

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie et de Microbiologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Plantes

Sujet

Etude phytochimique et activités biologiques
d'une plante médicinale du bassin méditerranéen
le romarin « *Rosmarinus officinalis L* »

Présenté par : Mlle BEDDEK MAHDJOUBA
Mlle HEDJAR LAMIA

Devant le jury :

Présidente : Mme HELLAL Z.	M.A.A	U.M.M.T.O
Promotrice : Mme BEMMANSOUR N.	M.C.A	U.M.M.T.O
Examinatrice 1: Mme IRATNI-AICHE G.	M.C.B	U.M.M.T.O
Examinatrice 2: Mme TALEB-TOUDERT K.	M.C.B	U.M.M.T.O

Promotion : 2017/ 2018

Remerciements

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

Nous remercions tout particulièrement notre promotrice, Mme BEMMANSOUR . Pour l'honneur qu'elle nous a fait en nous encadrant, pour l'aide précieuse qu'elle nous a apporté, pour ses remarques et ses conseils avisés, qui nous ont permis de mener à bien ce travail.

Nous tenons à remercier aussi Mme HELLAH. D'avoir accepté de présider ce jury et d'apporter ses appréciations sur notre travail.

Nous remercions également Mme IRATNI pour l'intérêt qu'elle a porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par ses propositions.

A toute personne ayant participé de près ou de loin à notre formation et à tous ceux qui nous ont apportés leurs soutiens et encouragements durant la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*Avec ma gratitude et tout mon amour, je dédie ce travail :
Aux deux être les plus chers au monde qui ont donné sens à mon
existence, en m'offrant une éducation digne de confiance qui
m'ont soutenu nuit et jours durant tout mon parcours.*

*J'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce
sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille.*

A toutes mes amies

Lamia.H

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

*A mes parents .Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de
l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure
bonne santé et longue vie.*

A toute ma famille, et mes amis.

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet
soit possible, je vous dis merci.*

Mahdjouba.B

Liste des abréviations

- : coefficient d'absorption molaire.
- AG** : acide gallique.
- CI50** : concentration inhibitrice 50.
- CMI** : concentration minimale inhibitrice.
- DMSO** : diméthylsulfoxyde.
- DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
- E** : équivalent.
- EAM** : extraction assistée par macération.
- Ex** : extraits.
- K₃Fe(CN)₆** : ferricyanure de potassium.
- MeOH** : méthanol.
- MH** : Mueller Hinton.
- MVS** : matière végétale sèche.

Liste des figures

Figure 1: Morphologie générale du Romarin	04
Figure 2 : Rameau feuillé à fleurs Romarin.....	05
Figure 3 : Tige principale et rameau feuille a fleurs du romarin.....	05
Figure 4: Acide benzoïque.....	10
Figure 5: Acide cinnamique.....	11
Figure 6: Structure chimique des deux flavonoïdes.....	12
Figure 7: Exemples de structure de Tannin hydrolysable.....	14
Figure 8: Exemple de structure de Tannins condensés.....	14
Figure 9 : Structure d'une molécule de coumarine.....	15
Figure 10: Structure chimique de stilbène.....	16
Figure 11: Matériel végétal récolté a bastos UMMTO.....	22
Figure 12 : Préparation des échantillons.....	24
Figure 13 : Protocole de préparation d'extrait méthanolique des polyphénols totaux par macération.....	27
Figure 14 : extraction des flavonoïdes	29
Figure 15 : Schéma sur la réaction de test FRAP.....	37
Figure 16 : Réduction du fer ferrique en fer ferreux.....	38
Figure 17 : Structure chimique du radical libre DPPH.....	38
Figure 18 : Réaction de test DPPH.....	39
Figure 19: Droite d'étalonnage d'acide gallique.....	42
Figure 20 : Histogramme montrant la teneur des trois classes des flavonoïdes.....	44

Figure 21: Les zones d'inhibitions de la gentamicine et des différents extraits du romarin obtenus sur la souche bactérienne <i>E. coli</i> testée.....	45
Figure 22: Les zones d'inhibitions de la gentamicine et des différents extraits du romarin obtenus sur la souche bactérienne <i>S.aureus</i> testée.....	45
Figure 23 : Le pouvoir antibactérien des extraits sur <i>E.coli</i>	46
Figure 24 : Le pouvoir antibactérien des extraits sur <i>S. aureus</i>	46
Figure 25: résultats de la CMI en milieu liquide.....	48
Figure 26: % d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations de l'acide ascorbique.....	50
Figure 27: % d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations des polyphénols totaux.....	51
Figure 28: % d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations des Anthocyanes.....	51
Figure 29: % d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations des C-glycosides.....	51
Figure 30: % d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations des Aglycones...	52
Figure 31: Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices 50 des extraits en mg/mL.....	5
3	
Figure 32 : Pouvoir réducteur d'acide ascorbique.....	56
Figure 33: Pouvoir réducteur des différents extraits.....	56

Liste des tableaux

Tableau I: Les principaux composés phénoliques.....	10
Tableau II : Classification des souches bactériennes testées.....	23
Tableau III : Tableau illustrant les dilutions d'extraits pour la détermination des CMI.....	36
Tableau IV : Résultats des tests phytochimiques de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	40
Tableau V: Variation de la DO en fonction des concentrations de l'acide gallique.....	42
Tableau VI: Teneur des polyphénols totaux d'extrait méthanolique des feuilles.....	42
Tableau VII: Les résultats des dosages et les teneurs des trois classes des flavonoïdes.....	43
Tableau VIII : Valeurs de la CMI des deux extraits (exprimés en mg/ml).....	48
Tableau IX : Valeurs des IC50 trouvées pour les extraits de notre plante.....	53

Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale01

Partie I : synthèse bibliographique

I-1-Les plantes aromatiques.....02

I-2- Les plantes médicinales.....02

I-3-La famille des lamiacées (labiées).....02

I-4- Présentation de la plante étudiée : Le romarin « *Rosmarinus Officinalis* L. ».....03

I-4-1-Historique.....03

I-4-2-Etymologie.....03

I-4-3-Origine et définition.....03

I-4-4-Classification botanique.....04

I-4-5-Habitat et description botanique.....05

I-4-6- Propriétés pharmacologique et thérapeutique du romarin.....06

I-4-6-1-Propriétés thérapeutiques.....06

I-4-6-2-Données pharmacologiques06

I-4-7-Les principaux constituants.....07

I-4-8-Toxicologie.....07

II- Les métabolites secondaires chez les plantes

II-1- Introduction.....08

II-2- Métabolisme secondaire.....08

II-3-Définition.....09

II-4- Principales classes des métabolites secondaires.....09

II-4-1- Les composés phénoliques.....09

II-4-1-1-Définition.....09

II-4-1-2- Classification.....10

II-4-1-2-1- Polyphénols monomériques.....	10
II-4-1-2-1-1- Acides phénoliques.....	10
II-4-1-2-1-2- Flavonoïdes.....	11
II-4-1-2-2- Polyphénols sous forme de polymères.....	13
II-4-1-2-2-1-Tanins.....	13
II-4-1-2-2-2- Lignines.....	15
II-4-1-2-2-3- Les coumarines.....	15
II-4-1-2-2-4- Les Stilbènes.....	16
II-4-1-3- Biosynthèse des polyphénols.....	16
II-4-2- Les alcaloïdes.....	16
II-4-2-1- Définition.....	17
II-4-2-2- Biosynthèse.....	17
II-4-2-3- Propriétés pharmacologiques et emplois.....	17
II-4-2-4- Propriétés physicochimiques.....	17
II-4-3- Les huiles essentielles.....	17

III- Etude des activités biologiques

III-1- Activité antimicrobienne.....	18
III-2- Activité antioxydante.....	21

Partie II: Etude expérimentale

I- Matériel et méthodes

I-1- Matériel	22
I-1-1- Matériel biologique.....	22
I-1-1-1- Matériel végétal.....	22
I-1-1-2- Les souches bactériennes testées.....	23
I-1-2- Matériel de laboratoire.....	24
I-2- Méthodes d'analyse.....	24
I-2-1-Préparation des échantillons.....	24
I-3- Screening phytochimiques.....	25
I-4- Les composés phénoliques.....	26
I-4-1- Méthode d'extraction.....	26
I-4-1-1- Extraction des polyphénols totaux.....	26
I-4-1-2- Extraction des flavonoïdes.....	28

I-5- Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible).....	30
I-5-1- Spectrophotométrie.....	30
I-5-2-Analyses quantitatives.....	30
I-5-2-1- Dosage des polyphénols totaux.....	30
I-5-2-2- Dosage des flavonoïdes.....	31
I-6-Activités biologiques.....	34
I-6-1- Activité antibactérienne des composés phénoliques et flavonoïdes.....	34
I-6-1-1 -Essais antimicrobiens.....	35
I-6-1-1-1- La méthode de diffusion à partir d'un disque.....	35
I-6-1-1-2- La méthode des microdilutions CMI.....	36
I-6-2- L'évaluation de l'activité antioxydante.....	37
I-6-2-1- Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	37
I-6-2-2- Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).....	38

II- Résultats et discussion

II-1- Screening chimique.....	40
II-2- Dosage des phénols totaux.....	41
II-3- Analyses quantitatives des flavonoïdes.....	43
II-4- Activité antibactérienne.....	45
II-4-1-Détermination de la méthode de diffusion des disques.....	45
II-4-2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	47
II-5-Activités antioxydant.....	49
II-5-1- Evaluation de l'activité antioxydant par le DPPH.....	50
II-5-2- Evaluation de l'activité antioxydant par le FRAP.....	55

Conclusion générale.....	59
---------------------------------	-----------

Références bibliographiques

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal recours de la médecine de nos grands-parents, malgré l'important développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies souvent mortelles (farnsworth *et al.*, 1986).

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales folkloriques.

Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques lorsqu'ils sont mal utilisés. De multiples études, portent sur la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les huiles essentielles qui ont des intérêts multiples mis en faveur par l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique (atik *et al.*, 2007).

Malgré la biodiversité immense du continent africain et de l'Algérie en particulier, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes (Millogo *et al.*, 2005). Une grande partie des recherches actuelles portent sur l'étude des molécules antimicrobiennes et anti-oxydante (les vitamines, les caroténoïdes et les polyphénols). En effet, les métabolites secondaires font et reste l'objet de nombreuses recherches « *in vivo* » comme « *in vitro* » (Hamidi, 2013).

La présente étude a pour objectif la valorisation d'une plante aromatique et médicinale locale *Rosmarinus officinalis L.* L'étude consiste à l'évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante des extraits de feuilles. Ce travail se repartie en deux parties :

La première partie est une synthèse bibliographique où nous apportons des généralités sur la plante et les composés phénoliques.

La deuxième partie est la partie expérimentale qui est consacrée à l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *Rosmarinus officinalis*, leur dosage et leur effet antibactérien vis-à-vis d'*Escherichia coli* (*E. coli*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Enfin, une conclusion qui résumera tous les résultats obtenus et quelques perspectives.

Les plantes médicinales et aromatiques furent utilisées par l'homme depuis l'antiquité. De nos jours leur utilisation a pris un essor considérable dans les industries de parfum, produits cosmétiques et pharmaceutiques. Les plantes sont la source principale de substances actives ou au moins 35 000 espèces sont utilisées dans le monde. L'Algérie avec sa diversité de climats et de sols, sa situation géographique et ses reliefs, présente une flore de 3 510 espèces dont 450 espèces sont répertoriées dans les hauts plateaux et le grand sud du pays (Quezel et Medail, 1995)

I-1- Les plantes aromatiques

Les plantes aromatiques sont constituées par des organes apportant une odeur et une saveur destinées à améliorer un bien-être lors de la dégustation. Il peut s'agir soit d'une plante entière ou d'un organe particulier (feuilles, fleurs, fruits, bourgeons, grains, rhizomes ou bulbes (Mostafa, 2011).

I-2- Les plantes médicinales

Il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au loin une partie possède des propriétés thérapeutiques (Farnsworth *et al.*, 1986). Plus de 35.000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains (Elqaj *et al.*, 2007).

D'après Babulka (2007) ; les plantes médicinales sont toutes des plantes qui possèdent une activité pharmacologique pouvant conduire à des utilisations thérapeutiques, grâce à la présence d'un certain nombre de substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain.

I-3- La famille des lamiacées (labiées)

D'après Bottineau (2010), la famille des lamiacées qui est également connue sous le nom des labiées, comporte environ 258 genres pour 6.900 espèces plus ou moins cosmopolites ; mais dont la plupart se concentrent dans le bassin méditerranéen telles que le thym, la lavande et le romarin. Les lamiacées sont des herbacées ayant la consistance et la couleur de l'herbe, parfois sous-arbrisseaux ou ligneuses. Une grande partie de ces plantes sont aromatiques riches en l'huile essentielle d'où leur intérêt économique et médicinal.

Les labiées dans les régions arctiques et en hautes montagnes, c'est une famille exceptionnellement homogène et extrêmement facile à reconnaître (Guignard, 1983).

I-4- Présentation de la plante étudiée : Le romarin « *Rosmarinus Officinalis L.* »

I-4-1- Historique

Faure Alphonse rapporte que le romarin est connu depuis la plus haute antiquité, et utilisé dans les cérémonies religieuses. A Rome, lorsqu'on fait un jardin, c'est pour y installer des plantes à parfum dont le romarin.

Au moyen âge, on est très sensible aux vertus des plantes. Platarius cite le romarin dont les fleurs et feuilles sont séchées en plein soleil.

Lieutaghi insiste sur ses propriétés médicinales et « L'eau de la reine de Hongrie » fut une réussite commerciale.

Aujourd'hui le romarin est un aromate culinaire et fournit une huile essentielle encore recherchée par l'industrie des parfums (Gilley, 2005).

I-4-2- Etymologie

Romarin : *Rosmarinus officinalis L.*

In Ait youcef (2006), le romarin appartient au genre *Rosmarinus L.* et à la famille des Labiacées. Elle peut avoir différentes appellations :

- ✓ Français : Romarin, Encensier, Herbe aux couronnes, Herbe des troubadours
- ✓ Berbère : iazir, aziir, yazir, hesislerneb
- ✓ Arabe : iklil, al-jabal, aklil, kelil, klil, hassalouban, hassalban
- ✓ Anglais: Rosemary (Max et Dominique, 2015).

