

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عمّار تليجي بالأغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOAT



**FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
*Mémoire de MASTER***

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

THÈME

***Etude comparative des activités antimicrobiennes et
antioxydante des deux huiles essentielles de Salvia
rosmarinus Shleid spontanée et cultivée***

Présente Par :

- M^{me}. BOUDELAA Nesrine
- M^{lle}. BOURENNANE Rania

Devant le jury composé de :

Mme. KRAZA Lamia	MCB (Université Amar Téliidji, Laghouat)	Présidente
M. SIFI Ibrahim	MCA (Université Amar Téliidji, Laghouat)	Examineur
Mme. ELHOUITI Fatiha	MCA (Université Amar Téliidji, Laghouat)	Rapporteur
Mme. NEBAG Halima	MCB (Université Amar Téliidji, Laghouat)	Co-Rapporteur

Soutenu publiquement le : 29/06/ 20122.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à ma mère Khadija. A toi mon roc, la femme forte, douce et battante qui a sacrifié sa vie pour ceux qu'elle aime. Toi qui continues à me choyer, tu me donnes tant qu'il m'est impossible de te le rendre. Avant je croyais que toutes les mamans sans exception étaient altruistes mais là je peux t'assurer que t'es vraiment exceptionnelle !

A mon cher époux, Khalil, pour son soutien et son appui moral tout le long de mon travail.

A mes sœurs Anfal et Naziha chiraz et mon petit frère Jawad pour leur assistance et leur amour fraternel

A ma tante Awali et sa famille pour ces soirées de rire et de jeux, pour votre soutien et votre bonne humeur depuis toutes ces années. Je vous aime

A mes amis, que nous nous connaissions depuis le lycée ou après le bac, Selma, Hadjer, Zhour, Ines et Imène, je vous remercie pour les bons moments et pour votre soutien.

Nesrine

Dédicace

*Avec l'aide d'ALLAH le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie A mes
Parents ;*

*Je n'oublie pas ses sacrifices, l'amour qui m'a donné, Pour leur encouragement, je le souhaite
la joie et de bonne santé. Ce travail n'est que le fruit de son soutien, et de son encouragement
répété, de leurs prières, de son amour profond. Je souhaite que ce mémoire l'apporte la joie.*

*Pour tous les sacrifices que vous avez consentis à mon égard afin que je puisse
Mener à bien mes études. Vous avez su m'inculquer le sens du devoir, de la responsabilité, de
la dignité, de l'honneur et de l'humilité. Je ne pourrais jamais vous rendre ce que vous avez
fait pour moi, mais j'espère seulement que vous trouverez dans ce modeste travail, un réel
motif de satisfaction.*

A mes petits sœurs et frère amine et sirine, amira

Ma grand-mère et père

A mes tantes et oncles

Rania

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Par ailleurs, nous tenons à remercier notre encadrant Dr. El houti Fatiha Maitre de conférences au Département des Sciences Biologiques, Faculté d'SNV Université de Laghouat pour avoir dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, ses conseils et la confiance qui nous a accordée afin de réaliser ce travail.

Un remerciement spécial à notre Co-encadrant Dr Nbeg Halima pour son aide, encouragement ainsi que son soutien moral qui ont été d'une grande importance pour l'élaboration de ce travail

Nous remercions les membres de jury, chacun à son nom, d'accepter de juger notre travail.

Nous remercions dr Tahri Djilali pour la récolte de la plante et monsieur Aissa et anfal pour sont aides précieuses merci infiniment.

Nous avons le plaisir d'adresser ns vifs remerciements à Tous nos enseignements, Equipe des laboratoires et la bibliothèque particulièrement : le laboratoire de département de biologie et le laboratoire de recherche Sciences fondamentales. Nous tenons à remercier respectivement tous ceux qui nous aident, soutenues, et encouragées pour la réalisation de ce modeste travail.

Résumé

Notre travail porte sur l'étude des activités biologiques des huiles essentielles (HEs) du *Salvia rosmarinus* Schleid (romarin) de deux régions du nord de Laghouat ; Anfous (spontané) et Gueltat Sidi Saad (cultivé). *S. rosmarinus* est une plante aromatique spontanée largement répandue en Algérie, appartenant à la famille des labiées (*Lamiaceae*) appelée communément par la population locale « Lazir », Elle est encore utilisée dans la médecine traditionnelle comme antispasmodique, ingrédients en produits de beauté aussi bien dans la conservation des produits alimentaires. L'extraction des HEs de *S. rosmarinus* a été effectuée par hydrodistillation. L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la méthode de l'aromatogramme. L'activité antioxydante est évaluée par le test de DPPH. Les résultats montrent que les HEs du *S. rosmarinus* spontanée et cultivée ont le même pouvoir biologique, elles possèdent une forte activité antimicrobienne contre la souche testée soit bactériennes (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*) ou fongiques (*Candida albicans* 10 et *candida albicans* 26). D'autre part les HEs ont montré un pouvoir remarquable de piégeage du radical libre DPPH.

Ces résultats peuvent être considérés comme point de départ pour des applications de la plante cultivée, c'est important d'avoir en considération que la récolte sylvestre peut être un risque pour la maintenance à long terme des espèces objet de récolte, et conduire à une réduction subite de leurs populations naturelles.

Mots clés : huile essentiel, *Salvia rosmarinus* Schleid, Activité antioxydante, activité antifongique, Activité antibactérienne.

Abstract

Our work focuses on the study of the biological activities of essential oils of *Salvia rosmarinus* Schleid (rosemary) from two regions north of Laghouat; Anfous (spontaneous) and Gueltat Sidi Saad (cultivated). *S. rosmarinus* is a spontaneous aromatic plant widely distributed in Algeria, belonging to the labiatae family (*Lamiaceae*) commonly called by the local population "Lazir", It is still used in traditional medicine as an antispasmodic, ingredients in beauty products as well in the preservation of food products. The extraction of essential oils from *S. rosmarinus* was carried out by hydrodistillation. The antimicrobial activity is demonstrated by the aromatogram method. The antioxidant activity is evaluated by the DPPH test. The results show that the HEs of spontaneous and cultivated *S. rosmarinus* have the same biological power, they have a strong antimicrobial activity against the strains tested either bacterial (*S. aureus*, *E coli*, *K. pneumoniae*, *Y. enterocolitica*) or fungal (*Candida albicans* 10 and *candida albicana* 26). On the other hand, HEs have shown a remarkable power of trapping the free radical DPPH.

These results can be considered as a starting point for applications of the cultivated plant, it is important to have in consideration that the sylvan harvest can be a risk for the long-term maintenance of the species object of harvest, and lead to a sudden reduction in their natural populations.

Keywords: essential oil, *Salvia rosmarinus* Schleid, antioxidant activity, antifungal activity, antibacterial activity.

ملخص

يركز عملنا على دراسة الأنشطة البيولوجية للزيوت الطيارة لنبته *Salvia rosmarinus* Shleid (إكليل الجبل) من منطقتي شمال الأغواط ؛ انفوس (بري) وقلنة سيدي سعد (مزروعة) . *Salvia rosmarinus* هو نبات عطري جبلي منتشر على نطاق واسع في الجزائر ، ينتمي إلى عائلة الشفويات الذي يطلق عليه السكان المحليون اسم "لازير" ، ولا يزال يستخدم في الطب التقليدي كمضاد للتشنج ، و يدخل في تركيب منتجات التجميل وكذلك في حفظ المنتجات الغذائية. هدف الدراسة هو استخراج الزيوت الطيارة من *Salvia rosmarinus* عن طريق التقطير المائي. و توضيح النشاط المضاد للميكروبات من خلال طريقة l'aromatogramme. تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة عن طريق اختبار DPPH , أظهرت النتائج أن المستخلصين للنبته البرية والمزروعة لهما نفس التأثير ، ولديهما نشاط مضاد للميكروبات قوي ضد السلالات المختبرة و من ناحية أخرى ، أظهرت الزيوت الطيارة قدرة معتدلة في محاصرة الجذور الحرة.

يمكن اعتبار هذه النتائج كنقطة انطلاق لتطبيقات النباتات المزروعة ، ومن المهم مراعاة أن الحصاد العشوائي يمكن أن يشكل خطرا على أنواع النباتات الطبية على المدى الطويل ، ويؤدي إلى انتشارها الطبيعي.

الكلمات المفتاحية: زيوت طيارة ، *Salvia rosmarinus* Shleid ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد

للفطريات ، نشاط مضاد للبكتيريا.

Liste des tableaux

Tableau 1: Les différentes classes de terpénoïdes.....	8
Tableau 2: Généralités sur les souches bactériennes utilisées.	16
Tableau 3: Liste des antibiotiques testés pour les souches bactériennes utilisées.....	17
Tableau 4: Représentation des milieux de culture utilisés. . Erreur ! Signet non défini.	
Tableau 5 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition (Fritz R, 2003).....	21
Tableau 6 : Les antibiotiques choisis et leurs concentrations.....	21
Tableau 7: Les rendements obtenus.	27
Tableau 8:diamètre moyenne en (mm) ± écart type des zones d'inhibitions de la Salvia rosmarinus spontanée et cultivée sur les souches testées. Erreur ! Signet non défini.	
Tableau 9: récapitulatif des valeurs de cmi des hes testées sur les souches pathogènes en g/ml.....	36
Tableau 10: Récapitulatif des valeurs de CMB des HEs testées sur les souches pathogènes en g/ml.....	36
Tableau 11:activité de piégeage des radicaux libres des extraits de la S. rosmarinus..	37

Liste des Figure

Figure 1: Coupe histologiques des tissus sécréteurs specialisés. (a et b) canaux sécréteurs, (c) poches sécrétrices, (d) cellules épidermiques.....	9
Figure 2 : Classification et illustration botanique du romarin.....	14
Figure 3: Carte de la distribution de romarin dans le monde (source : POWO).....	15
Figure 4 : Schéma représente la méthode des aromatoigrammes sur boite de pétri (Bekhechi, Atik-Bekkara, & Abdelouahid, 2008).	20
Figure 5: le flacon d'INT et sa structure chimique.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 6: Schéma représentant la microplaque utilisée.....	23
Figure 7:Photos des témoins négatifs réalisés par la méthode de l'aromatogramme.....	29
Figure 8: Photos des témoins positifs réalisés par la méthode de l'aromatogramme.....	30
Figure 9: Photos montrant l'effet antimicrobien de l'HE de <i>Salvia rosmarinus</i> spontanée	Erreur ! Signet non défini.
Figure 10: Photos montrant l'effet antimicrobien de l'HE de la <i>Salvia rosmarinus</i> cultivé. ...	54
Figure 11: Histogramme comparatif des résultats des deux extraits de la <i>Salvia rosmarinus</i> spontané et cultivé (pure).	31
Figure 12: Histogramme comparatif des résultats des deux extraits de la <i>Salvia rosmarinus</i> spontané et cultivé (diluer 1/2).....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 13: Histogramme comparatif des résultats des deux extraits de la <i>Salvia rosmarinus</i> spontané et cultivé (diluer 1/5).....	Erreur ! Signet non défini.
Figure 14: Les CMI de l'HE de <i>S. rosmarinus</i> spontané vis-à-vis les sept souches microbiennes.	34
Figure 15: Les CMI de l'HE de <i>S. rosmarinus</i> spontané vis-à-vis les sept souches microbiennes.	35
Figure 16: courbe representant la variation du pourcentage d'inhibition pi% en fonction de la concentration en antioxydants standards (vit e).	37

Table des matières

<i>Dédicace</i>	<i>I</i>
<i>Dédicace</i>	<i>II</i>
<i>Remerciement</i>	<i>III</i>
<i>Résumé</i>	<i>IV</i>
<i>Abstract</i>	<i>V</i>
<i>ملخص</i>	<i>VI</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>VII</i>
<i>Liste des Figure</i>	<i>VIII</i>
<i>Table des matières</i>	<i>IX</i>
<i>Abréviations</i>	<i>XII</i>
<i>Introduction</i>	<i>1</i>
<i>Données bibliographiques</i>	<i>3</i>
<i>I. Les plantes médicinales</i>	<i>4</i>
<i>I.1. Les plantes aromatiques</i>	<i>4</i>
I.1.1. Métabolites secondaires.....	<i>4</i>
I.1.1.1. Les huiles essentielles.....	<i>4</i>
I.2. Obtention de l'huile essentielle.....	<i>5</i>
I.2.1. Méthodes d'extraction.....	<i>5</i>
I.2.1.1. Entrainement à la vapeur d'eau.....	<i>5</i>
I.3. Propriété physico-chimique des huile essentielles.....	<i>6</i>
I.4. Composition chimique des huiles essentielles.....	<i>7</i>
I.4.1. Les terpènes.....	<i>7</i>
I.4.2. Composés aromatiques :.....	<i>9</i>
I.4.3. Les composés d'origine diverses.....	<i>9</i>

I.5. Localisation ou réparation des huiles essentielles	9
I.6. La toxicité des huiles essentielles	10
I.7. Activité biologique	10
I.7.1. Activité antimicrobienne.....	10
I.7.2. Activité antioxydante	11
<i>Matériels et Méthodes</i>	13
<i>II.1. Matériels biologiques</i>	14
II.1.1. Matériel végétal.....	14
II.1.1.1. Description botanique.....	14
II.1.1.2. Caractéristique botanique	14
II.1.1.4. Répartition géographique	14
II.1.1.5. Culture de romarin.....	15
II.1.1.6. Collecte de romarin	15
II.2. Les tests préliminaires.....	16
II.2.1. La préparation et l'identification sommaire des souches microbiennes.....	16
II.2.2. La levure	17
II.2.3. Les antibiotiques.....	17
II.3. Méthode expérimentale	17
II.3.1. L'extraction des huiles essentielles	17
<i>II.4. Etude de l'activité antimicrobienne</i>	18
Principe	18
II.4.1. Préparation de la préculture	18
II.4.1.1. Préparation de la suspension microbiennes.....	19
II.4.1.2.1. L'ensemencement.....	19
II.4.1.2.2. Préparation des disques d'aromatogramme.....	19
II.4.1.2.3. Incubation et lecture	20
II.4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne	21

II.4.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	21
II.4.2.2. Sensibilité des souches pour les antibiotiques.....	21
II.4.2.3. Révélation par d'Iodonitrotetrazolum chloride (INT).....	22
II.4.2.4. Evaluation des résultats.....	23
<i>II.5. Etude de l'activité antioxydante.....</i>	<i>23</i>
II.5.1. L'évaluation de l'activité antioxydante.....	24
II.5.1.1. Le principe du test DPPH.....	24
II.5.2. Le protocole expérimental.....	24
II.5.3. Expression des résultats.....	24
<i>Résultats et discussions.....</i>	<i>26</i>
<i>III.1. Activité biologique.....</i>	<i>27</i>
<i>III.1. Résultats de l'étude physico-chimique.....</i>	<i>27</i>
<i>III.1.1. Le rendement.....</i>	<i>27</i>
<i>III.1.2. Evaluation du rendement de l'HE des deux plantes.....</i>	<i>27</i>
<i>III.2. Activité antimicrobienne.....</i>	<i>29</i>
III.2.1. Résultats du témoin positif.....	30
III.2.3. Le pouvoir antimicrobien de la <i>S. rosmarinus</i> spontané et cultivé.....	31
III.2.4. Concentration minimale inhibitrice CMI.....	33
III.2.5. L'étude du pouvoir antioxydant.....	37
<i>Conclusion.....</i>	<i>39</i>
<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>41</i>

Abréviations

- **AMC** : Amoxicilline
- **HE** : L'huile essentiel
- **AFNOR** : Association française de normalisatio
- **ERO** : Espèces réactives de l'oxygène
- **GN** : Gélose nutritif
- **MH** : Muller Hilton
- **SB** : Sabouraud
- **DMSO** : Di-methylsulfoxyde
- **INT** : D'Iodonitrotetrazoluim chloride
- **CMI** : Concentration minimale inhibitrices
- **CMB** : Concentration minimale bactéricides
- **Les AINS** : Anti-inflammatoire non stéroïdien
- **ROS** : Reactive oxygen species
- **ABTS** : 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)
- **FRAP** : Ferric reducing antioxidant power
- **P** : Penicilline
- **DPPH** : 2,2-diphényl-picrylhydrazyl
- **VEE** : mg de vitamine E équivalent
- **I%** : Pourcentage d'inhibition %.
- **S. R. S** : *De S. rosmarinus spontane*
- **S. R. C** : *De S. rosmarinus cultivé*
- **C10** : *C.albicans ATCC 10231*
- **C26** : *C.albicans ATCC 26790*
- **(CHE/CVE)** : rapport de la concentration de l'HE sur la concentration de vitamine E
- **ROS** : Anions superoxydes.

