l'ostéoporose et les cancers (**Ren et al., 2003**).

2. Classification des composés phénoliques

Il existe de nombreuses classes de polyphénols : phloroglucinols, quinones, stilbénoides, coumarines, acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanes, 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

2.5.1. Définition et localisation des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances naturelles issues des plantes, présentes dans tout le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles.

Ils 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 04) (**Bruneton, 1999**).

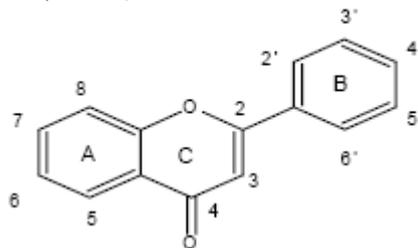


Figure 04 : Squelette de base des flavonoïdes

C'est chez les Angiospermes que la diversité structurale des flavonoïdes est maximale. On les trouve, d'une manière générale 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.

La teneur en flavonoïdes dans les végétaux 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**).

2.5.2. 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.

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.

Ainsi, les flavonoïdes existent sous différentes classes et ceci en fonction du degré d'oxydation et d'insaturation du cycle C (figure 05) (**Forkmann et Martens, 2001**).

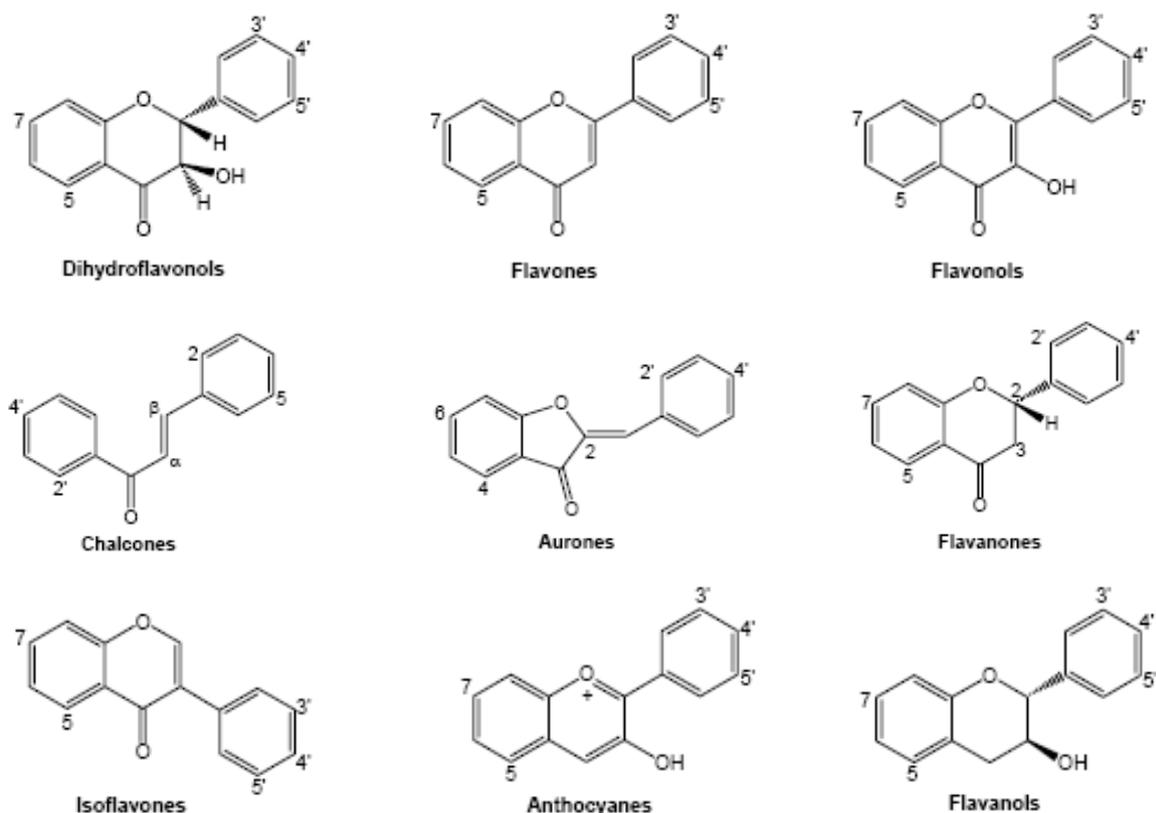


Figure 05: Différentes classes de flavonoïdes

2.5.3. Quelques 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 01.

Tableau 01: Activités biologiques des composés polyphénoliques (**Frankel et al., 1995**).

Polyphénols	Activités
Acides phénols (cinnamique et benzoïque)	Antibactériens Antifongiques Antioxydants
Coumarines	Vasoprotectrices et antiœdémateuses
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 III

Monographie de la plante

Chapitre III : Monographie de la plante étudiée

Le romarin du latin, *Rosmarinus officinalis linnaeus* signifiant « rose de la mer » ou encore appelé « Herbe aux couronnes », « Herbe aux troubadours » était déjà employé dans l’Egypte ancienne puis il est parvenu en Europe Centrale au IX^e siècle par l’intermédiaire des moines bénédictins. Le romarin acquit surtout sa célébrité parce que qu’il entrainait dans la composition de l’eau de la reine de Hongrie; En effet, âgée de soixante-douze ans, infirme et goutteuse; elle aurait retrouvé vigueur et beauté par une cure de cette eau magique (**Teuscher et al., 2005**).

Les mariées romaines portaient des couronnes de romarin tandis que les invités recevaient des branches enjolivées de rubans de soie multicolores.

Les étudiants grecs se confectionnaient des couronnes de romarins car elles avaient la réputation d’améliorer mémoire et facultés intellectuelles. Il y a d’ailleurs un adage qui dit que le romarin est à l’esprit ce que la lavande est à l’âme.

1. Taxonomie

La classification botanique complète du genre *Rosmarinus L.* n’a été achevée qu’au début 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 importantes de la flore d’Algérie, compte plus de 200 genres et 3500 espèces (**Boelens, 1985**).

La systématique du romarin est la suivante:

Règne : Plantae (végétal)

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae (alt. Labiatae)

Genre : *Rosmarinus*

Trois espèces du genre *Rosmanirus L* ont été décrites : *Rosmanirus officinalis L*, *Rosmanirus eriocalyx* et *Rosmanirus tomentosus* (**Quezel et Santa, 1963**).

2. Description botanique

Le romarin se présente sous forme d'un arbuste ou sous-arbrisseaux ligneux très odorants touffu, xérophyte, fortement rameux toujours vert, à racine pivotante et à tiges ligneuses, généralement érigées, pouvant atteindre jusqu'à 2 mètres de hauteur (**Quezel et Santa, 1963**).

- **Les feuilles** portées par des rameaux subarrondis, sont opposés et sessiles, étroites et lancéolées, de 4cm de long sur 5mm de large ; leur port est raide, leur texture dure et coriace, leurs limbes épais, cassant, vert foncé sur la face supérieure et blanchâtre sur la face inférieure ; ses bords sont enroulés sur le dessous et la nervure médiane est saillante.
- **Les fleurs** sont regroupées en petites grappes axillaires terminales, disposées à l'aisselle des feuilles, le calice bilabié à la forme d'une clochette ovale et duveteuse, la corolle est longuement tubuleuse, de 1,2 cm de large, bleu pâle, lilas ou blanche mais souvent maculée de petites taches violettes.
- **Le fruit** est un tétrakène lisse et globuleux, brun foncé de 2,3mm de long (**Teuscher et al., 2005**). La floraison a lieu de mai à juillet (figure 06).



Figure 06 : Le romarin (*Rosmarinus officinalis*)

3. Ecologie

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. Il est répandu sur la plupart des maquis, garrigues, sur les rivages marins, on le rencontre jusqu'à 1500m d'altitude. Il accompagne souvent le pin d'Alep, la sauge, le thym (Gilly, 2005).

4. Répartition géographique

Dans le monde, le romarin pousse dans de nombreux pays d'Europe et d'Asie notamment en Espagne, Italie, Grèce, sud de la France, nord de l'Afrique (du Maroc à la Tunisie), Inde, les Philippines, les Antilles, l'Australie, les Etats-Unis et le Mexique (Pelikan, 1986 ; Teuscher *et al.*, 2005).

En Algérie le romarin s'étale sur une superficie excédant 100 000 hectares (Bensebia *et al.*, 2009) et les principales localisations, appellations et utilisation traditionnelle sont reportées dans le tableau 02.

Tableau 02 : Principales localisations géographiques, appellations et utilisations du romarin en Algérie.

Wilaya	Nom local	Partie utilisée	Utilisation en médecine traditionnelle	Mode d'emploi	Superficie approximative
Biskra	K'lil	Toute la partie aérienne	Rhumatisme-Douleurs stomacales – Défaillance de foie	Tisane	1500 ha
Khenchela	K'lil	Feuilles	Maladies du cœur – Estomac – jaunisse	Infusion	5000 ha
Bouira	M'zir	Feuilles	Douleurs stomacales – Plante fourragère	Infusion	ND
Ain – Temouchent	Halhal	Toute la partie aérienne	Asthénie – Cellulite – Frigidité – Migraine – Œdème – Surmenage – Dépression nerveuse – Entorse – Foie – Impuissance	Infusion Inhalation Massage Embrocation	800 ha

Nâama	Yazir el Bel	Rameaux et fleurs	Antispasmodique et antiseptique	Infusion et bain	500 ha
El-bayadh	Azir halhal	Feuille	Insomnie – Fonction biliaire – Troubles intestinaux – Tonique pour le foie	Tisane	ND
Mila	ND	Feuille	Antispasmodique et antiseptique – Plante fourragère – Mélangée au bain contre les peaux sensibles.	Infusion	4000 ha
Mascara	Halhal	Feuille	Antispasmodique – Carminatif – Stomachique – Cholagogue – Emmenagogue – Cosmétique (parfums)	Extrait sec et liquide – Eau distillée – Sirop – Infusion – Collyre.	1500 ha
Médéa	Yazir	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	ND
M'sila	ND	Feuille	Toux – Conjonctivite – Graines consommées par les ovins – Appréciée par les abeilles	Infusion Collyre	45000 ha
Sétif	El' klil	Feuilles et fleurs	Douleurs gastriques et coliques - Condimentaires	Infusion	3500 ha
Souk ahras	ND	Feuilles	Estomac – Cuir chevelu	Infusion	4410 ha
Béjaia	ND	ND	ND	ND	500 ha
Sidi Belabes	ND	ND	Estomac - Grippe	ND	429,5 ha
Oran	ND	Feuilles	Antispasmodique et antirhumatismale	Infusion	2570 ha
Mostaganem	ND	Feuilles	Rhumatisme	ND	400 ha

ND : non déterminé

5. Composition chimique du romarin

- **Huile essentielle** : représente 1 à 3% de la plante, sa composition ainsi que la concentration en ses composés dépend fortement des chémotypes. En effet ses principaux constituants peuvent être du 1,8-cinéole (teneur peut varier entre 3 et 60% selon le chémotype), l' α -pinène (1 à 57% selon le chémotype), du camphre (1 à 57% selon le chémotype), du bornéol (1 à 18% selon le chémotype), de l'acétate de bornyl (1 à 21% selon le chémotype), de la verbénone (0 à 28% selon le chémotype), du *p*-cymène (0,5-10% selon le chémotype) ou du myrcène (0,5 à 12% selon le chémotype) ; ils peuvent être accompagnés de β -caryophyllène, de limonène, de linalool, de β -pinène, de sabinène, de γ -terpinène, d' α -terpinéol et de terpinéol-4 (Teuscher *et al.*, 2005).
- **Phénols diterpiniques**: 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)**: représente 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 07).

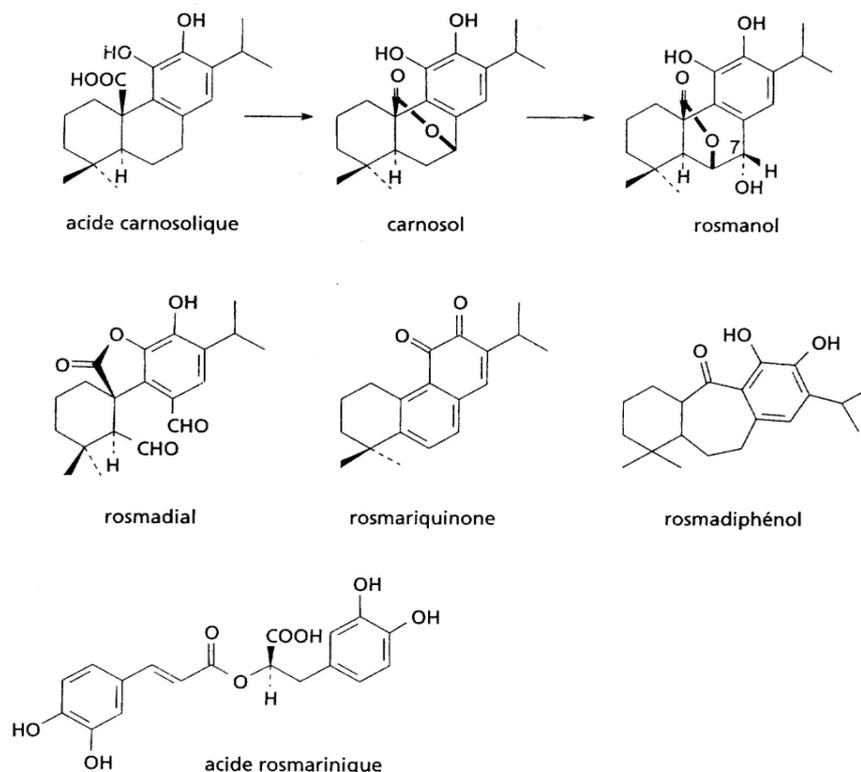


Figure 07: Composés phénoliques caractéristiques des extraits de Romarin

Nous concluons que la composition varie selon la localisation géographique. Déjà en 1973 **Granger et al.**, avaient remarqué que le composé majoritaire du romarin d'Italie est le 1,8 cinéole, alors que pour le romarin de Corse c'est l' α -pinène et le camphor pour le romarin poussant en Espagne.

6. Propriétés du romarin

L'huile essentielle de romarin est largement utilisée dans l'industrie alimentaire (boissons alcoolisées, desserts, bonbons, etc.). Elle agit comme agent aromatisant et conservateur du fait de ses propriétés antioxydante, antimicrobienne et antiradicalaire (**Gachkar et al., 2007**). Elle est aussi utilisée comme composant aromatique dans l'industrie des cosmétiques (savons, parfums, crèmes, etc.).

Elle contribue à l'augmentation des sécrétions biliaires, agit dans les affections du système nerveux et se révèle un excellent cicatrisant des plaies et brûlures.

Les extraits de Romarin sont connus pour leurs propriétés anti-oxydantes puissantes grâce à leurs constituants flavonoïdique et phénolditerpenique qui agissent comme des donneurs d'hydrogène et de capteurs de radicaux libres afin d'améliorer la conservation des produits alimentaires riches en graisses (**Frankel et al., 1996**).

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 promettant candidats pour les programmes chémopréventifs (**Cheung et Tai, 2007**).

Des extraits éthanoliques ont montré une importante dose-dépendante activité 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**).

7. Toxicité

Des effets secondaires n'ont pas été mentionnés quand le romarin est utilisé correctement, aux doses thérapeutiques adéquates (jusqu'à 20 gouttes par jours), mais à forte dose il peut être toxique (**Teuscher *et al.*, 2005**).

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 épileptisante (**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 IV

Phénomènes oxydatifs et implications

Chapitre IV : Phénomènes oxydatifs et implications

L'oxygène moléculaire est un élément indispensable à la vie des organismes aérobiques. Toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces oxygénées réactives (EOR).

Aux doses faibles, ces espèces sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques telle que la transduction du signal. Aux doses excessives, elles 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**).

Le stress oxydant 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. Définition d'un radical libre

Un radical libre est une espèce, atome ou molécule, 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**).

2. 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 (1O_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).

3. Principales cibles radicalaires

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

3.1. Les lipides

L'un des principaux problèmes de l'industrie agroalimentaire est d'assurer la conservation des aliments. Les phénomènes d'oxydation sont notamment redoutés. En effet, au niveau des lipides, les dégradations oxydantes 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).

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 liaisons doubles. Dans le cas précis des acides gras (et donc des molécules qui les contiennent dans leurs structures: glycérides, phospholipides...). Il est important de noter que les acides gras polyinsaturés, s'ils sont aujourd'hui unanimement considérés comme

meilleurs pour la santé (cas des $\omega 3$), 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**).

L'oxydation des lipides 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*. La réaction expliquant le phénomène d'oxydation a pour nom peroxydation lipidique. Cette réaction se déroule en trois phases suivantes (figure 08).

- **Phase d'initiation**

Elle consiste en la rupture homolytique, occasionnée par un initiateur radicalaire, d'une liaison C-H de la chaîne d'un acide gras, ce qui en fait un composé radicalaire très réactif vis-à-vis de l'oxygène et qui va donc se transformer en radical peroxyde. Ce mode d'initiation, favorisé par une élévation de température, peut être produit par des radiations ionisantes, des générateurs chimiques, des systèmes enzymatiques ou chimiques produisant des espèces activées de l'oxygène, ou de traces.

- **Phase de propagation**

Phase de propagation au cours de laquelle le radical peroxyde va arracher un hydrogène à un autre acide gras, créant un nouveau radical et entretenant ainsi une réaction en chaîne, pour se transformer en hydroperoxyde.

Lors de cette phase un seul radical libre peut initier la formation de nombreuses molécules d'hydroperoxydes (1000 ou plus par minute). La quantité d'hydroperoxydes générée correspond à la quantité d'oxygène consommée lors de l'oxydation des chaînes d'acide gras. La vitesse de formation des hydroperoxydes s'accélère au cours du temps (**Croguennec et al., 2006**).

Cette étape se traduit aussi par l'évolution des hydroperoxydes en composés secondaires d'oxydation, par deux voies principales (**Judde, 2004**) ;

- Une voie dite de scission, conduisant par coupure à la libération de composés volatils, notamment aldéhydiques, responsables de flaveurs de rance, caractérisés par un seuil de détection très faible ;
- une voie dite de remaniement, conduisant ensuite à différents types de pontage intra ou inter – acides gras à l'apparition d'acides gras oxydés, de triglycérides oxydés ;

Au cours de la phase de propagation l'auto oxydation s'auto-entretient, les lipides insaturés disparaissent progressivement. Puis, la concentration en hydroperoxydes croît pour atteindre son maximum (**Richard, 1992**).

▪ Phase de terminaison

La réaction s'achève d'elle-même lorsqu'il n'y a plus de molécules disponibles ou par recombinaison de deux radicaux libres entre eux pour conduire à un produit qui n'est pas un radical.

Il est à noter que certains antioxydants provoquent la terminaison de la peroxydation en piégeant les radicaux peroxydes. Ces antioxydants sont appelés «**chain breaking**» (Richard, 1992).

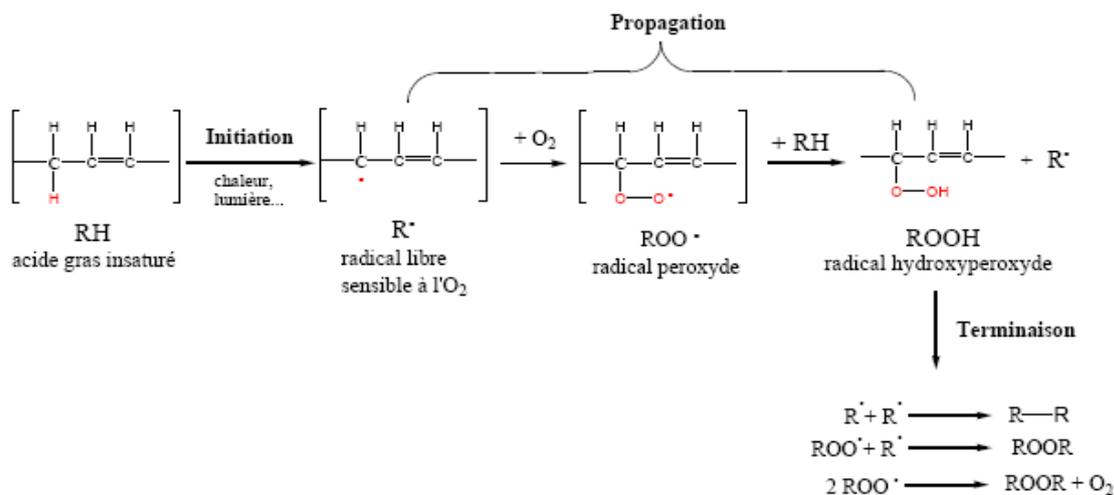


Figure 08 : Oxydation d'un acide gras insaturé (Moll et Moll, 1998)

3.1.1. Facteurs influençant l'oxydation des lipides

Les facteurs qui influencent l'oxydation des lipides sont nombreux. Il s'agit de facteurs intrinsèques tels que la composition en acides gras des lipides (nombre et position des insaturations), la présence de pro oxydants (hème, ions métalliques, enzymes) ou d'antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes...) et des facteurs externes telles que la température, la lumière, la pression partielle en oxygène, l'activité de l'eau, les conditions de stockage et de transformation (Eymard, 2003; Prior, 2003).

3.2. 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**).

3.3. 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**). 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**).

4. Les antioxydants

4.1. Définition

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.

4.2. 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 09).

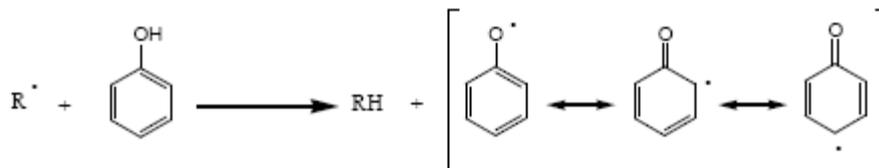


Figure 09 : Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques

4.3. Classification des antioxydants

4.3.1. 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 coll.*, 1997). Les molécules responsables de cette activité sont des molécules phénoliques et les acides carnosique, rosmarinique et carnosol.

3.3.2. 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.

4.3.4. 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.

5. 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 remarque :

- 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.

5.1. 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**).

5.2. 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.

5.3. 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.

5.4. 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.

5.5. 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.

5.6. 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.

5.7. 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.

5.8. 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'-diphényl-1-picrylhydrazyl DPPH et le radical cation 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate)ABTS.

Chapitre V
Activité antimicrobienne

Chapitre V : Activité antimicrobienne

Les vertus antiseptiques des huiles essentielles sont empiriquement connues et utilisées en médecine traditionnelle depuis l'antiquité (**Hala *et al.*, 2000**). 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, on note l'étude faite par Chamberland en 1887 de l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle (**Beylier-Maurel, 1976**), et qu'en 1919 Gatte Fosse a montré que le bacille de Koch était 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 létale 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. Expérimentation *in vitro*

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**).