I-4-3-Origine et définition

Le nom du genre *Rosmarinus* dérive du latin « *ros marinus* », qui signifie « rosée de mer ». Colonisant souvent les zones rocheuses du bassin méditerranéen (Bacon *et al.* , 2013).

Très bonne plante mellifère, qui se reconnaît de loin à sa forte odeur, le romarin est consommé depuis l'antiquité pour ses qualités aromatiques et médicinales (Gjerroumoui et Nacef, 2014).



Figure 1: Morphologie générale du Romarin.

I-4-4- Classification botanique

Position systématique du romarin selon Cronquist (1981).

RègnePlantae
EmbranchementSpermaphytes
Sous embranchementAngiospermes
DivisionMagnliophyta
ClasseMagnoliopsida
Ordre Lamiales
FamilleLamiaceae
Genre*Rosmarinus*
Espèces*Rosmarinus officinalis* L

I-4-5-Habitat et description botanique

Le romarin est une plante commune du bassin méditerranéen dont l'aire de répartition s'étend jusqu'au sud-ouest de l'Asie, il se développe sur les sols calcaires des collines de faible altitude et des garrigues en particulier en France et en Afrique du nord (Max et Dominique, 2015). On la trouve sur les sites bien ensoleillés, à sécheresse estivale accusée ; elle est également souvent cultivée dans les jardins (Ait youcef, 2006).

Sous-arbrisseau touffu, xérophYTE, fortement rameux et toujours vert, à racine pivotante, à tiges ligneuses, érigées, pouvant atteindre jusqu'à 2m de haut (Teuscher *et al.*, 2005).

Son écorce s'écaille sur les branches les plus âgées. Les rameaux velus portent les feuilles opposées et étroites d'un vert grisâtre sous le dessous (figure 2) (Lucienne, 2010).

Les feuilles longilignes sont quasiment dépourvues de pétiole. Elles ont des bords épais et, cassées, elles libèrent une forte odeur évoquant celle du pin. Vues de près, ses petites fleurs à pourpres ressemblent un peu à de minuscules orchidées (figure 3) (Bacon *et al.*, 2013).

La reproduction peut se faire par voies sexuée (graine) et asexuée (bouture et éclat de touffes). Les modes de dissémination qui lui sont propres sont : la gravité, le vent, l'eau, les animaux (mammifères, oiseaux, insectes, etc...) et l'homme (Aafi, 2014).

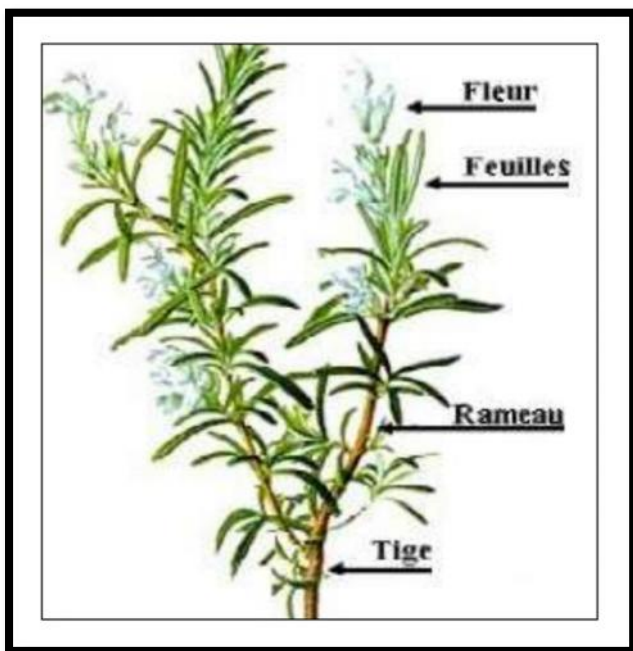


Figure 2 : Rameau feuillé à fleurs Romarin (Khorsi, 2013).



Figure 3 : Tige principale et rameau feuillé à fleurs du romarin (Khorsi, 2013).

I-4-6- Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin

Le romarin renferme une huile essentielle à laquelle il doit ses propriétés intéressantes. Il stimule le fonctionnement de la vésicule biliaire, il agit sur les fermentations intestinales et sur les douleurs abdominales qu'elles entraînent. Il calme aussi la toux et contribue au confort de l'asthmatique (Lapare et Collin, 2000). Il est tonicardiaque, hypotenseur décongestionnant veineux, régulateur hépatique (Huang *et al*., 1994).

I-4-6-1- Propriétés thérapeutiques

Selon Lucienne (2010) ; le romarin a des propriétés thérapeutiques différentes :

) Usage interne

Stimulant général, tonicardiaque, antiseptique, pulmonaire, carminatif, asthénie, surmenage, chlorose, asthme, rhumatismes, goutte, bronchite, hépatisme, dyspepsie.

) Usage externe

Cicatrisant, et parasiticide, plaies, brûlures, rhumatismes.

I-4-6-2- Données pharmacologiques

D'après Max *et* Dominique (2015), L'expérimentation animale et biologique permet de confirmer certaines des propriétés que la tradition prête au romarin :

) **Activité antispasmodique** : « *In vitro* » et à faible dose l'huile essentielle inhibe les contractions induites par une stimulation électrique et ce après une augmentation transitoire de la coction qui serait due à l'alpha-pinène. Le bornéol, agoniste partiel de l'acétylcholine, est le composant le plus spasmolytique de l'huile essentielle.

) **Activité antimicrobienne** : l'activité antimicrobienne a un large spectre d'application : l'huile essentielle est bactéricide pour certaines bactéries. Des extraits méthanoliques de romarin seraient également efficaces sur *Helicobacter pylori*, bactérie considérée comme responsable de nombreux troubles gastro-intestinaux et d'ulcères. Signalons aussi que l'acide rosmarinique est entre autres, anti-inflammatoire.

) **Effets antioxydants** : des propriétés antioxydantes ont été trouvées récemment aux composés volatils du romarin mais on attribue généralement ces propriétés aux diterpènes. Elles ont été étudiées sur différents substrats alimentaires.

I-4-7- Les principaux constituants

Parmi les principaux constituants du romarin on trouve :

Polyphénols : ils sont représentés par des acides-phénols, dérivés de l'acide cinnamique, principalement l'acide rosmarinique et des dérivés caféïques ainsi que par des flavonoïdes.

Dérivés terpéniques : ce sont principalement des diterpènes tricycliques, rosmaridiphénol et dérivés aromatiques de l'abiétane.

Huiles essentielles : la teneur dans la plante est de 1 à 3 %. La composition chimique de l'huile essentielle varie selon les provenances et les procédés (Lucienne, 2010).

Cette plante peut contenir également d'autres constituants dont les acides gras hydroxylés (surtout des dérivés de l'acide décanoïque) et des acides gras organiques (acides citrique, glycolique, glycérique) ; ainsi des stérols, de la choline et un mucilage (Ait youcef, 2006).

I-4-8-Toxicologie

Selon Max et Dominique (2015), la toxicité des huiles essentielles se manifeste par une action épiléptogène : eucalyptol et camphre inhibent « *in vitro* » la respiration tissulaire du cortex cérébral de rat. Mais la poudre de la plante totale elle-même n'est pas toxique : un lyophilisant de jeunes pousses peut être administré sans problème jusqu'à la dose de 22g/kg.

II- Les métabolites secondaires chez les plantes

II-1- Introduction

L'étude phytochimique d'une plante se fait pour déterminer sa nature, pour isoler son principe actif, ou encore pour extraire des constituants qui peuvent être utilisés comme précurseurs d'hémi synthèse de médicaments et ce, à l'aide de méthodes chromatographiques (CCM : chromatographie sur couche mince, HPLC : chromatographie liquide à haute performance, CPG : chromatographie en phase gazeuse), chimiques (hydrolyse), ou physiques (spectrophotométrie ultra-violet (UV) et Infrarouge (IR), spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire (RMN) (Tahrouche *et al.*, 2002).

Les constituants chimiques de la plupart des plantes restent encore peu connus (Baerts *et al.*, 1996).

Il est pourtant, important de connaître les composés chimiques d'une plante pour comprendre son activité biologique. La recherche de cette activité pour une plante est souvent orientée par son analyse qualitative et quantitative en composés majoritaires, bien que, dans plusieurs cas, elle puisse être due à des composés présents sous forme de trace (Tahrouche *et al.*, 2002).

On note aussi que les plantes constituent une réserve de molécules originales (propres à la plante) dont la majorité sont biologiquement actives seules ou en association (Yang *et al.*, 2008).

1-2- Métabolisme secondaire ou les métabolites secondaires

La majorité des molécules synthétisées par les plantes d'intérêt pharmaceutiques sont extraites directement de la plante entière. Ces molécules, appelées métabolites secondaires, ne constituent pas des espèces chimiques impliquées dans la croissance, aucun rôle spécifique pour la plante ne leur a été assigné.

Le métabolisme secondaire des plantes est lié au métabolisme primaire par cinq voies métaboliques principales: la voie de l'acide shikimique, de l'acide malonique, de l'acide mevalonique, des acides aminés et du glycéraldéhyde-3- phosphate (G3P) via la voie des pentoses phosphates (Taiz et Zeiger , 1998).

A l'inverse des métabolites primaires, les métabolites secondaires ne sont pas synthétisés de manière uniforme dans le règne végétal. Un métabolite secondaire particulier est souvent spécifique à quelques espèces, ils sont classés selon leur structure chimique; on les

résume en trois grandes catégories : les composés phénoliques, les isoprénoides et les composés azotés (Contin *et al.*, 1998).

I-3- Définition

Ce sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes (Boudjouref, 2011). Caractérisées généralement par de faible concentration dans les tissus végétaux (Newman et Cragg., 2012) et qui n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante (Guignard, 1996).

Les molécules organiques sont biosynthétisées à partir de métabolites primaires et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. En 1987 plus de 8.500 métabolites secondaires sont déjà connus. Les plus grands groupes sont les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et les composés phénoliques. Ils présentent une énorme valeur économique (en particulier pour l'industrie pharmaceutique et la cosmétique (Peeking *et al.*, 1987).

I-4- Principales classes des métabolismes secondaires métabolites

D'après leur biosynthèse, les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois classes: Polyphénols; terpénoïdes; stéroïdes et alcaloïdes (Hennebelle *et al.*, 2004).

II-4-1- Les composés phénoliques

II-4-1-1- Définition

D'après Bruneton (1999), les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié un groupement hydroxyle libre.

La grande majorité de composés phénoliques dérivent de l'acide cinnamique formé par la voie du shikimate. Ils sont solubles dans la solution de carbonate de sodium. Chimiquement, ils sont actifs et donnent souvent lieu à des liaisons hydrogènes, ou chélater des métaux pour les O-dihydroxyphénols (Catéchol), sensibles à l'oxydation (Gorham, 1977).

II-4-1-2- Classification

Les différents polyphénols sont classés d'une part, par le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, par la structure de squelette de base (Macheix *et al.*, 2006). Les principaux composés phénoliques sont illustrés dans le tableau I.

Tableau I: Les principaux composés phénoliques (Bruneton , 1999).

N°de Carbone	Squelette de base	Classe	Exemple
6	C ₆	Phénol simple	- Catéchol (1)
7	C ₆ -C ₁	Acides phénoliques	- Acide Salicylique (2)
8	C ₆ -C ₂	Acétophénones	- 3-acetyl-6-méthoxybenzaldehyde (3)
9	C ₆ -C ₃	- Acide hydroxycinnamique - Phénylpropènes - Coumarines	- Acide caféique (4) - Eugénol (5) - Ombelliférone (6)
10	C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	- Juglone (7)

II-4-1-2-1- Polyphénols monomériques

II-4-1-2-1-1- Acides phénoliques

Selon Pandey et Rizvi (2009), les acides phénoliques, ou acides phénols ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature (Haslam, 1994). Ils se divisent en deux classes: les dérivés de l'acide benzoïque (les acides hydroxybenzoïques) et les dérivés de l'acide cinnamique (les acides hydroxycinnamiques).

➤ Acides phénols dérivés d'acide benzoïque

Ce sont des hydroxybenzoïques et ils ont une structure générale de base de type (C₆-C₁) (figure4). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides (Harrar, 2012). Les plus répandus sont: l'acide salicylique et l'acide gallique (Bruneton, 1999).

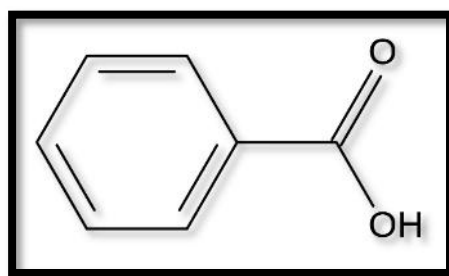


Figure 4 : Acide benzoïque (Pawlowska *et al.*, 2006).

➤ Acide phénols dérivés d'acide cinnamique

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique (figure 5) sont souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide paracoumarique et l'acide synaptique (Haslam, 1994).

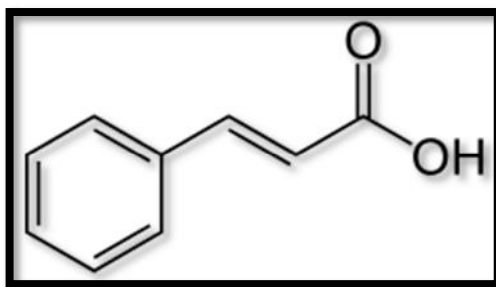


Figure 5: Acide cinnamique (Gorham, 1977).

II-4-1-2-1-2- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils dérivent tous de la flavone (ou 2-phénylchromone) et ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides (Ghestem *et al.*, 2001).

Ils sont très largement répandus dans le règne végétal et on les trouve en abondance dans les organes jeunes : feuilles et Boutons floraux (Ghestem *et al.*, 2001).

- Classification

Selon Ghestem *et al* (2001); Les génines sont réparties en différentes classes:

- flavones (apigénine...);
- flavonols (3-hydroxyflavones) (quercétol etc...);
- flavanones (2,3-dihydroflavone) (hespérétol, liquiritigénine...);
- chalcones (isomères des flavanones à cycle C ouvert) (isoliquiritigénine...);
- isoflavones (dérivés de la 3-phénylchromones par isomérisation des flavones);
- bisflavones (résultant de la dilérisation des flavones).