Introduction

Introduction

Depuis toujours, les huiles essentielles, et plus généralement les plantes aromatiques, ont été utilisées quotidiennement par l'Homme pour se parfumer, cuisiner et se soigner. L'histoire de l'aromathérapie a connu quatre périodes principales. Dans les temps les plus anciens, les plantes aromatiques étaient utilisées entières, généralement en infusion ou décoction.

Dans une seconde époque, elles ont été brûlées ou mises à macérer dans des huiles végétales. L'activité est alors attribuée aux substances odorantes. La période qui a suivi est celle de l'extraction de cette substance odorante et de la création de la distillation. La notion d'huile essentielle fait alors son apparition. La quatrième et actuelle période correspond au développement des connaissances sur les huiles essentielles par tous les moyens modernes, que cela concerne leurs propriétés physiques, chimiques ou physiologiques (Rios *et al.*, 1988).

Un grand nombre de plantes médicinales, aromatiques, plantes à épices et autres possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent des applications dans divers domaines à savoir en médecine, en pharmacie, en cosmétologie et dans le domaine de l'agriculture. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, en particulier, la recherche de nouveaux constituants naturels comme alternative thérapeutique.

La *Salvia rosmarinus* Shleid reconnue sous le nom vernaculaire romarin est une plante abondante en Algérie, elle excite à l'état spontané comme être cultivé, elle est utilisée pour l'ornementations. La *Salvia rosmarinus* possède d'excellentes propriétés antioxydant et antimicrobienne (Jones, 1998) comme toutes les plantes aromatique et médicinales, cette plante contient des composés chimiques ayant des propriétés antibactériennes. L'utilisation de ces molécules à base de plante peut présenter de nombreux avantages par rapport aux produits de synthèse actuels. C'est une des plantes médicinales plus intéressantes dans la production et la conservation de la santé.

Le romarin a fait l'objectif de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire. Il possède des propriétés anti inflammatoires et antispasmodiques (Glanmario *et al.*, 2007), et une action sur système nerveux (Yokoya *et al.*, 2007).

L'objectif général de ce travail est d'étudier les activités antibactériennes et antioxydants des huiles essentielles de deux plantes de *S. Rosmarinus*, spontané et cultivé. Pour atteindre cet objectif, les objectifs spécifiques suivants ont été dégagés :

- Evaluer l'activité antimicrobienne de ces huiles essentielles et de leurs fonctions sur les souches microbiennes ;
- Evaluer les propriétés anti oxydantes de ces huiles essentielles ;
- Comparer les pouvoirs biologiques de ces deux huiles essentielles.
-

En vue de rendre compte de la démarche scientifique adoptée, se manuscrit comportera trois parties. Dans une première partie, donnés bibliographiques sera présentée sur les plantes aromatique et médicinales, les huiles essentielles. La deuxième partie de manuscrit présentera le matériels et les méthodes utilisées, notamment l'extractions des huiles essentielles et l'études de leur activité antimicrobiennes, l'évaluation de l'activité antioxydante. Cette deuxième partie suivie par résultats et discussions, puis la conclusion. Les références bibliographique et l'annexe constituent la dernière partie du manuscrit.

Données bibliographiques

I. Les plantes médicinales

Une plante médicinale est une plante qui contient un ou plusieurs principes actifs, capable de prévenir, soulager ou guérir des maladies. Celles inscrites à la pharmacopée sont considérées comme des médicaments. Leur vente est exclusivement réservée aux pharmaciens et aux herboristes, et qui correspond souvent aux plantes aromatiques utilisées dans les préparations culinaires (Genva et Fauconnier, 2021).

Entre 20000 et 25000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une plante ou une molécule active d'origine végétale.

I.1. Les plantes aromatiques

Les plantes aromatiques sont par définition des plantes sauvages en majorité non cultivées, leur culture doit se faire le plus respectueusement possible de la nature ; c-à-d sans engrais, pesticides, fongicides, herbicides ou insecticides. Les plantes sauvages sont préférables pour obtenir une HE de qualité médicale, elles appartiennent essentiellement aux trois familles botaniques suivantes : Astéracées, Lamiacées et Apiacées (Ismaili *et al.*, 2021).

I.1.1. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires c'est les composés chimiques qui sont présent chez toutes les plantes supérieures. Ces métabolites sont responsables des fonctions périphériques indirectement essentielles à la vie des plantes, telles que la communication intercellulaire, la défense et la régulation des cycles catalytiques (Aouina et Sarra, 2019).

De nombreux métabolites secondaires possèdent des propriétés thérapeutiques et on les utilise dans des différents domaines ; parmi ces domaines le domaine pharmaceutique.

Les métabolites secondaires appartiennent à trois familles de composés peuvent être classifiés en différents groupes selon leurs caractéristiques chimiques : les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes (El Kalamouni, 2010).

I.1.1.1. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances aromatiques, parfumées, à la consistance huileuse, produites par le métabolisme des plantes. Elles se forment avec l'aide de l'énergie

solaire qui agit sur les cellules sécrétoires des plantes. La plante retient l'huiles essentielle dans une minuscule cavité glandulaire qui s'ouvre par exemple, lorsque la plante est soumise à la chaleur ou à la lumière intense (Meglouli, 2013).

Selon les standards ISO et AFNOR, d'octobre 1987, une HE est : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétal, après séparation de la phase aqueuse par procédés physiques ; soit par entrainement de la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques de l'épicarpe de *Citrus*, soit par distillation sèche » (Tremblin et Marouf, 2021).

I.2. Obtention de l'huile essentielle

I.2.1. Méthodes d'extraction

Le procédé d'obtention des HES intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique et son rendement. Il existe plusieurs méthodes d'extraction. AFNOR et ISO définissent des méthodes pour extraire les huiles essentielles comme : l'hydrodistillation, l'entrainement à la vapeur d'eau et l'expression à froid (Fellah *et al.*, 2006).

Des techniques plus récentes dites alternatives, plus performantes, pourraient résoudre les inconvénients des anciennes méthodes, comme les fluides subcritiques ou supercritiques, les micro-ondes, les fluides sous pression, etc.

I.2.1.1. Entrainement à la vapeur d'eau

Est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des HE. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contacte directe de l'eau et de la matière végétal à traiter. La vapeur d'eau fournie par une chaudière travers la matière végétale situé au-dessous d'une grille ce qui conduire l'éclatement des cellules et enfin la libération de l'huile essentielle (Fellah *et al.*, 2006).

I.2.1.1.2. Extraction par hydrodistillation :

C'est la méthode la plus simple et la plus ancienne utilisée pour extraire les huiles essentielles. L'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. Le principe correspond à une distillation hétérogène qui met en jeu l'application de deux lois physiques (loi de Dalton et loi de Raoult) (Toure, 2015).

I.2.1.1.3. Hydrodistillation par Clevenger

Le procédé consiste à immerger la matière végétale à traiter dans un ballon lors d'une extraction dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. L'ébullition de l'eau conduit à l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. A la fin de la distillation, deux phases seront observées, une phase aqueuse (l'eau aromatique) et la phase organique (l'huile essentielle), sa densité est inférieure à celle de l'eau (Elyemni *et al.*, 2019).

Les eaux aromatiques ainsi prélevées sont ensuite recyclées afin de maintenir le rapport plante/eau à son niveau initial. L'huile essentielle récupérée et séchée avec le sulfate de sodium (éliminé toutes traces d'eau) (Elyemni *et al.*, 2019).

I.2.1.1.4. Hydro-diffusion

Dans ce cas, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant, le principe de cette technique réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau- huile » dispersé dans la matrice végétale (Meyer-Warnod, 1984).

Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydro-diffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau (Lucchesi, 2005).

I.2.1.1.5. Extraction à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dans l'écorce des fruits comportent des poches sécrétrices d'essence. Ce procédé consiste à broyer à l'aide de presse, le matériel frais pour détruire les poches afin d'en libérer l'essence. Cette technique uniquement mécanique limite l'oxydation car elle conserve les antioxydants naturels contenue dans la fraction non volatile de l'essence. Le produit obtenu porte le nom de l'essence (car il ne subit aucune modification chimique) (Le Roux *et al.*, 2008).

I.3. Propriété physico-chimique des huiles essentielles

- ◆ Elles sont généralement liquides à température ambiante ;
- ◆ Elles sont volatiles et très rarement colorées ;
- ◆ Elles n'ont pas le touché gras et onctueux de l'huile fixée ;
- ◆ Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau ;

- ◆ L'indice de réfraction dépend essentiellement de la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpène donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse ;
- ◆ Elles sont solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé dans la plupart des solvants organique et les liquide, mais peu soluble dans l'eau ;
- ◆ Elles sont douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques ;
- ◆ Les HE sont stables à température ambiante si elles sont conservées de manière adéquate ; à l'abri de l'oxydation et de la polymérisation provoquée par l'air, par la lumière et par les variations de la température.

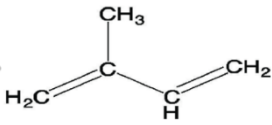
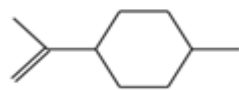
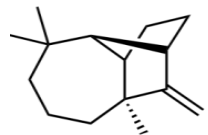
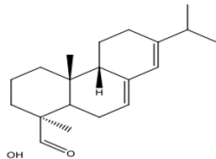
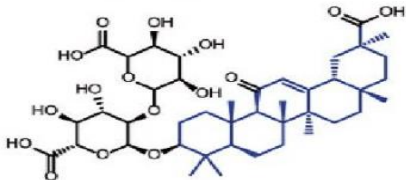

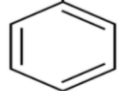
I.4. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes et variables, formées de constituants qui appartiennent à deux groupes de molécules : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane d'autre part (Jean, 2009).

I.4.1. Les terpènes

Sont des dérivés de l'isoprène (2-méthylbutadiènes) ; chaque groupe des terpènes est issu de la condensation d'un nombre d'unités isopréniques (Tableau 1).

TABLEAU 1: Les différentes classes de terpénoïdes.

Squelette carbone	Type de terpénoïdes	Exemple de molécule	Exemple de structure
C5	Hemiterpènes	Isoprène	
C10	Monoterpène	Monocyclique (limonène)	
C15	Sesquiterpènes	Longifolène	
C20	Diterpène	Acide abiétique	
C30	Triterpène	Glycyrrhizine	
C40	Terpènes	β-carotène	
+ C40	Polyterpènes	Caoutchouc	$\left[\left(\text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 \right)_m \text{CH} - \text{CH}_2 \right]_n$ 

I.4.2. Composés aromatiques :

Dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins présents dans la composition de l'HE, ils sont classés selon la nature des fonctions qu'ils portent : acide, ester et aldéhyde (Djeddi, 2011).

I.4.3. Les composés d'origine diverses

Il existe aussi de nombreuses molécules acycliques. Il s'agit de composés volatils issus de la dégradation, de terpènes non volatils (c'est le cas par exemple des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petites molécules odorantes, comme par exemple le (Z)-hex-3-èn-1-ol ou le décanal, qui sont obtenues à partir des acides linoléique et α -linoléinique par des voies enzymatiques)(Meyer-Warnod, 1984).

I.5. Localisation ou répartition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont présentes dans différentes parties des plantes : dans les fleurs ou elles ont un effet sédatif et relaxant ; dans l'écorce, les bois, les résines, les exsudats ou elles ont un effet réchauffant ; dans les racines ou elles développent des propriétés stabilisantes ; dans les fruits ou leurs propriétés nous mettent de bonne humeur, ouvrent l'appétit et nous rendent joyeux.

La synthèse et l'accumulation des HE sont souvent associées à la présence de structures histologiques particulières qui sont généralement localisées sur ou à proximité de la surface du végétal : cellule à l'huile essentielle des Lauracées ou des Zingibéracées, poils sécréteurs des Lamiacées, des poches sécrétrices des Myrtacées ou des Rutacées, canaux sécréteurs des Apiacées ou des Astéracées.

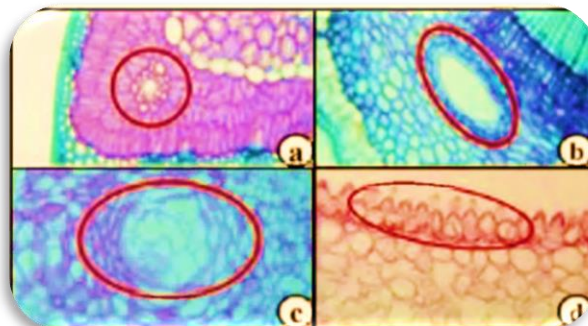


Figure 1: Coupe histologiques des tissus sécréteurs spécialisés. (a et b) canaux sécréteurs, (c) poches sécrétrices, (d) cellules épidermiques.

I.6. La 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 ce soit sans danger pour l'organisme. Cet aspect des huiles essentielles est d'autre 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. Généralement, les huiles essentielles ingérées par voie orale ont une toxicité aiguë faible. Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou carvacrol) ou allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde ou photo toxique huile de citrus contenant des furs coumarine), d'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique (Amiard, 2011).

I.7. Activité biologique

En dépit de leur antécédent d'être considérés comme des métabolites secondaires non essentiels des plantes, il est devenu clair que les huiles essentielles et leurs composants ont des fonctions biologiques spécifiques.