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.

Juven et al. (1994) ont obtenu une diminution importante des cellules vivantes de *Salmonella typhimurum* 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**).

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.

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 supprimeur 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 Péroël, 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 *Echericha 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 ; Carvacol, *p*-cymene, 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**).

Etant donné la complexité de leur composition chimique, 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.

La majorité des travaux cités dans les publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne.

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 dûe 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

Matériels et méthodes

Chapitre VI : Matériels et méthodes

1. Matière végétale

Le matériel végétal est constitué de trois écotypes de romarin (*Rosmarinus officinalis*), collecté au mois de Mars de différentes régions (tableau 03 et figure 10) qui sont :

- Ecole Nationale Supérieure Agronomique ENSA ex. INA (Alger)
- Tablat (Médéa), poussant à l'état spontané
- Beni yenni (Tizi Ouzou), poussant à l'état spontané

Tableau 03 : Caractéristiques de chaque région

Région	Altitude (m)	Latitude Nord	Longitude Est	Etage bioclimatique	Type de sol
ENSA (Alger)¹	48	36° 43'	3° 08'	Sub-humide à hiver tempéré	Sol limono-argileux avec un faible taux de calcaire et riche en matière organique
Tablat (Médéa)²	450	36°,24'	3°,19'	Sub-humide à hiver tempéré	Sol pauvre insaturé à teneur faible en calcaire et moyennement riche en matière organique en surface
Beni yenni (Tizi Ouzou)³	835	36°,39'	4°,24'	Sub-humide à hiver tempéré	Sol essentiellement calcaire recouvert d'une mince couche d'argile et d'humus

¹Mihoub, (2007) ; ²Zaouche, (1990) ; ³Fernane, (2009).

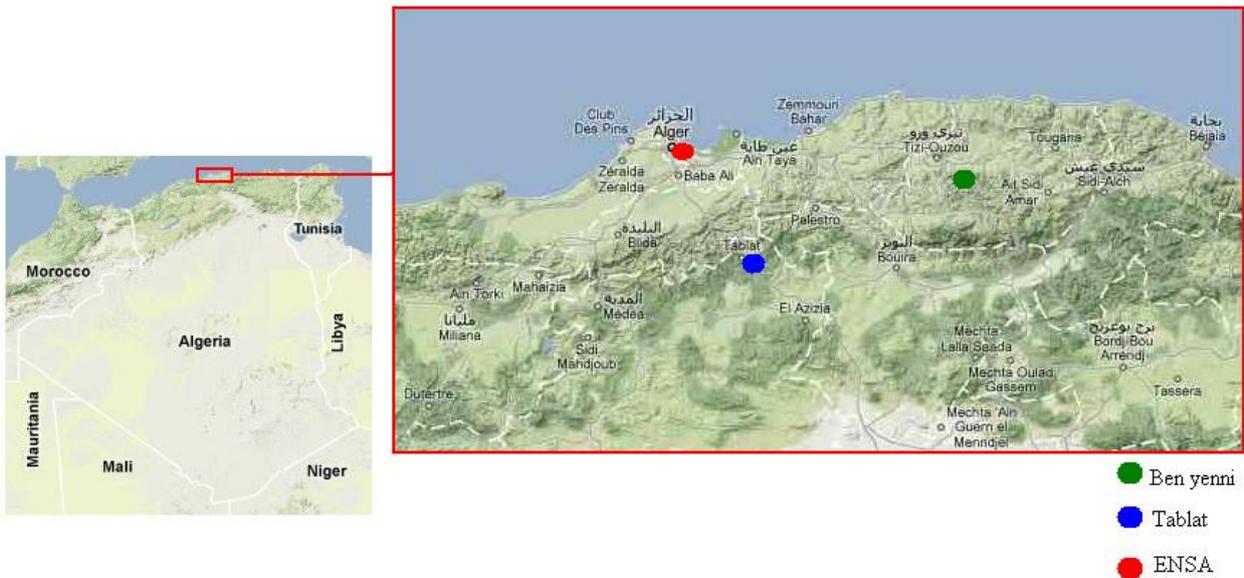


Figure 10 : Localisation des trois régions de récolte

2. Coupes anatomiques et localisation de sites producteurs d'huile essentielle

Pour définir la localisation des entités productrices d'huile essentielle et pour une meilleure compréhension des phénomènes d'extraction, nous avons effectué des coupes anatomiques sur les feuilles et les tiges de l'espèce étudiée au niveau du département de Botanique de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger selon la méthode de **Deysson(1954)**.

Les coupes ont été réalisées sur la moelle de sureau à main levée dans le but d'avoir des coupes transversales très fines. Ces dernières sont ensuite passées dans une série de bains ayant des solutions différentes comme cela est expliqué ci-dessous :

- Bain n°1 : solution d'hypochlorite de sodium à 12° pendant 20 mn, afin de vider les cellules de leur contenu et de garder ainsi que les parois.
- Bain n°2 : Eau distillée pendant 1 à 5 mn afin de stopper l'effet de l'hypochlorite de sodium.
- Bain n°3 : Acide acétique à 5% pendant 5mn, contribue aussi à stopper l'effet de l'hypochlorite de sodium et permet de préparer les coupes à la coloration.
- Bain n°4 : Eau distillée pendant 1 à 5mn afin de stopper l'effet de l'acide acétique.
- Bain n°5 : Coloration dans du carmino-vert pendant 1mn, ce qui donne un aspect rose pour les parois cellulosesiques et une coloration verte pour les parties lignifiées.
- Bain n°6: Eau distillée.

Un montage des coupes dans une goutte d'eau distillée entre lame et lamelle est observé immédiatement au microscope photonique de marque AUS JENA JENALUMAR doté d'un appareil photo (figure 11).

Plusieurs coupes ont été observées et les plus intéressantes ont été photographiées.



Figure 11 : Microscope photonique équipé d'un appareil photo

3. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles des trois écotypes de romarin a été effectuée par entraînement à la vapeur grâce au dispositif expérimental représenté par la figure 12 au laboratoire de chimie de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

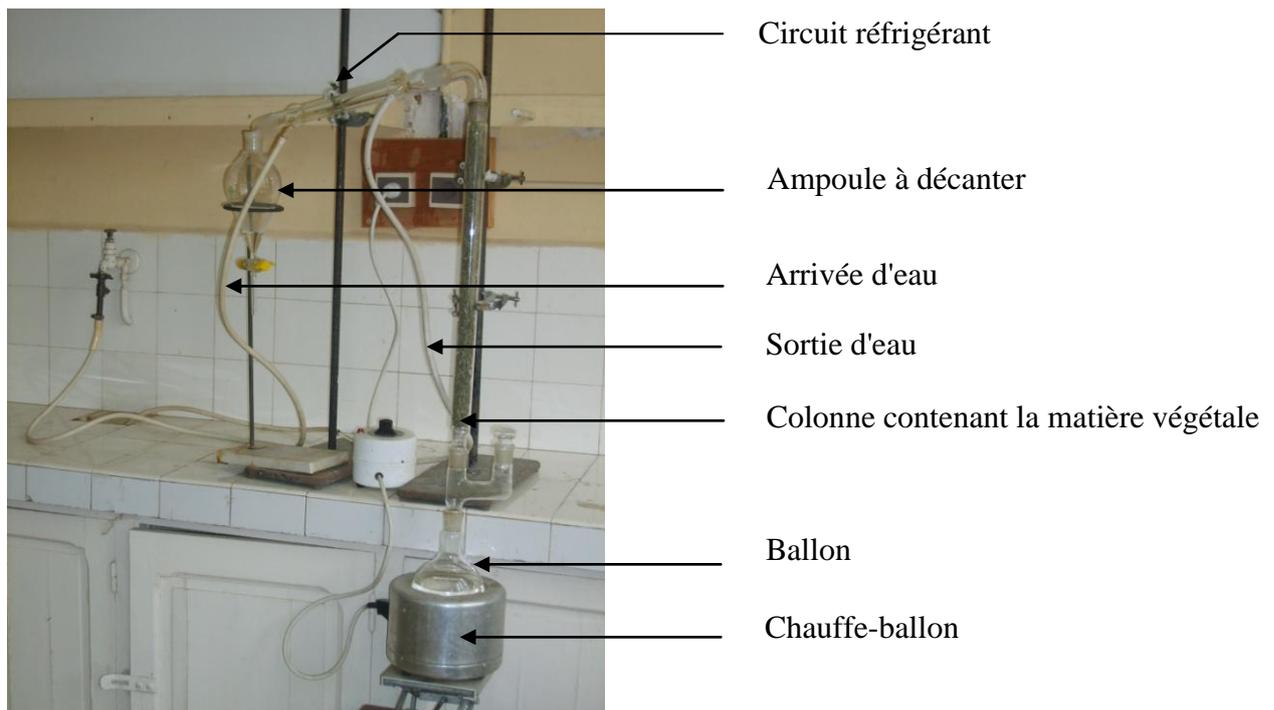


Figure 12 : Montage du procédé de l'entraînement à la vapeur

3.1. Protocole d'extraction

La matière végétale est introduite dans la colonne surmontant le ballon, ce dernier est rempli d'eau jusqu'au 2/3 de sa capacité. L'ensemble est porté à ébullition en branchant le chauffe ballon.

La vapeur envoyée dans l'extracteur (colonne), traverse la matière végétale et se charge d'huile essentielle, elle passe ensuite dans le réfrigérant où elle est condensée. 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.

L'huile essentielle recueillie est séchée à l'aide de sulfate de Sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer toutes traces d'eau.

Les huiles essentielles sont conservées 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.

3.2. 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 recueillie 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) (fraiche ou humide).

Afin d'étudier l'influence du séchage 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 à 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 :

$$H(\%) = \frac{P_2 - P_3}{P_E} * 100$$

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 (P₂- P₁)

3.3. Cinétique des extractions

Le même protocole expérimental est utilisé pour étudier la cinétique d'extraction, mais, l'huile essentielle est récupérée pour y mesurer le volume à des intervalles de temps différents. Dans notre travail, nous avons étudié la cinétique d'extraction de l'huile essentielle des trois écotypes de romarin. C'est une étude exploratoire dont le but est de déterminer les intervalles de temps qui permettent d'obtenir les rendements les plus intéressants.

4. Détermination des caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques des huiles essentielles des trois écotypes

La caractérisation d'une huile essentielle consiste en

- L'appréciation des caractéristiques organoleptiques
- Détermination des indices physiques (densité et indice de réfraction)
- L'obtention des profils chromatographiques et une quantification relative des différents constituants.

4.1. Caractéristiques organoleptiques

L'appréciation des caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles consiste à évaluer leurs : aspect, odeur, couleur et flaveur en utilisant nos sens.

4.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles sont importantes surtout du point de vue commercial, car elles sont soumises à une législation et une normalisation.

Les propriétés physico-chimiques de nos huiles essentielles sont déterminées par une série d'analyses qui sont indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

- **Densité relative à 20°C (NF T 75-111)**

Elle est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C, à la masse d'un égal volume d'eau distillée à la même température.

Cette grandeur est sans dimension et son symbole est : d_{20}^{20}

- **Indice de réfraction à 20°C (NF T 75-112)**

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un appareil de type Bellingham.

Lorsque celles-ci sont effectuées à une température T (°C) différente de 20 °C, on effectue alors la correction à 20 °C par le biais de la formule suivante:

$$n_D^{20} = n_D^T + 0,0004(T - 20)$$

Avec : n_D^T Valeur de la lecture obtenue à la température T (°C).

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

4.3.1. Analyse qualitative des huiles essentielles par CPG

L'analyse qualitative des huiles essentielles des trois écotypes de romarin 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
- 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.

4.3.2. Mode d'identification

L'identification des composés a été réalisée par comparaison, 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 ($C_9 - C_{23}$) 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

4.3.3. 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)
- Colonne apolaire : DB1-MS (100% dimethylpolysiloxane); longueur : 30 m; diamètre interne : 0,25 mm ; épaisseur du film de la phase : 0,25 μ m
- 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 30 min
- Volume injecté : 0,2 μ l ; 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

❖ 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
- L'ordre d'élution du composé sur la colonne considérée
- La comparaison des indices de rétentions en programmation de température à ceux cités par la littérature sur le même type de colonne
- La proposition et le pourcentage de probabilité de présence du composé, fournis par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse (Wiley 7N).

5. Préparation d'extraits éthanoliques des trois écotypes

Les extraits éthanoliques ont été obtenus en utilisant la méthode de Soxhlet (l'extraction solide-liquide) au niveau du laboratoire de chimie de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

5.1. Mode opératoire

Les feuilles, fleurs et les tiges des échantillons étudiées 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 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 solvant.

L'extrait ainsi récupéré a été placé dans un dessiccateur, pesé et conservé à 4-6°C. Le rendement en extrait éthanolique est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de la matière extraite (\%)} = [(P_1 - P_0) / E] * 100$$

Avec : **P₁**. Poids du ballon après évaporation du solvant (g)

P₀. Poids du ballon vide (g)

E. Poids de l'échantillon (poudre) (g)

6. Dosage des composés phénoliques des extraits de romarin

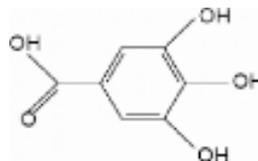
6.1. Dosage des polyphénols

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

6.1.1. 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)

6.1.2. 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.

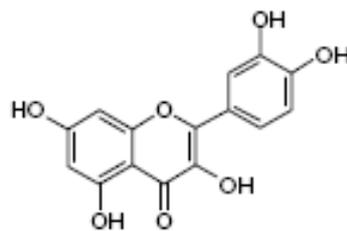
La même procédure est appliquée au standard d'acide gallique. Ainsi la concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et sera exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

6.2. Dosage des flavonoïdes

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

6.2.1. 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

6.2.2. 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.

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

L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par deux méthodes de référence citées dans la littérature : le pouvoir réducteur et l'activité d'inhibition du radical DPPH (2-2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl). Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles et des extraits éthanoliques a été comparé à un antioxydant de synthèse qui est le BHT.

7.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH

7.1.1. 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-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (figure 13).

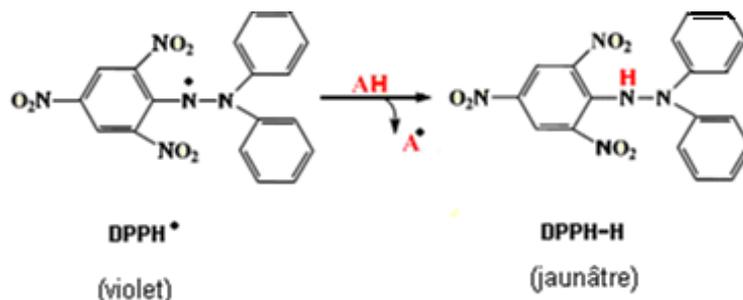


Figure 13 : Réaction du radical DPPH avec un antioxydant AH.

7.1.2. 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.

7.2. 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)**.

7.2.1. 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 14

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.

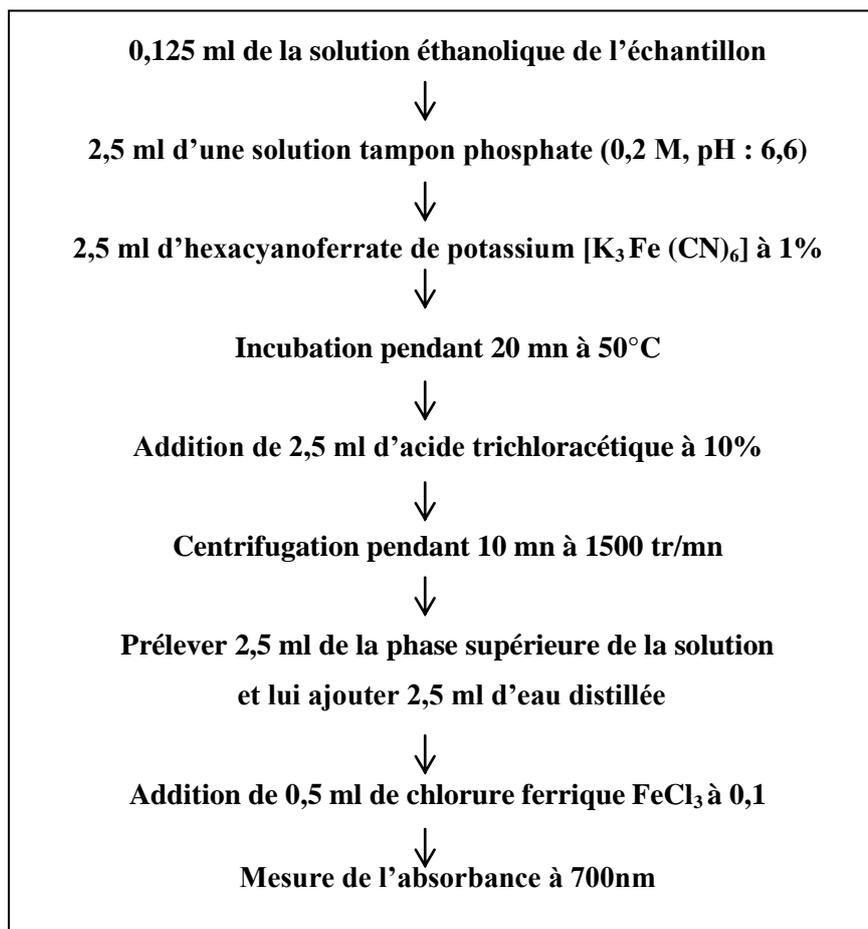


Figure 14 : Procédure de mise en œuvre du test du pouvoir réducteur

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

8.1. 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 (annexe1). Il faut noter que nous avons concideré qu'un 1 µg d'huile est equivalent 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 1 µl 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.

8.2. 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 (annexe 1). 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.

8.3. 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 Recherche

sur les Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse (LPBVB) de l'Ecole Nationale Supérieure (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.

8.3.1. 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 4.

Tableau 04 : 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, 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.	CIPA22
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillaceae</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

8.3.2. 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 cancérigènes, 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.

9. Analyse de données

La significativité des différences des résultats obtenus lors de l'évaluation des activités antioxydantes de nos huiles et extraits a été réalisée par une analyse de variance (ANOVA) à un ou à deux facteurs effectuées sur le logiciel Statistica 4.00 avec un seuil de signification fixé à 5%.

Chapitre VII

Résultats et discussions

1. Localisation de sites producteurs de l'huile essentielle de romarin

L'observation des coupes histologiques réalisées sur les feuilles et les tiges de romarin révèle la présence de poils técteurs, sécréteurs et glandulaires illustrés par les figures (15, 17, 19) et schématisés par les figures (16,18).

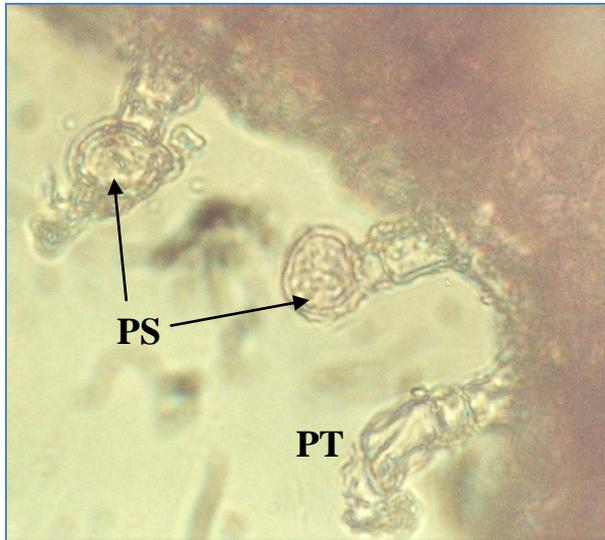


Figure 15 : Coupe transversale de la feuille de romarin mettant en évidence la présence de poils sécréteurs (PS) et tecteurs (PT) (Gr. : X 160).

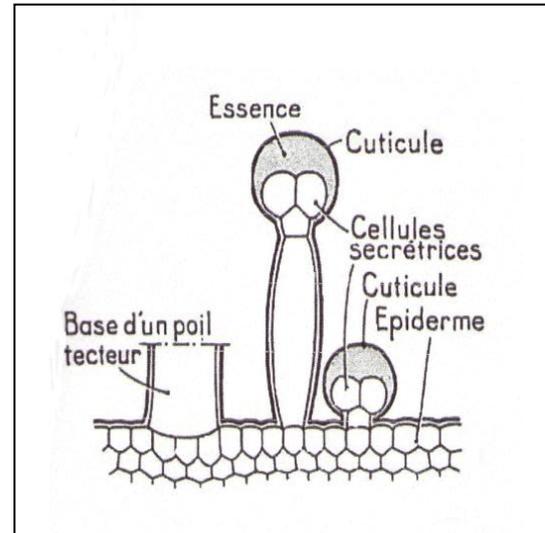


Figure 16 : Schéma d'un poil sécréteur et tecteur (Camefort, 1972).



Figure 17 : Coupe transversale de la feuille de romarin mettant en évidence la présence d'un poil glandulaire (PG) (Gr. X 160).

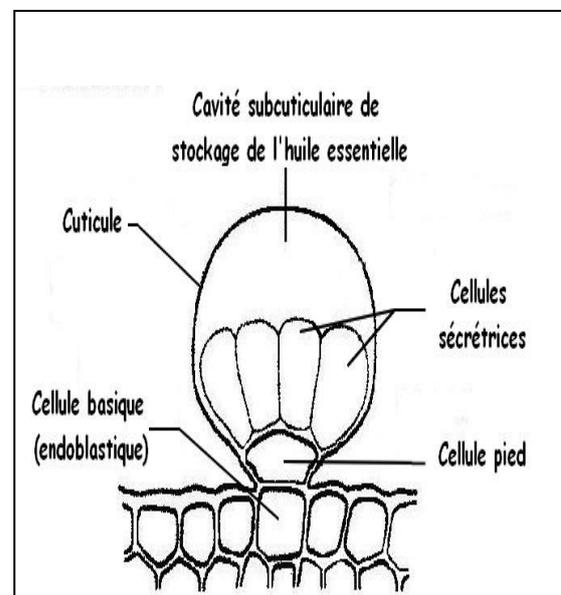


Figure 18 : Schéma d'un poil glandulaire (Stahl-Biskup, 2002)

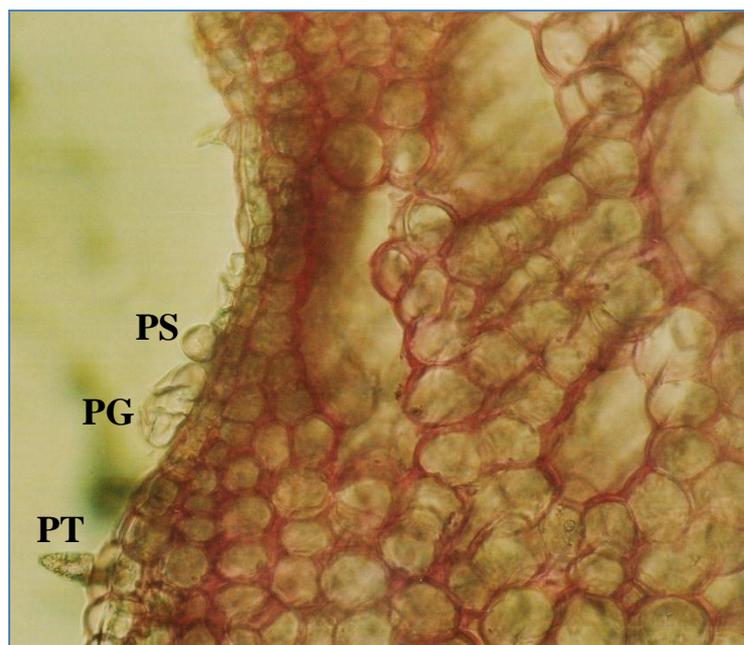


Figure 19 : Coupe transversale de la tige de romarin mettant en évidence la présence d'un poil tecteur, sécréteur et glandulaire (**Gr. X 80**).