- Structure chimique

Les flavonoïdes sont des hétérosides, c'est-à-dire des dérivés de génines sur lesquelles un ou plusieurs oses sont liés. La liaison genine-ose existe grâce à la réunion : soit d'un hydroxyle phénolique, soit d'un hydroxyle de l'hétérocyclique oxygéné, soit d'un groupement méthylène -CH avec l'hydroxyle hémiacétalique de l'oses. On obtient alors des O-Hétérosides ou des C- Hétérosides (figure 6) (Tahrouch *et al.*, 2002).

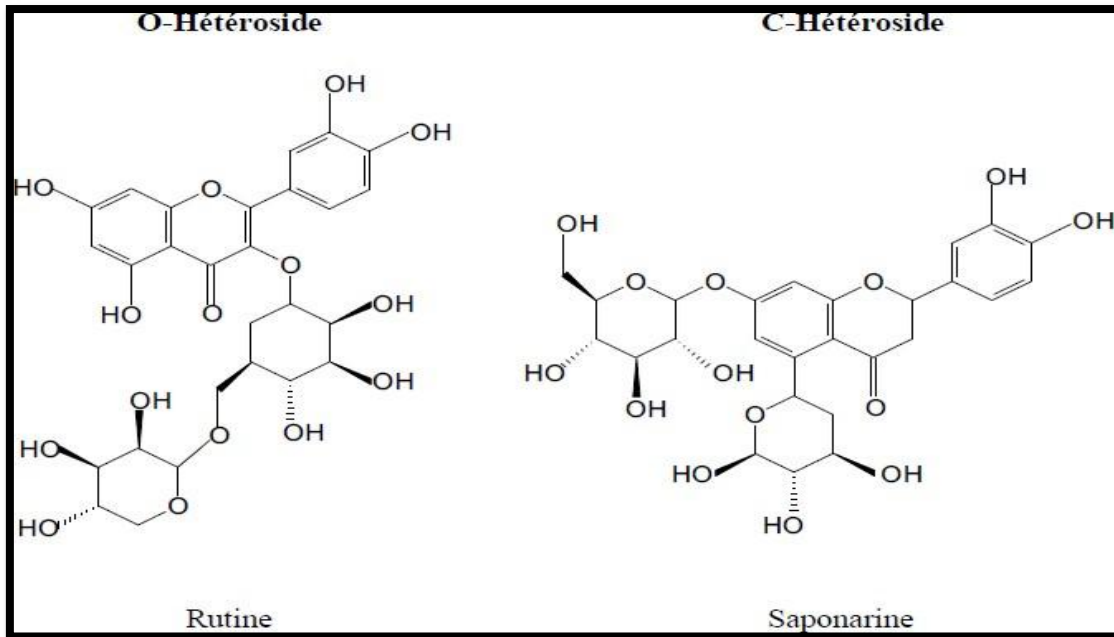


Figure 6: Structure chimique de deux flavonoïdes (Tahrouch *et al.*, 2002).

Les C-Hétérosides semblent intéressant en thérapeutique. La rupture de la liaison genine-ose est plus difficile dans le cas des C-Hétérosides que dans celui des O- Hétérosides (Tahrouch *et al.*, 2002).

-Propriétés pharmacologiques

Selon (Ghestem *et al.*, 2001) les flavonoïdes sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse par action sur la microcirculation. Ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et augmentent leur résistance. Cette action est appelée «vitaminique P» (bioflavonoïdes d'agrumes, quercétine, vitamine C, mélétine, sophrétine).

Différents mécanismes sont évoqués pour expliquer cette activité:

- des propriétés antioxydantes, piègeurs de radicaux libres;
- des propriétés inhibitrices d'enzymes...

A coté de cette action principale «vitaminique P», certains flavonoïdes présentent des activités particulières: diurétiques, anti-inflammatoires, antispasmodique etc ...

-Emplois en thérapeutique

D'après (Ghestem *et al.*, 2001) les flavonoïdes, seuls ou associés, sont prescrits dans les indications suivantes:

- traitement de troubles en rapport avec une insuffisance veineuse: jambes lourdes,

crampes, œdèmes, varices etc...;

-traitement de la crise hémorroïdaire;

-en ophtalmologie lors de troubles liés à la circulation rétinienne;

-métorragies liées à la présence d'un dispositif intra-utérin; (Une métorragie est un saignement de l'utérus en dehors des périodes des règles chez les humains).

-traitement de la fragilité capillaire au niveau de la peau et des muqueuses etc...

II-4-1-2-2- Polyphénols sous forme de polymères

II-4-1-2-2-1- Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes, hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da (Kamra *et al.*, 2006). Des composés faciles à se combiner aux protéines (Mangan, 1988 ; Mcsweeney *et al.*, 2001 ; Makkar, 2003). Grâce à la présence de plusieurs groupements hydroxyles phénoliques (Khenaka, 2011), aussi à d'autres polymères organiques tels que des glucides, des acides nucléiques, des stéroïdes et des alcaloïdes, pour former avec eux des complexes stables (Haslam, 1998).

Ils sont subdivisés en deux groupes distincts en fonction du type de l'acide phénolique et du type de liaisons qui déterminent la taille et la réactivité chimique de la molécule (Rira, 2006).

➤ Les tanins hydrolysables

Ce sont des esters du glucose et d'acides phénols qui sont:

-soit l'acide gallique (on parle alors de tanins galliques);

-soit l'acide ellagique, qui est un dimère de l'acide gallique (on parle alors de tanins ellagiques) (Tahrouch *et al.*, 2002).

Dans les deux cas, la fraction osidique est estérifiée par plusieurs molécules d'acide gallique ou plusieurs molécules d'acide ellagique (figure 7).

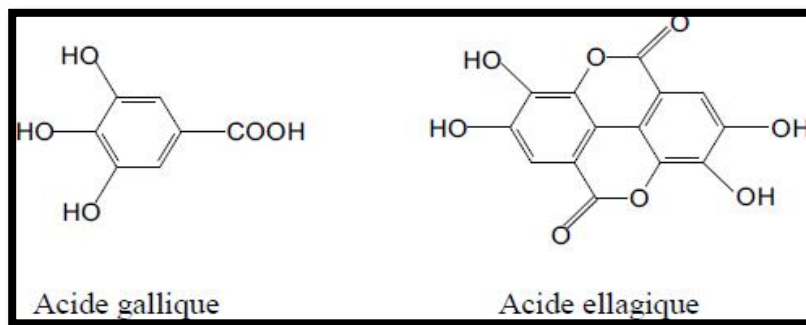


Figure 7: Exemples de structure de tanin hydrolysable (Bruneton , 1999).

➤ **Les tanins condensés ou proanthocyanidols**

Les tanins condensés sont des polymères constitués par des unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (figure8) (Bruneton, 1999).

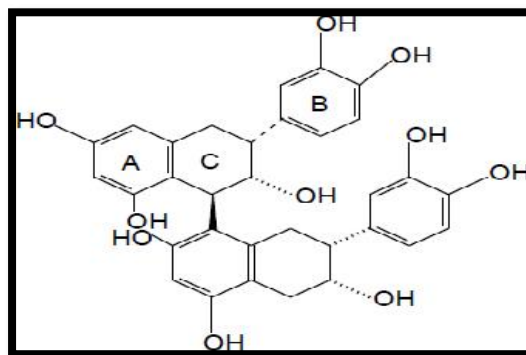


Figure 8: Exemple de structure de tanins condensés (Bruneton, 1999).

• **Propriétés pharmacologiques et biologique des tanins**

Les décoctions et les autres préparations à base de drogues riches en tanins. Elles sont employées le plus souvent en usage externe contre les inflammations de la cavité buccale, les catarrhes, la bronchite, les hémorragies locales, sur les brûlures et les engelures, les plaies, les inflammations dermiques, les hémorroïdes et la transpiration excessive.

En usage interne, elles sont utiles en cas de catarrhe intestinal, de diarrhée, d'affections de la vésicule, ainsi que comme antidote lors d'empoisonnement par les alcaloïdes végétaux (Valnet, 1984).

II-4-1-2-2-2- Lignines

C'est l'un des polymères biosourcés et aromatiques naturels les plus abondants sur terre (Privas, 2013). Subissant les contraintes de la gravité, la lignine est apparue afin notamment de rigidifier les parois cellulaires (Cruz *et al.*, 2001).

Le rôle des lignines dans l'évolution des végétaux, ils forment une barrière mécanique, participant à la résistance des plantes aux microorganismes et herbivores, la lignification est une réponse courante à l'infection ou la blessure de goût désagréable (Murry *et al.*, 1982).

II-4-1-2-2-3- Les coumarines

Les coumarines sont présentes dans de nombreux végétaux. Ils ont une structure de base (C₆-C₃) (figure 9). Elles sont produites en grandes quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense de type phytoalexique (Roux et Catier, 2007).

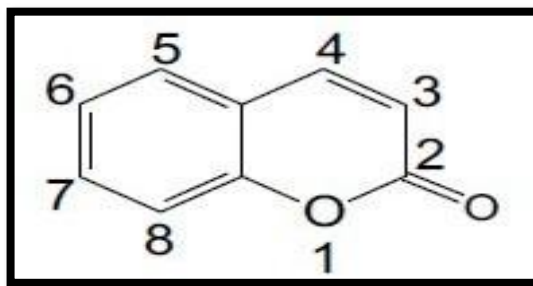


Figure 9 : Structure d'une molécule de coumarine (Cowan, 1999).

- Constitution chimique et structure

Les coumarines sont des composés aromatiques dérivant de l'acide O-hydroxy-Z-cinnamique, de même que la coumarine elle-même dérive de l'acide ortho-coumarique (Brouillard, 1993).

- Types de coumarines

-) **Les hydrox coumarines :** présentent également un intérêt pharmaceutique. L'esculine, contenue dans l'écorce du marron d'Inde a les mêmes effets que la vitamine P. Elle augmente la résistance des vaisseaux sanguins et présente donc un intérêt pour les soins des hémorroïdes et des varices (comme la rutine).
-) **Les furanocoumarines :** sont des agents toxiques photosensibles. Ils sont le résultat de la fusion d'une coumarine et d'un noyau de furane (Volak et Stola, 1983).

II-4-1-2-2-4- Les stilbènes

Les stilbènes (figure 10) sont des composés phénoliques contenant au maximum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, Le resvératrol et le ptérostilbène font partie de la famille des stilbènes et sont des composés synthétisés par la plante suite à un stress, Ces molécules peuvent s'oxyder sous l'action d'enzymes oxydase et les peroxydases (Perret, 2001).

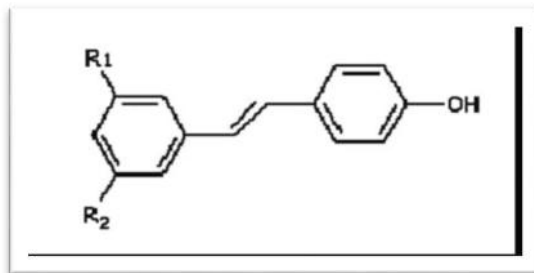


Figure 10: Structure chimique de stilbène (Perret, 2001).

II-4-1-3- Biosynthèse des polyphénols

D'après (Mohammedi, 2013) les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques :

- Celle de l'acide shikimique (shikimate).
- Celle issue de l'acétate-malonate.

De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte (Martin et Tsiotaina, 2002).

II-4-2- Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques naturelles composés de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote (Schauenberg et Paris, 2005). Plus ou moins basique, en facilitant leur isolement et purification comme sels solubles dans l'eau formés en présence des acides minéraux (Hess, 2002). Ils peuvent être présents dans tous les organes (Ziegler et Facchini, 2008). Leur teneur est très variable, généralement comprise entre 0.1% à 3% du poids sec de la drogue (Catier et Roux, 2007).

Les alcaloïdes existent rarement à l'état libre dans la plante, mais le plus souvent ils sont combinés à des acides organiques ou à des tanins (Ziegler et Facchini, 2008).

II-4-2-1- Biosynthèse

Contrairement à la plupart des autres types de métabolites secondaires, les nombreuses classes d'alcaloïdes ont des origines biosynthétiques unique (Ziegler et Facchini, 2008).

Les noyaux de base de ces différents alcaloïdes dérivent des acides aminés du métabolisme primaire (Nacoulma, 2012).

II-4-2-2- Propriétés pharmacologiques et emplois

Selon (Ghestem *et al.*, 2001) les alcaloïdes présentent des propriétés pharmacologiques marquées et ils ont de nombreuses utilisations en thérapeutique, notamment au niveau du système nerveux central, du système nerveux autonome et de système cardiovasculaire. Ils peuvent avoir des actions antitumorales, antiparasitaires...

II-4-2-3- Propriétés physicochimiques

Les alcaloïdes sont des composés de masse moléculaire variant de 100 à environ 900. Leur saveur est amère.

Les alcaloïdes non oxygénés et de faible masse moléculaire sont des liquides entraînés à la vapeur d'eau. Par contre les alcaloïdes oxygénés, de masse moléculaire élevée sont généralement des solides cristallins (Michel *et al.*, 2001).

II-4-3- Les huiles essentielles

Les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous la forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, les branches, le bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal, elles sont odorantes et très volatiles (Padrini et Lucheroni , 1997).

(Schauenberg et Paris, 2006) confirment que chez le romarin l'essence est contenue dans les feuilles et les sommités fleuries.

III-Activités biologiques

Les plantes médicinales sont toujours une source de remèdes sous forme de préparation traditionnelles ou principes actifs purs (Farnworth *et al.*, 1986).

Le criblage biologique est une étape très importante dans l'étude de ces plantes ou dans l'isolement et la caractérisation de leurs principes actifs. Il s'agit d'appliquer certains tests biologiques telles que : l'activité antibactérienne, l'activité antioxydante, l'activité antifongique etc ...

III-1- Activité antimicrobienne

Le terme "agent antimicrobien" désigne toute substance utilisée pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris, agents antibactériens. Les agents antimicrobiens sont utilisés depuis des décennies pour traiter les maladies transmissibles et prévenir les infections (CCE, 2001). Le mode d'action de ces agents sur les bactéries, peuvent être : Bactériostatique, lorsque la substance inhibe la multiplication des bactéries ou bactéricides : lorsque la substance détruit totalement les bactéries.

Les agents pathogènes les plus connus à ce jour sont les bactéries, les virus, les champignons et les parasites.

III-1-1- Activité antimicrobienne des polyphénols

Les polyphénols sont reconnus par leur toxicité vis- à -vis des microorganismes (Cowan, 1999). Une contamination des végétaux par des microorganismes pathogènes entraîne une forte augmentation des teneurs en composés phénoliques, ce qui correspond à la mise en place de mécanisme de défense de la plante (Macheix *et al.*, 2005). Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999 ; Hamidi, 2013).