Parmi ces activités biologiques, les huiles essentielles ont montré plusieurs capacités thérapeutiques et médicinales tels que l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti carcinogène, analgésique, antioxydant et antithrombotique (Carson et Hammer, 2011).

I.7.1. Activité antimicrobienne

Le pouvoir antibactérien des huiles essentielles semble être connu empiriquement depuis des siècles. Le spectre d'action des huiles essentielles est très étendu car elles agissent vis-à-vis d'un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances et des multirésistances aux antibiotiques.

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire sauf quelques exceptions (Trombetta *et al.*, 2005).

Les huiles essentielles empêchent le développement des champignons et des moisissures en les détruisant. Ces activités sont néanmoins variables d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche à l'autre (Samir *et al.*, 2019).

I.7.2. Activité antioxydante

Les cellules et tissus humains peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance).

La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dues à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé ; la production de radicaux dérivés de l'oxygène.

Les dommages cellulaires résultants du stress oxydatif et des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ont été impliqués dans le développement de diverses maladies chroniques humaines telles que la maladie de Crohn, les maladies cardiovasculaires, certains cancers et certaines maladies neurodégénératives. Au niveau cellulaire, les cellules soumises à un stress oxydatif peuvent entraîner un dysfonctionnement métabolique grave, notamment une peroxydation lipidique, une oxydation des protéines, une rupture des membranes et des lésions de l'ADN.

La famille des Lamiacées contient des quantités substantielles de composés phénoliques (compris l'acide rosmarinique et l'acide caféïque) qui peuvent protéger les tissus contre les dommages induits par O_2 et donc réduire le risque de maladies chroniques humaines (Erkan *et al.*, 2008).

I.7.2.1. Définition de stress oxydant

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Barouki, 2006). Il semble que la vraie origine d'un stress oxydant ne soit pas la génération d'ERO elle-même, mais le déséquilibre spatiotemporel entre la production d'ERO et leur élimination. L'équilibre peut être rompu lorsque la production est trop importante ou lorsque les systèmes de détoxification sont trop peu présents ou mal localisés (Morel, 2007).

I.7.2.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électron (s) libre (s), non apparié (s) sur leur couche externe. Les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant une à une autre

molécule : ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants (un temps de demi-vie extrêmement court : de nano (10^{-9}) - à la milliseconde) (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Des exemples des radicaux libres dérivés d'oxygène (ROS) sont : anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyle (OH^{\cdot}), peroxyde (RO_2^{\cdot}), alkoxyde (RO^{\cdot}) et hydroperoxyde (HO_2^{\cdot}). L'oxyde nitrique et dioxyde de nitrogène (NO_2^{\cdot}), sont deux types radicalaires dérivés d'azote. Les radicaux libres dérivés d'oxygène et d'azote peuvent être converti en d'autres espèces réactives non-radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), acide hypochloreux ($HOCl$) (Favier, 2003).

Matériels et Méthodes

II.1. Matériels biologiques

II.1.1. Matériel végétal

II.1.1.1. Description botanique

Salvia Rosmarinus Shleid connue sous le nom vernaculaire « romarin » est une plante médicinale de la famille des *Lamiacées*, largement utilisée en médecine traditionnelle (**figure 2**).

II.1.1.2. Caractéristique botanique

Le *Salvia rosmarinus* ou le romarin est un arbrisseau vivement rameux, touffu, toujours vert (feuilles persistantes), xérophyte, très aromatique, de cinquante centimètres à deux mètres de haut. Il possède des tiges ligneuses subarrondies à écorce brun foncé, avec des feuilles sessiles opposées, lancéolées, étroites et entières (d'en moyenne 3 cm sur 3 mm).

Une étude réalisée par Guy saint (2009) a montré que la composition chimique de l'HE varie selon le cultivar tandis qu'elle est constante au sein d'un même cultivar, et dans le deux différentes périodes de récolte (printemps et été) (Leplat, 2017).

II.1.1.3. Classification botanique

Selon (Quezel et Santa, 1963) la classification de romarin est la suivante :

Règne : Plantae

Embranchement : Tracheophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Salvia*

Espèce : *Salvia rosmarinus* Spenn L.



Figure 2 : Classification et illustration botanique du romarin.

II.1.1.4. Répartition géographique

Le romarin pousse spontanément dans le sud de l'Europe mais il est cultivé dans le monde entier (Larousse, 2013) plus particulièrement dans les régions tempérées (figure 3) (Guy Saint ,2009).

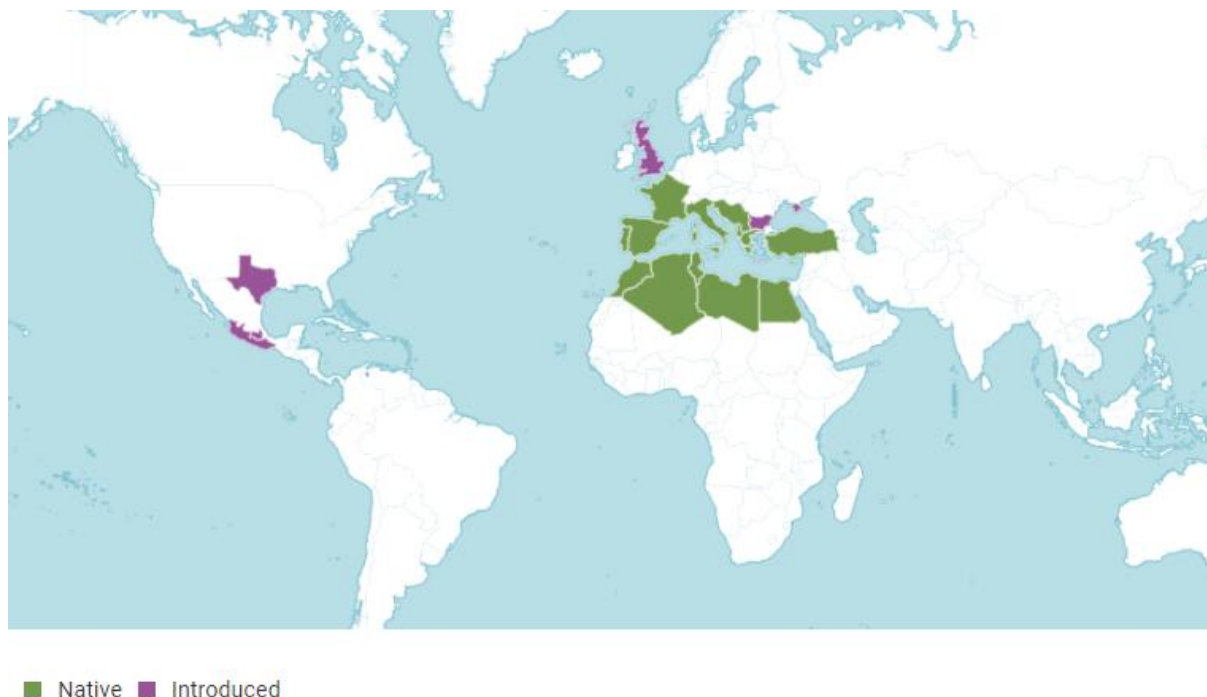


Figure 3: Carte de la distribution de romarin dans le monde (source : POWO).

II.1.1.5. Culture de romarin

Le romarin s'installe sur des sols très dégradés soit par des incendies soit par du surpâturage ; du bord de mer jusqu'à 900 mètres d'altitude aux adrets (sud) et 600-700 mètres aux ubacs (nord) (Park, 2012).

Le romarin peut croître même sur des terrains non adaptés à une exploitation agricole, il a donc peu d'exigences vis-à-vis du sol. Il a une préférence pour des sols argileux ou sablonneux, étant situés dans des endroits secs, chauds (c'est ainsi qu'il produit le plus d'huiles essentielles et qu'il dégage les parfums les plus puissants) (Parragon, 2011), abrités du vent et ensoleillés (Burguera *et al.*, 2005), une terre bien drainée, calcaire et meuble, une exposition plein sud, sont les meilleures conditions pour le romarin en zone non rustique (Moisselin *et al.*, 2002) in (leplat, 2017).

II.1.1.6. Collecte de romarin

L'espèce *S. rosmarinus* a été récoltée par Dr TAHRI Djilali en mois de mars 2021 de deux régions du nord de Laghouat ; Anfous (spontané) et Gueltat Sidi Saad (cultivé). Les parties aériennes de la plante sont ensuite séchées, broyées et conservées à l'abri de la lumière et l'humidité pour des analyses ultérieures.

II.2. Les tests préliminaires

II.2.1. La préparation et l'identification sommaire des souches microbiennes

Les souches microbiennes utilisées dans notre étude ont été choisies pour leurs fréquences élevées dans les contaminations humaines et sont des souches de référence ils sont obtenus de laboratoire de l'hôpital BEN AJJILA.

Ces bactéries font parties de deux groupes des microorganismes, qui sont les microorganismes pathogènes et des microorganismes contaminants. Dans notre travail nous avons retenu les espèces suivantes :

TABLEAU 2: GENERALITES SUR LES SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES.

Souches bactériennes testées	Caractère bactériologique	Habitats	Pouvoir pathogène
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	<ul style="list-style-type: none"> • Les fosses nasales • La gorge • Le tube digestif 	<ul style="list-style-type: none"> • Infection hospitalière. • Responsable des abcès, des plaies, des septicémies, des pneumonies, et de l'intoxication alimentaire.
<i>Echerichia coli</i>	Gram -	<ul style="list-style-type: none"> • Le tube digestif 	<ul style="list-style-type: none"> • Infection mortelle chez l'homme. • Septicémie méningite de nourrisson, de plaie opératoire et gastroentérite. • Douleur abdominale et des diarrhées sanglante.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	<ul style="list-style-type: none"> • Eau et sol humide. • Surface des végétaux. 	<ul style="list-style-type: none"> • Infection nosocomiales (personnes fragilisées ou immunodéprimées). • Infection urinaires, oculaires, et pulmonaires.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram -	<ul style="list-style-type: none"> • Tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. • Eau et le sol de la poussière. 	<ul style="list-style-type: none"> • Infections respiratoires communautaires survenant surtout chez des sujets fragilisées (personnes âgées, diabétiques ou alcooliques). • Infection nosocomiales (infection broncho-pulmonaires, urinaire, bactériémies, infections méningées post-traumatiques ou post-chirurgicale).
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gram -		<ul style="list-style-type: none"> • Infection symptomatique et parfois la mort chez lièvres et les singes. • Provoque une entérite aigue s'accompagnant de fièvre, diarrhées et douleur abdominales avec une prédominance chez les enfants de moins de 10 ans. • La peste.

II.2.2. La levure

Les souches fongiques testées sont les candidas, *Candida albicans* de référence ATCC 10231, et *Candida albicans* de référence ATCC 26790.

II.2.3. Les antibiotiques

Tableau 3: Liste des antibiotiques testés pour les souches bactériennes utilisées.

Antibiotique	CODE
Gentamycine	Gen 10
Amikacine	AK 30
Spiramycine	SR 100
Dextra	DXT 30

II.3. Méthode expérimentale

II.3.1. L'extraction des huiles essentielles

II.3.1.1. Procédés d'extraction

L'extraction des HE a été effectuée par hydrodistillation durant trois heures, à la température de 100 C, des parties aériennes séchées de la plante dans un appareil de type Clevenger. La vapeur de l'eau enrichie des constituants volatils est condensée puis décantée.

Cette opération est suivie par le calcul des rendements effectué selon la norme AFNOR 1986.

II.3.1.2. Détermination du rendement d'extraction

Détermination du rendement d'extraction selon la norme AFNOR (1986), le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse d'HE obtenus après l'extraction (M') et la masse de matière végétale utilisée (M).

Le rendement est exprimé en pourcentage (RHE), il est exprimé par la formule suivante :

$$\text{RHE}\% = M' / M \times 100$$

RHE : Rendement en huile essentiel en %

M': la masse des huiles essentielles en gramme

M : masse de la matière végétale séchée utilisée, en gramme

II.4. Etude de l'activité antimicrobienne

Principe

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme (appelé aussi méthode par diffusion sur milieu gélose ou méthode des disques) (De Billerbeck, 2007).

Cette méthode à l'avantage d'être d'une grande souplesse, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale (Fauchère et Avril, 2002).

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des HE sur un milieu nutritif solide (Pibiri, 2006). Après diffusion et détermination d'un gradient de concentration. Les bactéries ne vont pas croître sur la surface imbibée d'HE, c'est la zone d'inhibition (Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'huile essentielle, et plus il est petit, plus la bactérie est résistante).

II.4.1. Préparation de la préculture

Les tests antimicrobiens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de 18 à 24 heures en phase de croissance exponentielle pour les bactéries. La réactivation des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne dans milieu (MH) et de l'espèce fongique dans un milieu Sabouraud à partir d'un milieu de conservation.

II.4.1.1. Préparation de la suspension microbiennes

A partir des cultures jeunes sur les milieux gélosés (MH) et Sabouraud ; on prélève 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 5 ml d'eau physiologique stérile, on agite au vortex. La standardisation de la suspension microbienne est calibrée à 10^6 UFC, soit une absorbance comprise entre 0,08-0,1 mesuré à l'aide d'un spectromètre à longueur d'onde 517 nm.

II.4.1.2.1. L'ensemencement

Le milieu de culture utilisé est MH et Sabouraud qui sont les milieux les plus employées pour les tests de sensibilités aux agents antimicrobiennes.

- ◆ Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- ◆ L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- ◆ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosé, sèche, de haut en bas, en stries serrés.
- ◆ Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de pétri 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- ◆ Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

II.4.1.2.2. Préparation des disques d'aromatogramme

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de deux extraits de romarin spontané et cultivé, nous avons utilisé la méthode d'aromatogramme, c'est une méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé (figure 4).

- ◆ Les disques sont fabriqués à partir de papier Watman n° 3 1 de 5 mm.
- ◆ Ensuite ils sont mis dans une boîte en verre et stérilisés à l'autoclave.
- ◆ Les huiles essentielles sont diluées dans DMSO à 1/2, 1/5, v/v d'huile dans le DMSO ; ces doses sont établies selon les expériences préliminaires.
- ◆ Une fois les géloses MH et Sabouraud sont ensemencées, les disques disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisés au bec, ensuite imbibées les disques par 10 μ l d'huile essentielle brute et des dilutions de DMSO, à l'aide d'une micropipette.

- ◆ Dans chaque boîte de pétri on applique trois disques pour la même concentration.
- ◆ Les boîtes sont ensuite fermées et laissées diffuser à la température ambiante pendant 30 minutes.

Témoin négatif : Dans une boîte de pétri ensemencé, des disques imprégnés par DMSO ont été appliqués afin de confirmer leur non activité sur les germes.

Témoin positif : Des disques d'antibiotique ont été appliqués dans une boîte de pétri ensemencé et utilisés comme contrôle négatif.