Selon **Wagner *et al.* (2004)**, seuls les poils glandulaires et sécréteurs ont l'aptitude de biosynthétiser, sécréter et séquestrer les huiles essentielles en quantité significative. Ces types de poils sont beaucoup plus répandus et plus denses sur les feuilles que sur les tiges. C'est la raison principale qui fait que les tiges produisent une quantité infime d'huiles essentielles par rapport aux feuilles et aux fleurs.

2. Rendement en huile essentielle

Les rendements (valeurs moyennes) en huile essentielle reportés dans le tableau 05 et la figure 20 montrent des différences notables entre les écotypes.

Tableau 05 : Rendement en huile essentielle des trois romarins

Echantillon	Rendement (g/100g MV)
R. INA	1,02
R. Tablat	0,89
R. Beni Yenni	1,8

R : Romarin
MV : matière végétale

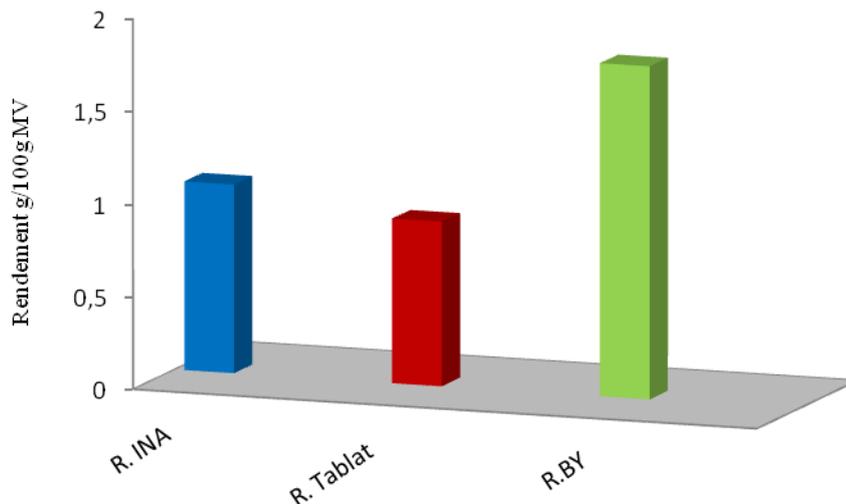


Figure 20 : Rendement en huiles essentielles des trois romarins

Le rendement le plus élevé (figure 20) est enregistré pour le romarin de Beni Yenni (1,8 g/100g de matière végétale), suivi par le romarin de l'INA et Tablat (1,02 et 0,89g/100g de matière végétale respectivement). Ces différences de rendements pourraient être expliquées par les conditions édaphoclimatiques dans lesquelles la plante évolue.

Les études de **Boutekedjiret *et al.* (1998)** ; **Sahraoui *et al.* (2007)**, effectuées sur le romarin de l'INA et celui des Bibans obtiennent des rendements en huile essentielle dans le même ordre de grandeur (1,2 g/100 et 1,5g/100g respectivement) que ceux que nous avons obtenus.

Angioni *et al.* (2004), obtiennent des rendements allant de 0,48 à 1,75g/100g de matière végétale pour les huiles essentielles issues du romarin de Sardaigne.

Cependant, le rendement enregistré par les huiles essentielles des mêmes romarins de l'INA obtenus par hydrodistillation sont de l'ordre de 1,7 à 1,8 g/100g de matière végétale (**Makhlouf, 2002** ; **Bousbia, 2006**). La méthode d'extraction pourrait donc être à son tour un facteur non négligeable pour l'appréciation des rendements obtenus.

3. Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle

Les effets du séchage sur la variation du rendement en huile essentielle des différents romarins sont illustrés dans les figures (21, 22)

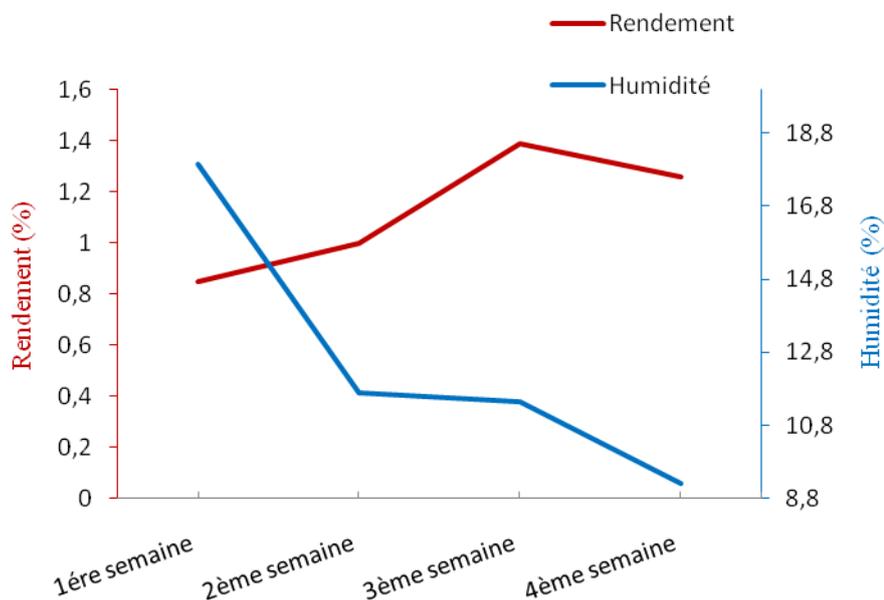


Figure 21: Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle du romarin de l'INA

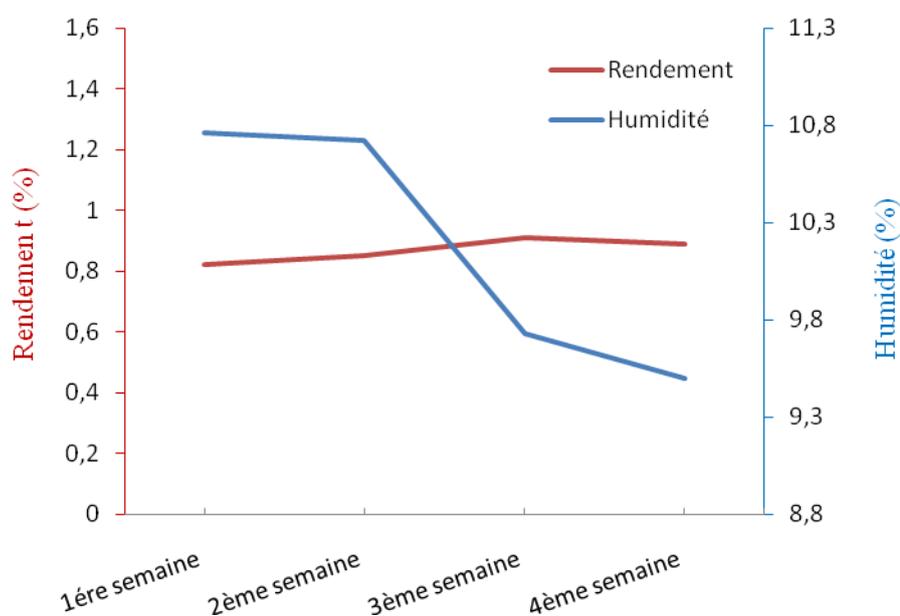


Figure 22 : Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle du romarin de Tablat

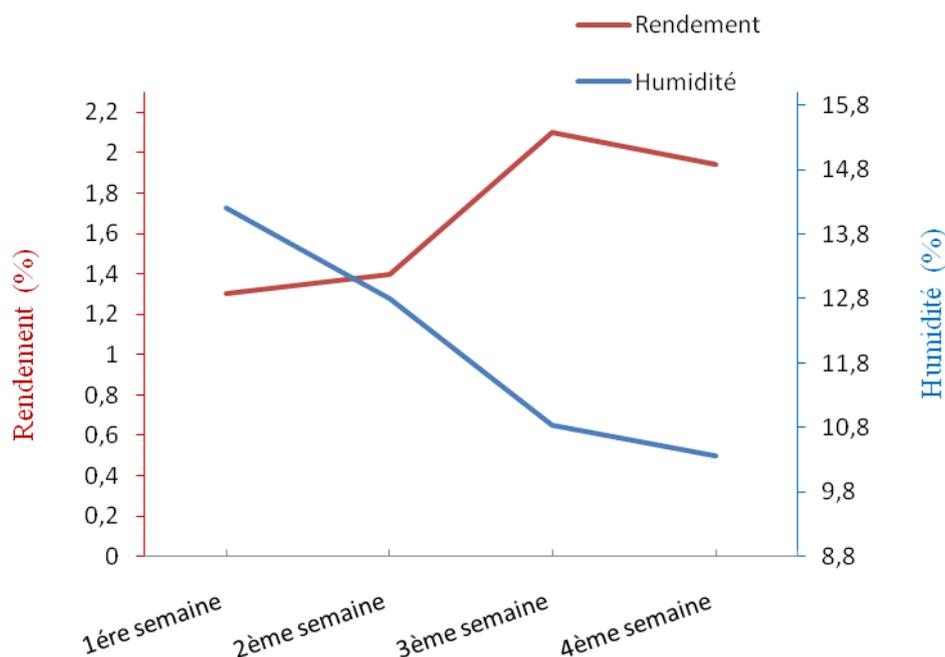


Figure 23 : Effet du séchage sur le rendement en huile essentielle du romarin de Beni Yenni

A première vue, l'ensemble des graphiques de rendements et d'humidités (figures 21, 22, 23) présentent la même allure générale.

On remarque également, que les augmentations des rendements en huile essentielle sont inversement proportionnelles aux taux d'humidité pendant les trois premières semaines pour l'ensemble des écotypes de romarin. Le maximum en rendement est atteint à la troisième semaine (1,39 g/100g de matière végétale sèche pour le romarin de l'INA, 0,91 et 2,1 g/100g de matière végétale sèche pour les romarins de Tablat et Beni Yenni respectivement). 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 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.

4. Cinétique d'extraction des huiles essentielles

Afin d'étudier l'influence de la provenance de la plante sur la cinétique d'extraction, nous avons suivi l'évolution des rendements en huile essentielle en fonction du temps pour chaque écotype.

Une masse d'environ 50g de la matière végétale sèche ont été soumise à une extraction par entrainement à la vapeur d'eau pendant une durée de 90mn. L'huile essentielle a été récupérée à des intervalles de temps plus ou moins réguliers. Le rendement est exprimé en pourcentage (g/100g de la matière végétale sèche).

Les résultats de la cinétique d'extraction sont regroupés dans le tableau 06 et la figure 24.

Tableau 06 : Variation du rendement en huile essentielle des romarins étudiés en fonction du temps d'extraction.

Temps (min)	Rendement (g/100g MVS)		
	R.INA	R. Tablat	R.BY
0	0	0	0
5	0,44	0,35	0,4
10	0,61	0,49	0,8
15	0,77	0,68	1,2
20	0,84	0,78	1,5
25	0,92	0,86	1,6
30	0,97	0,9	1,68
35	1,01	0,9	1,71
40	1,06	0,9	1,75
45	1,09	0,9	1,78
50	1,14	0,9	1,83
55	1,19	0,9	1,87
60	1,23	0,9	1,9
65	1,23	0,9	1,93
70	1,23	0,9	1,95
80	1,23	0,9	1,98
90	1,23	0,9	2

MVS : matière végétale sèche.

R : Romarin.

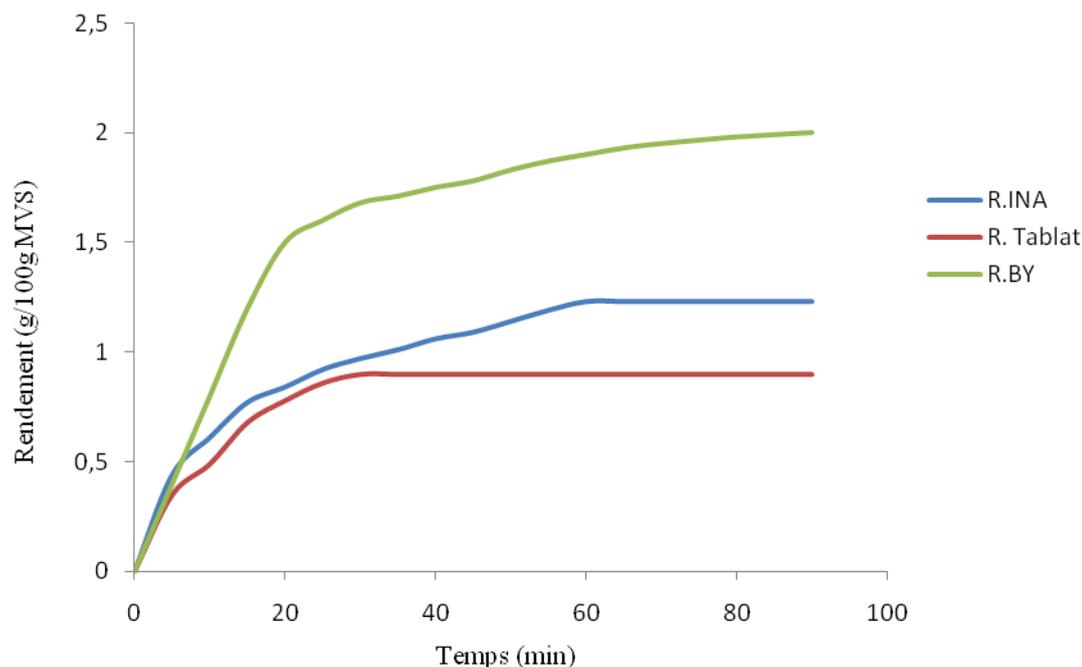


Figure 24 : Cinétique d'extraction des huiles essentielles des romarins étudiés

Selon la figure 24, on constate que les cinétiques correspondantes aux trois huiles essentielles des différents écotypes, présentent la même allure générale.

Les trois courbes se caractérisent par une partie ascendante où on remarque une augmentation rapide du rendement en huile essentielle pour les trois romarins, ceci peut être expliqué par le fait que les poils sécréteurs d'huiles essentielles présents au niveau de la feuille et de la tige sont exogènes, facilitant ainsi l'extraction de l'huile essentielle.

Ensuite, nous avons une tendance linéaire et la formation d'un palier au cours duquel les quantités en huiles recueillies sont pratiquement nulles en raison de l'épuisement des organes de la plante. Cependant, on peut remarquer que le palier est atteint à 90mn pour le romarin de Beni Yenni, alors que pour le romarin de l'INA et Tablat le palier est atteint à 60mn et 30mn respectivement. Ces différences pourraient être expliquées par les plus ou moins grandes quantités d'huiles contenues dans les feuilles et les tiges des différents échantillons. Ceci est clairement vérifié par les valeurs du rendement final enregistré par les différents romarins : celui de Beni Yenni (2g/100g de la matière végétale sèche), de l'INA (1,39g/100g), et de Tablat (0,91g/100g).

5. Propriétés physiques et organoleptiques des huiles essentielles

Les indices physiques et organoleptiques des huiles essentielles des trois romarins étudiés sont regroupés dans le tableau 07.

Tableau 07 : Caractéristiques physiques et organoleptiques des huiles essentielles

Caractéristiques	R. INA	R. Tablat	R. Beni Yenni	AFNOR	
Physiques	Densité relative à 20°C	0,884	0,893	0,890	0,860-0,920
	Indice de réfraction à 20°C	1,476	1,475	1,472	1,466-1,475
Organoleptiques	Aspect	Liquide mobile limpide	Liquide mobile limpide	Liquide mobile limpide	Liquide mobile limpide
	Couleur	Jaune	Jaune pâle	Jaune	Presque incolore à jaune pâle
	Odeur	Caractéristique aromatique camphrée			Caractéristique plus au moins camphrée

Nos résultats sont conformes à ceux rapportés par l'association française de normalisation (AFNOR, 2000).

6. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles des romarins de l'INA, de Tablat ainsi que celle de Beni Yenni a été établie par chromatographie en phase gazeuse seule (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

Le tableau 08 résume l'ensemble des composés identifiés ainsi que leurs proportions pour chacune des huiles des romarins étudiés (INA-Tablat-Beni Yenni).

Tableau 08 : Composition (%) chimique des huiles essentielles des différents romarins

N°	Composés ¹	IK ²		R. INA	R.Tablat	R.Beni Yenni	Identification ³
		Ir DB1	PEG				
1	Tricyclene	913	1017	0,1	0,2	0,1	SM-IR
2	α -Thujene	921	1029	t	t	-	SM-IR-E
3	α -Pinene	926	1026	51,8	20,9	24,7	SM-IR-E
4	α -Fenchene	946	1046	-	-	t	SM-IR
5	Camphene	957	1072	6,2	22,0	4,5	SM-IR-E
6	Verbenene	958	1121	0,2	-	0,4	SM-IR
7	1-Octen-3-Ol	962	1411	-	t	-	SM-IR
8	Sabinene	970	1132	t	t	-	SM-IR
9	3-Octanone	980	1225	-	-	t	SM-IR
10	β -Pinene	985	1119	2,3	6,6	0,2	SM-IR-E
11	β -Myrcene	990	1173	1,1	0,2	0,6	SM-IR
12	α -phellandrene	1005	1177	0,1	0,1	0,1	SM-IR-E
13	δ -3-carene	1009	1163	t	-	0,3	SM-IR-E
14	α -terpinene	1020	1192	0,2	0,1	0,1	SM-IR-E
15	p-cymene	1025	1290	1,1	0,2	3,8	SM-IR-E
16	1-8 cineole	1034	1223	t	9,5	t	SM-IR-E
17	β - phellandrene	1044	1222	t	-	-	SM-IR
18	Limonene	1045	1212	4,5	-	14,3	SM-IR-E
19	β -Ocimene	1052	1246	t	t	-	SM-IR
20	γ -terpinene	1057	1261	0,8	0,1	0,1	SM-IR-E
21	cis-sabinene hydrate	1058	1567	t	t	-	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	SM-IR
25	Terpinolene	1093	1300	0,3	0,1	0,2	SM-IR-E
26	Filifolone	1097	1423	-	-	0,7	SM-IR
27	Linalool	1104	1558	1,1	-	-	SM-IR-E
28	trans-sabinene Hydrate	1101	1482	-	t	-	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	32,0	13,8	SM-IR-E
34	Exo-Methyl camphelinol	1144	-	-	-	0,2	SM-IR
35	Pinocarvone	1162	1586	0,3	t	1,6	SM-IR
36	Pinocamphone	1164	1507	-	-	0,3	SM-IR
37	Borneol	1167	1732	-	0,3	-	SM-IR
38	isoBorneol	1177	-	0,9	-	-	SM-IR-E
39	4-Terpineol	1182	1613	0,3	0,2	1,2	SM-IR
40	α -Terpineol	1190	1723	0,2	0,2	2,2	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	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	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	SM-IR

67 α -Curcumene	1460	1790	0,1	-	1,0	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	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	-	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	
Monoterpenes			68,7	50,5	49,8	
Monoterpenes oxygénés			18,7	42,5	35,2	
Sesquiterpene			9,1	5,6	8,6	
Sesquiterpene oxygénés			0,4	0,2	0,6	

¹composés classés dans l'ordre d'élution sur la colonne apolaire DB1 ; ²indice de rétention relatif aux n-alcanes C9-C23 ; 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%).

6.1. Composition chimique de l'huile essentielle du romarin de l'INA

L'analyse par CPG et CPG/SM nous a permise d'identifier 48 composés (figure25) représentant 96.9% de la somme totale des aires de pics des chromatogrammes (figures 28a et 28b).