L'activité antimicrobienne des composés phénoliques a été rapportée dans plusieurs recherches. Les composés phénoliques sont utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire.

Les acides phénolique comme l'acide P-coumarique, acide caféique agissent en tant que des facteurs empêchant la croissance de *S. aureus* (Stojkovi *et al.*, 2013).

Une étude « *in vitro* » faite par Khatkar *et al.*, (2014) a également démontré que les dérivés synthétiques de l'acide P-coumarique possèdent une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* et *E.coli*.

L'activité antibactérienne des agents naturels, telles que les huiles végétales, ont été reconnues et utilisées depuis des siècles, notamment dans la conservation des aliments (Tajkarimi *et al.*, 2010).

III-1-2- Activité antimicrobienne des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont parmi les plus communs des produits naturels qui présentent un large spectre d'activité antibactérienne (Xiao *et al.*, 2014). Des études scientifiques menées au cours des dernières années ont généré un intérêt croissant dans leur rôle potentiellement important dans le maintien de la santé humaine. Un nombre considérable de plantes médicinales contiennent des flavonoïdes, qui ont été rapportées par de nombreux auteurs comme ayant des propriétés antibactériennes (Malesev *et al.*, 2007).

La catéchine, par exemple, flavonoïde isolée du thé vert, est douée de propriétés antimicrobiennes (Cowan, 1999).

De nombreux groupes de flavonoïdes également ont été isolés et identifiés comme possédant une activité antifongique, antivirale et antibactérienne (Cushnie et Lamb, 2005).

Ozçelik *et al.*, (2008) ont rapporté que les flavonoïdes ont montré « *in vitro* » une activité antimicrobienne contre les souches de *Klebsiella pneumoniae*.

Harikrisna *et al.*, (2004) montrent le pouvoir antimicrobien d'un flavonoïde glycoside 'prunine-6-O-pcoumarate' contre deux souches de bactéries Gram+ (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus albus*) et deux bactéries Gram- (*Esherichia coli* et *Proteus vulgaris*).

Les résultats de Benarba *et al.*, (2015) ont montré que les flavonoïdes possèdent des effets thérapeutiques contre plusieurs maladies telle que la toux, la grippe, l'asthme, l'hypertension et les intoxications.

III-2- Activité antioxydante**III-2-1- Définition du stress oxydant**

Le stress oxydant est le déséquilibre entre la génération des espèces réactives d'oxygène et la capacité des corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatif (Halmi, 2015). Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses antioxydantes donc c'est un déséquilibre de la balance antioxydants/pro-oxydant (Aliouat et Boulkelia, 2012).

III-2-2- Les radicaux libres

Un radical libre (RL) est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié, extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron, il peut arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en cédant un électron (agissant alors comme un réducteur) (Djadouri et Ben Dahra, 2014).

Dans un radical libre, le nombre d'électrons sur la dernière orbital est impair, il se créera alors des liaisons entre atomes car les radicaux libres tenteront d'aller rechercher un électron pour former une nouvelle molécule, l'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs sont souvent appelés espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein de laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

L'objectif de notre travail est d'évaluer les propriétés biologiques (activité antibactérienne et antioxydante) d'extrait phénolique du romarin.

Le travail pratique est subdivisé en trois parties suivantes :

-) Caractérisation phytochimique des feuilles du romarin ;
-) Extraction et dosage des polyphénols ;
-) Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne d'extrait phénolique des feuilles du *Rosmarinus officinalis* L .

I-1- Matériel

I-1-1- Matériel biologique

I-1-1-1 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes : Feuilles de *Rosmarinus officinalis* L.



Figure 11: Matériel végétal récolté a bastos UMMTO.

➤ Période de récolte de notre plante

La récolte de notre plante a été effectuée sur des arbustes d'apparence saine au mois d'avril 2018, au sein de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

➤ Identification botanique

L'identification de la plante étudiée a été faite selon la clé de détermination de Quszel et Santa (1963). Cette identification a été confirmée au niveau du département d'agronomie de l'université de Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.

I-1-1-2 les souches bactériennes testées

Les différentes fractions de l'extrait méthanoliques de *Rosmarinus officinalis L.* ont été testées sur deux souches bactériennes : la bactérie à Gram positif *S. aureus* ATCC 43300 qui tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales (Chambers, 1997), et la bactérie à Gram négatif *E. coli* ATCC 25922 qui est plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales (Nataro et Kaper, 1998).

Ces souches ont été fournies par le laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université de UMMTO et ont étéensemencée juste avant le test antibactérien dans un bouillon nutritif et incubé à 37 °C pendant 24 h.

Le tableau ci-dessous montre la classification des souches bactériennes testées.

Tableau II: Classification des souches bactériennes testées (Sutra *et al.*, 1998; Delarras, 2007).

Classification	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Règne	Bacteria	Bacteria
Phylum	Firmicutes	Proteobacteria
Classe	Bacilli	Gammaproteobacteria
Ordre	Bacillales	Enterobateriales
Famille	Staphylococcaceae	Enterobacteriaceae
Genre	Staphylococcus	Escherichia
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>

I-1-2- Matériel de laboratoire**I-1-2-1- Réactifs chimiques et solvants**

Dans cette étude nous avons utilisé: Méthanol comme solvant et les réactifs chimiques: $AlCl_3$; Folin ciocalteu; Na_2CO_3 ; 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH); Acide ascorbique; acide gallique; diméthyle sulfoxyde (DMSO); l'eau physiologique.

I-1-2-2- Milieu de culture

Nous avons utilisé la gélose nutritive Mueller Hinton (MH) pour l'étude de la sensibilité des souches bactériennes à différentes concentrations d'extraits méthanoliques.

I-2- Méthode d'analyses**I-2-1-Préparation des échantillons**

La plante récoltée est nettoyée puis séchée à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules.

Après l'opération de séchage, les feuilles ont été broyées au mortier. Ces poudres sont ensuite conservées dans des flacons en verre hermétiquement fermés à basse température $18^{\circ}C$ en vue de procéder aux différentes manipulations (figure 12).



Figure 12 : Préparation des échantillons.

I-3- Screening phytochimiques

Cette étude permet de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques (les polyphénols totaux, flavonoïdes etc ...) de la plante étudiée. Le matériel végétal est épuisé successivement par macération dans des solvants de polarité croissante (méthanol, eau). Les tests phytochimiques pour les polyphénols, les anthocyanes, les flavonoïdes ont été réalisés par différentes méthodes.

I-3-1- Test de présence des polyphénols totaux

Peser 400mg de poudre de la plante dans un récipient en verre et additionner 4mL d'eau distillée et 12mL d'acétone, les placer dans le bain marie à 60°C pendant 5min avec agitation et filtration avec du papier filtre « Whatman n°3 », récupérer le filtrat dans un tube à essai et ajouter 1 à 2 gouttes de FeCl_3 à 10% (Bouquet et Fouret, 1975).

La présence des composés phénoliques dans les extraits est indiquée par l'apparition de la couleur vert noirâtre.

I-3-2- Test de présence des flavonoïdes

La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par un test simple et rapide (Karumi *et al.*, 2004).

Le test consiste à ajouter à 1mL de l'extrait méthanolique, 2.5mL d'alcool chlorhydrique (HCl, éthanol, eau distillée), des copeaux de magnésium métallique (Mg). Laisser agir 3min et observer le changement de la couleur. La présence de flavonoïdes est confirmée par la coloration rose orangée (flavones), rose violacée (flavonones), rouge (flavonols, flavononols).

I-3-3- Test de présence des anthocyanes

Dans un tube à essai mettre 5mL d'extrait + 5mL d'acide sulfurique, additionner 2mL de NH_4OH (H_2SO_4). Le test positif se manifeste par une coloration bleu-violacée en milieu basique, indique la présence d'anthocyanes (Debray *et al.*, 1971).

I-3-4- Test de présence des flavonols et flavonones

Dans un tube à essai ajouter 1mL d'extrait + 200 μL d'HCL pur + quelques fragments de Mg^{+2} . L'obtention de la coloration rouge met en évidence la présence des flavonols et le rouge violacée des flavonones (Karumi *et al.*, 2004).

3-5- Test de présence des tanins (Cathéchique ou Gallique)

Mettre 1mL de solution avec 2 mL H₂O et ajouter 2 à 3 gouttes de FeCl₃ 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration bleu-verte (tanins Cathéchique) ou bleu-noire (tanins Gallique) (Trease et Evans, 1987).

I-4- Les composés phénoliques

I-4-1-Méthode d'extraction

Dans notre étude, l'extraction est effectuée par l'utilisation d'un solvant organique à polarité Méthanol (MeOH) pour l'extraction des principes actifs à partir de la plante de *Rosmarinus Officinalis* L.

➤ Extraction assistée par macération (EAM)

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation. L'opération bien que généralement longue et à rendement souvent médiocre, est utilisée dans le cas d'extraction de molécules thermosensibles (Leybros et Fremeaux, 1990).

I-4-1-1- Extraction des polyphénols totaux

) Principe

Il consiste à dissoudre le principe actif à l'intérieur du solide et l'entraîner à l'extérieur, la plupart des auteurs suggèrent que l'entrée du solvant se fait par mécanisme osmotique et la sortie du soluté par dialyse ou par diffusion. Le solvant utilisé dans cette présente étude est le méthanol (Ribereau, 1982). Le rendement d'extraction en polyphénols augmente aussi avec le temps de contact du solvant (Lapornik *et al.*, 2005).

) Mode d'opération

La macération consiste à émerger 20g de poudre dans 200 mL de Méthanol pendant 24h à température ambiante, ensuite la filtration avec du papier filtre et récupération du solvant par évaporation dans un rotavapeur à 55°C, puis récupération de l'extrait avec 3mL de DMSO ; et conservé a 4°C jusqu'à l'utilisation (Rebaya *et al.* , 2015) voire la figure13.

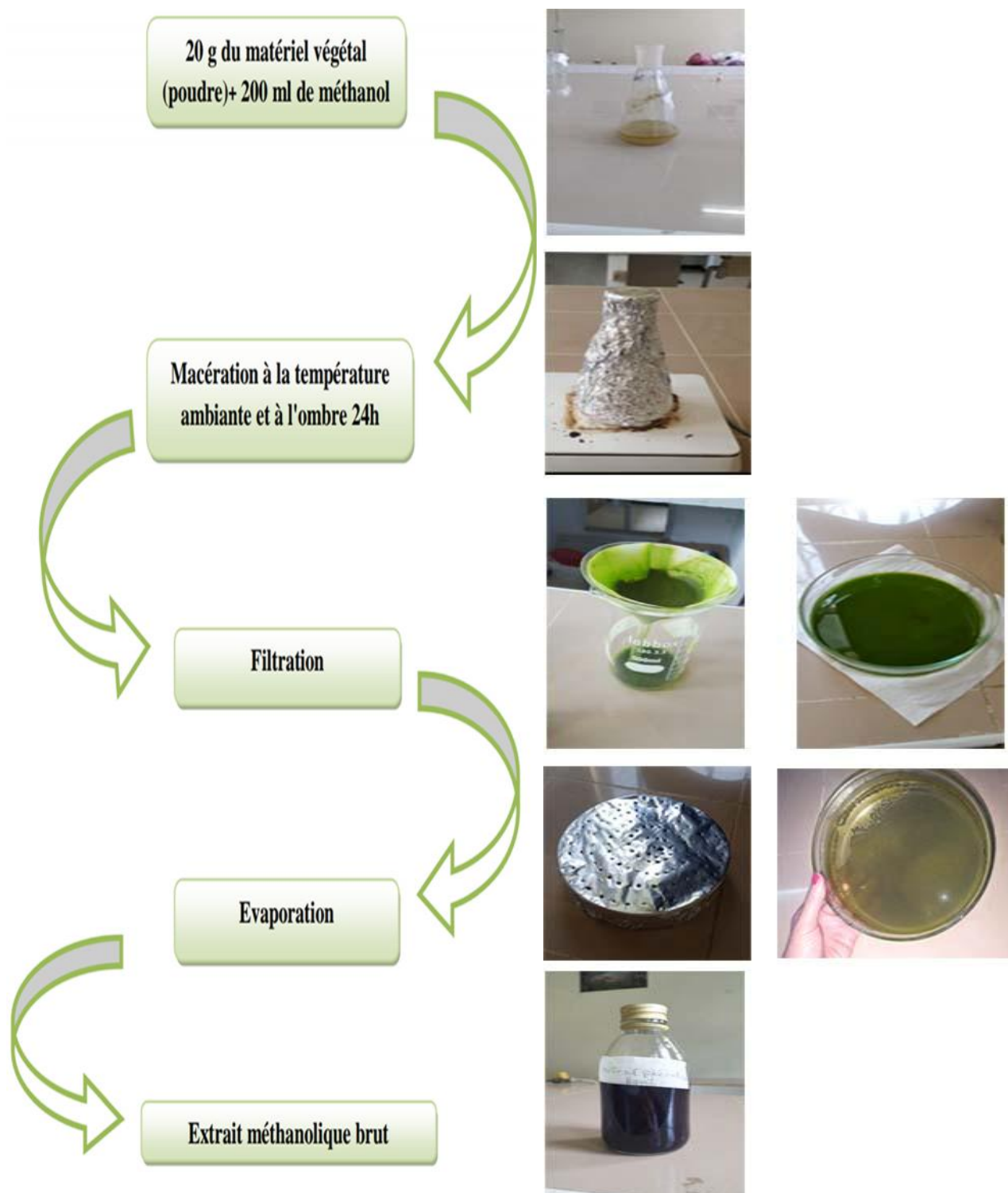


Figure 13 : Protocole de préparation d'extrait méthanolique des polyphénols totaux par macération.

4-1-2- Extraction des flavonoïdes

Les résultats de Hassan *et al.*, (2007) ont mis en évidence l'existence des flavonoïdes dans le romarin, pour extraire ces flavonoïdes nous avons procédé à la technique ci-dessous.

) Principe

Le protocole d'analyse selon Lebreton *et al.*, (1967), repose sur l'hydrolyse acide des hétérosides du matériel végétal, suivie d'une analyse des aglycones. Cette technique permet la séparation des anthocyanes et les aglycones flavonique.

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée à partir de la matière végétale sèche (MVS) contenue dans 1g de feuilles.