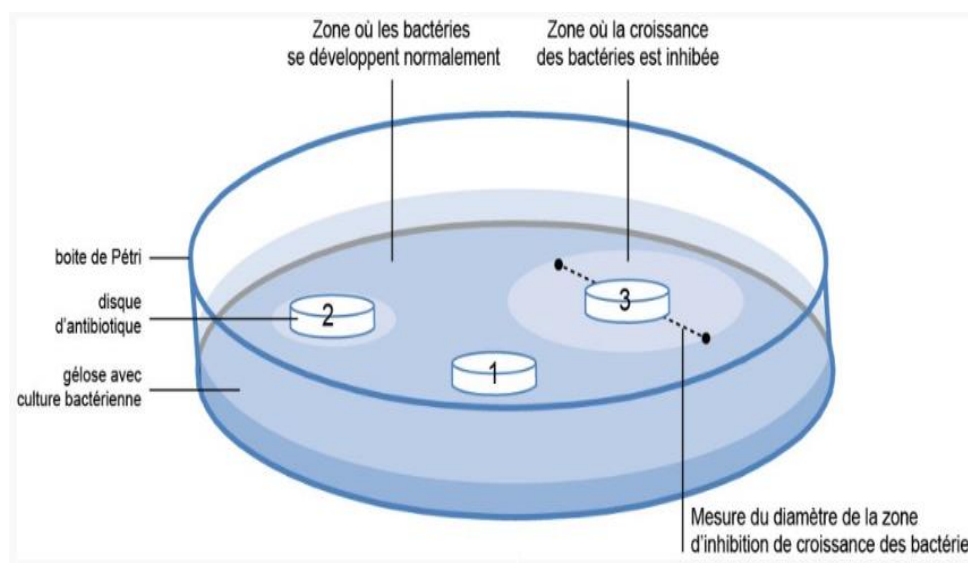


Figure 4 : Schéma représente la méthode des aromagrammes sur boîte de pétri (Bekhechi *et al.*, 2008).

II.4.1.2.3. Incubation et lecture

- ◆ Pendant 18 à 24 heures à 37° C, pour tous les boîtes dans l'étuve.
- ◆ Les résultats sont observés le lendemain des expériences.
- ◆ La lecture se fait par mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque, en mm les résultats sont exprimées par le diamètre de la zone d'inhibition et peuvent être symbolisées par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle ou de dilution de DMSO.

Tableau 4 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition (Fritz R, 2003).

Sensibilité	Zone d'inhibition
Non sensible ou résistante (-)	Diamètre < 6 mm
Sensible (+)	Diamètre compris entre 9 à 14 mm
Très sensible (++)	Diamètre compris entre 15 à 19 mm
Extrêmement sensible (+++)	Diamètre > 20 mm

II.4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles ont été réalisés en suivant la méthode de micro-dilution, en milieu liquide. Afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ainsi que les concentrations minimales bactéricides et fongicides (CMB et CMF), pour les extraits bioactifs (Rios *et al.*, 1988).

II.4.2.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique ou de substance antimicrobienne inhibant toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. La CMI permet de définir la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes aux substances antimicrobiennes (Kablan *et al.*, 2008).

II.4.2.2. Sensibilité des souches pour les antibiotiques

Afin de tester la sensibilité des bactéries pour des antibiotiques, nous avons choisi l'amoxicilline pour (*E. coli*), et la pénicilline pour (SCN), comme le montre le tableau 6.

Tableau 5 : Les antibiotiques choisis et leurs concentrations.

Les antibiotiques	Les concentrations
Amoxicilline (AMC) + Clavnalique	10 mg/ml
Amoxicilline pure (AMC)	10 mg/ml
Pénicilline (P)	10 mg/ml

II.4.2.3. Révélation par d'Iodonitrotétrazolum chloride (INT)

Nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'extraits biologique sur une microplaque a été déterminé à l'aide d'un réactif coloré (INT) (figure 5). Ce dernier agit comme un accepteur des électrons est réduit par des bactéries viables pour produire un produit coloré.

La couleur jaune de tétrazolium est réduite transformer dans les puits ou les microorganismes vivants à une couleur rose/violette. La CMI pour le test de microdilution, est définie comme la concentration d'extrait la plus faible présente une inhibition de la croissance microbienne et empêche le réactif de changer de couleur (Mfengwana et Mashele, 2016).

Le test

La concentration minimale inhibitrice CMI des microorganismes testés a été déterminée en utilisant une microplaque stérile à 96 puits.

Sept séries de six puis contenant initialement 100 μ l de milieu de culture liquide (MH) pour la bactérie et (SB) pour la levure.

100 μ l de HE pure ont été ajoutés au premier puits de chaque série. Une dilution de 2 en 2 d'une rangée à l'autre jusqu'au sixième puits de la 7^{ème} série a été réalisée et les suspensions microbiennes avec une charge de 10^6 UFC/ml sont ensuite ajoutées. Deux puits servant de témoin négatif est ensemencé sans extrait et ce sont les puits 8 et 9 de chaque série qui ont été conservée pour le contrôle négatif. Les rangées C et D et F colonnes de 10 à 12 ont été conservés pour le contrôle positive de l'antibiotique, volume de 100 μ l à concentration croissantes, on a jeté 100 μ l du dernier puit. (Rangé F pour la pénicilline), (rangé C et D pour l'amoxicilline).

Puis l'ensemble est incubé à l'étuve à 37° C pendant 18 heures.

Après 18 heures d'incubation, on ajoute au contenu de chaque puits 40 μ l d'une solution à 0,2 mg/ml de d'Iodonitrotétrazolum chloride (INT) et le tout est à nouveau incubé durant une 30 min les puits colorées en rose violet sont ceux dans lesquels la concentration de composé de synthèse est insuffisante pour inhiber la croissance microbienne (figure 6). La CMI correspond à la concentration du puits non coloré en rose violette dans lequel il y a la plus faible quantité d'HE. La lecture est faite en comparaison avec les puits témoins.

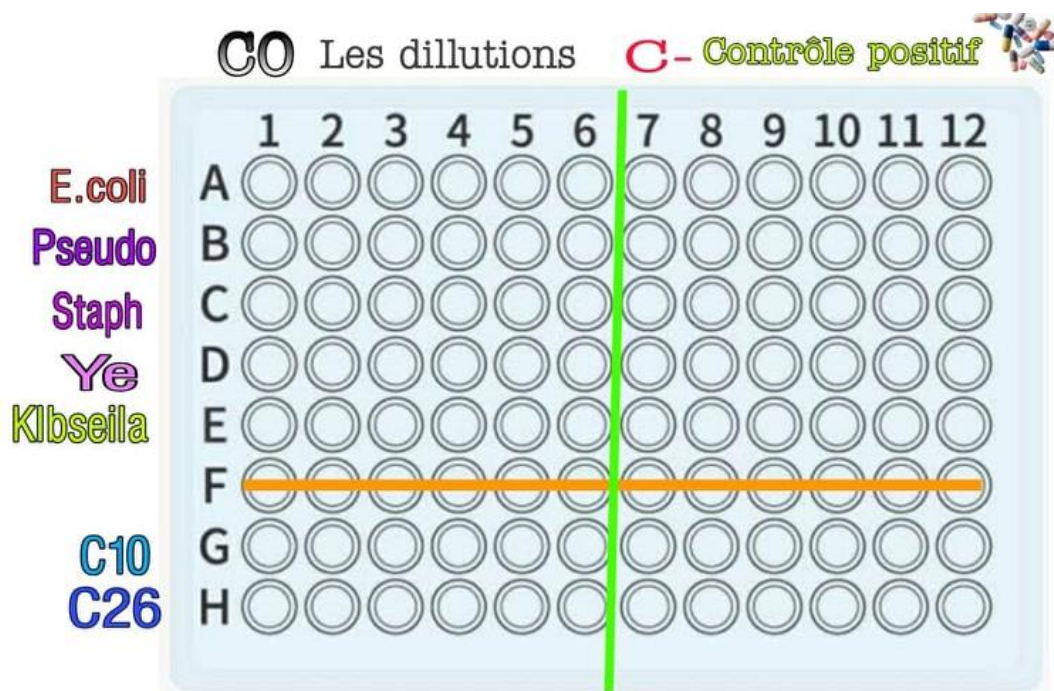


Figure 5: Schéma représentant la microplaque utilisée.

II.4.2.4. Evaluation des résultats

Les résultats sont notés à l'œil nu.

Nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) en ensemençant un échantillon des tubes ne présentant pas de croissance sur le milieu de culture. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est la plus petite concentration de l'échantillon suffisante pour inhiber la croissance d'une souche de bactérie et levure. La concentration la plus faible de l'échantillon à laquelle > 99,99% des bactéries sont tuées après 24 heures d'incubation à 37°C correspond à la CMB.

II.5. Etude de l'activité antioxydante

Certaines classes thérapeutiques telles que les AINS (anti-inflammatoire non stéroïdien), les anti-thyperlipoprotéïnémiques, les β -bloquants et certains médicaments sont connus pour leurs propriétés antioxydante (Grünwald, 2006).

Ainsi les vitamines tel que la vitamine E et C, la vit C contient une forme énediol est régénérée par l'intervention d'enzyme superoxyde dismutase en présence d'une catalase. Le vit E semble devoir fixer le radical hydroxyle avec formation d'une molécule d'ouverture de cycle.

Toujours dans le but de comparer et d'évaluer la fiabilité de l'activité antioxydante de l'huile essentiel de la *S. rosmarinus* spontané et cultivé, nous avons suivi le protocole suivant.

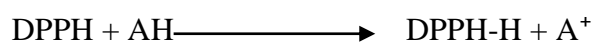
II.5.1. L'évaluation de l'activité antioxydante

Beaucoup de tests sont utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des extraits. La plupart de ces tests sont basés sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans les milieux réactionnels. Les tests les plus fréquemment utilisés sont DPPH, FRAP et ABTS (Saidi, 2019).

II.5.1.1. Le principe du test DPPH

La méthode 2,2-diphényl-picrylhydrazyl (DPPH) est un test standard utilisé pour évaluer les propriétés antioxydantes qui est basé sur la mesure de la capacité des antioxydantes à piéger le radical 2,2-diphényl-picrylhydrazyl (DPPH). Ce dernier est un radical stable soluble dans le méthanol et l'éthanol qui présente une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confère une coloration violette, cette couleur passe de violet au jaune lorsque le DPPH est réduit en diphenylpicrylhydrazine par un capteur de radicaux libres (Rather *et al.*, 2012).

La réaction résumée par l'équation suivante :



II.5.2. Le protocole expérimental

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par la mesure du pouvoir piégeage du radical DPPH (2,2 Dphenyl-picryhydrazyl) la méthode décrite par Burits et Bucar (2015), où 500 μl de chacune des solutions éthanoliques de l'huile essentielle de *S. rosmarinus* spontanée et de l'huile de *S. rosmarinus* cultivé testé à concentration (0,0457 g/ml) de *S. rosmarinus* spontanée et (0,0433 g/ml) de *S. rosmarinus* cultivé mélangé avec 500 μl d'une solution éthanolique de DPPH après une période d'incubation de 30 minute. La gamme de la vitamine E été également analysé à la même concentration pour comparaison.

Un blanc constitué d'éthanol et la solution de DPPH accompagne la lecture de chaque série. La vitamine E est utilisée comme composé étalon et le résultat est exprimé en mg de vitamine E équivalent (mg VEE) par g d'huile. La solution radicalaire de DPPH est préparée fraîchement et les essais sont repris au moins trois fois.

II.5.3. Expression des résultats

L'activité antioxydante est exprimée par le pourcentage d'inhibition de la solution méthanol de DPPH (Saeed *et al.*, 2010) et de la solution éthanolique. D'après DUNG *et al.*,

(2008) et Eyob *et al.*, (2008). Le pourcentage d'inhibition est déterminé en appliquant la formule suivante :

$$I (\%) = 1 - \left(\frac{A}{A_0}\right) \times 100$$

I% : pourcentage d'inhibition %.

A : absorbance de la solution de DPPH en présence de l'huile essentiel ou de la vitamine E.

A₀ : absorbance de la solution de DPPH en absence de l'huile essentiel ou de la vitamine E.

Résultats et discussions

III.1. Activité biologique

III.1. Résultats de l'étude physico-chimique

III.1.1. Le rendement

Le rendement en huile essentielle de l'hydrodistillation par Clevenger est utilisé pour la récupération des huiles essentielles. Ce processus a déjà été largement appliqué pour l'obtention de HE à partir de la partie aérienne de la *Salvia rosmarinus* (Wollinger *et al.*, 2016). Le tableau ci-dessous présente les rendements en HE de la *Salvia rosmarinus* ; spontané et cultivé.

III.1.2. Evaluation du rendement de l'HE des deux plantes

Comparaison des rendements entre les deux plantes de la *Salvia rosmarinus* spontané et cultivé

En faisant la moyenne des rendements de deux plantes de la *S. rosmarinus* spontané et cultivé ont donné des valeurs très voisines, et les rendements sont moyennement riches (tableau 7).

Tableau 6: Les rendements obtenus.

La plante	<i>S. rosmarinus</i> spontané	<i>S. rosmarinus</i> cultivé
Rendement %	1,90	1,80

La plante a donné une huile limpide de couleur jaune clair et d'une odeur aromatique. Le rendement en huile essentielle de *S. rosmarinus* spontanée est très voisine que celui de l'huile essentielle de *S. rosmarinus* cultivé. Par rapport à certains travaux, le rendement en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* étudiée montre quelques différences. Atik Bekkara *et al.*, (2007) ont mentionné les rendements des huiles essentielles des parties aériennes RC et du RS allant de 0,6 % et 0,8 % respectivement. Djeddi *et al.*, (2011) ont évalué une teneur en huiles essentielles de partie aérienne fraîche récoltée au stade de la floraison en mois de mars dans une zone à climat subhumide, 0,82 %. Bousbia *et al.*, (2008) ont montré que le romarin cultivé à donner un rendement variant de $0,33 \pm 0,09$ % à $0,35 \pm 0,07$ % selon la méthode d'extraction. Les rendements du romarin des différentes régions en Algérie. Des études ont montré une différence de rendement en huile essentielle selon la variété de la plante et les caractéristiques écologiques de la zone de récolte

(Zaouali *et al.*, 2010 ; Jamshidi *et al.*, 2009, Ouejda-Sana *et al.*, 2013) ont signalé une différence de rendement selon le phénotype cultivé.

Cela suggère l'influence de différents facteurs tels que l'habitat, le climat, la nature de la plante elle-même sur le rendement en huile essentielle et plus probablement sur sa composition.

III.2. Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles étudiées vis-à-vis 7 souches microbiennes a été réalisée par méthode de l'aromatogramme. Les résultats de cette méthode est exprimé exclusivement à partir de la mesure de diamètres d'inhibition en mm, une mesure qui souvent transcrit dans des différents symboles proportionnels à l'activité (**tableau 5**).