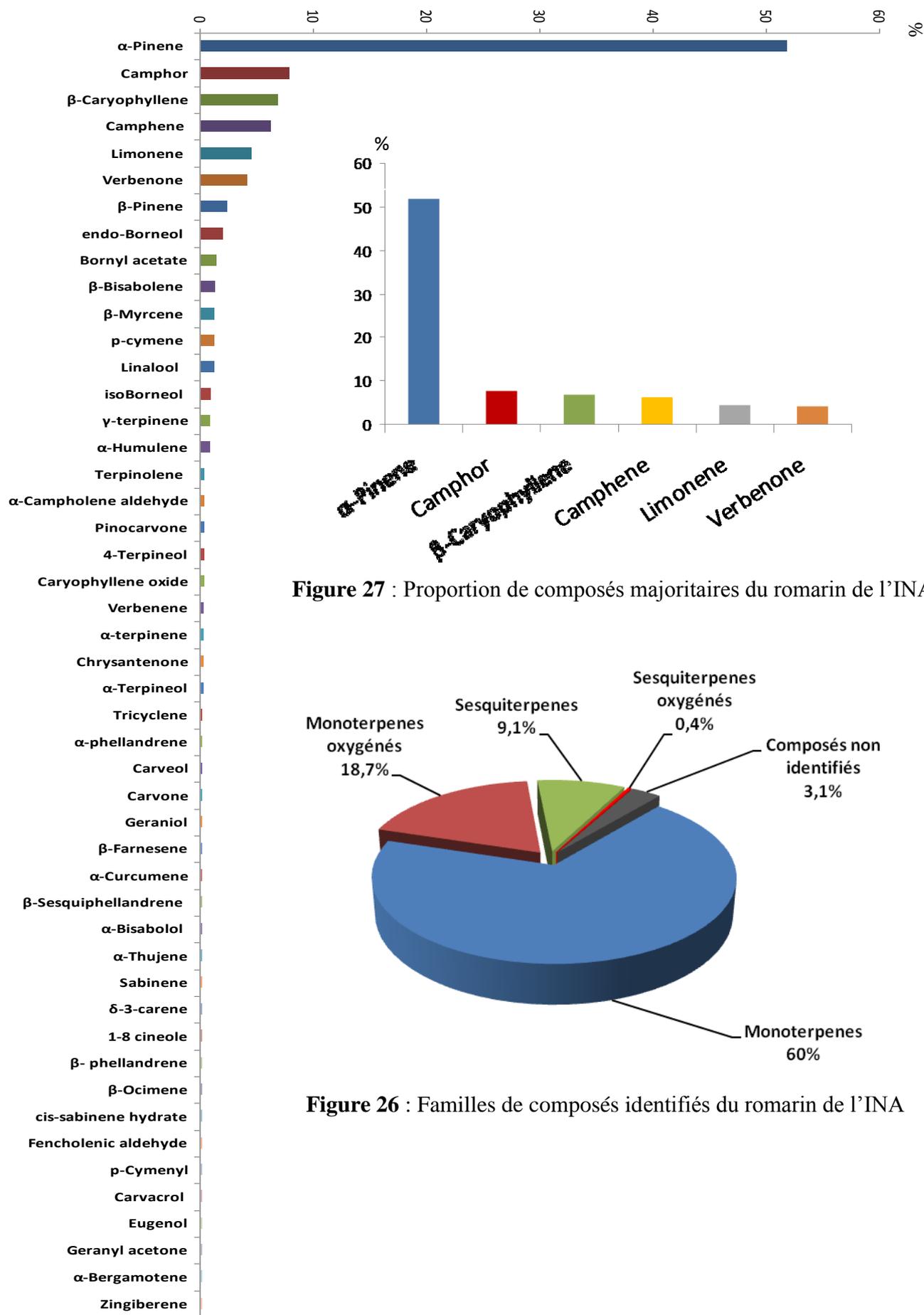


Figure 27 : Proportion de composés majoritaires du romarin de l'INA

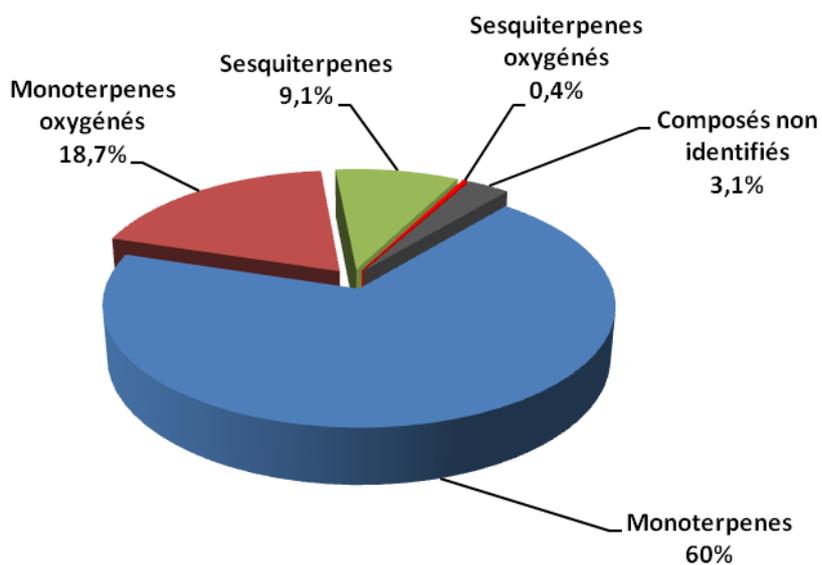


Figure 26 : Familles de composés identifiés du romarin de l'INA

Figure 25 : Composition chimique de l'huile essentielle du romarin de l'INA

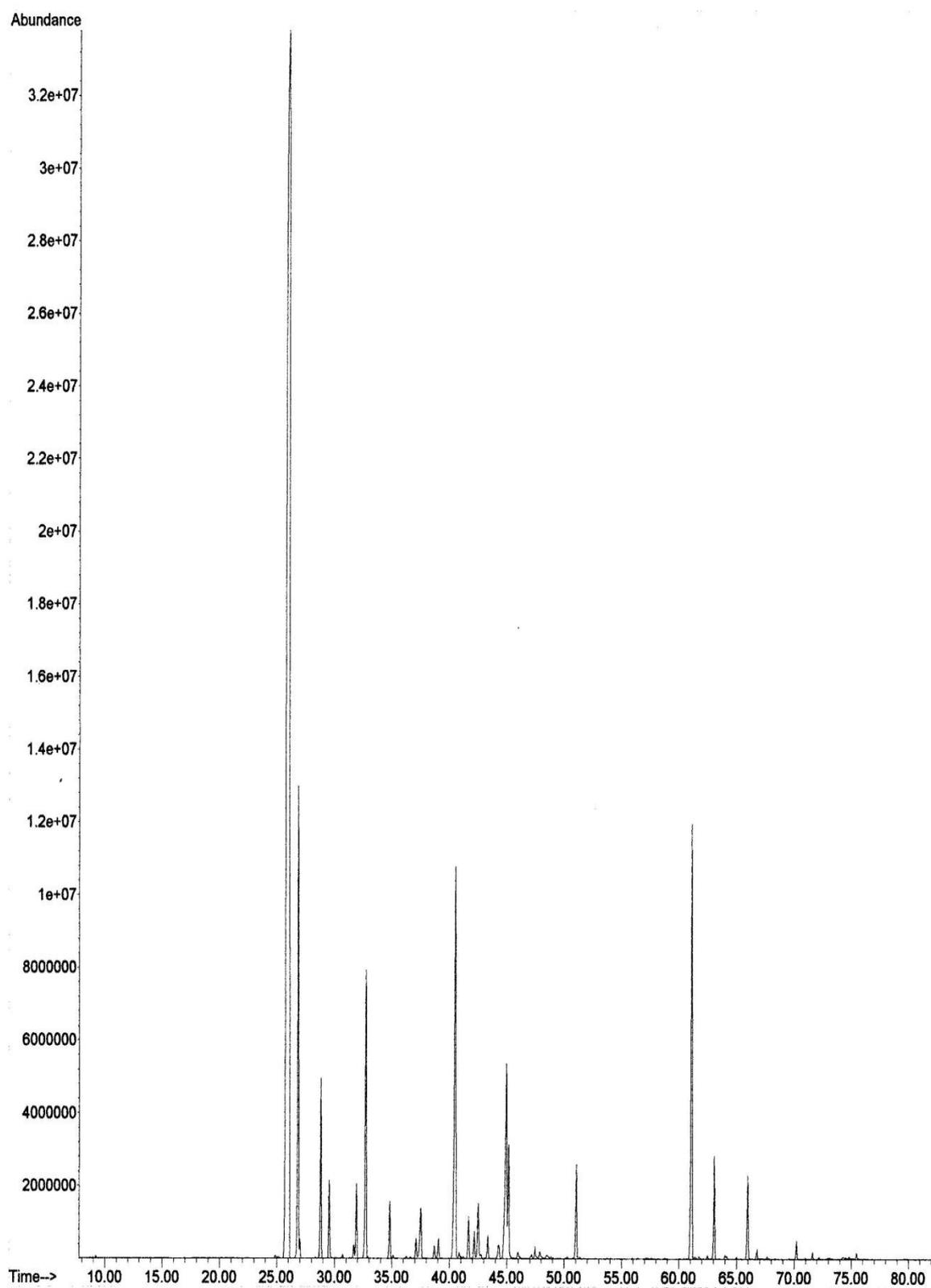


Figure 28a : Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle du romarin de l'INA

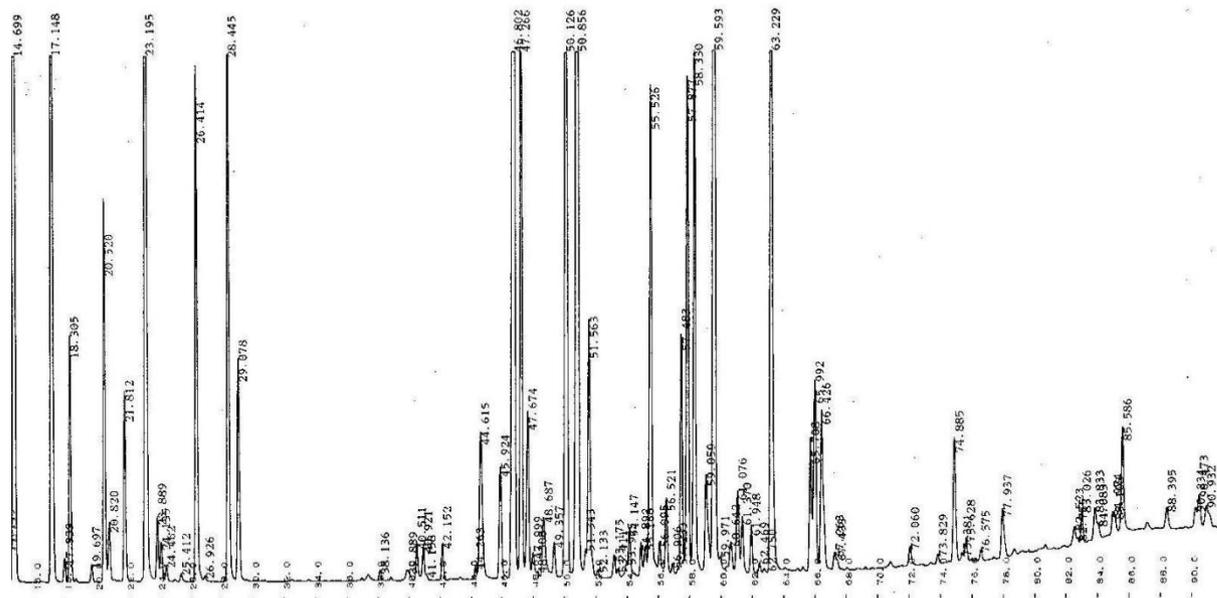


Figure 28b : Chromatogramme CPG de l'huile essentielle du romarin de l'INA

Comme nous le montre la figure 26, les monoterpènes représentent la majorité des pics identifiés avec 60%, suivis par les monoterpènes oxygénés (18,7%) puis les sesquiterpènes (9,1%) et les sesquiterpènes oxygénés (0,4%).

Selon l'histogramme représenté par la figure 27, cette huile est caractérisée par l' α pinène comme composé le plus important 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'INA, étudié par différents auteurs (**Makhlouf, 2002 ; Sahraoui et al., 2007 ; Bousbia et al., 2009**).

Dans l'ensemble des études citées ci-dessus ainsi que dans ce travail, l' α pinène est de loin le composé majoritaire. Un tel modèle de composition correspond à un chémotype à α -pinène (**Rosuj et Garcia-Granados, 1987**).

Même si la nature et les proportions des composés majoritaires sont sensiblement les mêmes entre celles de notre échantillon et celles obtenues par **Makhlouf, (2002) ; Sahraoui et al. (2007) ; Bousbia et al. (2009)**, on peut cependant noter des différences de concentrations qui pourraient être liées aux procédés d'extraction et à la période de récolte.

Les analyses effectuées sur l'huile essentielle du romarin de l'INA obtenue par hydrodistillation montrent une concentration légèrement inférieure en α -pinène (44,05%) (**Bousbia et al., 2009**) par rapport à celle que nous avons obtenue par entraînement à la vapeur (51,8%).

La teneur en α -pinène de l'huile essentielle du romarin de l'INA obtenue par la même méthode (entraînement à la vapeur), peut présenter, malgré tout, des différences notables. En effet **Sahraoui et al. (2007)**, enregistrent une concentration de 15,5% alors que nous observons dans notre cas une concentration de 51,8%. Cette grande différence pourrait être expliquée par la période de récolte (du stade végétatif de la plante) (**Yesil Celiktas et al., 2007 b ; Hazzit et Baaliouamer, 2009**).

6.2. Composition chimique de l'huile essentielle du romarin de Tablat

L'analyse par CPG et CPG/SM a permis d'identifier 47 composés (figure 29) représentant 98,8% de l'information fournie par les chromatogrammes (figures 32a et 32b), où les proportions des composés regroupés par famille et illustrées par la figure 30 révèle que la moitié des pics identifiés (50,5%) correspondent aux monoterpènes. L'autre moitié regroupe les monoterpènes oxygénés (42,5%) suivis par les sesquiterpènes (5,6%) et les sesquiterpènes oxygénés (0,2%).

D'après la figure 31, la prédominance combinée du camphor (32%), camphene (22%), α -pinène (20,9%), 1-8 cinéole (9,5%) et β -pinène avec 6,6% caractérise la composition chimique de cette huile.

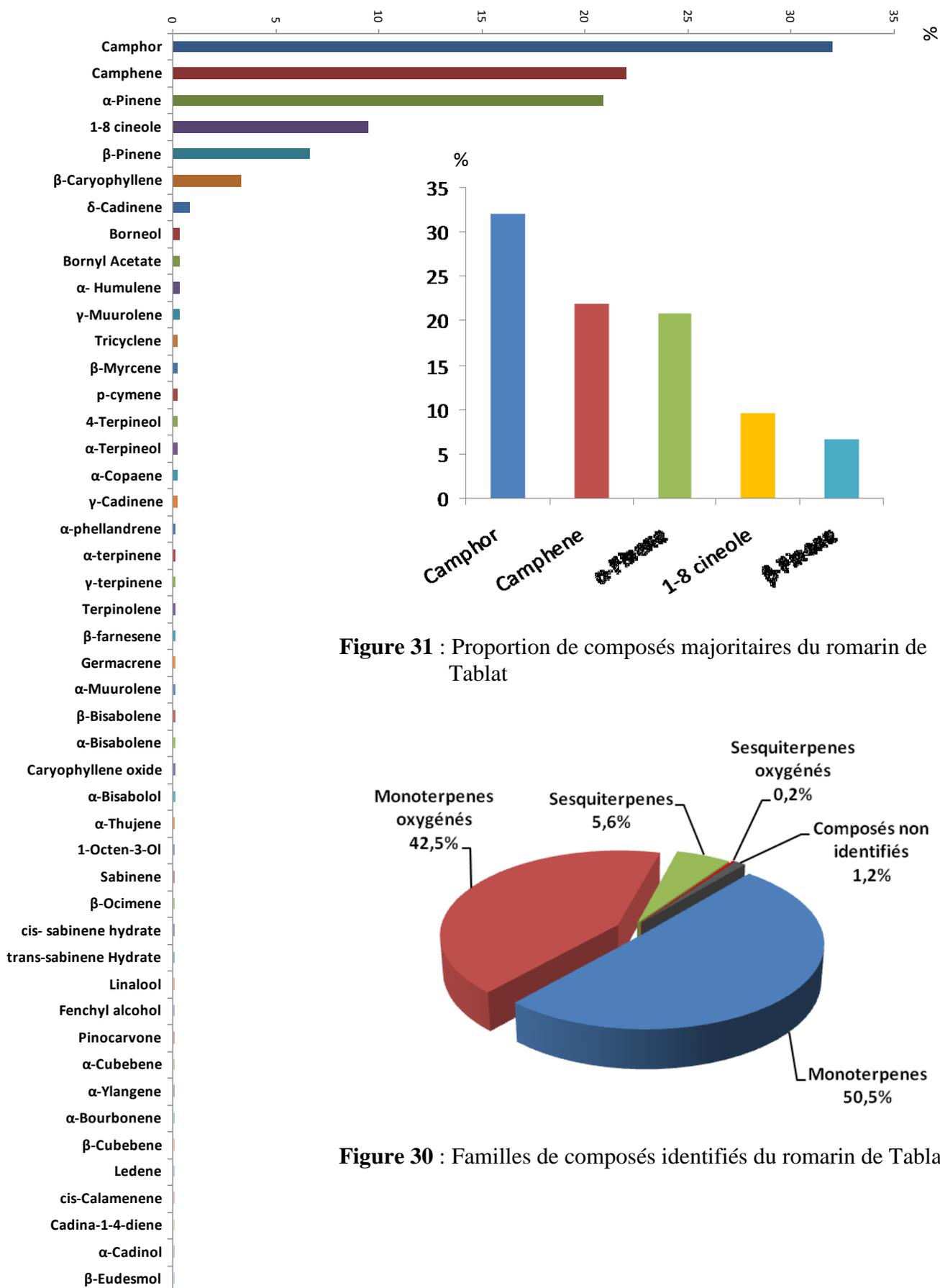


Figure 29 : Composition chimique de l'huile essentielle du romarin de Tablat

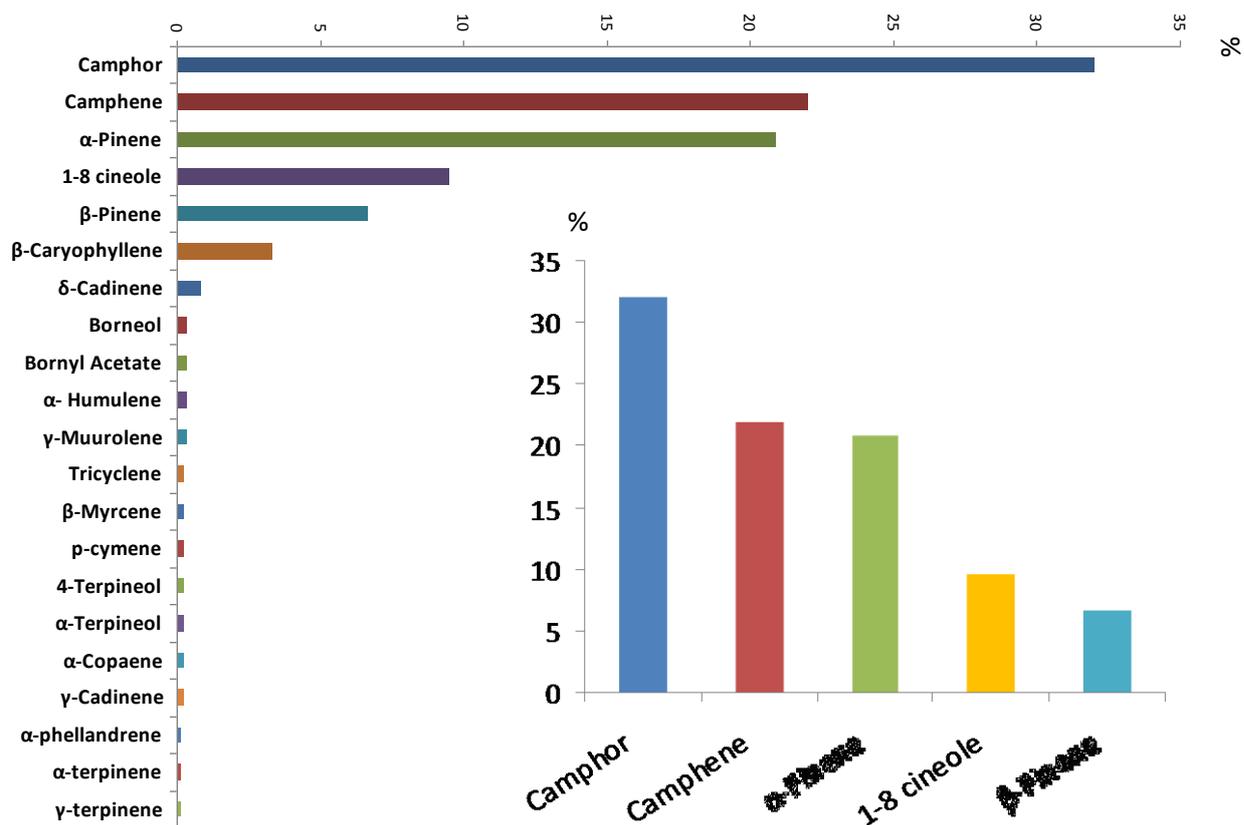


Figure 30 : Familles de composés identifiés du romarin de Tablat

Figure 31 : Proportion de composés majoritaires du romarin de Tablat

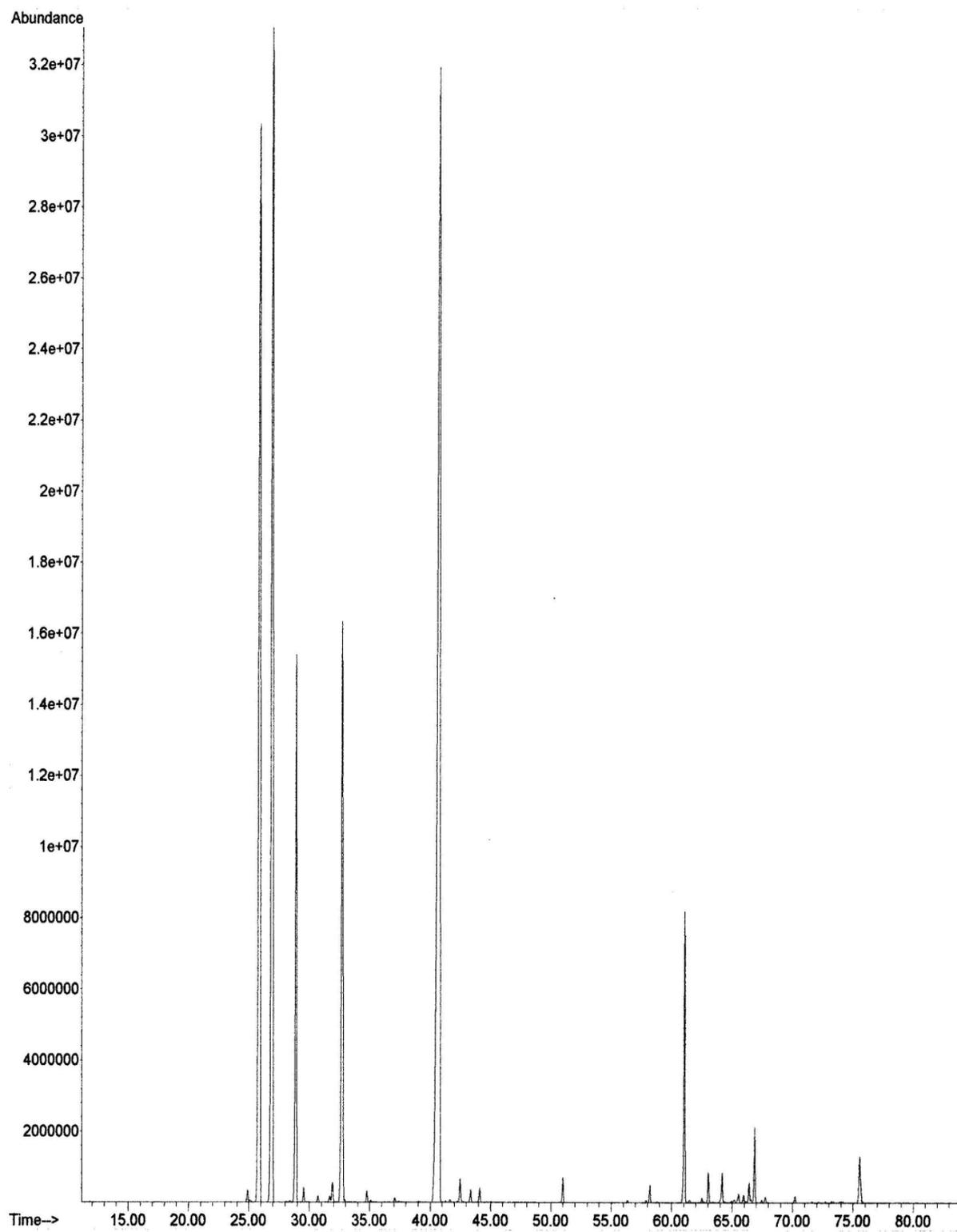


Figure 32a : Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle du romarin de Tablat