La technique consiste à broyé la MVS à sec puis l'hydrolyse est réalisée par 80mL d'HCl (2N) dans un bain Marie pendant 40min à 90°C avec une insufflation d'oxygène toutes les 10min qui permettent l'oxydation des pro-anthocyanes en anthocyanidines correspondants. Après l'addition de deux lavages de 35 mL d'éther diéthylique, deux phases se forment :

- la phase supérieure ou la phase étherée contenant les aglycones flavoniques.

- la phase inférieure ou la phase aqueuse qui contient les anthocyanes, les C-glycosides (en additionnant deux lavages de 35mL du n-butanol à la phase aqueuse obtenue).

La phase étherée est évaporée à sec, le résidu est repris dans 10mL d'éthanol pour le dosage.

Les étapes précédentes sont illustrées dans le diagramme ci- dessous (figure 14). Les trois extraits obtenus ont été laissés sécher jusqu'à obtention d'un résidu sec puis récupérés avec quelques millilitres de DMSO. Le poids de chaque extrait sec a été déterminé et ceci nous permet de calculer la concentration des solutions mères de nos extraits. La figure 14 résume toutes les étapes de l'extraction.

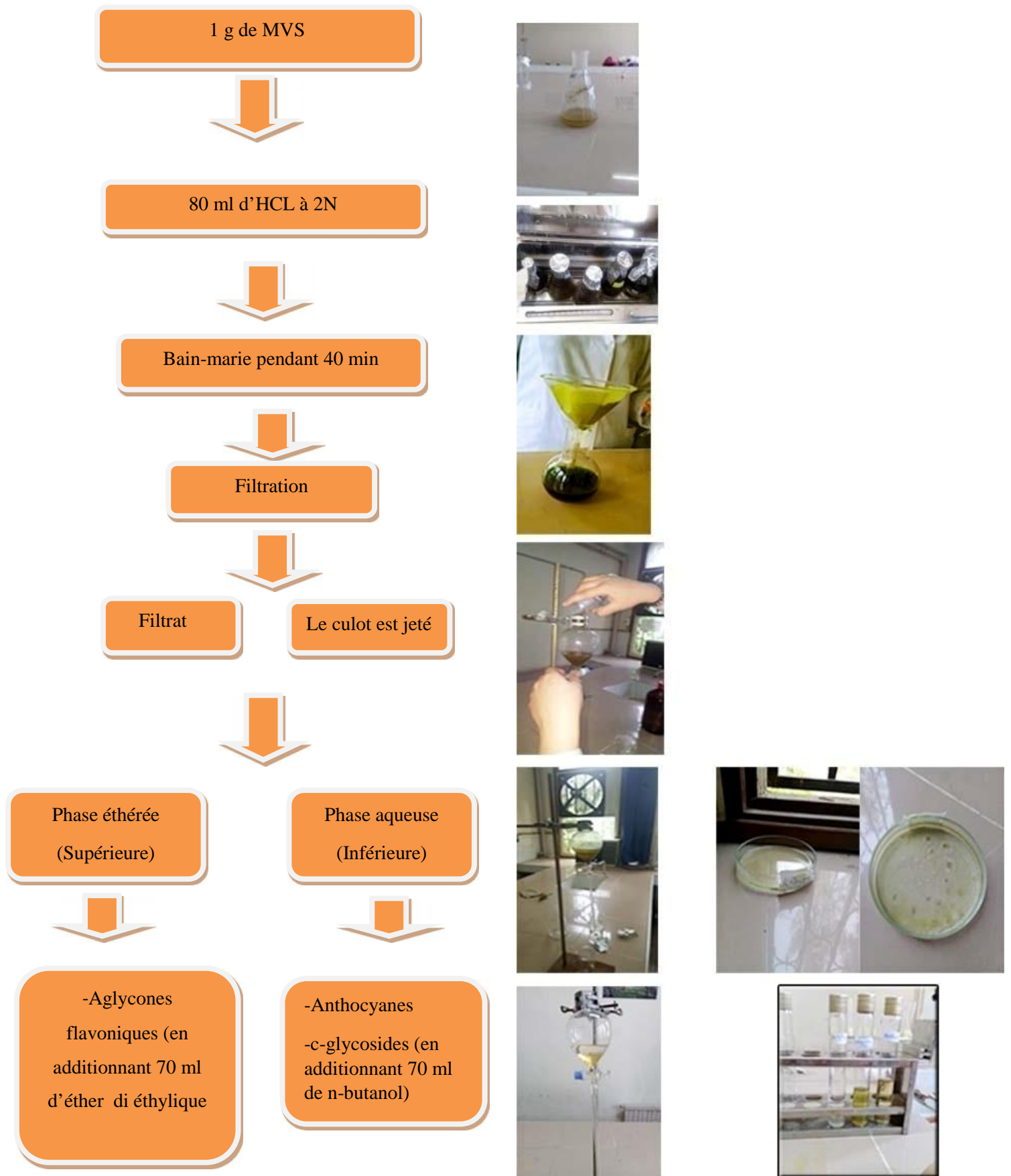


Figure 14 : extraction des flavonoïdes.

A partir du résidu sec étheré repris dans 5mL d'éthanol à 95°, nous réalisons une dilution d'une part avec l'éthanol 95°et d'autre part avec une solution alcoolique de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 1% laisser agir pendant 15min. La lecture des aglycones flavoniques se fait à l'aide d'un spectrophotomètre type UV/Visible à 420 nm.

I-5- Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)

I-5-1- Spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert.

La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier. Lorsqu'une lumière d'intensité I₀ passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I₀
L'absorbance de la solution est définie comme suit :

$$A = -\log T \quad \text{Avec } T \text{ (transmittance)} \quad T = I/I_0$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible (Wafa, 2015).

I-5-2- Analyses quantitatives

I-5-2-1- Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux peuvent être dosés par le réactif de Folin-Ciocalteu's reagent (El hajaji *et al.*, 2011).

En milieu basique, le réactif de Folin-Ciocalteu oxyde les groupements oxydables des composés phénoliques présents dans l'échantillon à doser. Les produits de réduction de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des polyphénols totaux présents dans l'échantillon (Veillet, 2010).

La quantification des polyphénols totaux a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait méthanolique (mg EAG/g).

- ✓ Préparation de folin: 1 volume de folin + 9 volumes de l'eau distillée.
- ✓ Préparation de la solution de Na_2CO_3 : 7.5g de carbonate de sodium anhydre ont été dissouts dans 100mL d'eau distillée.
- ✓ Préparations des solutions d'acide gallique :

Dans une fiole jaugée de 100mL dissoudre 0.5g d'acide gallique dans 10mL d'éthanol et dilués avec de l'eau distillée de façon à obtenir des concentrations différentes.

- ✓ Courbe d'étalonnage :

Elle est réalisée avec la mesure des densités optique des solutions de différentes concentrations d'acide gallique.

) Principe

La teneur phénolique totale est déterminée avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant le Folin- Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline (Vuorela , 2005).

Dissoudre 200 μL de chaque extrait dans le méthanol et ajouter 1mL de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions sont mélangées et incubées pendant 4 min. Après l'incubation 800 μL de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (75g/L) a été ajoutée. Le mélange final est secoué et puis incubé pendant 2h dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm.

) Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique et exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (mg EAG/mg).

I-5-2-2- Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) citée par (Boudiaf, 2006) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits. Le contenu en flavonoïdes des extraites a été déterminé en suivant le protocole de Quettier-deleu *et al.*, (2000), avec quelques modifications.

) Principe

Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres en présence de chlorure d'aluminium, grâce aux groupements hydroxyles libres (Ribereau-gayon, 1968). Ainsi la couleur jaune obtenue est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes dans l'extrait.

) Procédure expérimentale

A température ambiante, 0.5mL de la solution d'extrait est ajouté à 0.5mL d'une solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3), le tout est bien mélangé. Après incubation pendant 15min à l'obscurité, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 430nm contre un témoin préparé suivant la même méthode sauf que chaque extrait est remplacé par son solvant.

1. Dosage des proanthocyanes

La lecture des extraits s'établit par spectrophotométrie à 520 nm.

La teneur absolue en anthocyanes est calculée par la formule suivante dont le coefficient correctif est égal à 6 (Lebreton *et al.*, 1967).

$$T \text{ (en mg/g)} = 5,2 \times 10^{-2} \times \text{DO} \times V \times d/p$$

2. Dosage des C-glycosylflavones

La lecture des extraits s'établit également par spectrophotométrie à 340 nm et la teneur absolue est calculée par la formule suivante :

$$T \text{ (en mg/g)} = 2.37 \times 10^{-2} \times \text{DO} \times V \times d/p$$

3. Dosage des aglycones flavonique

Pour déterminer la teneur en aglycones, nous utilisons la méthode du dosage différentiel, qui est basée sur deux dilutions :

La 1^{ère} dilution se fait dans de l'éthanol (extrait étheré + éthanol 95°).

La 2^{ème} dilution se fait dans la solution d' AlCl_3 (Extrait étheré + AlCl_3 dans l'éthanol 95°).

La solution d'AlCl₃ se fait par le mélange de 1g de chlorure d'aluminium dans 100mL d'éthanol 95°.

A partir du résidu sec étheré repris dans l'éthanol à 95°, nous réalisons une dilution d'une part avec l'éthanol 95° (cuve de référence) et d'autre part avec une solution alcoolique de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 1% (cuve de mesure), après réaction avec le AlCl₃ pendant 15min, la lecture des aglycones flavoniques se fera entre 400 et 435 nm au spectrophotomètre. Concernant le dosage des aglycones flavonique (420nm) et des flavonols (435nm), la formule utilisée est la suivante :

$$T \text{ (mg/g)} = 1,3 \times 10^{-2} \times DO \times V \times d/p$$

T : teneur différentielle des aglycones flavoniques exprimée en mg par g de M.V.S.

P : poids sec du matériel végétal hydrolysé.

DO : densité optique du pic différentiel égale à DO (AlCl₃) – DO (éthanol 95°).

P : poids sec du matériel végétal hydrolysé en g.

V : volume de la solution méthanoïque / éthanolique.

d : facteur de dilution.

I-6. Activités biologiques**I-6-1- Activité antimicrobienne des composés phénoliques et flavoniques****I-6-1-1- Méthode de diffusion (Aromatogramme)**

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne des composés phénoliques et flavonoïdes présents dans nos extraits obtenus par différentes méthodes d'extraction.

Pour étudier l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques, nous avons choisi la méthode de diffusion des disques sur milieu solide, ou méthode de Vincent, appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme (Rhayour, 2002). Afin d'y parvenir nous avons suivis ces étapes suivantes:

➤ Revivification et repiquage des souches utilisées

- Les souches ont été revivifiées dans un bouillon nutritif puis repiquer sur du BHI et laissées incuber dans l'étuve à 37° C pendant 24h.

➤ Préparation de l'inoculum et ensemencement des souches

- 3 à 5 colonies identiques ont été prélevées, puis elles ont été déchargées dans de l'eau physiologique stérile. Après homogénéisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex, la standardisation à 10^6 UFC/mL a été réalisée par spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620nm. La D₀ obtenue doit être comprise entre 0,08 et 0,1 ce qui correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 UFC/ml (UFC : Unité Formant Colonie).
- Les boîtes de Pétri stériles préalablement coulées avec 13 ou 15 mL de gélose (MH), ont été ensemencées avec l'inoculum à l'aide d'un écouvillon stérile. Placer les boîtes de Pétri à basse température (+4°C) pendant 15 à 30mn afin de permettre aux extraits de diffuser dans la gélose avant que les bactéries ne commencent à se multiplier ;
- Retirer les boîtes du réfrigérateur et les placer à l'étuve, à la température optimale de croissance du germe à étudier (37°C) pendant 24 h. Les boîtes doivent être placées couvercle en bas ;
- Les zones d'inhibition autour du point d'application des disques sont mesurées en millimètres après les 24h d'incubation (Kosalek *et al.*, 2013).

La lecture des résultats est estimée par la mesure du diamètre de zone d'inhibition autour des disques imprégnés des différents extraits.

Trois cas sont possible:

- Souche résistante : Absence de zone d'inhibition,
- Souche sensible : la dimension du diamètre de la zone d'inhibition est égale ou supérieure à 10mm.
- Souche (intermédiaire) : la dimension du diamètre de la zone d'inhibition est inférieure à 10mm.
-

I-6-1-2- Détermination des CMI (Concentration Minimale Inhibitrice)

La CMI est définie comme la plus petite concentration d'extrait pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans extrait.

Les CMI sont déterminées par la méthode standardisée de micro-dilution en milieu liquide. L'étude est réalisée en microplaques en matière plastique comportant 96 puits à fond « U » (8 rangées de 12 puits numérotés de 1 à 12) en bouillon Mueller- Hinton, avec un inoculum bactérien final. Les microplaques sont incubées 18h à 37°C pendant 24 H.

La détermination des (CMI) a été réalisée que pour les extraits qui se sont avérés les plus performants, à savoir : l'extrait 2 (les anthocyanes) et l'extrait 3 (les C-glycosides).

Les dilutions d'échantillons ont été distribuées dans les cupules en partant de la concentration la plus forte à la plus faible (tableau III).

Tableau III : Tableau illustrant les dilutions d'extraits pour la détermination des CMI.

Rapport de dilution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Concentration de l'extrait 2 (mg/mL).	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81
Concentration de l'extrait 3 (mg/mL).	183,36	91,68	45,84	22,92	11,46	9,73

I-6-2- L'évaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer « *in vitro* » l'activité antioxydante par piégeage des différents radicaux selon la méthode de FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant parameter) ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH (diphényl picrylhydrazyle).

I-6-2-1- Réduction du fer : FRAP (FerricReducingAntioxidant Power)

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe^{2+} , la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu-verte du fer ferreux (Fe^{2+}) (Ou *et al.*, 2001) selon la (figure15).