Si les complexes doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en trace, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique. L'attention doit également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant réagit avec certaines composées pour causer la dissociation ou la déshydratation de ces complexes (Yrjoen, 2004).

Pour cela, le DMSO a été testé comme solvant, les résultats montrent qu'il est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes (**figure 7**).

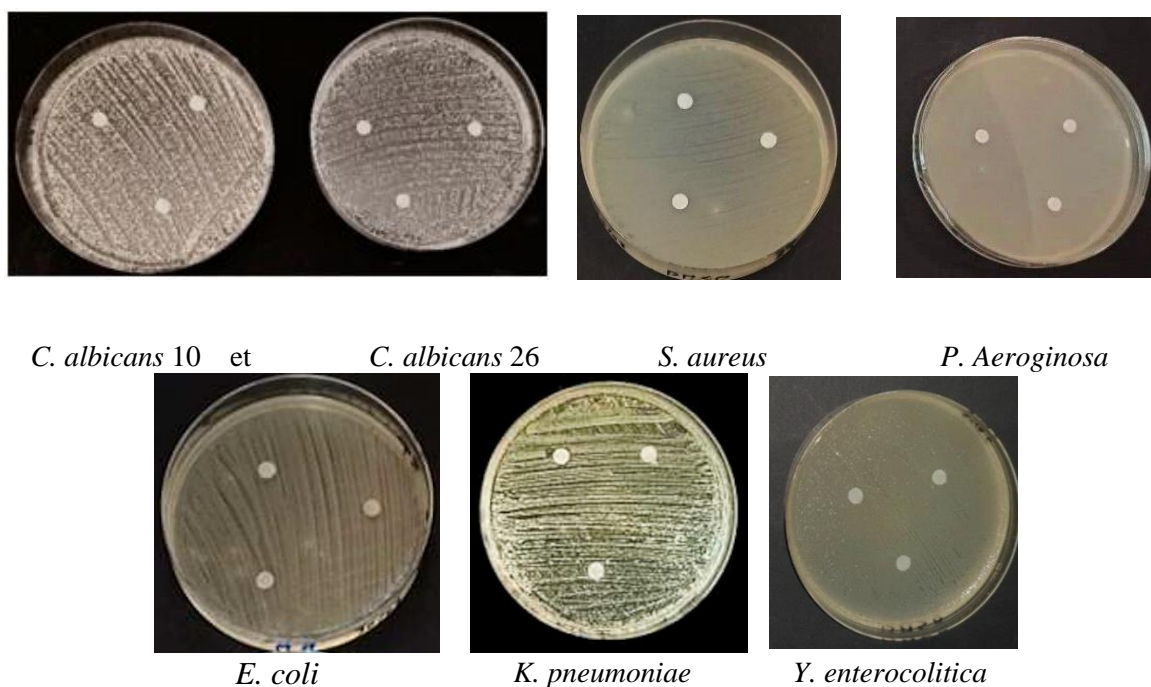


Figure 6:Photos des témoins négatifs.

III.2.1. Résultats du témoin positif

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition des zones d'inhibitions autour des disques. Le choix des antibiotiques est lié à leur fréquence d'utilisations en milieu hospitalier. Les résultats sont illustrés par les photos présentées dans la figure 8.

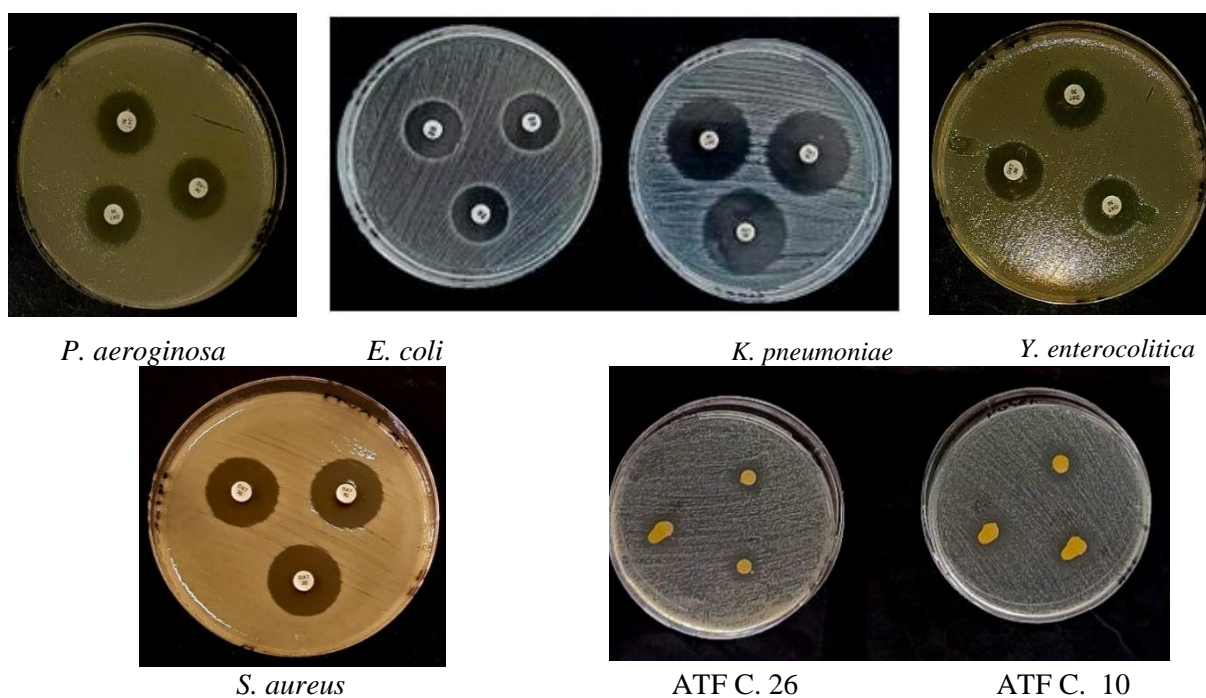


Figure 7: Photos des témoins positifs.

III.2.3. Le pouvoir antimicrobien de la *S. rosmarinus* spontané et cultivé

L'huile essentielle de *S. rosmarinus* spontanée a montré une activité très sensible sur

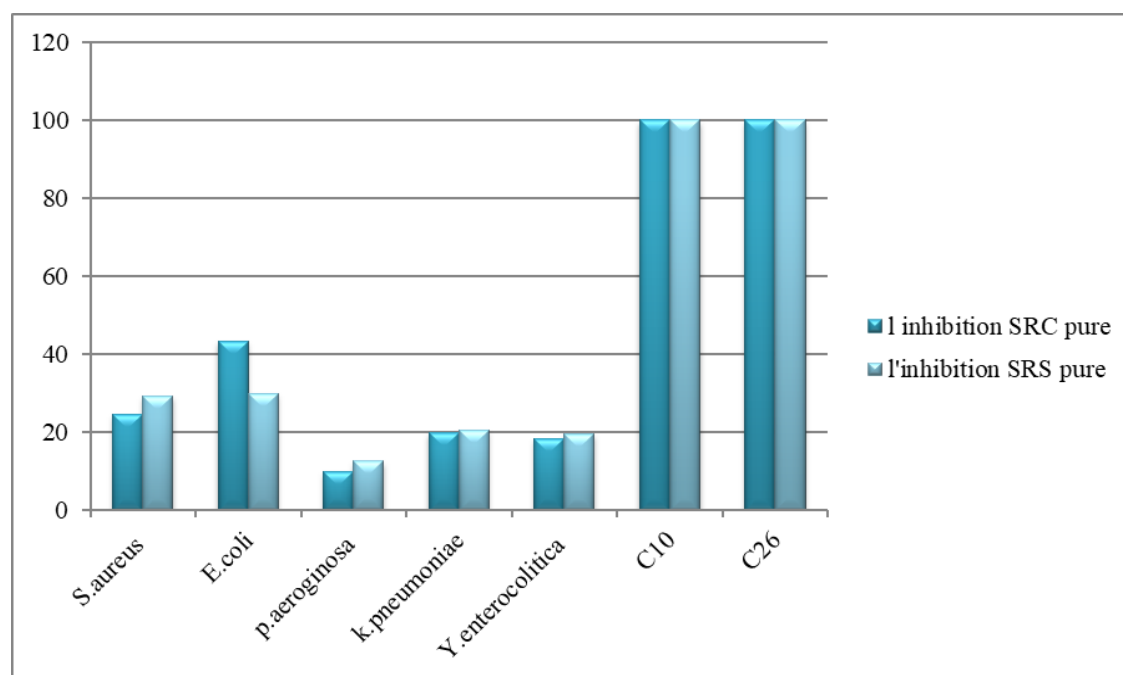


Figure 9: Histogramme comparatif des résultats des deux extraits de la *Salvia rosmarinus* spontané et cultivé (pure).

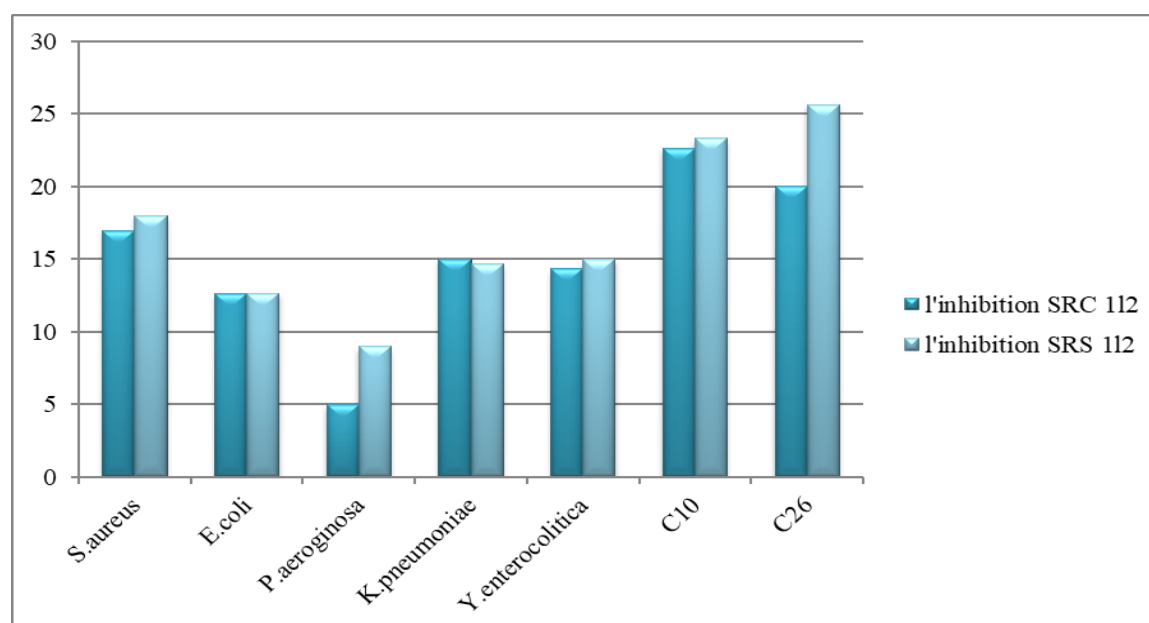


Figure 10: Histogramme comparatif des résultats des deux extraits de la *Salvia rosmarinus* spontané et cultivé (1/2).

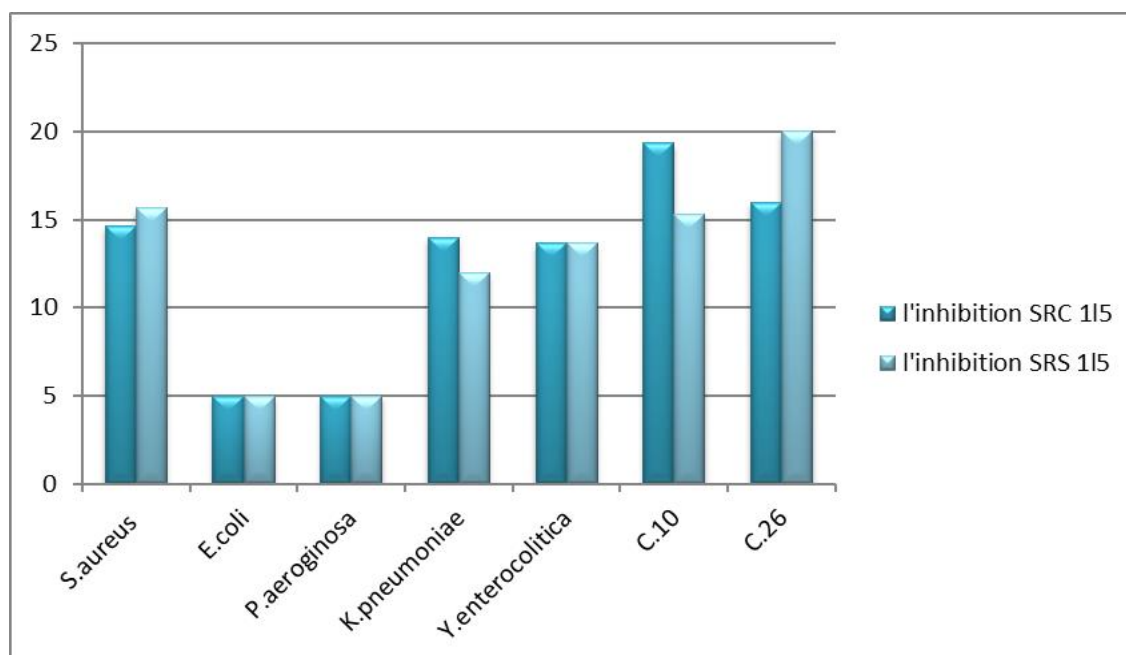


Figure 11: Histogramme comparatif des résultats des deux extraits de la *Salvia rosmarinus* spontané et cultivé (1/5).

Les résultats représentés dans les figures 9 et 10 montrent clairement l'activité inhibitrice des huiles essentielles de la *Salvia rosmarinus* que ce soit spontané ou cultivé. Nous remarquons que les microorganismes étudiés n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis les HEs testées par la méthode de l'aromatogramme. Les souches sont très sensibles (++) , soit extrêmement sensible (+++). En comparant les diamètres des halos d'inhibition des deux HEs de la *S. rosmarinus* spontané et cultivé, nous remarquons qu'il n'y a pas une grande différence, c'est-à-dire les valeurs entre les deux extraits sont très proches. Dans ce cas nous pouvons en conclure que la *S. rosmarinus* spontanée peut raisonnablement se substituer à celle de cultivé.