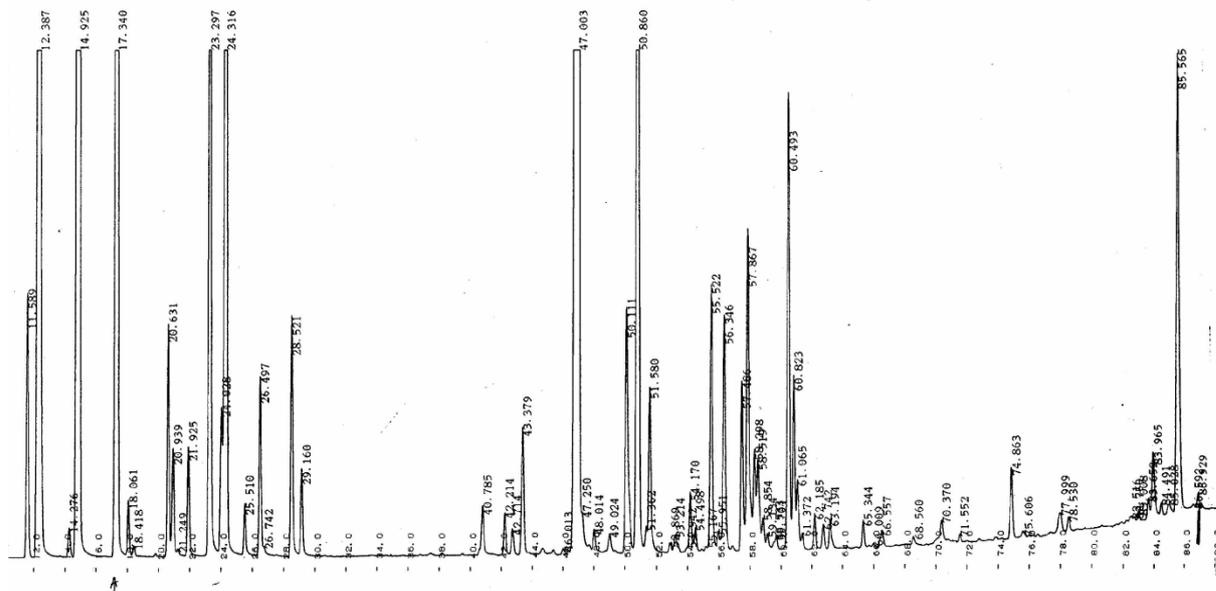


Figure 32b : Chromatogramme CPG de l'huile essentielle du romarin de Tablat

D'une manière générale, on remarque une grande similitude en composés majoritaires entre l'huile essentielle du romarin d'Espagne (**Bannour et al., 2006**) et de Cuba (**Pino, 1998**) avec celle de Tablat. D'une part les trois huiles se caractérisent par la prédominance du camphor (38%, 34,8%, 32% respectivement) et d'autre part elles se distinguent par leurs fortes proportions en 1-8 cinéole (16%, 11%, 9,5% respectivement).

6.3. Composition chimique de l'huile essentielle du romarin de Beni Yenni

L'analyse par CPG et CPG/MS a révélé l'identification de 57 composés (figure 33) correspondant à 92,2% de l'ensemble des pics enregistrés par les chromatogrammes (figures 36a et 36b).

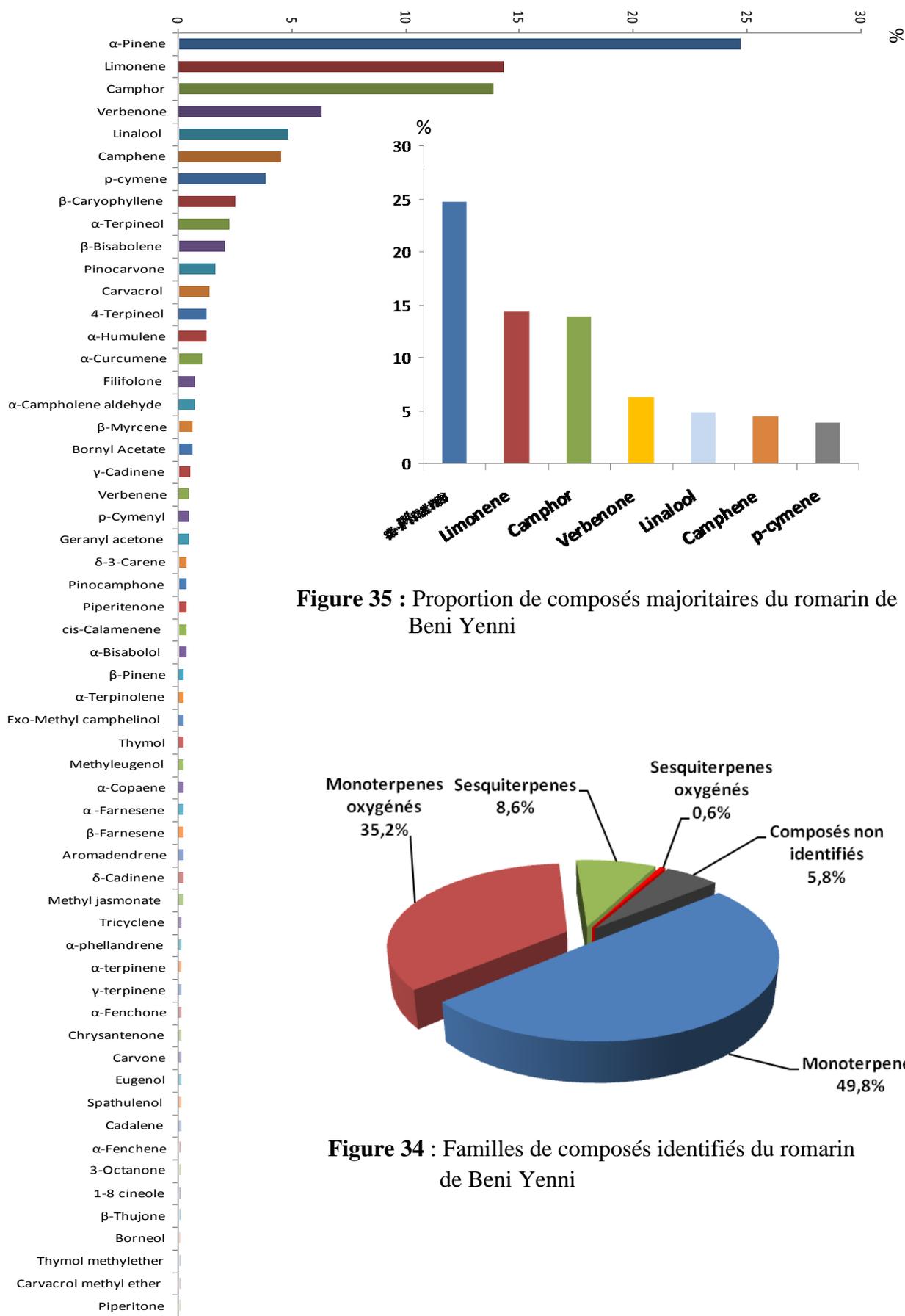


Figure 35 : Proportion de composés majoritaires du romarin de Beni Yenni

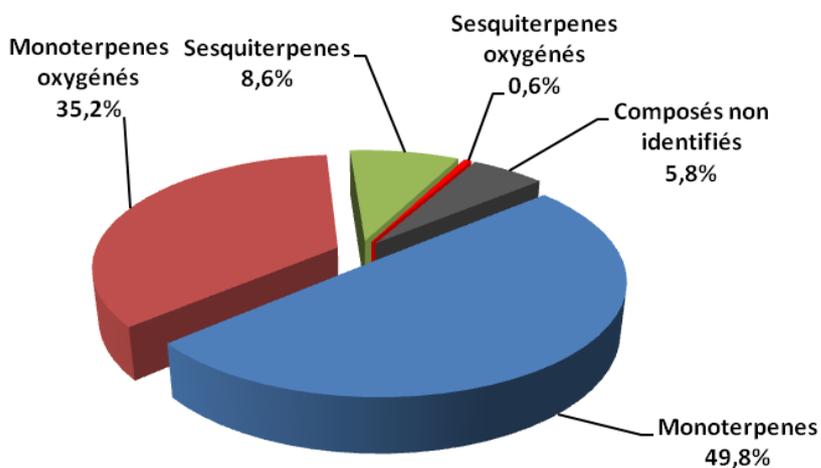


Figure 34 : Familles de composés identifiés du romarin de Beni Yenni

Figure 33 : Composition chimique de l'huile essentielle du romarin de Beni Yenni

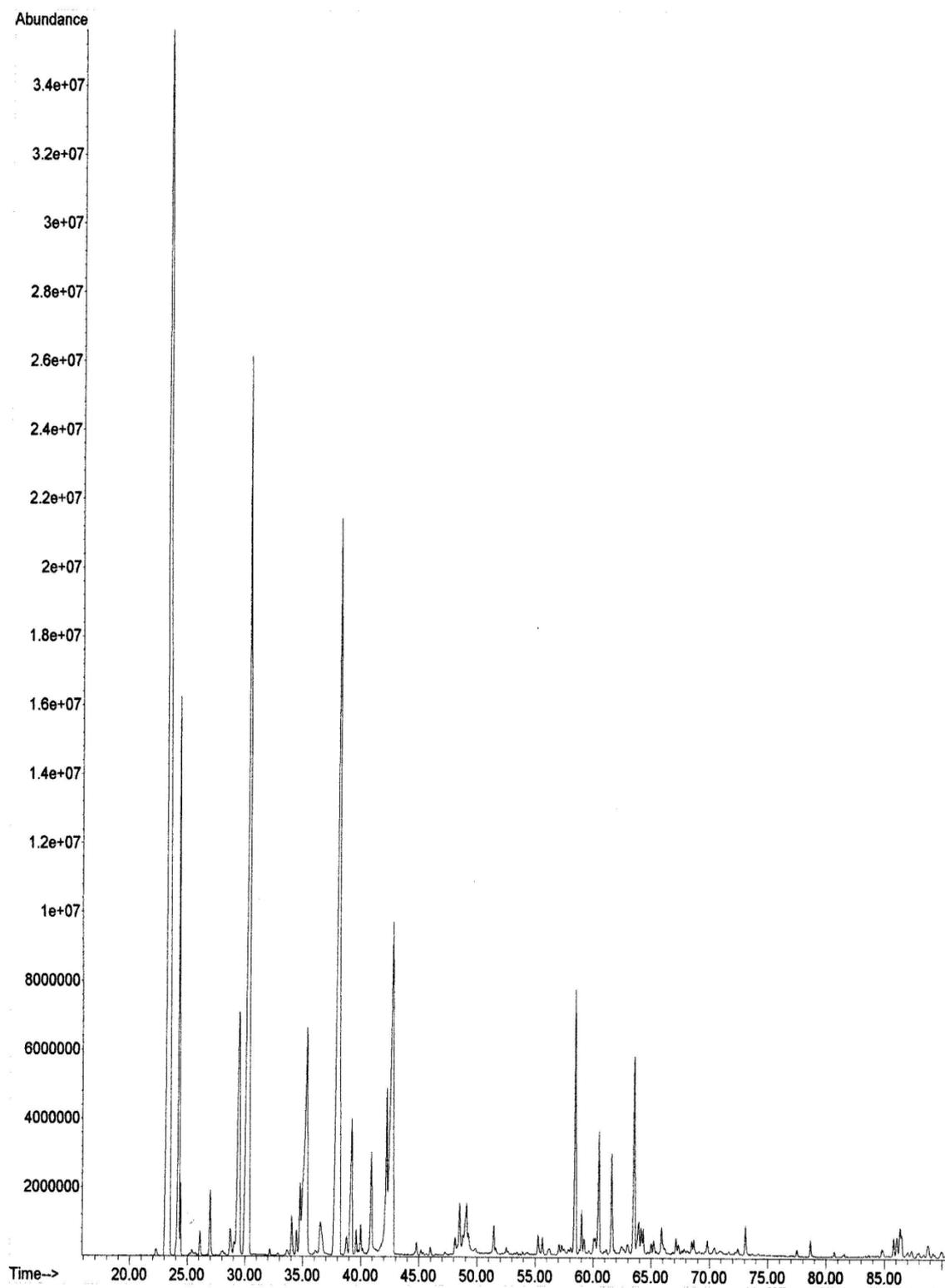


Figure 36a : Chromatogramme CPG/SM de l'huile essentielle du romarin de Beni Yenni

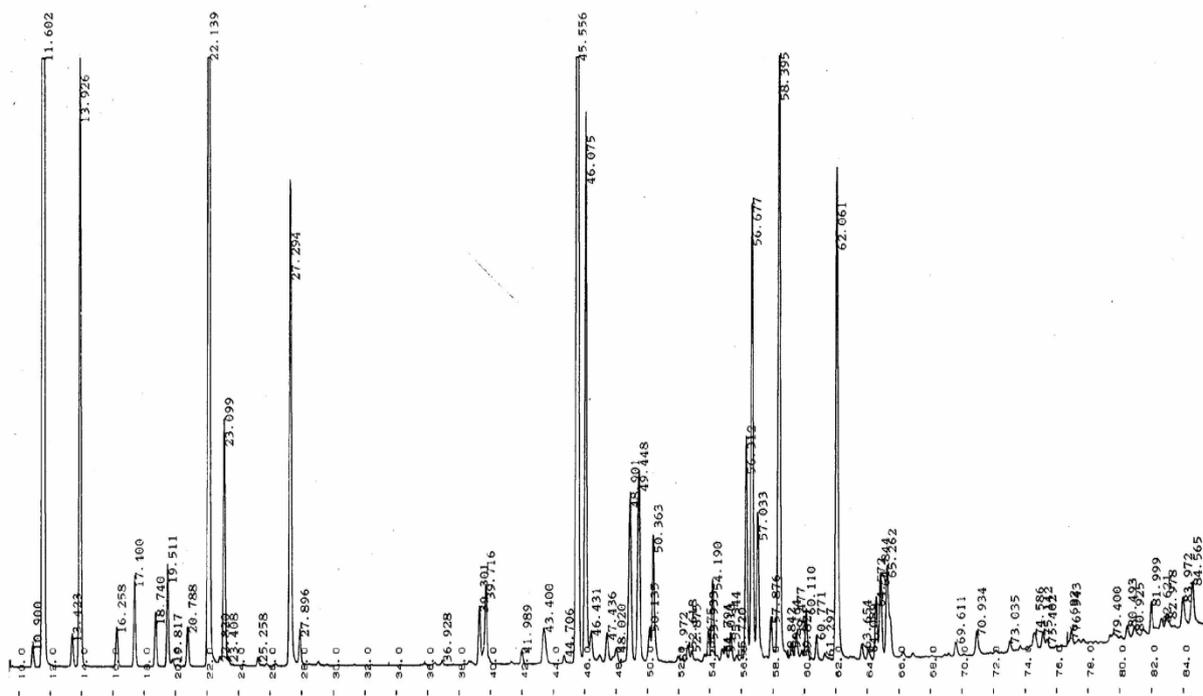


Figure 36b : Chromatogramme CPG de l'huile essentielle du romarin de Beni Yenni

Comme le montre la figure 34, 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).

D'après la figure 35, l'huile essentielle de Beni Yenni se caractérise par sept 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%, 4,8%, 4,5%, 3,8% respectivement.

Au regard des différents travaux cités dans la littérature, l'analyse par CPG et CPG/SM de l'huile essentielle du romarin de Beni Yenni révèle une plus grande diversité de composés ainsi que des singularités importantes. 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).

6.4. Comparaison des compositions des huiles essentielles étudiées

Lorsque l'on compare les huiles essentielles des romarins étudiés (figure 37 et tableau 08), on remarque que celle du romarin de l'INA se distingue des autres par sa grande teneur en monoterpènes (proche de 70%) alors que les huiles essentielles de Tablat et de Beni Yenni ont une teneur autour de 50%. Le fort taux en monoterpènes de l'huile essentielle de l'INA est dû à sa forte concentration en α -pinène (51,8%), alors que ce dernier ne représente qu'un peu plus de 20% dans les huiles essentielles de Tablat et de Beni Yenni.

Par contre, l'huile essentielle du romarin de l'INA possède le plus faible taux en monoterpènes oxygénés (18,7%), alors que dans les huiles essentielles du romarin de Tablat et de Beni Yenni on enregistre un taux de 42,5% et 35% respectivement. L'importante teneur en camphor (32% pour l'huile essentielle de Tablat et 13,8% pour l'huile essentielle de Beni Yenni) ainsi qu'en 1-8cinéole pour l'huile essentielle de Tablat 9,5% explique le fort taux en monoterpènes oxygénés de ces deux huiles.

Même si l'huile essentielle de Tablat ne possède qu'une teneur de 9.5% de 1-8cinéole, c'est la seule des trois huiles à avoir un taux significatif en ce composé (1-8 cinéole se trouve sous forme de trace dans l'huile essentielle du romarin de l'INA et de Beni Yenni). Selon ce constat, il semblerait que les huiles des trois régions étudiées sont différentes de l'huile essentielle du romarin des Bibans (**Boutekedjiret 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.

Malgré la proximité des teneurs en sesquiterpènes des huiles essentielles du romarin de l'INA et de Beni Yenni (9,1%, 8,6% respectivement), il semblerait que l'huile essentielle du romarin de Beni Yenni présente une plus grande diversité en ces composés avec des teneurs faibles, alors que l'huile essentielle du romarin de l'INA tire sa forte teneur en sesquiterpènes principalement du β - caryophyllène qui représente à lui seul environ 75 % des sesquiterpènes. L'huile essentielle du romarin de Tablat quant à elle présente une teneur en sesquiterpènes inférieure à celle des deux autres huiles.

De manière globale, l'analyse par CPG et CPG/SM montre clairement une plus grande diversité de composé dans l'huile essentielle de Beni Yenni comparée aux deux autres huiles de romarins étudiés. Ainsi l'huile essentielle de Beni Yenni contient entre autres une proportion non négligeable de filifolone (0,7%) (figure 38), composé qui est détecté pour la

première fois dans l'huile essentielle de romarin d'Algérie. Ce composé ne se trouve que dans de très rares huiles de romarin comme celles du romarin des régions d'Izmir et Canakale (Turquie) (Yesil Celiktas *et al.*, 2007)b.

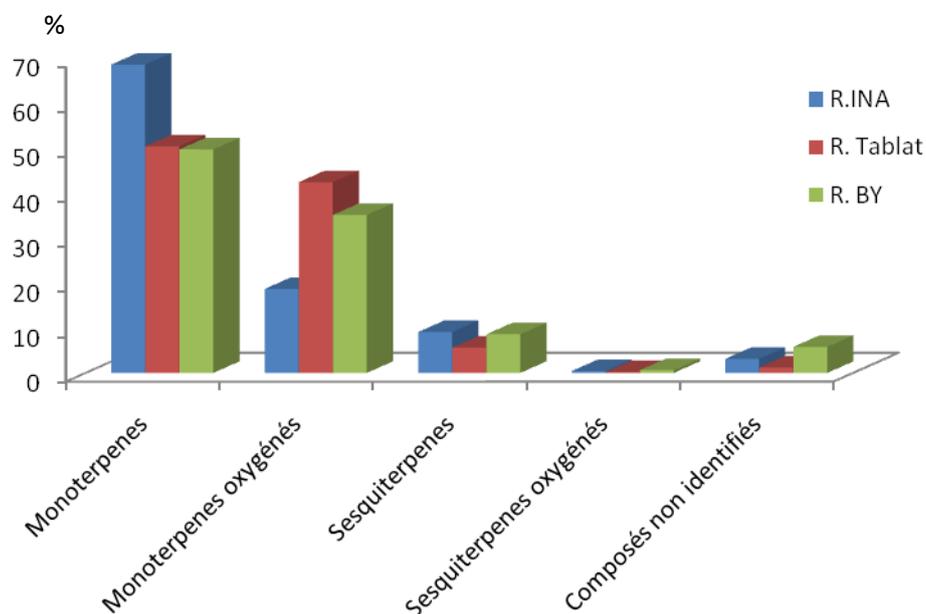


Figure 37 : Proportion des familles de composés identifiés du romarin des trois régions

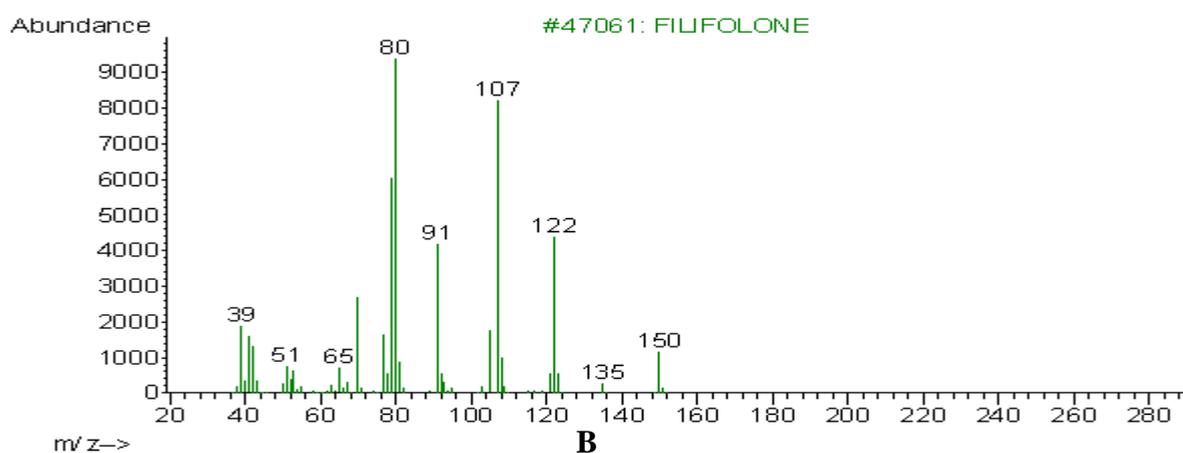
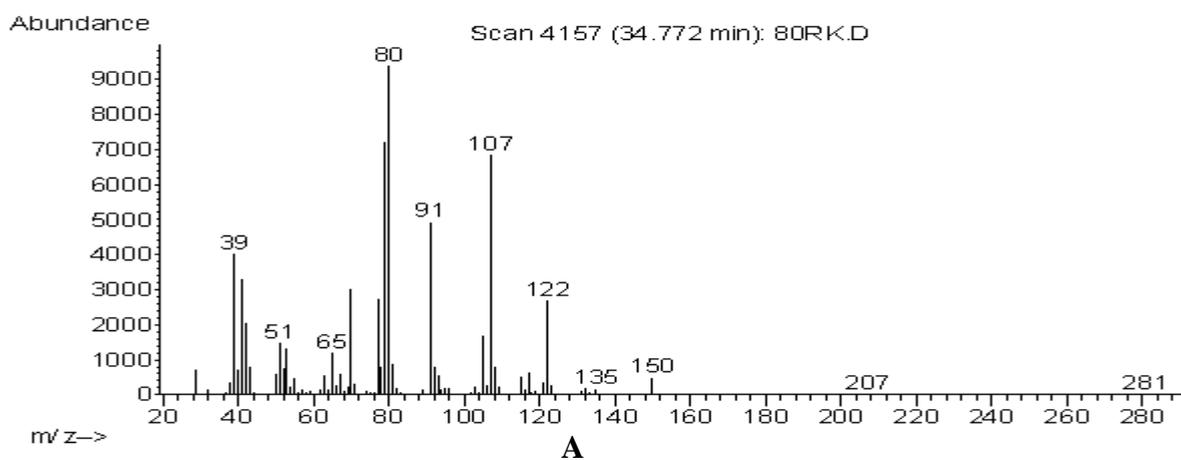


Figure 38 : Spectres de masse du filifolone. A : Spectre de masse du composé détecté dans l'huile essentielle. B : Spectre de masse du filifolone fourni par la banque de donnée

L'ensemble des différences de compositions et de teneurs sont liées à la diversité des habitats dans lesquels évoluent les romarins dont les huiles essentielles ont été investiguées. Ainsi **Tucker et Maciarello (1986)** ; **Angioni *et al.* (2004)** ; **Graber *et al.* (2010)** rapportent que la composition chimique des huiles essentielles de romarin est très dépendante des conditions pédoclimatiques.