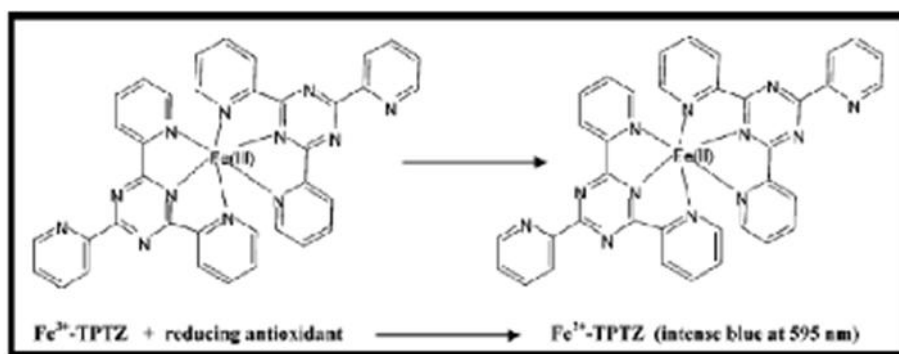


Figure 15 : Schéma sur la réaction de test FRAP (Prior RI *et al.*, 2005).

Le protocole expérimental utilisé est celui de Yildirim., Mavi., et Kara (2001) où 1mL d'échantillon à différentes concentrations, est mélangé avec 1mL d'une solution tampon phosphate à 0.2 M (pH= 6.6) et 1mL d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 1mL d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000g pendant 10 min. 1mL du surnageant est ajouté à 1mL d'eau distillée et 100µL d'une solution de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 0.1% (figure16). La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS). Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Singleton et Rossi, 1965).

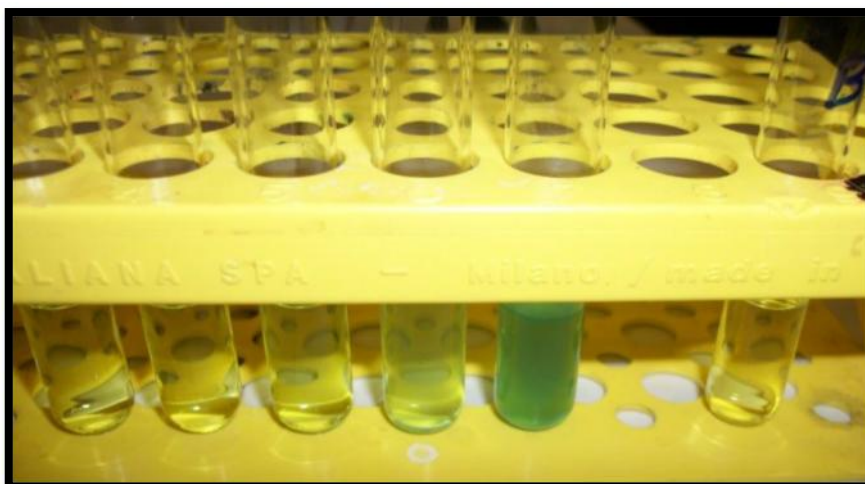


Figure 16 : Réduction du fer ferrique en fer ferreux.

I-6-2-2- Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) :

Le composé chimique DPPH fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (Blois 1958; Brandwilliams *et al.*, 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont, d'azote (Figure 17) (Popovici *et al.*, 2009).

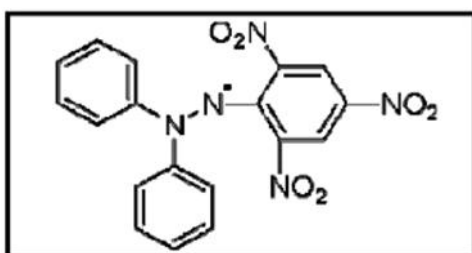


Figure 17 : Structure chimique du radical libre DPPH (Popovici *et al.*, 2009).

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Vis, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (Molyneux, 2004). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyle) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Figure 18) (Sanchez-moreno , 2002 ; Maataoui *et al.*, 2006).

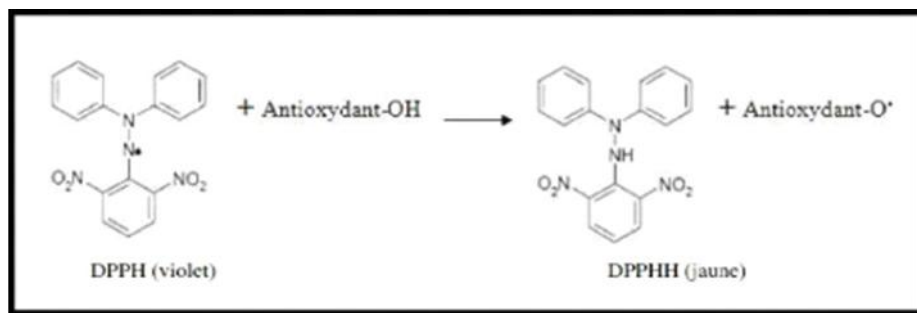


Figure 18 : Réaction de test DPPH (Congo, 2012).

L'activité du piégeage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par Lopes-lutz *et al.*, (2008) et Athamena *et al.*, (2010). 1mL de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 1mL de la solution méthanoïque du DPPH. Parallèlement, un témoin négatif est préparé en mélangeant 1mL de méthanol avec 1mL de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à 37°C. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration (Bougandoura, 2013). Le test est répété trois fois et les résultats ont été exprimés en pourcentage de réduction du DPPH (PI%) selon la formule suivante :

Les valeurs des concentrations pour inhiber ou réduire 50% de la concentration initiale du DPPH (IC50) ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire ou logarithmiques des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de chacun des extraits testés (Scherer et Godoy, 2009 ; Fabri *et al.*, 2009).

$$I \% = [1 - (\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

II- Résultats et discussion





II-1- Screening chimique


Les tests phytochimiques consistent à détecter les différents composés existants dans nos échantillons par la caractérisation qualitative. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques.

Les résultats du criblage phytochimique sont reportés dans le tableau IV ci-dessous. Ils révèlent la présence ou l'absence d'un groupe de métabolites secondaires.

Tableau IV: Résultats des tests phytochimiques de *Rosmarinus officinalis* L.

(-) Négative; (+) Faiblement positif. (++) Positif; (+++) fortement positif.

Métabolites Secondaires	Remarque	Résultats	coloration
Flavonoïdes	Apparition d'une couleur rose orangée.	+++	
Anthocyanes	Apparition d'une couleur violée qui vire au bleu violacé par acidification.	++	
Polyphénols	Apparition de la couleur vert noirâtre.	+++	
Tanins	Apparition de la coloration bleu-vert (tanins Cathéchique) et bleu-noire (tanins Gallique).	+	

Flavonols et flavonones	Apparition de la coloration rouge (flavonols) et le rouge violacée (flavonones).	+	
-------------------------	--	---	---

Flavonoïdes : transformation de la solution en couleur rose orangée; indiquant la présence des flavonoïdes dans notre plante.

Anthocyanes : la coloration violée, montre la présence des anthocyanes dans notre solution.

Polyphénols : la coloration vert noirâtre, indique que l'espèce *Rosmarinus officinalis* L. est très riche en polyphénols.

Tanins : nous remarquons la transformation de la solution en couleur bleu-verte, indiquant la présence de tanins cathéchiques et bleu-noire pour les tanins Galliques. L'espèce *Rosmarinus officinalis* L. contient bien des tanins.

Flavonols et flavonones : Ces deux composés sont mis en évidence par la présence de colorations rouge et rouge violacée.

Le criblage phytochimique des extraits méthanoliques des feuilles du romarin montre que cette plante contient : les tanins, les flavonoïdes, les polyphénols totaux, les anthocyanes, les flavonols et flavonones.

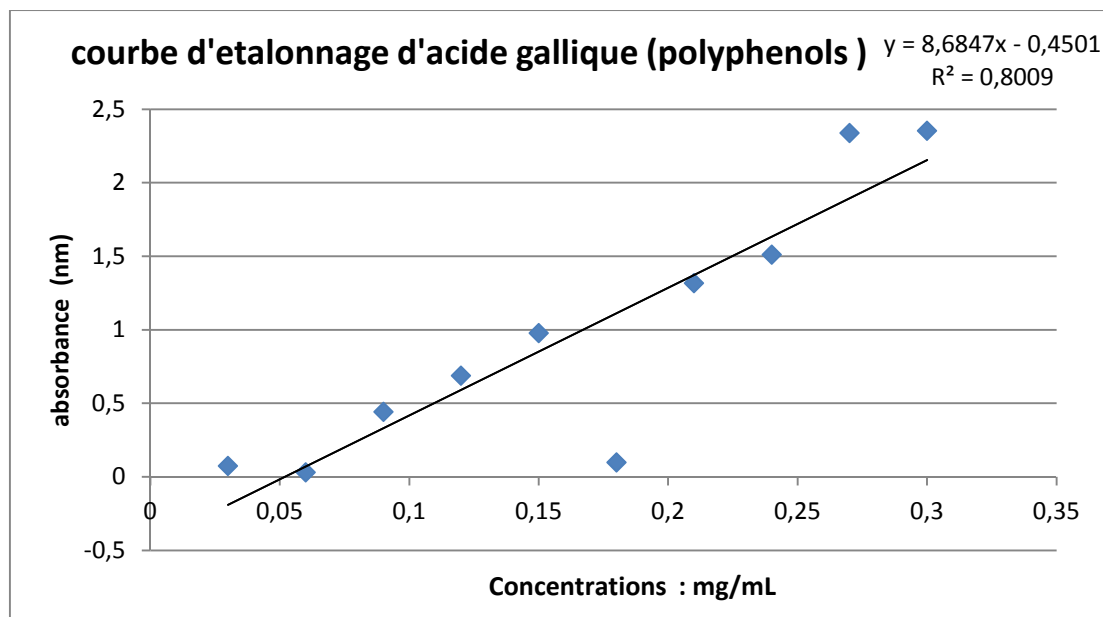
II-2- Dosage des phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux contenus dans les différents extraits ont été déterminées par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Afin de caractériser l'extrait préparé à partir des feuilles de *Rosmarinus Officinalis* L., la quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y=ax+b$) (figure 19) réalisée par une solution étalon (l'acide gallique) à différentes concentrations (Tableau V).

La mesure de l'absorbance d'extrait méthanolique a été effectuée à une longueur d'onde 760nm. Les résultats obtenus sont reportés sur le tableau suivant :

Tableau V : Variation de la DO en fonction des concentrations de l'acide gallique.

Concentration (mg/mL)	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15	0,18	0,21	0,24	0,27	0,30
D,O (nm)	0,075	0,310	0,443	0,687	0,978	0,981	1.317	1.510	2.337	2.353

**Figure 19 :** Droite d'étalonnage d'acide gallique.**Tableau VI :** Teneur des polyphénols totaux d'extrait méthanolique des feuilles.

L'extrait des polyphénols totaux	Feuilles
La concentration mg EAG/g d'extrait	12.87

Le dosage des polyphénols totaux nous a permis de quantifier la teneur correspondante de l'extrait étudié, rapportée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g Extrait).

Généralement, toutes les plantes de la famille des *Lamiacées* sont connues pour leur composés phénoliques (Gortzi *et al.*, 2007 ; Fecka et Turek, 2008). En effet, nous avons constaté que tous nos extraits renferment des phénols dont les teneurs augmenteraient avec la polarité du solvant d'extraction.

Les résultats obtenus indiquent que la quantité des composés phénoliques est relativement importante dans les feuilles du romarin (12,87 mg EAG/g Ex).

Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre et d'un organe à un autre, cela peut être dû à plusieurs facteurs, à savoir : facteurs climatiques, patrimoine génétique, le stade de développement de la plante et la période de sa récolte ainsi que la méthode d'extraction et celle de la quantification des composés d'intérêt biologique.

La teneur des polyphénols dans les feuilles du romarin est moindre à celle trouvée par Ekran *et al.*, (2008) : (162 mg EAG/g Ex) ; et Ho *et al.*, (2008) : (127 mg EAG/g Ex), mais assez proche de celle de Tsai *et al.*, (2007) : (58.1 mg EAG/g Ex) et Tawaha *et al.*, (2007) : (39.1 mg EAG/g Ex).

La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles, non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et protéines etc... (Vuorela , 2005 ; Gomez-caravaca *et al.*, 2006).

II-3- Analyses quantitatives des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes à partir du broyat des feuilles séchées du *Rosmarinus officinalis* L. a permis d'obtenir trois classes flavoniques. Celles des anthocyanes, des Aglycones et les C-glycosides. Les résultats du dosage par spectrophotométrie des extraits flavoniques de la plante et leurs teneurs sont représentés dans le tableau VII.

Tableau VII : Les résultats des dosages et les teneurs des trois classes des flavonoïdes.

D,O / T		D,O (nm)	Teneur (T)
Extraits			
Anthocyane		0,310	1.13 mg/g
C-glycoside		0.088	0.07 mg/g
Aglycone	Aglycones flavoniques	0.655	0.045mg/g
	Flavonols	1	

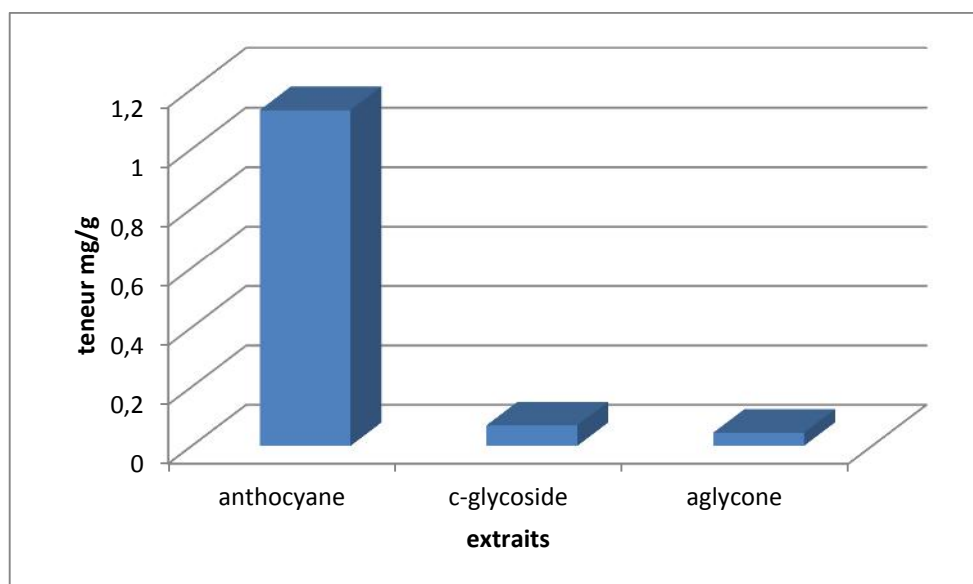


Figure 20 : Histogramme montrant la teneur des trois classes des flavonoïdes.