Ainsi, nous pouvons clairement remarquer que toutes les souches ont une sensibilité aux différentes dilutions des HEs de *S. rosmarinus* spontané et cultivé. En effet des diamètres d'inhibition à l'action des deux huiles spontané et cultivé allant de 100% à 18 mm en fonction des deux dilutions 1/2, 1/5 pour les souches fongiques. Les halos d'inhibitions pour la bactérie *E. coli* atteint 45 mm pour l'huile pure de la plante cultivée et 30 mm de la plante spontanée et 15 à 13 mm pour les souches testées par les huiles dilués à 1/2, 1/5, respectivement. Nous avons observé une sensibilité élevée des bactéries *S. aureus* varie entre 24,66 mm de l'huile pure à 15 mm de l'huile diluée (1/5) de la plante cultivée, et 29,33 mm de l'huile pure et 18 à 15 mm de l'huile diluée (1/2 et 1/5) de la plante spontanée. Tandis que *Klebsella pneumoniae* et *Yersinia enterocolitica* ont des zones d'inhibitions varient entre 20

mm à 15 mm pour les deux huiles des plantes spontanée et cultivée. Sauf *Pseudomonas aeruginosa*, qui apparaitre plus résistante contre les deux huiles. Les HEs non diluées restent les plus efficaces dans l'inhibition de développement bactérienne avec des zones d'inhibition proches ou supérieures à celles de l'antibiotique. Nos résultats rejoignent ceux de (Lograda *et al.*, 2014), ainsi que ceux de Casanova *et al.* (2018) qui ont observé une sensibilité élevée de *S. aureus* à l'HE de romarin.

Dans une étude réalisée par Mouas *et al.*, (2017), il a été observé que les HEs de romarin avaient un large spectre antimicrobien en inhibant la croissance des bactéries pathogènes ainsi que certaines levures et moisissures. Le même auteur a fait une analyse chimique d'huile essentielle de romarin, les composés majeurs identifiés étaient le 1,8-Cineole, α -Pinène et Camphre. Pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de cette HE, les mêmes auteurs l'ont étudié vis-à-vis de cinq microorganismes différents. Les résultats ont indiqué que *S. aureus* et *E. coli* sont trouvés parmi les trois souches bactériennes les plus sensibles à l'action de l'HE de romarin. Selon les mêmes auteurs cette forte activité d'HEs de romarin est liée à la présence d'une quantité importante des composés 1,8-Cineole, α -Pinène et Camphre dans sa composition. Une autre étude menée par Belhamel *et al.*, (2014), concernant les effets inhibiteurs de quelques huiles essentielles parmi lesquelles se trouve le romarin, sur la croissance de quatre bactéries pathogènes qui sont *E. coli*, *S. aureus* et autres souches. Ces résultats sont en accord complet avec les notre et avec ceux de Casanova *et al.*, (2018) qui ont remarqué que *E. coli* était deux fois plus sensible que *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Yersinia enterocolitica* à l'action de l'huile de romarin. L'étude a montré aussi qu'il y a une forte corrélation entre l'efficacité antibactériennes et la concentration en composées phénoliques.

Ksouri *et al.*, (2020), se sont intéressés à l'étude de l'activité antifongiques des HEs de romarin *in vitro*. Les résultats ont montré activité antifongique. L'analyse chimique par CG/SM des HEs de romarin a montré qu'elle est composée principalement du 1,8-Cineole, α -Pinène et Camphre. Selon les mêmes auteurs, les composés majeurs jouent un rôle important dans l'activité antifongique de l'huile essentielle de romarin.

III.2.4. Concentration minimale inhibitrice CMI

Les figures ce dessous représentent les résultats obtenus sur les microplaques des CMI des HEs, chaque rongé correspondant une souche microbienne testée. Sur l'ensemble des dilutions réalisées (10 pour chaque huile).

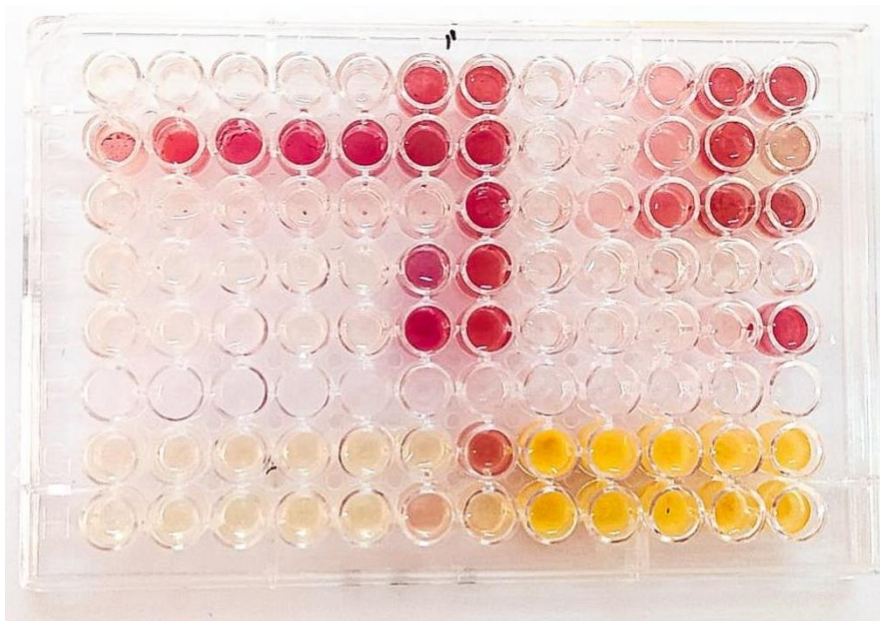
Salvia rosmarinus spontané

Figure 12: détermination des CMI de l'HE de *S. rosmarinus* spontané vis-à-vis les sept souches microbiennes.

La figure 12 montre les résultats de CMI de l'HE de *S. rosmarinus* spontané vis-à-vis des sept souches testées, à savoir : *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* 10231, et *Candida albicans* 26790.

L'HE de *S. rosmarinus* spontané montre un effet inhibiteur très prononcé. Elle est active contre toutes les souches (sauf *Pseudomonas aeruginosa*) dans un intervalle de concentration de 0,013 *g/ml* à 0,11 *g/ml*. Les résultats obtenus montrent que : *S. aureus* et la levure *Candida albicans* 10231 sont les souches les plus sensibles à l'action de cette huile avec une valeur de CMI est de l'ordre 0,013 *g/ml*.

Pour les souches restantes *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* et *Candida albicans* 26790 nous avons enregistré une inhibition de la croissance à partir des concentrations de 0,028 *g/ml*.

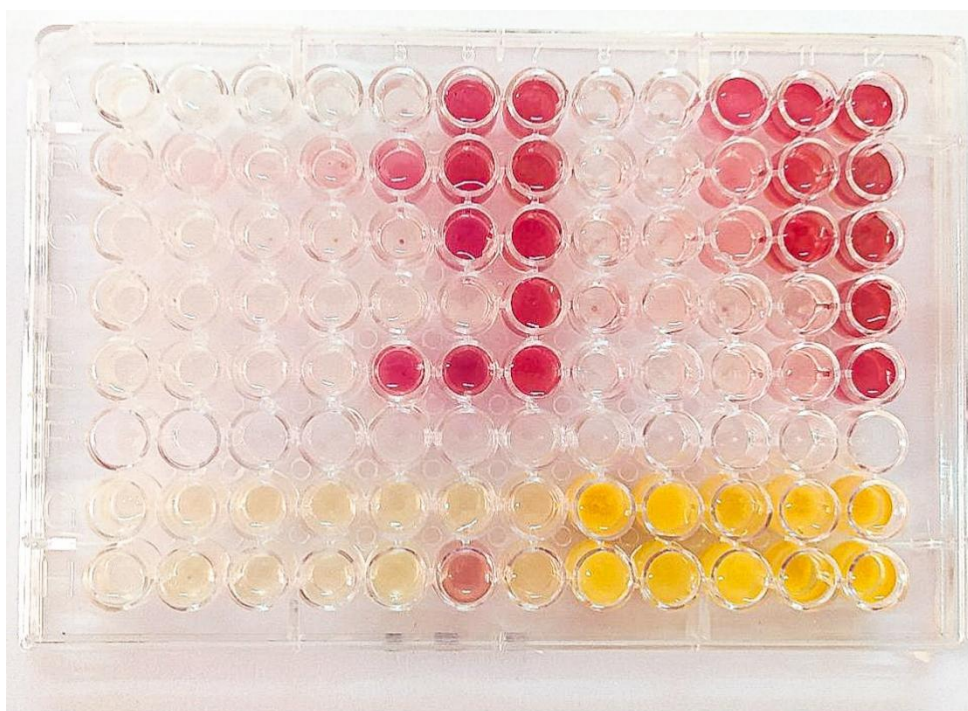
S. rosmarinus cultivé

Figure 13: détermination des CMI de l'HE de *S. rosmarinus* cultivée vis-à-vis les sept souches microbiennes.

A partir de la figure nous pouvons constater que les HEs de la *S. rosmarinus* cultivé exerce une bonne action inhibitrice sur toutes les souches, même sur *Pseudomonas aeruginosa* à partir des concentrations de 0,11 g/ml, qui est résisté l'action de l'huile essentiel de la *S. rosmarinus* spontanée. *Yersinia enterocolitica* et la levure *Candida albicans* 10231 Ces deux souches ont été inhibées par l'huile essentielle de la *S. rosmarinus* cultivé à la concentration de 0,01 g/ml.

Alors qu'*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* et la levure *Candida albicans* 26 se sont montrées sensible aux concentrations de l'HE de *S. rosmarinus* cultivé compris de concentration de 0,03 g/ml. (Tableau 10).

TABLEAU 7: Récapitulatif des valeurs de CMI des HEs testées sur les souches pathogènes en g/ml.

Huile essentielle	Souches microbiennes	CMI (g/ml)
<i>S. rosmarinus</i> spontané	<i>E.coli</i>	0,027
	<i>S.aureus</i>	0,013
	<i>K.pneumoniae</i>	0,027
	<i>Y. enterocolitica</i>	0,027
	<i>C.albicans ATCC 10231</i>	0,013
	<i>C.albicans ATCC 26790</i>	0,013
<i>S. rosmarinus</i> cultivé	<i>E. coli</i>	0,05
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,11
	<i>S. aureus</i>	0,03
	<i>K. pneumoniae</i>	0,03
	<i>Y. enterocolitica</i>	0,01
	<i>C.albicans ATCC 10231</i>	0,01
	<i>C.albicans ATCC 26790</i>	0,03

Après avoir des valeurs des CMI à des basses concentrations, un repiquage se fait pour déterminer la concentration bactéricide des bactéries et fongicides et celle des levures par l'action de l'HE de la *S. rosmarinus* spontané et cultivé. Les résultats représentés dans le (tableau 9).

TABLEAU 8: Récapitulatif des valeurs de CMB des HEs testées sur les souches pathogènes en g/ml.

Huile essentielle	Souches microbiennes	CMB / CMF (g/ml)
<i>S. rosmarinus</i> spontané	<i>E.coli</i>	0,05
	<i>S.aureus</i>	0,11
	<i>K.pneumoniae</i>	0,05
	<i>Y. enterocolitica</i>	0,05
	<i>C.albicans ATCC 10231</i>	0,11
	<i>C.albicans ATCC 26790</i>	0,22
<i>S. rosmarinus</i> cultivé	<i>E. coli</i>	0,22
	<i>S. aureus</i>	0,05
	<i>K. pneumoniae</i>	0,05
	<i>Y. enterocolitica</i>	0,22
	<i>C.albicans ATCC 10231</i>	0,22
	<i>C.albicans ATCC 26790</i>	0,43

Sachant que les valeurs de la CMI et CMB sont inversement proportionnelles au degré d'efficacité des HEs. Les résultats que nous avons obtenus classent nos HE dans le même ordre d'efficacité.

III.2.5. L'étude du pouvoir antioxydant

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres par nos huiles essentielles, par l'utilisation de la méthode au DPPH. Ce radical libre présente une coloration violette, lorsqu'il piégé par des substances antioxydants, la formes réduit confère à la solution une coloration jaune pale (Igwe, 2004).

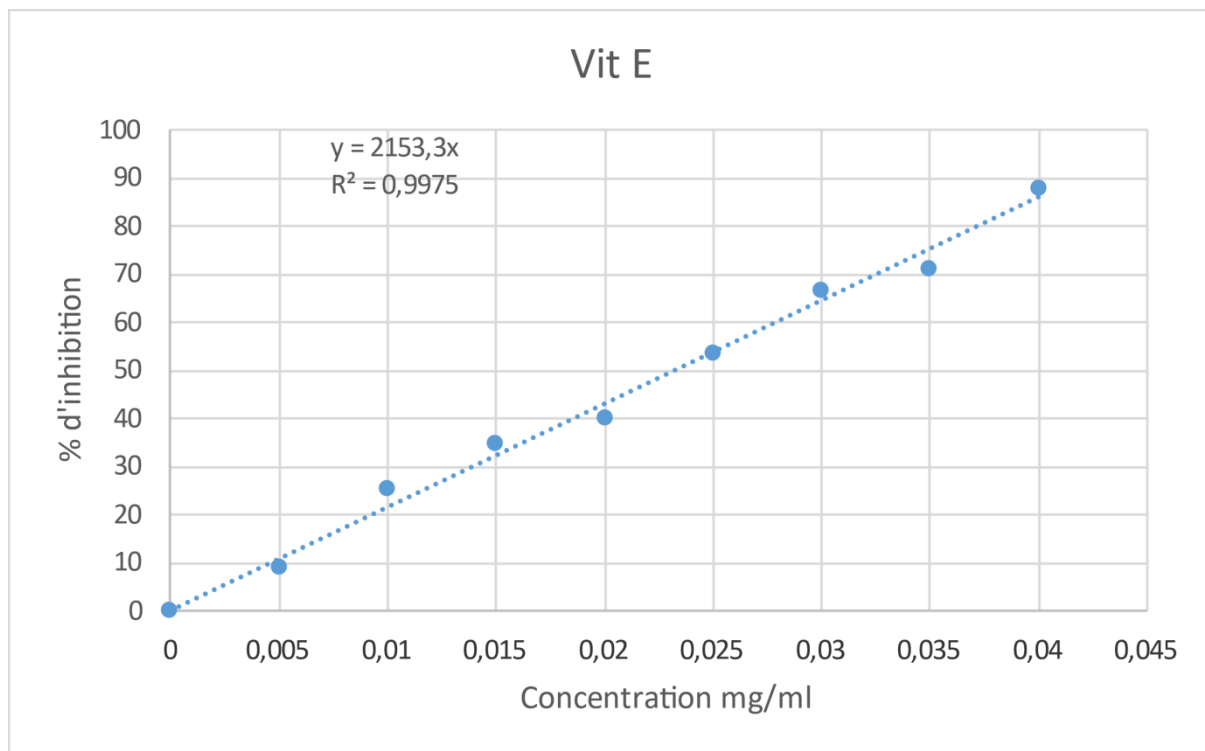


Figure 14: Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition PI% en fonction de la concentration en antioxydants standards (vit E).

Après l'études de l'activité antioxydante des huiles essentielles de la *Salvia rosmarinus* spontanée et celui de cultivé, nous avons déterminé le rapport de (C_{HE}/C_{VE}), définit comme étant la concentration nécessaire du vitamine E qui a le même pourcentage d'inhibition à celle de l'huile et le VEE qui est la quantité de vitamine E en 1 g qui donne l'activité de 1g d'extrait. Les résultats obtenus représenté dans le tableau suivant :

TABLEAU 9: Activité de piégeage des radicaux libres des extraits de la *S. rosmarinus*.