7. Rendement en extraits

Le tableau 09 et la figure 39 représentent les rendements en extraits exprimés en pourcentage (g extrait/100g matière végétale) obtenus pour les trois écotypes étudiés.

Tableau 09 : Rendements en extrait des trois romarins étudiés

Echantillon	Rendement (%)
R. INA	39,6
R. Tablat	20,55
R.Beni Yenni	22,61

R. romarin

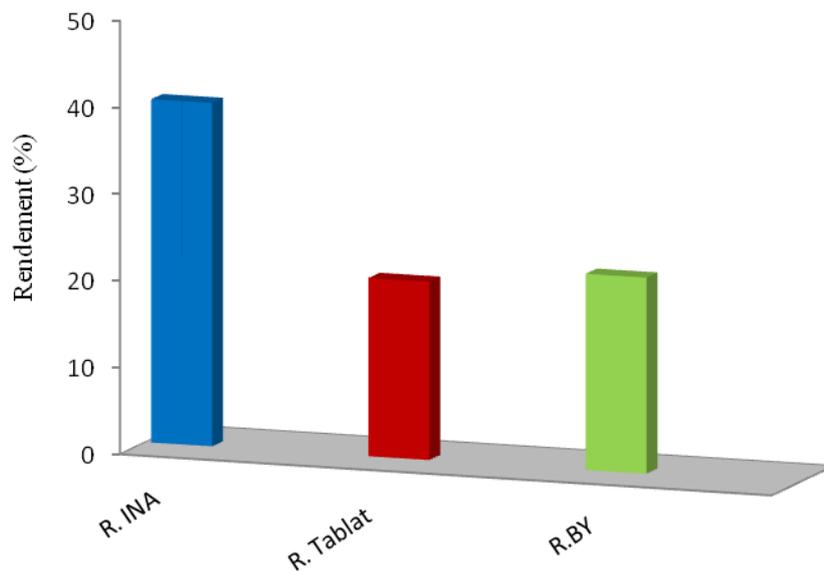


Figure 39 : Rendements en extraits

D'après la figure 39, on remarque que le romarin de l'INA enregistre le plus fort rendement avec environ 40% suivi par le romarin de Beni Yenni et de Tablat avec respectivement 22,61% et 20,55%.

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 (facteurs génétiques) 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).

Il n'existe pas dans la littérature de modèles prédictifs des rendements utilisant la composition chimique d'une plante donnée (Maisuthisakul *et al.*, 2008).

De plus, 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).

7.1. Teneur en phénols totaux

La teneur en phénols totaux des différents écotypes étudiés est déterminée par la méthode colorimétrique de Folin ciocalteu, en utilisant la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique qui est représentée par la figure 40.

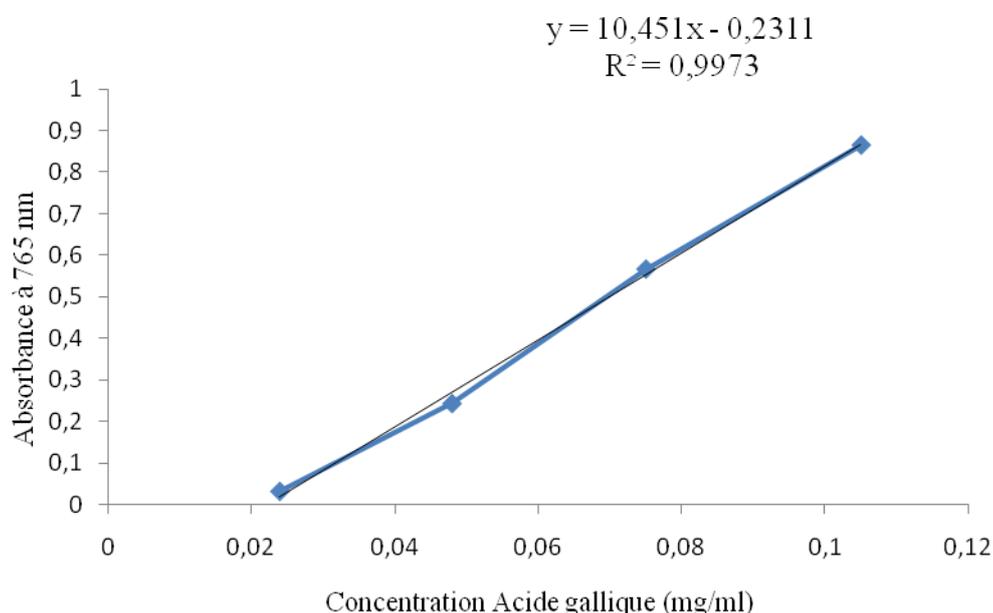


Figure 40 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les résultats du dosage des phénols totaux sont représentés dans le tableau 10 et la figure 41.

Tableau 10 : Teneurs en phénols totaux des différents extraits

Extraits	Teneur en phénol total (mg eq.ag/g)*
R. INA	462,7
R. Tablat	372,73
R.BY	408,62

* mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait
R. romarin

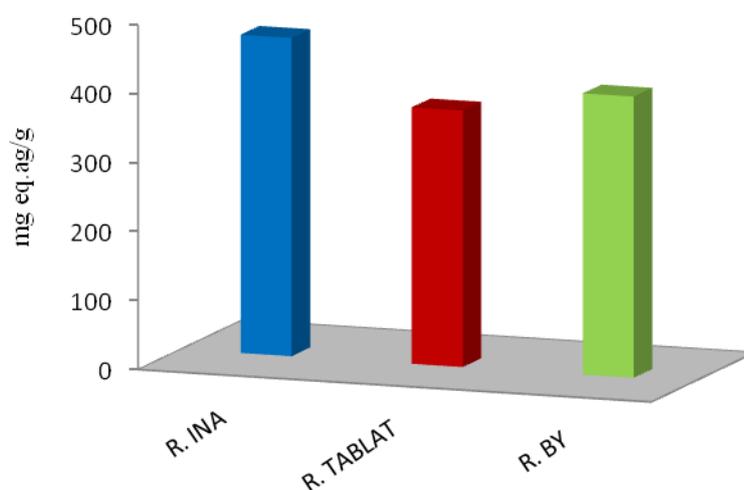


Figure 41 : Teneur en phénols totaux

Selon la figure 41, les résultats du dosage des phénols totaux ont permis d'enregistrer de fortes teneurs pour l'ensemble des extraits étudiés, avec cependant des différences notables. Ainsi l'extrait du romarin de l'INA se distingue par la plus forte teneur en phénols totaux (462,7 mg eq.ag /g d'extrait) suivi par celui du romarin de Beni Yenni (408,62 mg eq.ag /g d'extrait) et le romarin de Tablat (372,73 mg eq.ag /g d'extrait).

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.

Les variations importantes des teneurs en phénols totaux du romarin de différentes provenances s'expliqueraient, en plus de l'aspect purement génétique, 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 (Wojdylo *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), à titre d'exemple, les extraits aqueux et méthanoliques issus de romarin traité dans les mêmes conditions que les nôtres (feuilles séchées, méthode d'extraction) ont des teneurs en phénols totaux de 185 mg eq.ag /g (Dorman *et al.*, 2003).

Les mêmes teneurs en phénols totaux sont observées pour des extraits méthanoliques obtenus avec des feuilles séchées dont les extraits bruts sont prétraités avec un procédé incluant l'acide chlorhydrique (Kosar *et al.*, 2005).

La teneur en phénols totaux des extraits de romarin obtenue à partir des feuilles fraîches est la plus faible enregistrée avec environ 2,19 mg eq.ag /g (Zheng et Wang, 2001).

7.2. Teneur en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium en utilisant la courbe d'étalonnage établie pour la quercitrine et représentée par la figure 42.

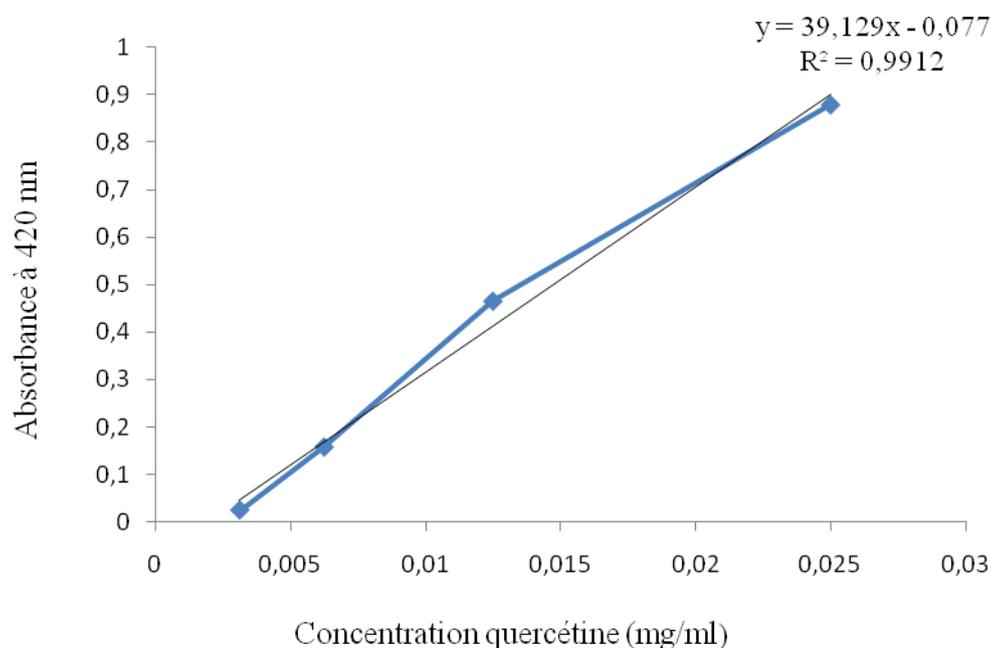


Figure 42 : Courbe d'étalonnage de la quercitrine

La teneur en flavonoïdes des trois extraits de romarin est représentée dans le tableau 11 et la figure 43.

Tableau 11 : Teneur en flavonoïdes des différents extraits de romarin

Extrait	Teneur en flavonoïdes (mg eq. qr /g extrait)*
R. INA	54,75
R. Tablat	38,14
R.BY	45,17

* mg équivalent de quercitine /g d'extrait
R. romarin

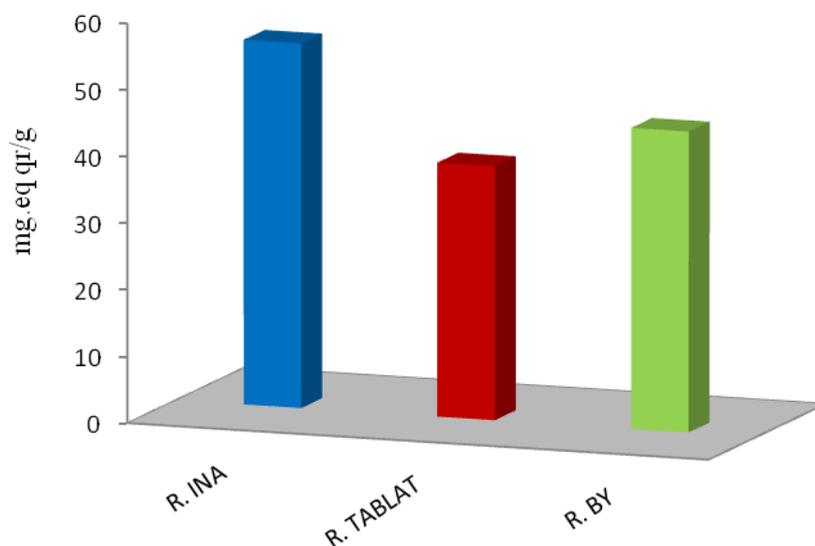


Figure 43: Teneur en flavonoïdes des extraits

Les résultats du dosage des flavonoïdes des trois extraits étudiés révèlent de fortes teneurs en flavonoïdes avec une même hiérarchisation des teneurs que celles obtenues pour les phénols totaux (54,75mg eq. qr /g d'extrait pour le romarin de l'INA, 45,17 mg eq. qr /g d'extrait pour le romarin de Beni Yenni et 38,14 mg eq. qr /g d'extrait pour le romarin de Tablat).

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.

On note cependant, que même si la teneur en phénols totaux est largement supérieure à celle décrite par **Dorman *et al.* (2003)**, **Chen *et al.* (2007)**, la proportion en flavonoïdes ne représente que 25% environ des phénols totaux, alors que ces mêmes auteurs enregistrent des proportions supérieures à 50%.

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

8.1. Activité de piégeage du radical DPPH

Le recours à l'évaluation du pouvoir de piégeage du radical DPPH comme méthode pour la mesure de l'activité antioxydante de nos huiles et extraits, est motivé par le fait que cette méthode est largement utilisée pour sa fiabilité et répétabilité (**Thaipong *et al.*, 2006 ; Siddhuraju, 2007**).

8.1.1. Activité de piégeage du radical DPPH des différentes huiles essentielles des romarins étudiés

Les résultats de l'évaluation de l'activité de piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles et le BHT sont résumés dans le tableau 12 et la figure 44.

Tableau 12 : Activité de piégeage du radical DPPH des différentes huiles essentielles de romarin comparée à celle du BHT.

Concentration (mg/l)	Activité de piégeage du radical DPPH des huiles essentielles (%)			
	R. INA	R. Tablat	R. Beni Yenni	BHT
100	10,98 ±0,26	4,66 ±0,88	6,24 ±0,9	73,15±0,85
200	14,27 ±0,48	6,36 ±0,67	8,18 ±0,44	80,63±0,32
400	15,31 ±0,33	9,48 ±0,33	11,7 ±0,03	84,75±0,52
600	16,18 ±1,73	10,75 ±0,42	14,24±0,62	86,35±0,6
800	17,61 ±0,3	16,75 ±0,21	17,12±0,25	88,81±0,3
1000	21,74 ±0,49	17,09 ±0,35	19,7±0,65	91,07±0,13

L'analyse de variance de l'effet des écotypes et des concentrations en huile essentielle indique un effet très hautement significatif ($<0,01$) de ces deux facteurs sur l'activité du piégeage du radical DPPH (tableau 13).

Tableau 13 : Récapitulatif de l'ANOVA des activités de piégeage du radical DPPH exprimées par les huiles des trois écotypes

Facteur	Somme des carrés	ddl	Signification
A	68061,36	3	$<0,01$
B	1493,58	5	$<0,01$
A x B	127,12	15	$<0,01$
Erreur	17,74	48	

A : Ecotype ; B : Concentration (mg/l) ; A x B : Interaction (Ecotype - Concentration).

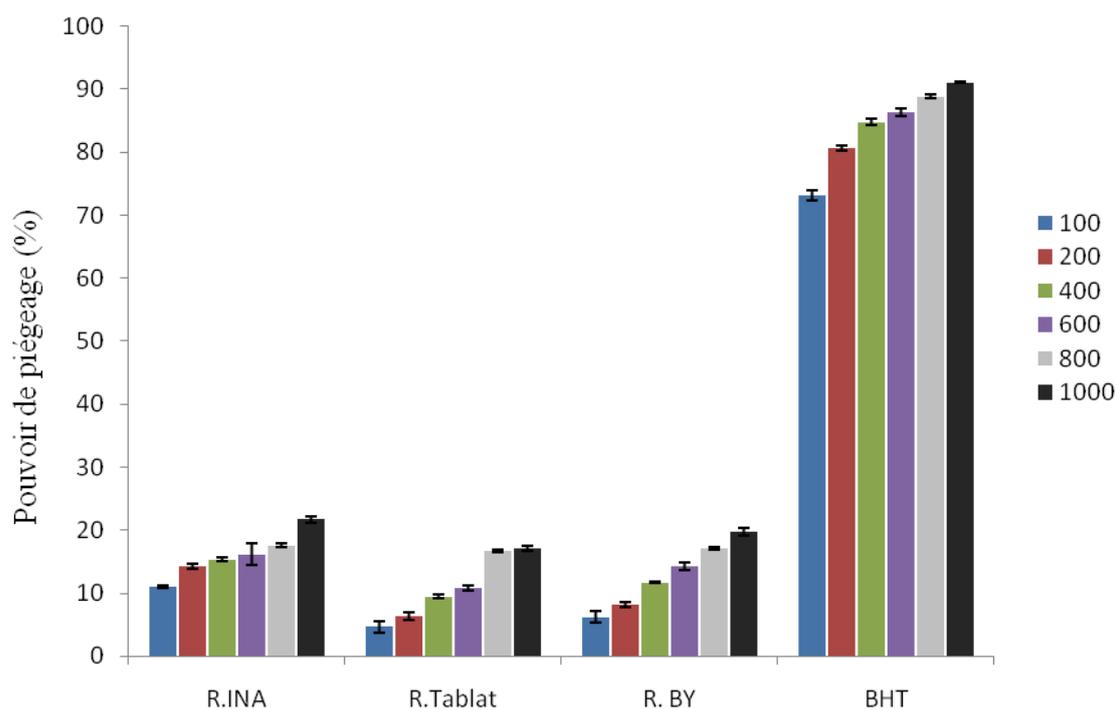


Figure 44 : Activité de piégeage du radical DPPH par les différentes huiles essentielles de romarin et du BHT

D'après la figure 44, 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 celles des différentes huiles essentielles quelque soit les concentrations considérées ; même si ces huiles montrent des activités notables.

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 étant donné qu'à la plus forte concentration (1000mg/l), on arrive à peine à un taux d'inhibition de 20%.

La comparaison des moyennes du pouvoir de piégeage montre que l'huile essentielle de l'INA présente une activité significativement supérieure ($p < 0,05$) à celle de Beni Yenni, qui est elle-même supérieure à celle de Tablat.

Des études similaires menées sur des huiles essentielles de différentes plantes attribuent ces différences d'intensité de piégeage à la composition chimique de ces dites huiles (**Wang et al., 2008 ; Oke et al., 2009**).

La teneur ainsi que la nature des composés majoritaires semblent donc 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. La meilleure activité de piégeage du radical DPPH de l'huile essentielle du romarin de l'INA, pourrait être liée à sa 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**).

8.1.2. Activité de piégeage du radical DPPH des extraits de romarins étudiés

Les différentes activités de piégeage obtenues pour les différents extraits comparé à celle du BHT (antioxydant de synthèse) sont reportées dans le tableau 14 et la figure 45

Tableau 14 : Résultats d'activité de piégeage du radical DPPH des différents extraits de romarin comparée à l'activité du standard BHT

Concentration (mg/l)	Activité de piégeage du radical DPPH des extraits (%)			
	R. INA	R. Tablat	R. Beni Yenni	BHT
2	13,45 ±0,41	13,46 ±0,24	11,3±1,65	ND
5	37,10±0,59	14,84 ±0,18	19,12±0,42	ND
10	46,91±1,24	25,82±0,77	26,84±0,71	31,40±0,70
20	69,75±1,13	48,4±1,18	55,97±0,33	42,14±0,48
50	86,24±0,35	70,79±0,7	92±0,06	62,49±0,69
100	88,27±0,42	85,04±0,55	92,08±0,008	73,15±0,85

ND : non déterminé

L'analyse de variance de l'effet des écotypes et des concentrations en extrait indique un effet très hautement significatif (<0,01) de ces deux facteurs sur l'activité du piégeage du radical DPPH (tableau 15).

Tableau 15 : Récapitulatif de l'ANOVA des activités de piégeage du radical DPPH exprimées par les extraits des trois écotypes

Facteur	Somme des carrés	ddl	Signification
A	14511,8	3	<0,01
B	23082,0	5	<0,01
A x B	33118,3	15	<0,01
Erreur	23,0	48	

A : Ecotype ; B : Concentration (mg/l) ; A x B : Interaction (Ecotype - Concentration).