Les anthocyanes représentent la classe la plus importante dans les feuilles de *Rosmarinus officinalis L.* avec une valeur de 1.13 mg/g. Les C-glycosides et les Aglycones présentent les valeurs les plus basses 0.07 mg/g et 0.045mg/g respectivement.

D'après les résultats de Ho et ses collaborateurs (2008), l'extrait méthanolique du romarin est riche en polyphénols et pauvre en flavonoïdes. En outre, Tsai *et al.* (2007) ont également trouvé que l'extrait méthanolique du romarin contient 60.7 ± 1.1 mg EC/g. Une teneur très élevée par rapport à nos résultats, cette différence trouve probablement son explication dans la différence du standard utilisé pour le dosage des flavonoïdes.

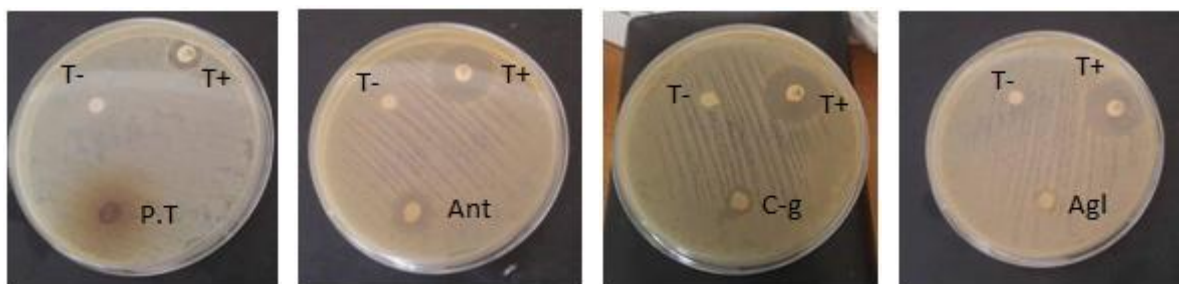
Maisuthisakul *et al.*, (2008) ont constaté que la teneur totale des flavonoïdes des extraits méthanoliques des 28 plantes, est liée à la teneur des composés phénoliques totaux.

II-4- Activité antibactérienne

II-4-1- Détermination de la méthode de diffusion des disques

Les extraits de *Rosmarinus officinalis L.* ont été testés sur les souches bactériennes suivantes: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Les résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits sont indiqués dans les figures 21 et 22.

La méthode d'aromatogramme sert à prédire la sensibilité d'un germe aux substances étudiées. Les résultats de la technique de Vincent par l'utilisation de la gentamicine comme témoin positif et le méthanol comme témoin négatif sur les différentes souches bactériennes étudiées sont représentés dans les figures ci-dessous.



Extrait 1 :
Polyphénols totaux

Extrait 2 :
Anthocyanes

Extrait 3 :
C-glycosides

Extrait 4 :
Aglycones

Figure 21 : Zones d'inhibitions de la gentamicine et des différents extraits du romarin obtenus sur la souche bactérienne *E.coli* testée.



Extrait 1 :
Polyphénols totaux

Extrait 2 :
Anthocyanes

Extrait 3 :
C-glycosides

Extrait 4 :
Aglycones

Figure 22 : Zones d'inhibitions de la gentamicine et des différents extraits du romarin obtenus sur la souche bactérienne *S. aureus* testée.

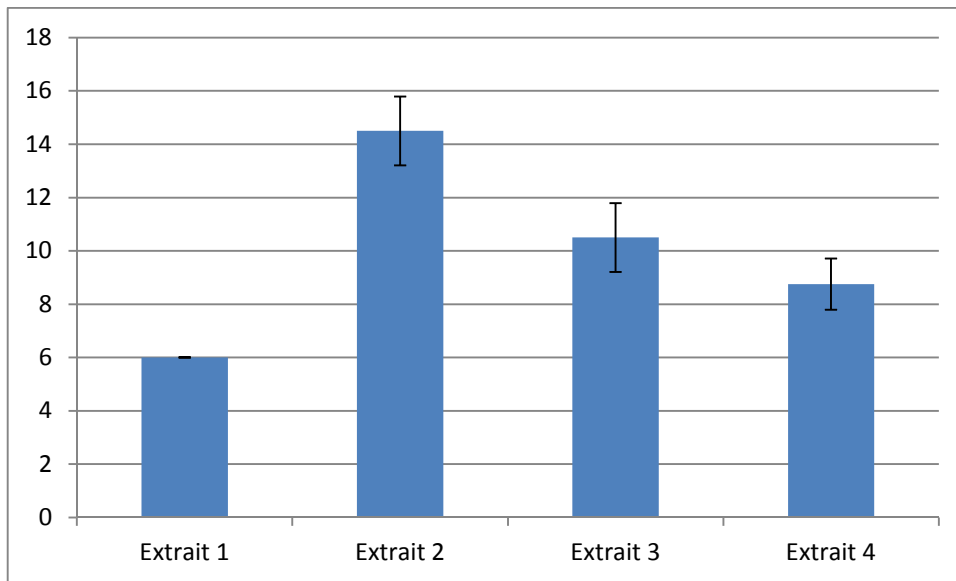


Figure 23 : Le pouvoir antibactérien des extraits sur *E.coli*.

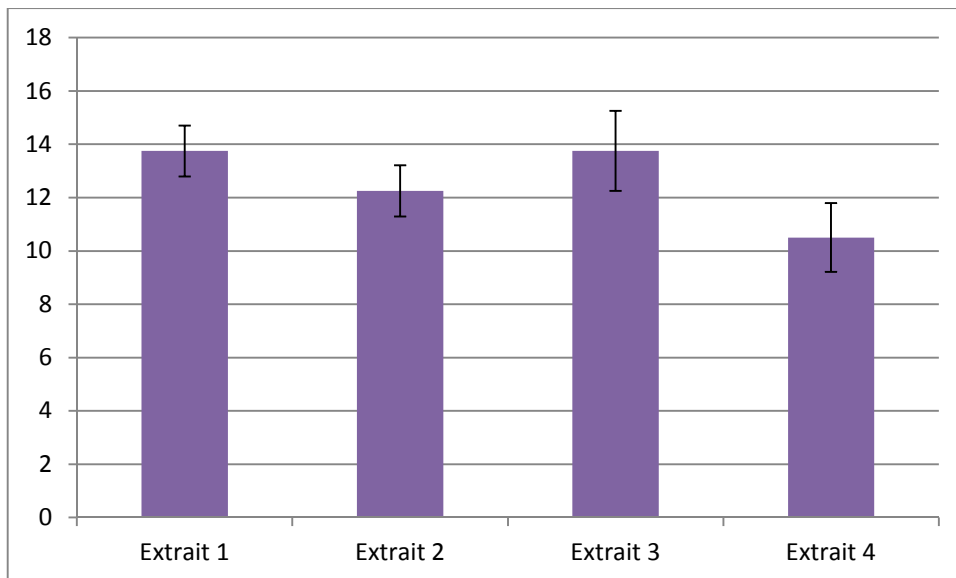


Figure 24: Le pouvoir antibactérien des extraits sur *S.aureus*.

Les figures 23 et 24 montrent la présence d'une activité antibactérienne pour la plupart de nos extraits (Anthocyanes) et (C-glycosides) sur les souches testées *S. aureus* et *E. coli* avec les diamètres d'inhibition de 13 mm et 14mm respectivement.

Nous constatons ainsi que les polyphénols totaux n'ont pas d'effet sur *E.Coli* et une sensibilité moyenne pour la souche de *S.aureus* d'un diamètre de 13mm. Avec les Aglycones les deux souches présentent une zone d'inhibition de 8mm pour *E. coli* et de 10mm pour *S.aureus*.

La souche *E. coli* possède un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des deux extraits du romarin (Polyphénols, Aglycones). Par contre une activité importante a été remarquée pour *S. aureus* à des faibles concentrations des quatre extraits de la plante.

De plus nos résultats viennent consolider ceux rapportés par (COWAN, 1999) que les composés phénoliques montrent la plus grande activité antibactérienne et que la souche *S. aureus* est plus particulièrement sensible aux composés phénoliques.

Plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram (+) par rapport aux Gram (-) (Kone *et al.*, 2004 ; Hayouni *et al.*, 2007 ; Turkmen *et al.*, 2007 ; Shan *et al.*, 2007 ; Falleh *et al.*, 2008), Ceci peut s'expliquer par la différence dans les couches externes des bactéries Gram (-) et Gram (+).

S. aureus à Gram positif sont plus sensibles que les bactéries à Gram négatif. La résistance de ces dernières n'est pas surprenante, en fait, ces bactéries possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides qui est en relation avec la nature de leurs membranes externes composées de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes (Mann *et al.*, 2000).

L'huile essentielle et l'extrait méthanolique de romarin (Blida et Djelfa) ont montré une activité importante sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif, ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes (Burt S, 2004).

II-4-2-Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Après la mise en évidence de l'activité antibactérienne de nos extraits bruts par la méthode des disques, nous avons essayé de déterminer les concentrations minimales inhibitrices CMI relatives aux deux extraits les plus performants.

La méthode de microplaque nous a permis de déterminer les valeurs des CMI qui varient de 62.5 à 11.5mg/mL (TableauVIII). Les résultats de la détermination des CMI montrent une variabilité dans la sensibilité des souches aux différentes concentrations de l'extrait.

La croissance bactérienne diminue avec l'augmentation de la concentration d'extrait et plus les CMI sont faibles plus l'activité antibactérienne des extraits est meilleure.

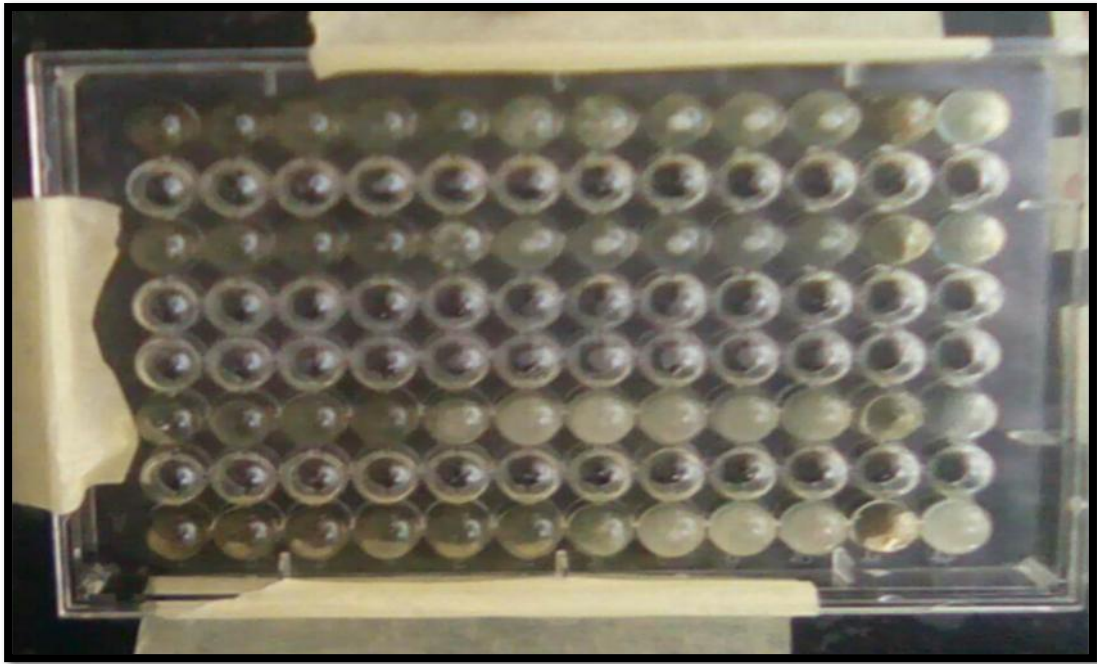


Figure 25 : Résultats de la CMI en milieu liquide.

Tableau VIII : Valeurs de la CMI des deux extraits.

Extraits	Extrait 2	Extrait 3
Souches bactériennes		
<i>Staphylococcus aureus</i>	62,5 mg/mL (1/8)	11,5 mg/mL (1/32)
<i>Escherichia coli</i>	31,25 mg/mL(1/16)	45,84 mg/mL (1/8)

Les criblages des activités antibactériennes a permis de conclure que la 1/8 est la concentration minimale inhibitrice qui donne une réponse classée comme sensible pour la souche *S. aureus* à l'extrait 2 « anthocyanes » et la concentration 1/32 pour l'extrait 3 « C-glycosides ». Concernant la souche d'*E.coli*, elle est considérée comme sensible à la concentration 1/16 pour les anthocyanes et à la concentration 1/8 pour les C-glycosides.

II-5- Activité antioxydante

II-5-1- Méthode de DPPH

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis L.* est mesurée en présence d'un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique.

L'activité du radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est estimée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm. La réduction du DPPH aboutit à un changement de la couleur (DPPH) violette vers le jaune (DPPH-H).

La capacité de la réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance déduite par des substances anti radicalaires.

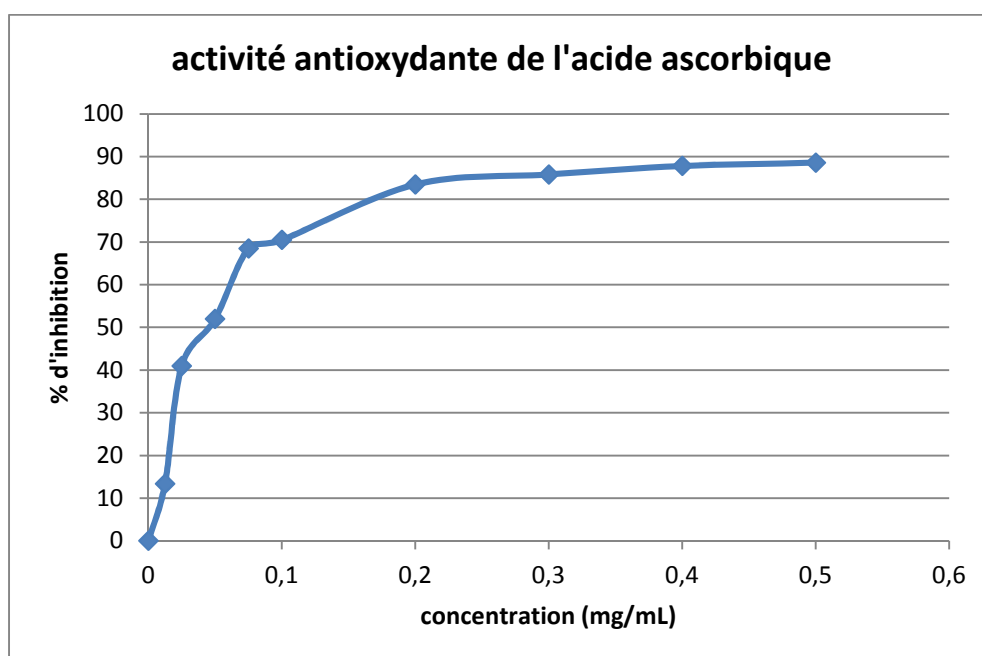


Figure 26 : % d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations de l'acide ascorbique.