	Rapport (C_{HE}/C_{VE})	VEE g/l
<i>Salvia R</i> spontanée	$1624,29 \pm 3,45$	$0,00061 \pm 1,33 \cdot 10^{-6}$
<i>Salvia R</i> cultivée	$1743,41 \pm 60,95$	$0,00057 \pm 2 \cdot 10^{-5}$

Les valeurs représentent la moyenne \pm Écart type.

Les résultats de l'activité antioxydante de l'HE de la *Salvia rosmarinus* spontanée et cultivée sont représentés dans le (**tableau 11**).

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 11, Les résultats montrent que la vitamine E est 1624,292 fois plus actif que la *Salvia rosmarinus* spontanée, et 1743,414 fois plus actif à celle de la *Salvia rosmarinus* cultivée, et que les valeurs de rapport de (C_{HE}/C_{VE}) de *Salvia rosmarinus* spontanée et cultivée sont très proches.

Pour le VEE, nous avons trouvé une valeur de $0,00061 \pm 1,33.10^{-6}$ g/l, et $0,00057 \pm 2,00066.10^{-5}$ g/l pour *Salvia rosmarinus* spontanée et cultivée respectivement ce qui confirme que les deux huiles, S.R.S et S.R.C ont la même capacité antioxydante.

Nos résultats montrent que la plante cultivée a la même capacité antioxydante avec celle de la plante spontanée d'un part, mais une capacité faible par rapport au vitamine E ou de l'acide ascorbique par exemple.

Contrairement à nos résultats qui ont montré une activité anti-radicalaire modérée des huiles essentielles de *Salvia rosmarinus* spontanée et cultivée, Samah Djeddi et ces collaborateurs (2015), ont révélé une forte activité de piégeage des radicaux libre DPPH Par les huiles de *Thymus numidicus* de la famille de lamiacée, et ça peut être dû aux différents paramètres comme la composition et de région de récolte.

Conclusion

Conclusion

Les nouvelles tendances est la cultivation des plantes Aromatiques et médicinales pour leur propriété thérapeutique, gestion durable de la biodiversité végétale. C'est important d'avoir en considération que la récolte sylvestre peut être un risque pour la maintenance à long terme des espèces objet de récolte, et conduire à une réduction subite de leurs populations naturelles, soit à cause de la récolte en excès, soit par méconnaissance de leurs mécanismes de diffusion. De cette façon, la cultivation est une procédure de grande importance économique et environnementale, qui permet de préserver les ressources naturelles.

Les HEs sont bien connues pour avoir une vaste gamme d'activité biologique, aussi bien qu'elles aient tendance à avoir une basse toxicité pour les mammifères, moins d'effet environnementaux et une large acceptation publique. C'est pour quoi elles formaient la base de beaucoup d'application y compris traités, produits pharmaceutiques, la conservation alimentaires des produits cru et médecine et thérapie naturelle.

Les travaux menés au cours de notre étude auront permis, de mettre en lumière le potentiel antibactérien des deux huiles essentielles de la plante *Salvia rosmarinus* spontanée et cultivée. Les deux extraits sont distinguées par leur activité antimicrobiennes très proche et prononcée sur toutes les souches testées à savoir *E.coli*, *Klebseilla pneumoniae*, *S.aureus*, *Yersinia enterocolitica*, et *Candida albicans 10* et *Candida albicana 26*.

Les résultats constatés montrent que la capacité antioxydante des huiles essentielles testées est faible, comparé à celle des antioxydants synthétiques (vitamine E). D'après nos résultats nous pouvons constatée que nos huiles essentielles sont des agents, plutôt antimicrobiens qu'antioxydants.

D'après ces résultats nous pouvons conclure que la *Salvia rosmarinus* cultivée peut raisonnablement se substituer à celle de la *Salvia rosmarinus* spontanée ce qui permet de préserver les ressources naturelles.

*Références
bibliographiques*

- Amiard, J.-C. (2011).** *Les risques chimiques environnementaux. Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes*: Lavoisier.
- AOUINA, M., & Sarra, L. (2019).** *Biologie des huiles essentielles de la famille des Lamiaceae*. Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila,
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Barouki, R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/sciences*, 22(3), 266-272.
- Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., & Abdelouahid, D. (2008).** Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, 6(3), 153-159.
- Burguera, J. L., Burguera, M., Antón, R. E., Salager, J.-L., Arandia, M. A., Rondón, C., . . . Galignani, M. (2005).** Determination of aluminum by electrothermal atomic absorption spectroscopy in lubricating oils emulsified in a sequential injection analysis system. *Talanta*, 68(2), 179-186.
- Carson, C. F., & Hammer, K. A. (2011).** Chemistry and bioactivity of essential oils. *Lipids Essent Oils Antimicrob Agents*, 25, 203-238.
- De Billerbeck, V.-G. (2007).** Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5(5), 249-253.
- El Kalamouni, C. (2010).** *Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées*.
- Elyemni, M., Louaste, B., Nechad, I., Elkamli, T., Bouia, A., Taleb, M., . . . Eloutassi, N. (2019).** Extraction of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. by two different methods: Hydrodistillation and microwave assisted hydrodistillation. *The Scientific World Journal*, 2019.
- 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*, 110(1), 76-82.
- Fauchère, J.-L., & Avril, J.-L. (2002).** *Bactériologie générale et médicale*: Ellipses.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.

- Fellah, S., Romdhane, M., & Abderraba, M. (2006).** Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*. I cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal-Societe Algerienne De Chimie*, 16(2), 193.
- Genva, M., & Fauconnier, M.-L. (2021).** Les huiles essentielles dans les thérapies contre le cancer.
- Ismaili, R., Lanouari, S., Lamiri, A., & Moustaid, K. (2021).** Étude ethnobotanique de plantes aromatiques et médicinales marocaines. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 34(2), 403-413.
- Jean, B. (2009).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*: Lavoisier.
- Kablan, B., Adiko, M., & Abrogoua, D. (2008).** Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtalmies en Côte d'Ivoire. *Phytothérapie*, 6(5), 282-288.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- Lambert, M. J., Whipple, J. L., Vermeersch, D. A., Smart, D. W., Hawkins, E. J., Nielsen, S. L., & Goates, M. (2002).** Enhancing psychotherapy outcomes via providing feedback on client progress: A replication. *Clinical Psychology & Psychotherapy*, 9(2), 91-103.
- Le Roux, X., Barbault, R., Baudry, J., Burel, F., Doussan, I., Garnier, E., . . . Roger-Estrade, J. (2008).** *Agriculture et biodiversité. Valoriser les synergies*. INRA,
- Leplat, M. (2017).** Le romarin, *Rosmarinus officinalis* L., une Lamiacée médicinale de la garrigue provençale.
- Lucchesi, M.-E. (2005).** *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles*. Université de la Réunion,
- Meyer-Warnod, B. (1984).** Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. *Perfumer & flavorist*, 9(2), 93-104.
- Mfengwana, P.-M.-A. H., & Mashele, S. S. (2016).** Antimicrobial Activity Screening of *Philenoptera violacea* (Klotzsch) schrire and *Xanthocercis zambesiaca* (Baker) Dumaz-Le-Grand.

- Moisselin, J.-M., Schneider, M., & Canellas, C. (2002).** Les changements climatiques en France au XX^e siècle. Etude des longues séries homogénéisées de données de température et de précipitations. *La météorologie*.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007).** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. *Food control*, 18(5), 414-420.
- Park, H.-M., & Park, I.-K. (2012).** Larvicidal activity of Amyris balsamifera, Daucus carota and Pogostemon cablin essential oils and their components against Culex pipiens pallens. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 15(4), 631-634.
- Pibiri, M.-C. (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Retrieved from
- Rather, M. A., Dar, B. A., Dar, M. Y., Wani, B. A., Shah, W. A., Bhat, B. A., . . . Qurishi, M. A. (2012).** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of Juglans regia L. and its constituents. *Phytomedicine*, 19(13), 1185-1190.
- Rios, J.-L., Recio, M. C., & Villar, A. (1988).** Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology*, 23(2-3), 127-149.
- Saeed, S., Rashid, N., Jones, P. G., Ali, M., & Hussain, R. (2010).** Synthesis, characterization and biological evaluation of some thiourea derivatives bearing benzothiazole moiety as potential antimicrobial and anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry*, 45(4), 1323-1331.
- Samir, D., Naouel, A., & Safa, G. (2019).** Assessment of Hematological Parameters, Enzymes Activities, and Oxidative Stress Markers in Salivary and Blood of Algerian Breast Cancer Patients Receiving Chemotherapy. *Journal of Biochemical Technology*, 10(4), 50.
- Toure, D. (2015).** *Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire*. Université Felix Houphoët Boigny, Côte d'Ivoire,

- Tremblin, G., & Marouf, A. (2021).** Chapitre 17 Les plantes aromatiques communes. In *Abrégé de biologie végétale appliquée* (pp. 249-268): EDP Sciences.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., . . . Bisignano, G. (2005).** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2474-2478.
- Wollinger, A., Perrin, E., Chahboun, J., Jeannot, V., Touraud, D., & Kunz, W. (2016).** Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *Comptes Rendus Chimie*, 19(6), 754-765.
- Yokoya, N. S., Necchi, O., Martins, A. P., Gonzalez, S. F., & Plastino, E. M. (2007).** Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 19(3), 197-205.
- Amiard, J.-C. (2011).** *Les risques chimiques environnementaux. Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes*: Lavoisier.
- AOUINA, M., & Sarra, L. (2019).** *Biologie des huiles essentielles de la famille des Lamiaceae*. Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila,
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Barouki, R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/sciences*, 22(3), 266-272.
- Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., & Abdelouahid, D. (2008).** Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, 6(3), 153-159.
- Burguera, J. L., Burguera, M., Antón, R. E., Salager, J.-L., Arandia, M. A., Rondón, C., . . . Galignani, M. (2005).** Determination of aluminum by electrothermal atomic absorption spectroscopy in lubricating oils emulsified in a sequential injection analysis system. *Talanta*, 68(2), 179-186.
- Carson, C. F., & Hammer, K. A. (2011).** Chemistry and bioactivity of essential oils. *Lipids Essent Oils Antimicrob Agents*, 25, 203-238.
- De Billerbeck, V.-G. (2007).** Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5(5), 249-253.

- El Kalamouni, C. (2010).** *Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées.*
- Elyemni, M., Louaste, B., Nechad, I., Elkamli, T., Bouia, A., Taleb, M., . . . Eloutassi, N. (2019).** Extraction of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. by two different methods: Hydrodistillation and microwave assisted hydrodistillation. *The Scientific World Journal*, 2019.
- 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*, 110(1), 76-82.
- Fauchère, J.-L., & Avril, J.-L. (2002).** *Bactériologie générale et médicale*: Ellipses.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108(10), 863-832.
- Fellah, S., Romdhane, M., & Abderraba, M. (2006).** Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*. I cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal-Societe Algerienne De Chimie*, 16(2), 193.
- Genva, M., & Fauconnier, M.-L. (2021).** Les huiles essentielles dans les thérapies contre le cancer.
- Ismaili, R., Lanouari, S., Lamiri, A., & Moustaid, K. (2021).** Étude ethnobotanique de plantes aromatiques et médicinales marocaines. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 34(2), 403-413.
- Jean, B. (2009).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*: Lavoisier.
- Kablan, B., Adiko, M., & Abrogoua, D. (2008). Évaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtalmies en Côte d'Ivoire. *Phytothérapie*, 6(5), 282-288.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- Le Roux, X., Barbault, R., Baudry, J., Burel, F., Doussan, I., Garnier, E., . . . Roger-Estrade, J. (2008).** *Agriculture et biodiversité. Valoriser les synergies*. INRA,
- Leplat, M. (2017).** Le romarin, *Rosmarinus officinalis* L., une Lamiacée médicinale de la garrigue provençale.

- Lucchesi, M.-E. (2005).** *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles.* Université de la Réunion,
- Meyer-Warnod, B. (1984).** Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. *Perfumer & flavorist*, 9(2), 93-104.
- Mfengwana, P.-M.-A. H., & Mashele, S. S. (2016).** Antimicrobial Activity Screening of *Philenoptera violacea* (Klotzsch) schrire and *Xanthocercis zambesiaca* (Baker) Dumaz-Le-Grand.
- Moisselin, J.-M., Schneider, M., & Canellas, C. (2002).** Les changements climatiques en France au XX^e siècle. Etude des longues séries homogénéisées de données de température et de précipitations. *La météorologie*.
- Park, H.-M., & Park, I.-K. (2012).** Larvicidal activity of *Amyris balsamifera*, *Daucus carota* and *Pogostemon cablin* essential oils and their components against *Culex pipiens pallens*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 15(4), 631-634.
- Pibiri, M.-C. (2006).** *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles.* Retrieved from
- Rather, M. A., Dar, B. A., Dar, M. Y., Wani, B. A., Shah, W. A., Bhat, B. A., . . . Qurishi, M. A. (2012).** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. *Phytomedicine*, 19(13), 1185-1190.
- Rios, J.-L., Recio, M. C., & Villar, A. (1988).** Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology*, 23(2-3), 127-149.
- Samir, D., Naouel, A., & Safa, G. (2019).** Assessment of Hematological Parameters, Enzymes Activities, and Oxidative Stress Markers in Salivary and Blood of Algerian Breast Cancer Patients Receiving Chemotherapy. *Journal of Biochemical Technology*, 10(4), 50.
- Toure, D. (2015).** *Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire.* Université Felix Houphoet Boigny, Côte d'Ivoire,
- Tremblin, G., & Marouf, A. (2021).** Chapitre 17 Les plantes aromatiques communes. In *Abrégé de biologie végétale appliquée* (pp. 249-268): EDP Sciences.

- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., . . . Bisignano, G. (2005).** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2474-2478.
- Wollinger, A., Perrin, E., Chahboun, J., Jeannot, V., Touraud, D., & Kunz, W. (2016).** Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *Comptes Rendus Chimie*, 19(6), 754-765.
- Yokoya, N. S., Necchi, O., Martins, A. P., Gonzalez, S. F., & Plastino, E. M. (2007).** Growth responses and photosynthetic characteristics of wild and phycoerythrin-deficient strains of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 19(3), 197-205.