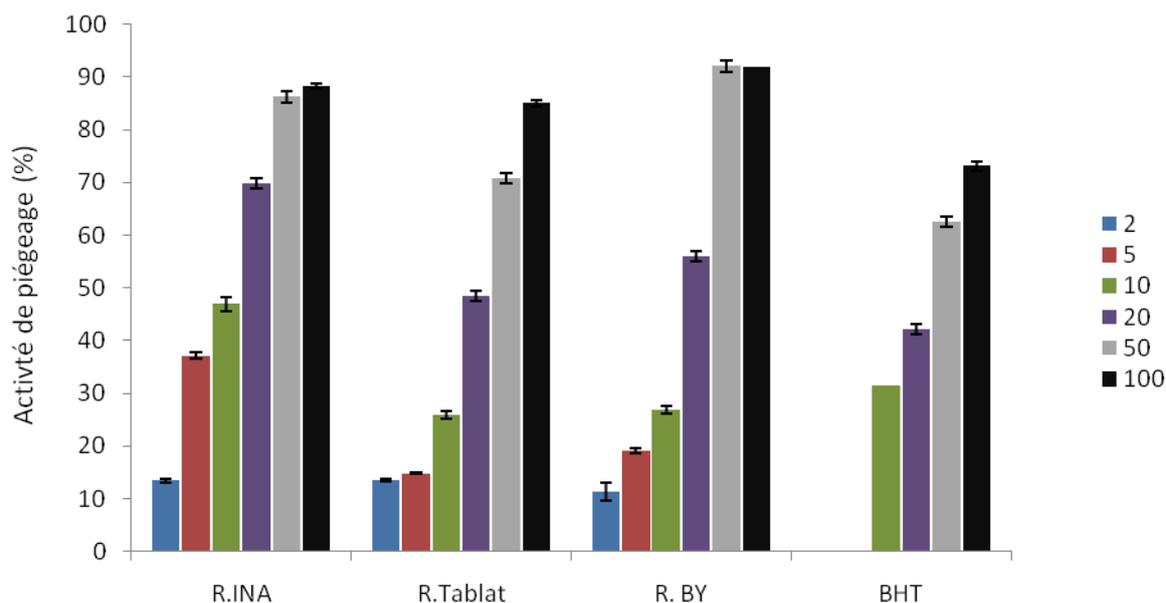


Figure 45 : Activité de piégeage du radical DPPH par les différents extraits de romarin et du BHT

D'après la figure 45, 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 à l'augmentation des concentrations en extraits) ; avec cependant une différence nette de supériorité des intensités de piégeage des extraits.

Aux concentrations inférieures ou égales à 20 mg/l, l'activité de piégeage du radical DPPH de l'extrait du romarin de l'INA est la plus importante. A ces mêmes concentrations on note également une réelle supériorité de l'activité de piégeage du radical DPPH par le romarin de Beni Yenni par rapport à celle de Tablat.

Cependant, aux concentrations supérieures ou égales à 50 mg/l, on remarque que le pouvoir du piégeage du radical DPPH des extraits du romarin de Beni Yenni et celui de l'INA est à peu près similaire, alors que l'activité de l'extrait du romarin de Tablat reste toujours inférieure à celles des deux autres extraits même si l'écart s'amenuise à une concentration de 100mg/l.

De manière générale, hormis mis pour les concentrations de 10mg/l (où seul l'extrait du romarin de l'INA a une activité supérieure à celle du BHT), les concentrations supérieures montrent, pour l'ensemble des extraits étudiés, une activité de piégeage plus élevée que celle du BHT avec une large supériorité de l'extrait du romarin de l'INA.

La comparaison des moyennes du pouvoir de piégeage montre que l'extrait du romarin de l'INA présente une activité significativement supérieure ($p < 0,05$) à celle de Beni Yenni, qui est elle-même supérieure à celle de Tablat.

La détermination des IC_{50} des différents extraits et du BHT (figure 46), permet de conforter l'ensemble de nos observations. Etant donné que les plus faibles valeurs d' IC_{50} indiquent les plus grandes activités antioxydantes, on conclut d'une part que l'extrait du romarin de l'INA possède de loin la plus forte activité ($IC_{50}=10.4\text{mg/l}$), suivi par l'extrait du romarin de Beni Yenni et de Tablat (14,92 mg/l et 20,73mg/l respectivement), et d'autre part que l'ensemble des extraits étudiés disposent d'une plus grande activité antioxydante par rapport à celle du BHT ($IC_{50}=28\text{mg/l}$).

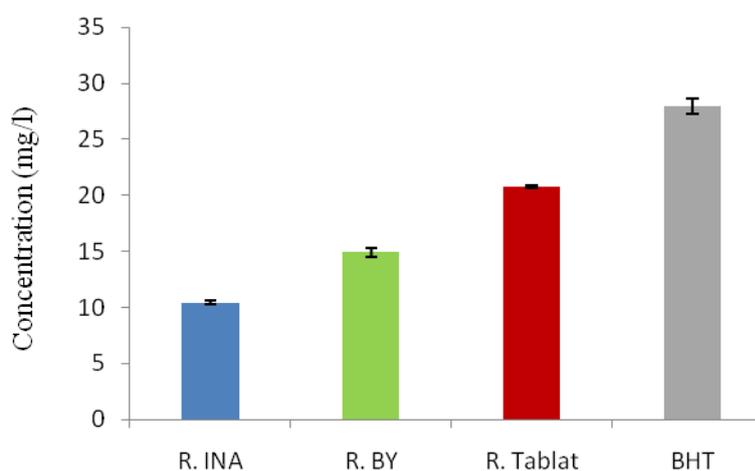


Figure 46 : IC_{50} des différents extraits et du BHT

En effet, diverses études montrent le fort pouvoir antioxydant des extraits de romarin 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)

Ce phénomène est vérifié pour les extraits que nous avons étudiés, il est à noter que l'intensité du pouvoir de piégeage augmente avec la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes de chaque extrait comme résumé dans le tableau 16.

Tableau 16 : Valeurs d'IC₅₀, phénols totaux et flavonoïdes des différents extraits

Extrait	IC ₅₀ (mg/l)	Phénols totaux (mg eq. ag/g)	Flavonoïdes (mg eq. qr/g)
R. INA	10,4±0,17a	462,7	54,75
R. Beni Yenni	20,73±0,37b	408,62	45,17
R. Tablat	14,92±0,11c	372,73	38,14

Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes (0,05%).

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) est dépendante des facteurs génétiques et environnementaux (climat, altitude, latitude, etc...) dans lesquels évolue la plante (Shan *et al.*, 2005 ; Wojdyło *et al.*, 2007).

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.

8.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur mesure la capacité de réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺), 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.

8.2.1 Le pouvoir réducteur des différentes huiles essentielles

L'ensemble des estimations du pouvoir réducteur des différentes huiles essentielles et du BHT sont représentées dans le tableau 17 et la figure 47.

Tableau 17 : Pouvoir réducteur des différentes huiles essentielles de romarin et du BHT

Concentration (mg/l)	Absorbances des huiles essentielles lues à 700nm			
	R. INA	R. Tablat	R. Beni Yenni	BHT
100	0,018 ±0,002	0,039±0,004	0,037±0,006	0,863±0,011
200	0,117 ±0,001	0,105±0,003	0,118±0,009	1,063±0,024
400	0,295 ±0,007	0,213±0,014	0,243±0,003	1,161±0,008
600	0,348 ±0,009	0,318±0,006	0,254±0,001	1,178±0,005
800	0,380 ±0,005	0,373±0,005	0,274±0,003	1,218±0,036
1000	0,394 ±0,004	0,387±0,002	0,31±0,002	1,303±0,003

L'analyse de variance de l'effet des écotypes et des concentrations en huile essentielle indique un effet très hautement significatif ($p < 0,01$) de ces deux facteurs sur le pouvoir réducteur (tableau 18).

Tableau 18 : Récapitulatif de l'ANOVA des pouvoirs réducteurs exprimés par les huiles essentielles des trois écotypes

Facteur	Somme des carrés	ddl	Signification
A	10,74178	3	<0,01
B	1,15416	5	<0,01
A x B	0,04792	15	<0,01
Erreur	0,00546	48	

A : Ecotype ; B : Concentration (mg/l) ; A x B : Interaction (Ecotype -Concentration).

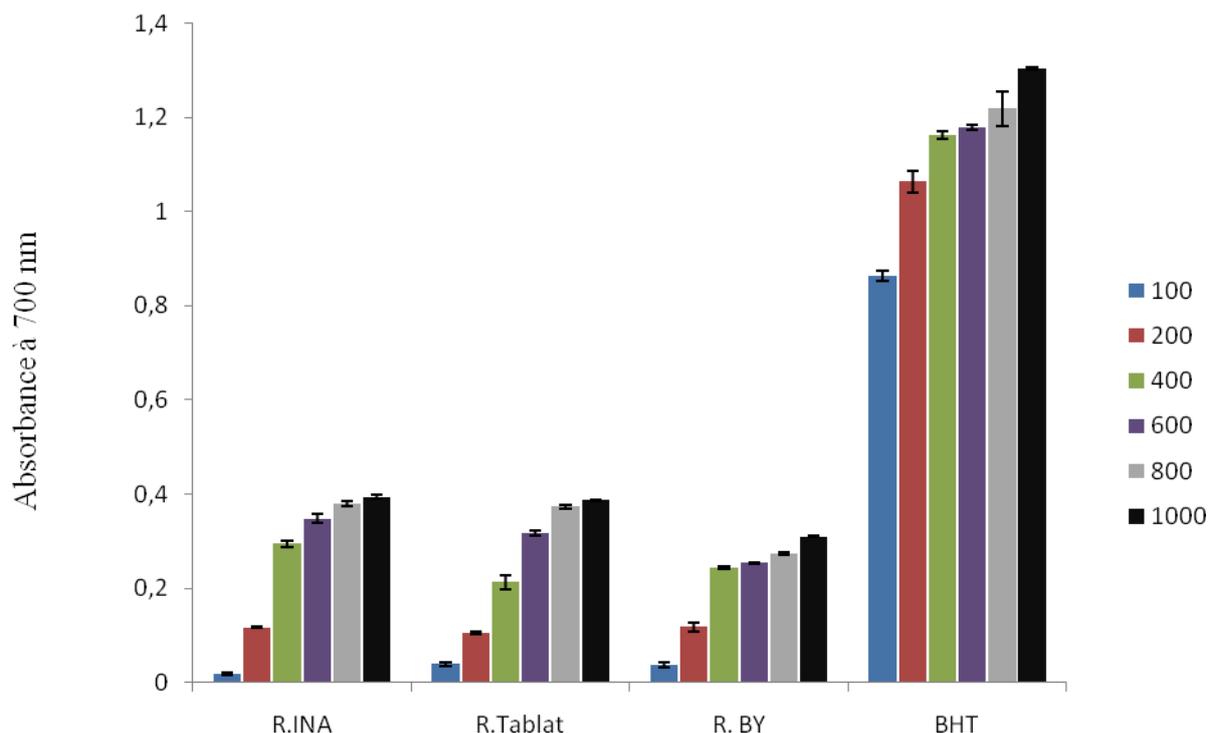


Figure 47 : Pouvoir réducteur des différents huiles essentielles de romarin et du BHT

D'après la figure 47, on remarque que le pouvoir réducteur de l'ensemble des huiles essentielles augmente proportionnellement avec leur concentration, de même que pour le BHT.

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

Hormis pour la concentration de 100mg/l, où le pouvoir réducteur de l'ensemble des huiles essentielles semble négligeable au regard du pouvoir réducteur du BHT, aux valeurs allant de 200 à 600 mg/l, l'huile essentielle du romarin de l'INA apparaît comme ayant un pouvoir réducteur largement supérieur à celles de Beni Yenni et de Tablat.

Aux concentrations de 800 et 1000 mg/l, les capacités réductrices des huiles essentielles du romarin de l'INA et de Tablat semblent équivalentes, alors que celle de l'huile essentielle du romarin de Beni Yenni est plus faible.

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.

8.2.2 Le pouvoir réducteur des différents extraits de romarins

Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur des différents extraits rapportés dans le tableau 19 et la figure 48 montrent la même tendance de proportionnalité entre l'augmentation des concentrations et l'augmentation du pouvoir réducteur observé pour les huiles (figure 47).

Tableau 19 : Pouvoir réducteur des différents extraits de romarin comparé au pouvoir réducteur du BHT et de l'acide ascorbique

Concentration (mg/l)	Absorbances des extraits lues à 700nm				
	R. INA	R. Tablat	R. Ben Yenni	BHT	Acide ascorbique
2	0,156 ± 0,005	0,022 ± 0,003	0,009 ± 0,003	ND	0,1985 ± 0,0065
5	0,245 ± 0,005	0,024 ± 0,001	0,03 ± 0,0006	ND	0,3865 ± 0,0015
10	0,277 ± 0,005	0,049 ± 0,008	0,072 ± 0,002	ND	0,689 ± 0,016
20	0,422 ± 0,006	0,119 ± 0,009	0,146 ± 0,008	0,311 ± 0,006	1,6275 ± 0,016
50	0,652 ± 0,006	0,293 ± 0,008	0,405 ± 0,002	0,576 ± 0,001	2,8965 ± 0,0175
100	0,879 ± 0,012	0,504 ± 0,011	0,765 ± 0,009	0,863 ± 0,011	ND

L'analyse de variance de l'effet des écotypes et des concentrations en extrait indique un effet très hautement significatif ($p < 0,01$) de ces deux facteurs sur le pouvoir réducteur (tableau 20).

Tableau 20 : Récapitulatif de l'ANOVA des pouvoirs réducteurs exprimés par les extraits des trois écotypes

Facteur	Somme des carrés	ddl	Signification
A	35478,03	4	<0,01
B	7935,06	5	<0,01
A x B	63789,37	20	<0,01
Erreur	0,00	60	

A : Ecotype ; B : Concentration (mg/l) ; A x B : Interaction (Ecotype - Concentration).

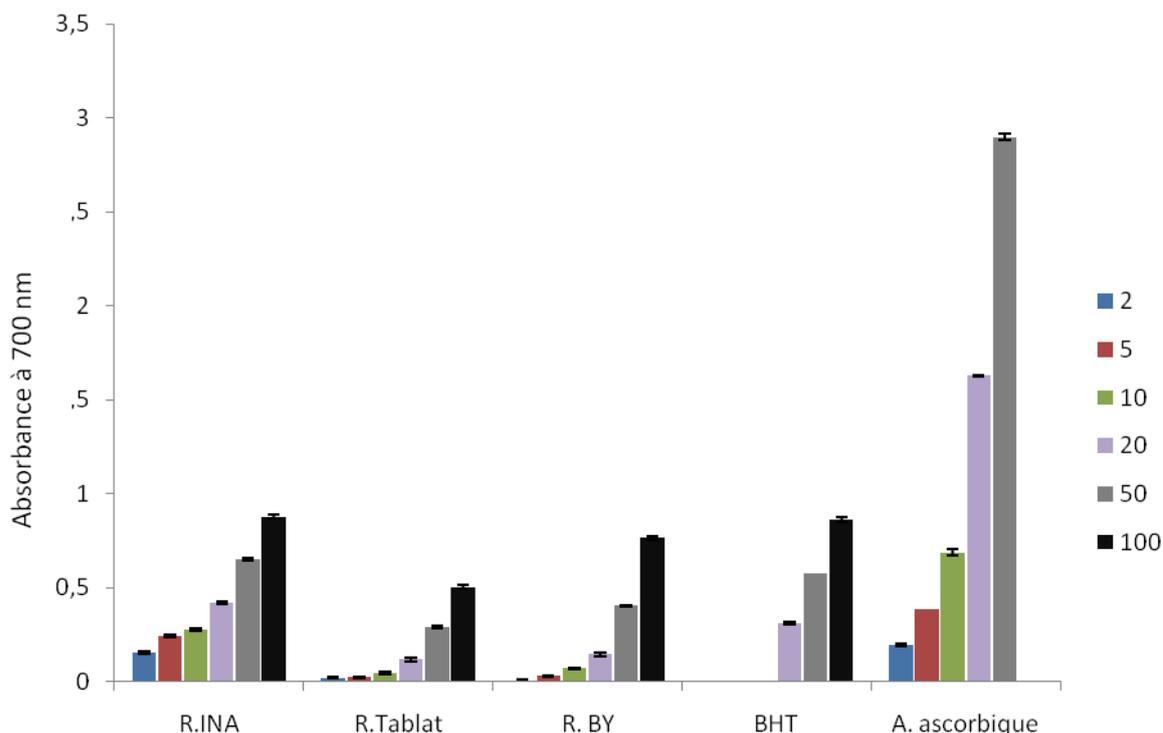


Figure 48 : Pouvoir réducteur des différents extraits de romarin, du BHT et de l'acide ascorbique

On remarque, que la capacité réductrice des extraits est nettement plus importante que celle des huiles, ceci devient d'autant plus prononcé aux concentrations élevées (≥ 20 mg/l).

La figure 48 montre que l'extrait du romarin de l'INA possède un pouvoir réducteur supérieur à celui du BHT et des deux autres extraits. De plus on peut remarquer que pour l'ensemble des concentrations, le pouvoir réducteur significativement différent ($p < 0,05$) des trois extraits gardent le même ordre (extrait INA > extrait Beni Yenni > extrait Tablat).

De plus, on observe clairement une corrélation entre la capacité réductrice de nos extraits avec leurs teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux. On peut donc conclure que l'intensité réductrice de nos échantillons de romarin serait attribuée à leurs teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux. Le pouvoir réducteur de ces derniers serait dû à leurs aptitudes aux substitutions de groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques (**Shimada et al., 1992**). La capacité réductrice de nos extraits par rapport à l'acide ascorbique (connu pour son fort pouvoir réducteur) reste cependant relativement faible.

9. Activités antimicrobienne, antifongique et antilevurienne

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

La détermination des concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{l/ml}$) des différentes huiles et extraits de romarin vis-à-vis de certains microorganismes pathogènes, mycotoxinogènes et phytopathogènes sont représentées dans le tableau 21.

Tableau 21 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des huiles essentielles et des extraits

Microorganismes	Concentration ($\mu\text{l/ml}$)		Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	
	Huile essentielle		Extrait	
	(R. INA)	(R. Tablat)	(R. INA)	(R. Tablat)
<i>En. cloacae E13</i>	10	>20	2	4
<i>E.coli E195</i>	20	>20	4	6
<i>K.pneumoniae E 40</i>	20	20	2	2
<i>K.pneumoniae KP19</i>	>20	>20	4	4
<i>S.enterica E32</i>	>20	>20	2	4
<i>P.aeruginosa</i>	15	>20	4	4
<i>B.subtilis</i>	8	>20	2	2
<i>L.monocytogenes</i>	15	>20	2	2
<i>A.carbonarius</i>	4	>20	6	8
<i>A.niger</i>	8	>20	8	10
<i>A.flavus</i>	8	>20	20	20
<i>F.O.L</i>	6	20	6	10
<i>P.glabrum</i>	15	>20	20	20
<i>P.expansum</i>	6	>20	6	8
<i>C.albicans</i>	10	>20	8	20

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

❖ CMI des huiles essentielles

L'évaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle du romarin de l'INA et de Tablat représentée dans le tableau 21 confirme l'existence d'un effet antimicrobien des huiles essentielles de romarin sur un large spectre de microorganismes (pathogènes, mycotoxinogènes, phytopatogènes). Les résultats obtenus pour l'huile essentielle du romarin de l'INA sont en accord avec ceux rapportés par différents auteurs (**Gachkar et al., 2007 ; Yesil Celiktas et al., 2007 b; Okoh et al., 2010**).

On note, de grandes différences d'activités entre l'huile essentielle du romarin de l'INA et celle de Tablat, avec une meilleure efficacité de l'huile essentielle du romarin de l'INA. L'huile essentielle du romarin de Tablat n'a manifesté aucune action inhibitrice à une concentration inférieure ou égale à 20µl/ml.

Chaibi et al. (1997), attribuent ces différences d'activités d'huiles essentielles à leurs différences de teneurs en composés actifs tels que les phénols, les aldéhydes et les cétones.

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 (**Benchaar et al., 2008 ; Oussalah et al., 2008**).

La plus forte activité de l'huile essentielle du romarin de l'INA pourrait donc être liée à sa forte teneur en α -pinène (51,8%). En effet **Benchaar 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 et le 1-8 cinéole, alors que le camphor, composé majoritaire de l'huile essentielle du romarin de Tablat (32%), aurait une action moins prononcée.

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 (**Burt, 2004**).

Ultee et al. (2000) ; Bagamboula et al. (2004), démontrent l'existence d'un synergisme d'action entre le carvacrol et le ρ -cymène.

L'huile essentielle du romarin de l'INA, montre 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=8µl/ml), alors que *K. pneumoniae* et *S. enterica* ne sont pas affectée même à une concentration de 20µl/ml (tableau 21).

Ces résultats suggèrent que l'huile essentielle du romarin de l'INA possède une activité bactériostatique contrastée au regard des activités des huiles essentielles précédemment étudiées, excepté pour le genre *Salmonella* qui semble toujours posséder le même pouvoir de résistance (20µl/ml) (**Hammer et al., 1999**). En effet, l'huile essentielle du romarin de l'INA semble avoir une meilleure activité inhibitrice en ce qui concerne le genre *Bacillus* comparée aux résultats obtenus par **Govarisa et al. (2007)** qui notent des CMI de 20 µl/ml.

On observe cependant pour *E.coli* et *L.monocytogenes* des activités plus faibles que celles rapportées dans certaines études. En effet, **Burt (2004)**, rapporte une CMI de l'ordre de 10µl/ml vis-à-vis d'*E. coli* et **Gachkar et al. (2007)** notent une CMI de 2µl/ml pour le genre *Listeria*.

En ce qui concerne les activités fongistatiques des deux huiles, on remarque la même tendance que celle observée contre les bactéries : l'huile essentielle du romarin de Tablat ne semble pas manifester d'activités inhibitrices aux concentrations inférieures à 20µl/ml. En revanche l'huile essentielle du romarin de l'INA possède une plus grande aptitude fongistatique que bactériostatique. En effet, certains travaux constatent un fort effet fongistatique de l'huile essentielle de romarin contre les champignons aflatoxinogènes et les *Fusariums* (**Duru et al., 2003**).

Quant aux levures, l'huile essentielle du romarin de l'INA possède une activité inhibitrice appréciable contre *C. albicans* comparée à l'huile essentielle du romarin de Tablat (10 et >20µl/ml respectivement).

Différents auteurs attribuent l'activité antimicrobienne des huiles essentielles à leurs degrés d'hydrophobicités (caractéristique lipophile) (**Gutierrez et al., 2008 ; Tajkarimi et al., 2010**).

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 (figure 49). 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 certaine action de l'huile essentielle du romarin de l'INA vis-à-vis des bactéries gram négatif, suggère que certains composés arrivent à atteindre la double membrane phospholipidique.

Holley et Patel, (2005), rapportent que la présence de porines sur la membrane externe des bactéries gram négatif permettent le passage de composés de faible poids moléculaire (inférieure à 600 Da), tels que certains composés phénoliques.

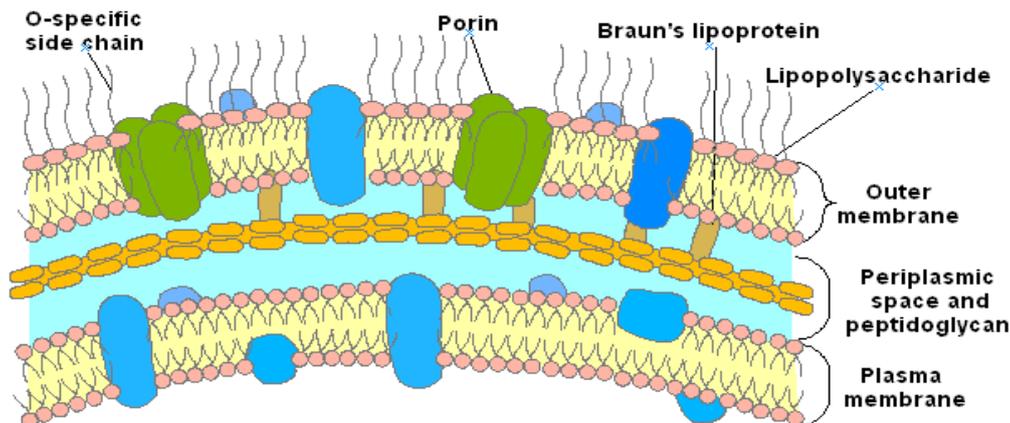


Figure 49 : Représentation schématique de la Structure de la membrane des bactéries Gram négatif

En ce qui concerne les levures et les moisissures, la présence de stérols dans leurs membranes (absents chez les procaryotes) ne confère pas de résistances particulières à ces microorganismes (**Vardar-Unlu et al., 2003**).

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.

❖ *CMI des extraits*

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits de romarin de l'INA et de Tablat représentée dans le tableau 21 montre le fort pouvoir inhibiteur de ces derniers par rapport à celui des huiles essentielles. Plusieurs auteurs rapportent cette forte action des extraits de romarin sur la croissance microbienne (**Georgantelis et al., 2007 ; Tsai et al., 2007**).

Del campo et al. (2000), attribuent la forte action des extraits 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. La plus forte teneur de ces derniers dans l'extrait du romarin de l'INA pourrait expliquer sa plus grande activité par rapport à l'activité de l'extrait du romarin de Tablat (figure 41 et 43).

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. (2002), 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.

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

L'évaluation du pouvoir biocide des huiles et extraits présentée dans le tableau 22, montre clairement que ces derniers ne possèdent pas un réel pouvoir létal vis-à-vis des microorganismes considérés aux concentrations utilisées.

Tableau 22 : Concentrations Minimales Bactéricides des huiles essentielles et des extraits.

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

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

L'étude du pouvoir antimicrobien des huiles et extraits de romarin de l'INA et de Tablat suggère que l'ensemble de nos huiles et extraits possèdent une réelle capacité inhibitrice mais une quasi absence de pouvoir létal aux concentrations considérés. Les différences de pouvoir inhibiteur attribuées à leurs teneurs en certains composés actifs, seraient eux même liés aux conditions écologiques dans lesquelles évolue la plante, à la période de récolte et au mode d'extraction (Ozcan et Erkmen, 2001 ; Oussalah *et al.*, 2008).

Il faut cependant souligner, l'existence de différences notables d'évaluation du pouvoir antimicrobien des huiles et des extraits de romarin dans les diverses études citées. Ces différences sont liées aux conditions expérimentales de mise en œuvre des méthodes d'évaluation des activités inhibitrices, bactéricides ou fongicides tels que le volume et la concentration de l'inoculum, la durée de la phase de croissance, le milieu de culture, le pH du milieu, la température d'incubation etc... (Burt, 2004).

Conclusion

Conclusion générale

Le romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) est un arbuste largement répandu et abondant dans notre pays et dans le reste du bassin méditerranéen. Une meilleure connaissance de cette plante du point de vue de sa composition chimique et de ses éventuelles propriétés contribuerait à sa valorisation 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 des huiles essentielles et extraits de romarin issus de trois régions d'Algérie : Alger (INA), Medea (Tablat) et Tizi Ouzou (Beni Yenni).

Dans la première partie de notre travail, l'étude histologique au microscope photonique des tiges et feuilles de romarin, révèle la présence de poils sécréteurs, tecteurs et glandulaires. L'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur a fourni des rendements de 0,89 g/100g MV pour le romarin de Tablat, 1,02 g/100g MV pour le romarin de l'INA et 1,8 g/100g MV pour le romarin de Beni Yenni.

L'influence de la durée de séchage sur les rendements en huiles essentielles des trois romarins a montré un optimum atteint à la troisième semaine de séchage, puis une diminution au delà. L'étude de la cinétique d'extraction en fonction du temps permettant la fixation de la durée optimale d'extraction qui fournit la majorité d'huile, révèle que le romarin de Beni Yenni est le dernier à atteindre le palier d'extraction synonyme d'une plus grande quantité d'huile contenue dans ce romarin.

En ce qui concerne le rendement en extraits obtenus par soxhlet, le romarin de l'INA enregistre le plus grand rendement (39,6%), suivi par le romarin de Beni Yenni et Tablat (22,61% et 20,55% respectivement).

Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des huiles de romarin des trois régions par l'étude de leurs compositions chimiques par GC et GC/MS ainsi qu'à l'évaluation des teneurs en phénols totaux et flavonoïdes des extraits.

La caractérisation des trois huiles de romarins étudiés, nous a permis de constater une grande variabilité chimique de ces dernières. Ainsi l'huile essentielle du romarin de l'INA se caractérise par une prédominance de l' α -pinène (51,8%), camphor (7,8%), β -caryophyllène (6,8%), limonène (4,5%) et le verbénone (4,1%). L'huile essentielle du romarin de Tablat se

caractérise à son tour par la prédominance du camphor (32%), camphène (22%), α -pinène (20,9%), 1-8 cinéole (9,5%) et β -pinène (6,6%). Quant à l'huile essentielle du romarin de Beni Yenni, elle se distingue des autres huiles par sa plus grande diversité en composés, dont les plus importants de cette huile sont l' α -pinène (24,7%), le limonene (14,3%), le camphor (13,8%), la verbenone (6,3%), le linalool (4,8%), le camphene (4,5%) et le p-cymene (3,8%).

L'évaluation de la teneur en phénols totaux des extraits, nous a permise d'enregistrer le plus fort taux pour l'extrait du romarin de l'INA (462,7mg eq.ag/g), suivi par l'extrait du romarin de Beni Yenni et de Tablat (408,62 et 372,73 mg eq.ag/g respectivement).

Le dosage des flavonoïdes de ces mêmes extraits révèle une teneur de 54,75 mg eq.qr/g pour l'extrait du romarin de l'INA, 45,17 mg eq. qr/g pour l'extrait du romarin de Beni Yenni et 38,14mg eq. qr/g pour l'extrait du romarin de Tablat.

Dans la troisième partie, nous avons évalué *in vitro* le potentiel antioxydant et antimicrobien des huiles essentielles et des extraits étudiés.

L'estimation de l'activité antioxydante de l'ensemble de nos huiles et extraits par le test de l'inhibition du radical DPPH et l'évaluation du pouvoir réducteur, révèle que les extraits ont un pouvoir antioxydant bien supérieur, lié à leur forte teneur en composés phénoliques.

L'inhibition du radical DPPH exprimée en terme de concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC₅₀), n'a pu être évaluée pour les huiles étant donné qu'à la concentration maximale (1000mg/l), aucune des huiles n'arrivent à dépasser 20% d'activité de piégeage, alors que pour les extraits, la détermination des IC₅₀ indique que l'ensemble de nos extraits possèdent une activité d'inhibition du radical DPPH plus élevée que celle du BHT (IC₅₀=28mg/l), avec une supériorité de l'extrait du romarin de l'INA (IC₅₀=10,4mg/l), suivi par l'extrait du romarin de Beni Yenni (14,92mg/l) et l'extrait du romarin de Tablat (20,73mg/l).

En ce qui concerne le pouvoir réducteur des huiles essentielles des romarins considérés, on constate également qu'elles possèdent une faible capacité réductrice par rapport au BHT et aux extraits. L'extrait du romarin de l'INA fournit un pouvoir réducteur plus fort que celui du BHT mais reste cependant inférieur à celui de l'acide ascorbique.

L'estimation de l'activité antimicrobienne des huiles et des extraits de romarin évaluée sur un ensemble de bactéries (gram positif et gram négatif), champignon (mycotoxinogènes et phytopathogènes) et une levure révèle que nos huiles et extraits possèdent beaucoup plus un pouvoir inhibiteur que létal.

L'huile essentielle et extrait du romarin de l'INA montrent une action plus forte que ceux de Tablat dont l'huile n'a manifesté aucun pouvoir inhibiteur même à la concentration maximale considérée (20µl/ml) vis-à-vis de la quasi-totalité des germes.

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 lié à la plus grande difficulté de diffusion des composés actifs lipophiles à travers la membrane des bactéries gram négatif.

En outre, et de façon générale, les extraits de romarin expriment un pouvoir inhibiteur nettement plus fort que celui des huiles essentielles. Ce fort pouvoir serait attribué à la plus forte teneur des extraits en composés phénoliques.

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 leur 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 : le test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), mesure du pouvoir de piégeage du radical hydroxyle (OH[•]), du radical superoxyde (O₂[•]) et du radical mono-oxyde d'azote (NO[•]).

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.

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.

Références bibliographiques

- **Abrassart J.L., 1997.** Aromathérapie essentielle : huiles essentielles : parfums pour le corps et l'âme. Éd. Guy Trédaniel, 271 p.
- **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.
- **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.
- **Baba Aissa F., 2000.** Encyclopédie des plantes utiles. Ed. EDAS, 368 p.
- **Babovic N., Djilas S., Jadranin 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.
- **Bagamboula C. F., Uyttendaele M., Debevere J., 2004.** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. Flexneri*. *Food Microbiology*, Vol. 2, p.p.33–42.
- **Bannour F., Chéraif 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.
- **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.
- **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.

- **Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardini J.F., Costa J., 2007.** Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, Vol. 106, p.p. 132 – 139.
- **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.
- **Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A., 1988.** Extraction des huiles essentielles : Chimie et technologie. *Information chimie*, Vol. 298, p.p. 179 – 184.
- **Beylier-Maurel M.F., 1976.** Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana. E.P.P.O.S.*, Vol. 58, p.p. 283 – 286.
- **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.
- **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.
- **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., 2004.** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (Nigelle, Coriandre, Origan, Thym, Romarin). Etude de leurs activités antimicrobiennes. Mémoire. Mag., INA, El Harrach, 130 p.
- **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, N°. 1, p.p.355–362.
- **Boutekedjiret 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., (2002).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Tech & doc-Lavoisier, Paris, 1095 p.
- **Bruneton J., 1995.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Tech & doc-Lavoisier, Paris, 526 p.
- **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plante médicinale. Tech & doc-Lavoisier, Paris, 585 p.
- **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.
- **Camefort H., 1972.** Morphologie des végétaux vasculaires : cytologie, anatomie et adaptation. Paris, Doin, 409p.
- **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.
- **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 Clinical Nutrition*, Vol. 81, p.p. 223 – 229.
- **Cohen M., 2002.** Stress oxidant, 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.
- **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.
- **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.
- **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. *Phytoterapy*, 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.
- **Eymard S., 2003.** Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. Thèse de doctorat, Ecole polytechnique de l'Université de Nantes, France, 125 p.
- **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.
- **Falchi Delitala L., Soccolini R., 1980.** Study on *Rosmarinus officinalis* L. in Sardinia. Note I: botanical consideration and contribution to the knowledge of its essential oil. *Rivista Italiana E.P.P.O.S*, Vol. 72, p. 195.
- **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.
- **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.
- **Fernane A., 2009.** Place de l'entomofaune dans l'arthropodologie de trois stations forestière dans la région de Larbàa Nath Irathen (Tizi Ouzou). Thèse Magi., INA.. El Harrach, 217p.
- **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., Huang S., Aeschbach R., Prior E., 1996.** Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Vol. 44, p.p. 131 – 135.
- **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.
- **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 α -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.
- **Govarisa A., Florou-Panerib P., Botsogloub E., Giannenasb I., Amvrosiadisc I., Botsogloub N., 2007.** The inhibitory potential of feed supplementation with rosemary and/or α -tocopheryl acetate on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast during refrigerated storage. *LWT*, Vol. 40, p.p. 331–337.
- **Graber M.F., Pérez-Correa J.R., Verdugo G., Del Valle J.M., Agosin E., 2010.** Spinning cone column isolation of rosemary essential oil. *Food Control*, Vol. 21, p.p. 615–619.
- **Granger R., Passet J., Geneviève A., 1973.** L'essence de *Rosmarinus officinalis* L. : influence du mode de traitement du matériel végétal. *Parfum Cosmétique*. Savon de France, Vol. 3, N° 6, p.p. 307 – 312.
- **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, Plovidid, Bulgarie.
- **Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P., 2008.** The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International journal of Food Microbiology*, Vol. 124, p.p. 91–97.
- **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., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 86, p.p.985– 990.
- **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.

- **Hart P.H., Brand C., Carson C.F., 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 pallescens* de Noé from Algeria. *Journal of Essential oil Research*, Vol. 21, p.p. 162-165.
- **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.
- **Judde A., 2004.** Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanisme, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ?. *Corps gras et lipides*, Vol. 11, p.p. 414 – 418.
- **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.
- **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.
- **Kurkin V.A., 2003.** Phenylpropanoids from medicinal plants. Distribution, classification, structural analysis and biological activity. *Chemistry and Natural Compounds*, Vol. 39, p.p. 123 – 153.
- **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 Helveticae*, 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
- **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.
- **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.
- **Liebler D.C., Kling D.S., Reed D.J., 1986.** Antioxidant protection of phospholipids bilayers by atocopherol. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 2, N°. 51, p.p. 12114 – 12119.
- **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.
- **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., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F., 2007.** Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineer*, Vol. 79, p.p. 1079 - 1086.
- **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.
- **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., Rémésy C., Jiménez L., 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 79, p.p. 727 – 47.
- **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.
- **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.
- **Mihoub I., 2007.** Etude comparative de quelques lignées F10 de blé dur (*Triticum durum* Desf.). Mém. Ing. INA, El Harrach, Alger, 93 p.
- **Moll M., Moll N., 1998.** Les additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Ed. Dunod, Paris, 218 p.
- **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.

- **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.
- **Oke F., Aslim B., Ozturk S., Altundag S., 2009.** Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, Vol. 112, p.p. 874–879.
- **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.
- **Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M., 2007.** Inhibitory effects of selected plant essential oils on four pathogen bacteria growth: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, Vol. 18, N°. 5, p.p. 414 – 420.
- **Oyaizu M., 1986.** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, Vol. 44, p.p. 307 – 315.
- **Ozcan M., Erkmen O., 2001.** Antimicrobial activity of essential oils of Turkish plant spices. *European Food Research Technology*, Vol. 212, p.p.658–660.
- **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.
- **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., Villalaín 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 Européene, 1997.** 3ème édition, Tome 1.
- **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.
- **Pino J.A., Estrarron M., Fuentes V., 1998.** Essential Oil of Rosemary (*Rosmarinus 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., Martinez-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.
 - **Prior E., 2003.** Lipides et corps gras alimentaires : usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire. Ed. Tech et Doc-Lavoisier, Paris, p.p. 157 – 187.
 - **Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris, CNRS, Tome 1 et 2, 1170 p.
 - **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.
 - **Robert G., 2000.** Les Sens du Parfum. Ed. Osman Eroyllles, 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.
 - **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.
- **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., Inuma 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.
- **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.
- **Siddhuraju P., 2007.** Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologic*, Vol. 40, p.982–990.
- **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.
- **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.

- **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.
- **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.
- **Stahl-Biskup E., 2002.** Thyme: the genus thymus. Ed. Taylor & Francis, London, 331p.
- **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.
- **Tajkarimi M., S.A. Ibrahim, D.O. Cliver, 2010.** Antimicrobial herb and spice compounds in food. *food control*, (In press).
- **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, Anton R., Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Lavoisier, Paris, 522p.
- **Thaipong K.; Boonprakob U.; Crosby K.; Cisneros-Zevallos L.; Bryne, D. H., 2006.** Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol.19, p.669–675.
- **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.
- **Tucker A. O., Maciarello M. J., 1986.** The essential oils of rosemary cultivars. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol.1, p.p.137–142.
- **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.
- **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.
- **Vanier P., 1994.** Les huiles essentielles et la thérapie par les huiles essentielles. *Guide Ressources*, Vol. 9, p.p. 69 – 73.
- **Vardar-Unlu G., Candan F., Sokmen A., Daferera D., Polissiou M., Sokmen M., Donmez E., Tepe B., 2003.** Antimicrobial and antitoxic activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Vol. 51, p.p.63–67.
- **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-Yufer 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.
- **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.
- **Willem J.P., 2002.** Les huiles essentielles : médecine d'avenir. Ed. Dauphin, Paris, 311 p.
- **Wojdyło A., Oszmian'ski J., Czemerys 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.
- **Zaouche S., 1990.** Contribution à la cartographie de la region d'EL ASSAOUIA (TABLAT) : Etude des possibilités de l'utilisation de la photo aérienne en cartographie. Mém. Ing. Agr. INA El-Harrach, 73 p.
- **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.

Annexes

Annexe 1

Gélose nutritive

Peptone..... 5g
Extrait de viande.....1g
Extrait de levure.....2g
Chlorure de sodium.....5g
Agar.....15g
Glucose.....10g
pH égale à 7,2

Isp2

Glucose.....4g
Extrait de malt.....10g
Extrait de levure.....4g
pH égale à 7, 3

Résumé

Les huiles essentielles de romarin (*Rosmarinus officinalis*) issues de trois régions d'Algérie (ENSA, Tablat, Beni Yenni), ont été extraites par entraînement à la vapeur. Le rendement le plus élevé a été obtenu pour le romarin de Beni Yenni avec 1,8%.

L'analyse par CPG et CPG/SM des trois huiles essentielles a révélé de grandes variabilités en compositions chimiques. L' α -pinène est le composé majoritaire de l'huile essentielle du romarin de l'ENSA et de Beni Yenni (51,8 et 24,7% respectivement), alors que c'est le camphor pour l'huile essentielle du romarin de Tablat (32%). L'huile essentielle de Beni Yenni se distingue des deux autres huiles par sa plus grande diversité en composés.

En ce qui concerne les extraits de romarins de ces mêmes régions, le romarin de l'ENSA enregistre le plus fort rendement (39,6%). Le dosage des phénols totaux des différents extraits révèle la plus grande teneur de ces derniers dans l'extrait du romarin de l'ENSA.

L'estimation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits étudiés par le test d'inhibition du radical DPPH et du pouvoir réducteur montre que les extraits ont un pouvoir antioxydant supérieur à celui des huiles essentielles et du BHT. Ceci serait lié à leur teneur en composés phénoliques plus importante. L'huile essentielle et l'extrait du romarin de l'ENSA se distinguent des autres huiles et extraits par leurs plus fortes activités antioxydantes.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'ensemble des huiles et des extraits révèle une plus grande aptitude biostatique que biocide avec une nette supériorité des extraits. Les germes gram positif semblent être les plus sensibles. L'huile et extrait du romarin de l'ENSA montrent ici encore leurs plus fortes actions.

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

Abstract

Essential oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) from three Algerian regions (ENSA, Tablat, Beni Yenni) were obtained by steam distillation. The highest yield was scored for Beni Yenni rosemary with 1.8%.

The GC and GC/MS analysis of these oils revealed high chemicals compounds variability. α -Pinène was the main compound for ENSA and Beni Yenni essential oils (51.8 and 24.7% respectively), whereas camphor (32%) was the main compound for Tablat essential oil. Beni Yenni essential oil expressed the highest compounds diversity.

Regarding the extracts of rosemary of these same regions, ENSA rosemary records the highest yield (39.6%). Total phenol compounds estimation show their greatest amount in ENSA rosemary.

The antioxidant activities of essential oils and extracts assessed by radical DPPH scavenging and reducing power demonstrate a best antioxidant power of extracts compared than that of essential oils and BHT. This could be due to their higher amount of phenolic compounds. Essential oil and extract of ENSA rosemary differentiate from the other essential oils and extracts by their more powerful antioxidant activity.

Antimicrobial activity evaluation demonstrated the more important biostatic capability than biocide of rosemary essential oils and extracts, with a higher activity for extracts. Gram positive strains seem to be more sensitive than gram negative. ENSA essential oil and extract still show their higher action.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, essential oils, extracts, phenolic compounds, antioxidant, antimicrobial activities.

ملخص:

تم إستخلاص زيوت الأساس لنبات إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) بهدف المقارنة من ثلاث مناطق من الجزائر هي المدرسة الوطنية العليا للفلاحة (ENSA)، تابلات و بني يني وذلك بإستعمال تقنية الجر والتقطير ببخار الماء. سجلت أكثر مردودية من الزيوت المستخلصة عند نبات منطقة بني يني بنسبة 1,8 %.

أظهرت التحاليل المخبرية بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية والكروماتوغرافيا الغازية المقارنة بتحليل طيف الكتلة للزيوت الثلاث، أن هناك فروقات معتبرة في تركيبها الكيميائي، إذ وجد أن المركب ألفا-بينان هو المركب الغالب في زيت نبات منطقتي ENSA و بني يني بنسب 51,8 و 24,7 % على التوالي، بينما في زيت نبات منطقة تابلات فإن الكافور هو المركب الغالب بنسبة 32% . يتميز كذلك زيت نبات منطقة بني يني عن الزيتين الآخرين بتنوع أكثر من ناحية المركبات التي يحويها.

فيما يتعلق بمستخلصات العصاره الكلية لهذا النبات، فقد سجلت أكبر مردودية في حالة ENSA بنسبة 39,6 %، وعند قياس المحتوى الكلي من المركبات الفينولية لمختلف المستخلصات تبين أنها تحوي كذلك أكبر نسبة منها.

بمقارنة القدرة المضادة للأكسدة لذا هذه الزيوت والمستخلصات المقدره بواسطة إختبار تثبيط الجذر DPPH و إختبار القدرة الإرجاعية، تبين أن المستخلصات تتميز بقدرة أعلى من الزيوت و حتى من مركب الـ BHT ، وقد يرجع هذا التفوق لغناها بالمركبات الفينولية. بمقارنة النبات في المناطق الثلاث نلاحظ أن زيت ومستخلص إكليل الجبل لمنطقة ENSA يتميزان عن الزيوت والمستخلصات الأخرى بنشاطهما العالي المضاد للأكسدة.

تقديرات النشاط المضاد الحيوي للميكروبات لمجموع الزيوت والمستخلصات أظهر بصفة عامة ميل أكبر للتثبيط الحيوي منه للإبادة الحيوي مع تسجيل لقدرات أحسن لدى المستخلصات ونجاعة أكبر تجاه الجراثيم موجبة الغرام. تبين أيضا أن زيت ومستخلص إكليل الجبل من منطقة ENSA يتميز بأحسن قدرات التضاد.

الكلمات المفتاحية: *Rosmarinus officinalis* ، زيوت الأساس ، المستخلصات، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط الحيوي المضاد للميكروبات.