Annexe

Annexes

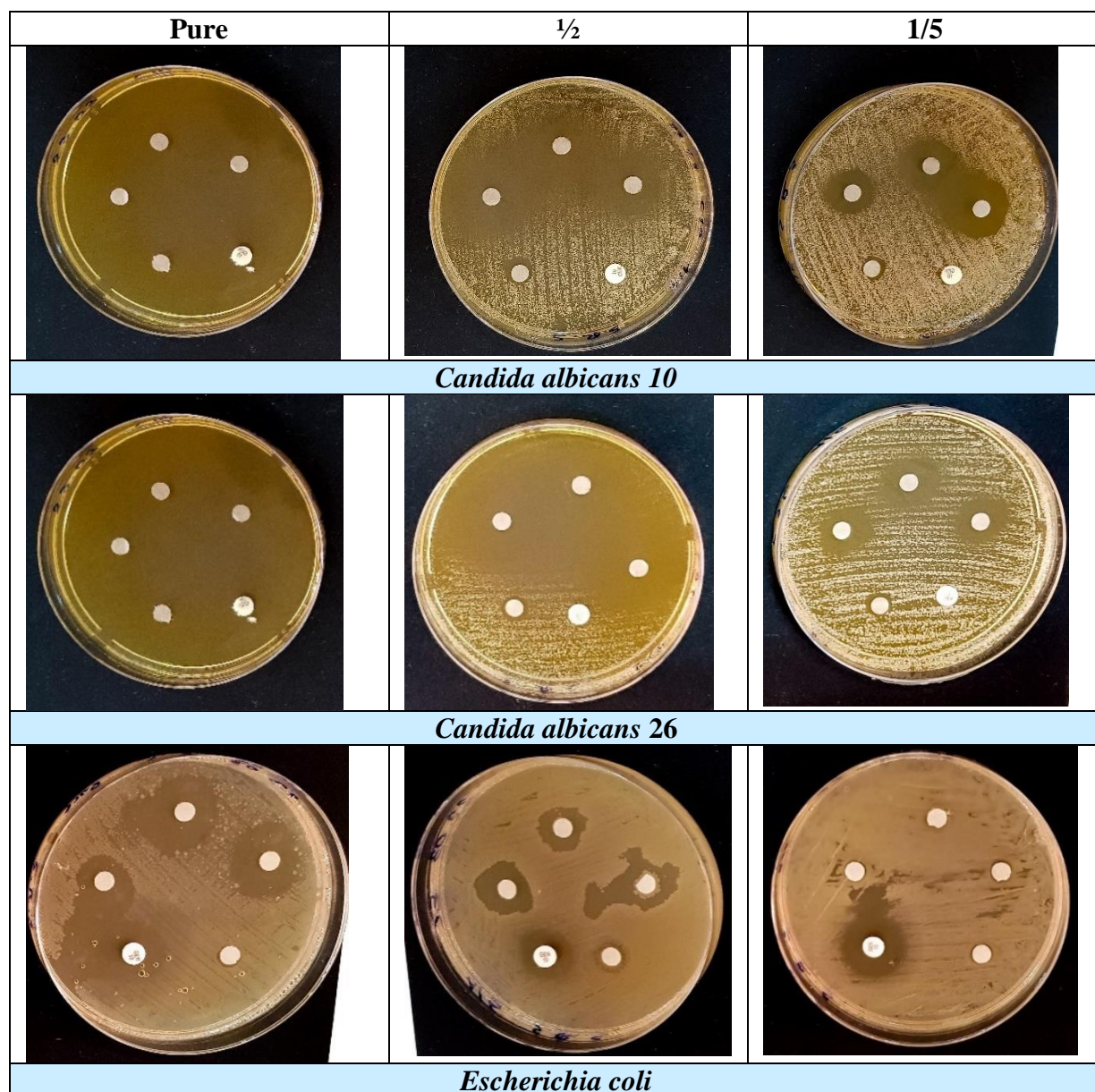
Annexes 1 : Préparation des milieux de cultures

Tableau 1 : Représentation des milieux de culture utilisés.

Milieu de culture	Propriété	Préparation
Mueller Hinton	Solide	38 g (MH) + 1 litre eau distillée
Sabouraud	Solide	65 g (SB) + 1 litre eau distillée
Bouillon Mueller Hinton	Liquide	21 g (MHB) + 1 litre d'eau distillée
Bouillon Sabouraud	Liquide	28 g (SBB) + 1 litre d'eau distillée

Annexe 2 : Tests avec l'huile essentielle de la *Salvia rosmarinus* spontané et cultivé

La figure 1 et 2 : représentent les photos des zones d'inhibition par la méthode de l'aromatogramme, respectivement :



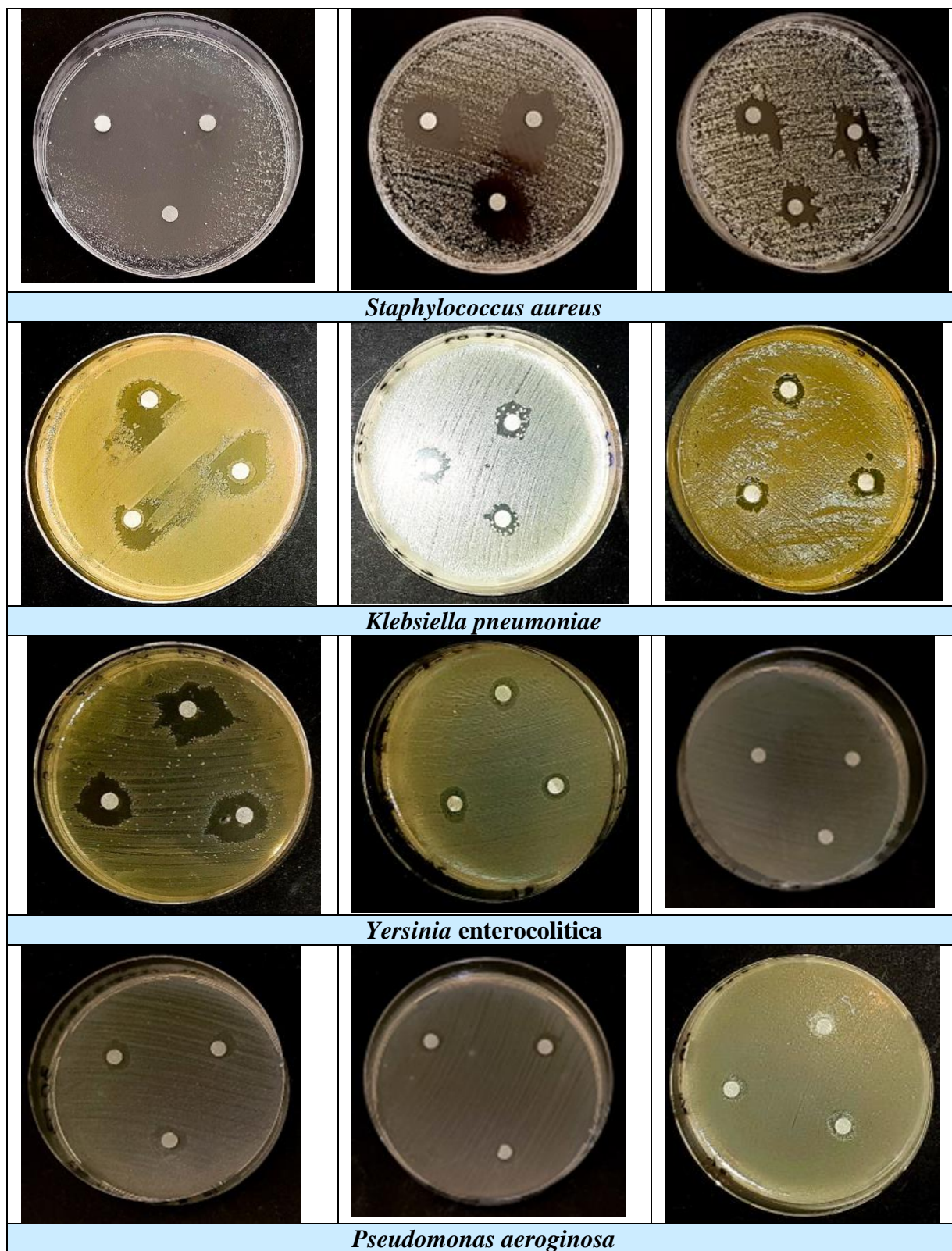
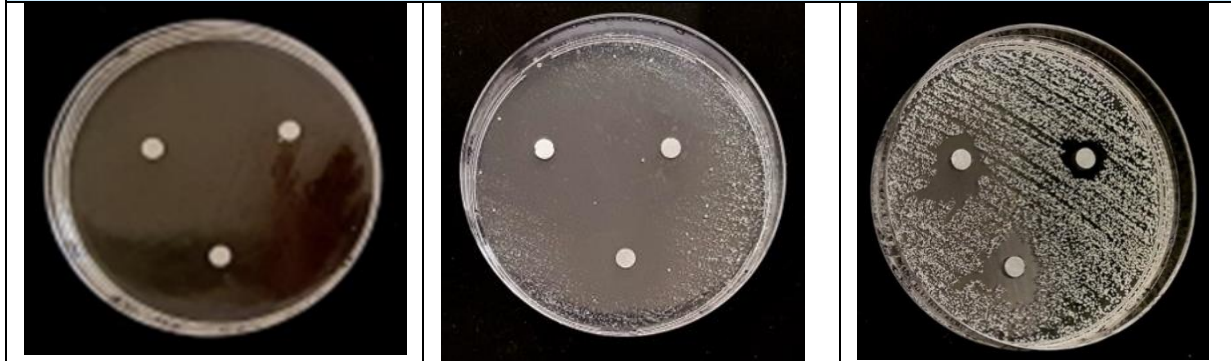


Figure 1 : Photos montrant l'effet antimicrobien de l'HE de la *Salvia rosmarinus* spontané.

Pure	1/2	1/5
------	-----	-----



Candida albicans 10



Candida albicans 26



Escherichia coli



Staphylococcus aureus

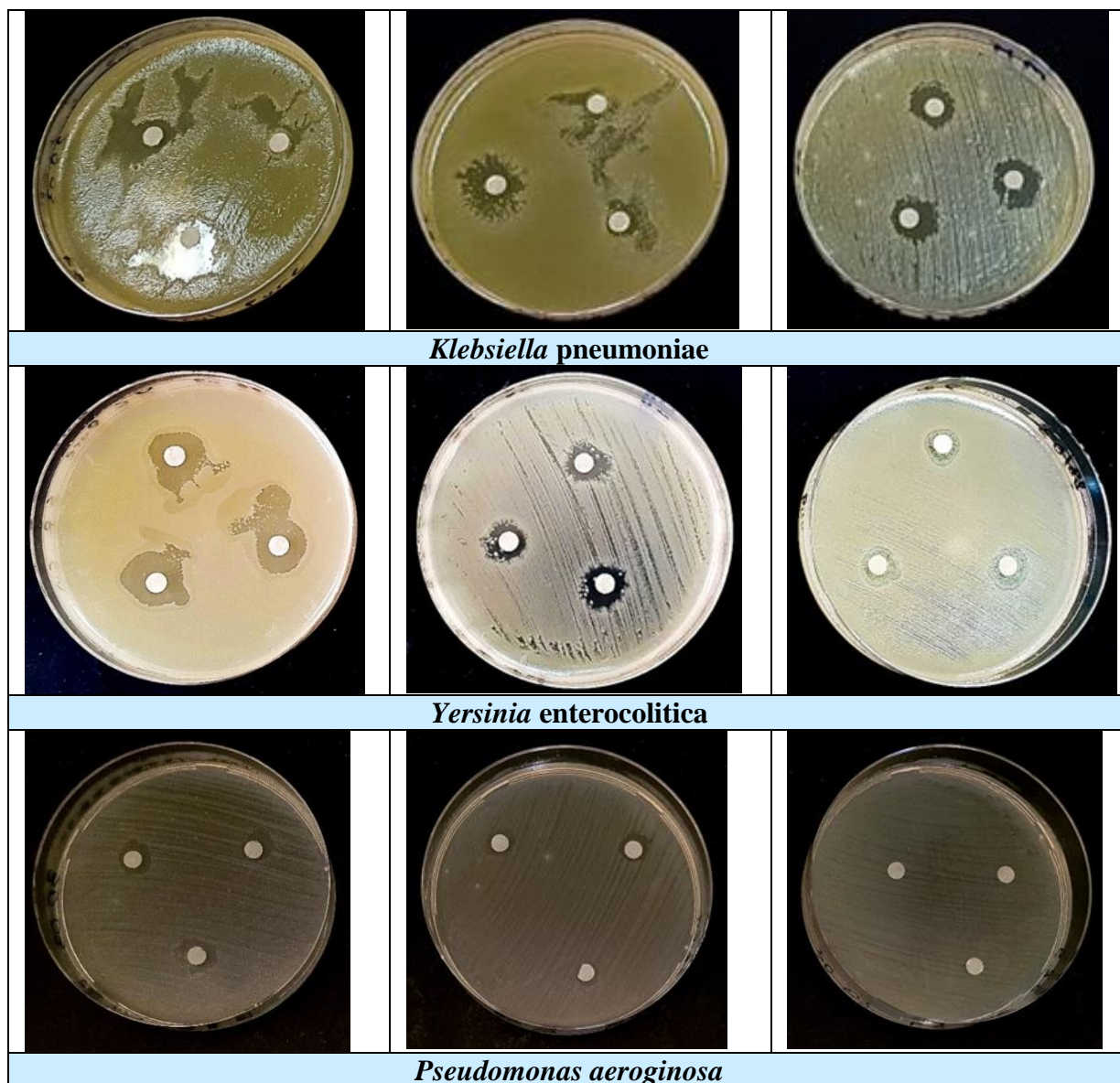


Figure 2 : Photos montrant l'effet antimicrobien de l'HE de la *Salvia rosmarinus* cultivé.

Annexe 3 : diamètre moyenne en (mm) ± écart type des zones d'inhibitions de la *Salvia rosmarinus* spontanée et cultivée sur les souches testées.

Extraits	Diamètres de la zone d'inhibition en (mm)						
	S. R. S			S. R. C			
Souches	C ₀	C _{1/2}	C _{1/5}	C ₀	C _{1/2}	C _{1/5}	
Bactéries	<i>E. coli</i>	30,66 ± 0,57	12,66 ± 3,05	5 ± 00	43,33 ± 2,88	12,66 ± 0,57	5 ± 00
	<i>P. aeruginosa</i>	12,66 ± 2,51	9 ± 1	5 ± 00	10 ± 00	5 ± 00	5 ± 00
	<i>Y. enterocolitica</i>	19,66 ± 2,51	15 ± 1,73	13,66 ± 1,52	18,33 ± 1,53	14,33 ± 1,55	13,66 ± 0,57
	<i>K. pneumoniae</i>	20,66 ± 4,04	14,66 ± 1,15	12 ± 0	20 ± 0	15 ± 2	14 ± 1
	<i>S. aureus</i>	29,33 ± 2,88	18 ± 2	15,66 ± 0,57	24,66 ± 6,5	17 ± 1,73	14,66 ± 0,57
	Levures	<i>C. albicans 10</i>	100 ± 00	11 ± 2,88	15,33 ± 0,57	100 ± 00	11 ± 4,04
<i>C. albicans 26</i>		100 ± 00	25,66 ± 5,03	20 ± 2	100 ± 00	20 ± 2	16 ± 1