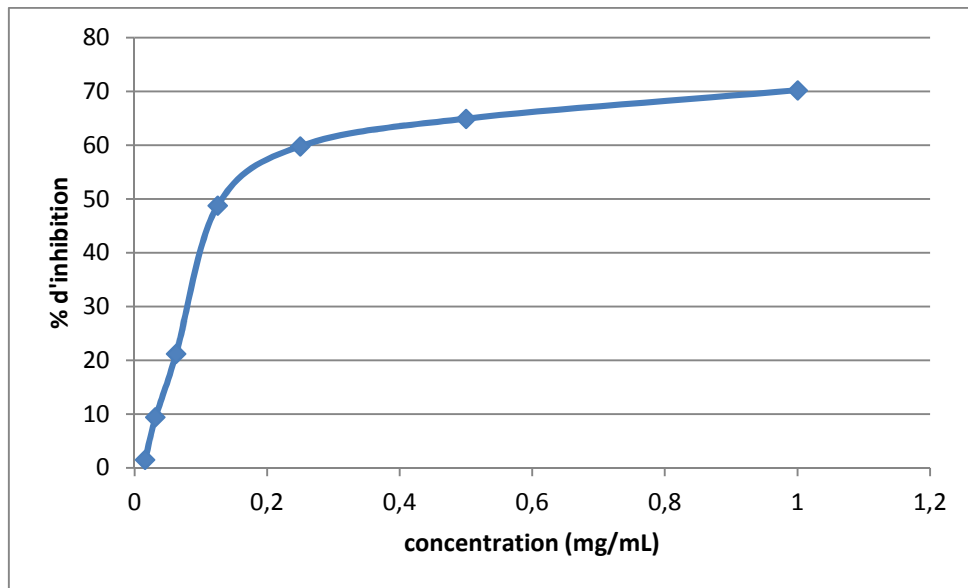


Figure 27: % d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations des polyphénols totaux.

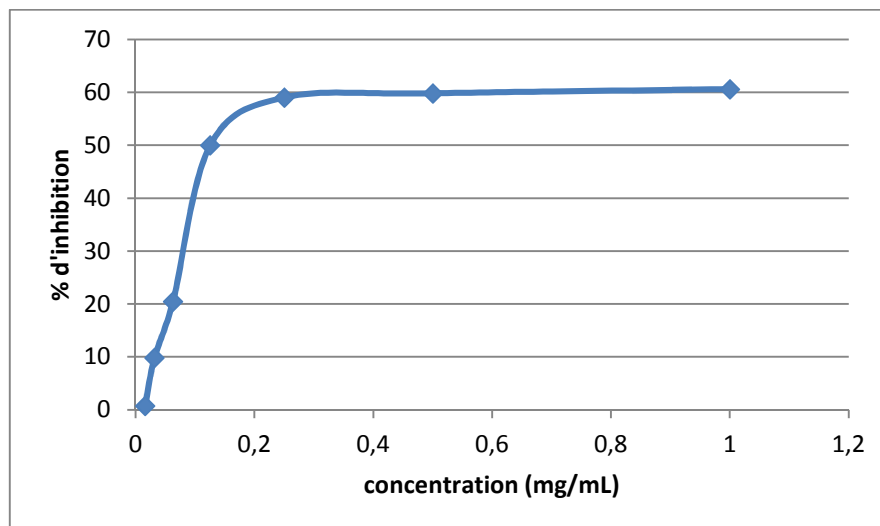


Figure 28: % d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations des Anthocyanes.

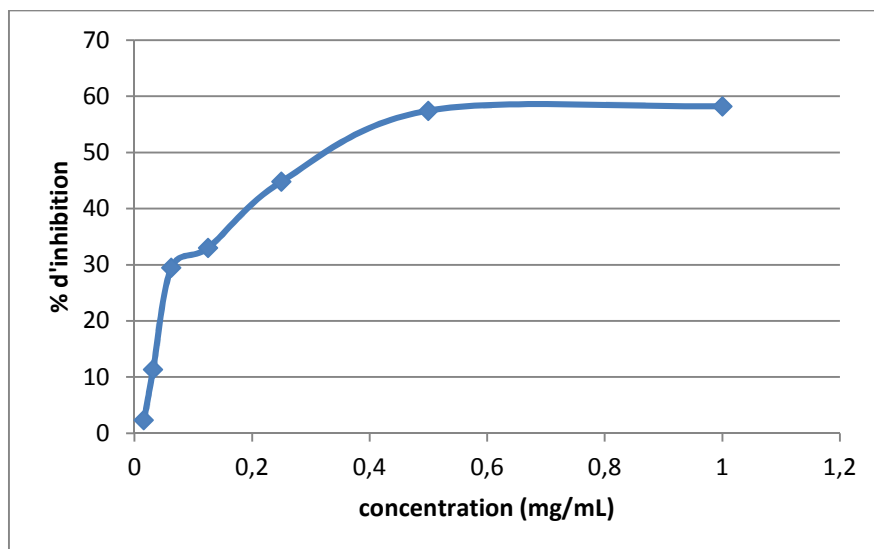


Figure 29: % d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations des C-glycosides.

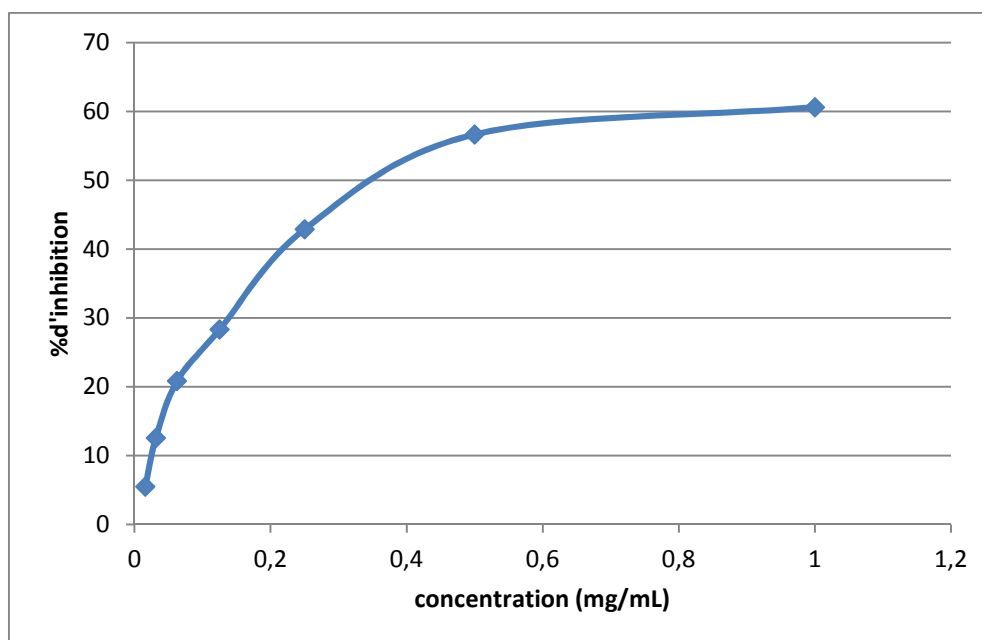


Figure 30 : % d'inhibition du radical libre en fonction des concentrations des Aglycones.

D'après les résultats obtenus nous avons remarqué que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration. Le taux d'inhibition du DPPH enregistré en présence des différents extraits de la plante est inférieur à celui de l'acide ascorbique.

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit le paramètre IC50.

Evaluation de l'IC50

Il exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée ce qui indique l'efficacité de l'extrait (Pokorny *et al.*, 2001).

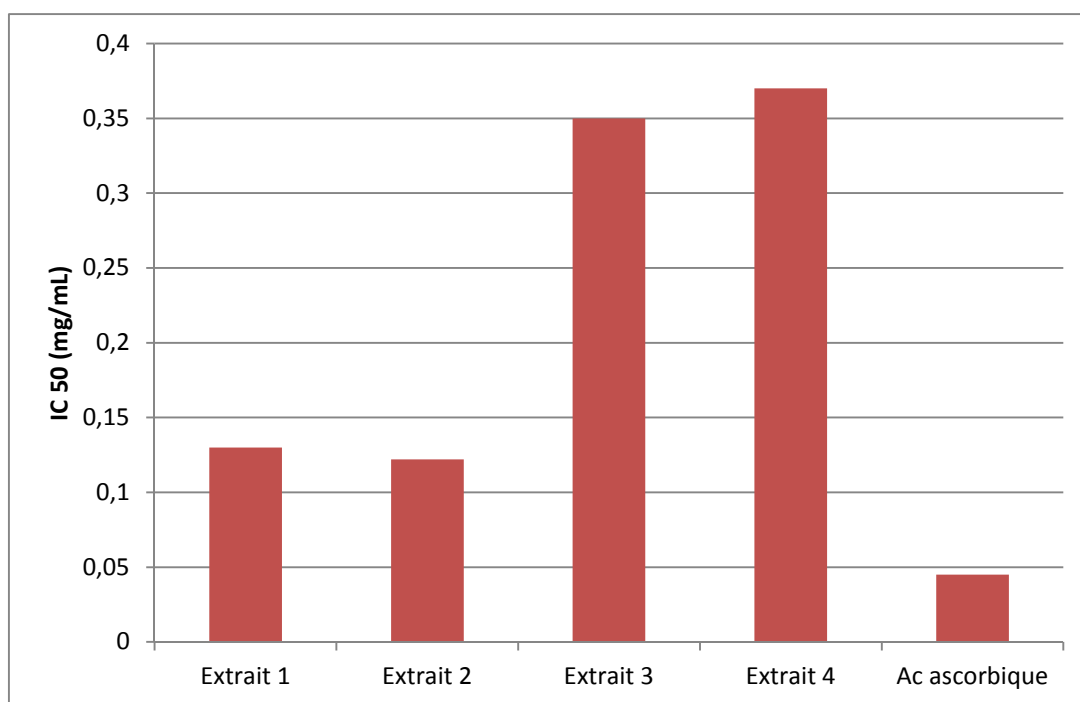
La concentration de l'échantillon essentielle pour inhiber 50% du DPPH radicalaire, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibitions calculés en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés. L'IC50 et l'activité antioxydante de l'extrait testés sont inversement proportionnels (Prakash *et al.*, 2007).

Les valeurs des IC50 trouvées pour tous les extraits testés figurent dans le tableau IX et dans la figure31.

Tableau IX : Valeurs des IC50 trouvées pour les extraits de notre plante.

Echantillons	IC50 (mg/mL)
Acide ascorbique	0.045
Polyphénols totaux	0.130
Anthocyanes	0.122
C-glycosides	0.350
Aglycones	0.370

Les résultats de l'activité anti radicalaire des extraits des feuilles de *Rosmarinus officinalis L.* montrent que les quatre extraits testés possèdent une activité anti radicalaire avec un IC50 de l'ordre de 0,130mg/mL pour les polyphénols totaux et 0,122mg/mL pour les anthocyanes, 0,350mg/mL pour les C-glycosides et 0,370mg/mL pour les aglycones. L'antioxydant standard (l'Acide ascorbique) démontre un IC50% = 0,045 mg/mL (voir tableau IX).

**Figure 31**: Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices 50 des différents extraits en mg/mL.

Extrait 1 : polyphénols totaux

Extrait 2 : Anthocyanes

Extrait 3 : C-glycosides

Extrait 4 : Aglycones

D'après l'histogramme illustré dans la figure 39, nous pouvons classer les extraits par ordre de réactivité décroissante : l'acide ascorbique > anthocyanes > polyphénols totaux > C-glycosides > aglycones.

Il ressort des résultats du test DPPH qu'à une concentration de 1mg/mL, l'extrait des polyphénols totaux exerce un pouvoir de piégeage du radical libre DPPH à 70,25%. Tandis qu'à la même concentration, les anthocyanes inhibent ce radical libre à 60,63%. Par ailleurs, les C-glycosides exercent un pouvoir de piégeage de l'ordre 58,26%, pour les aglycones l'inhibition du DPPH est de 59,90% à cette même concentration.

En comparaison avec l'antioxydant standard (l'Acide ascorbique) démontre un IC50% = 0,045 mg/mL, par rapport aux quatre extraits du romarin. Nos résultats concordent avec rapporté par Jadith, (2005) qui est de l'ordre de 0,013mg/mL. Nous constatons aussi que l'extrait des anthocyanes possède une activité antioxydante supérieure à celle des deux autres extraits suivit par l'extrait des polyphénols. Notre résultat est presque identique à celui rapporté auparavant par Jadith, (2005) qui est de l'ordre de 0,013mg/mL.

La valeur d'IC50 de l'acide ascorbique que nous avons trouvé (0.05mg/mL) est proche de celle trouvée (0.07mg/mL) par Rached *et al.*, (2010). Concernant l'IC50 des aglycones concorde avec les résultats trouvés par Ouici, (2012) qui est de l'ordre de 0,40mg/mL.

Des études montrent que l'activité anti-radicalaire est corrélée avec le taux des flavonoïdes dans les extraits des plantes médicinales (Mariod *et al.* , 2009 ; Locatelli *et al.* , 2010).

D'autre part, il y a aussi une corrélation entre la concentration des polyphénols et l'activité antioxydante, ce qui confirme que les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. Ces résultats sont conformes avec ceux de plusieurs auteurs, qui ont rapporté une telle corrélation positive entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante (Makris *et al.*, 2007 ; Hua *et al.*, 2008 ; Angelov *et al.*, 2008 ; Berrin *et al.*, 2008).

En effet Falleh *et al.*, (2008) a montré que l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la concentration des polyphénols, mais également de la nature et de la structure des antioxydants dans l'extrait.

Généralement, les polyphénols ayant un nombre élevé des groupements hydroxyles présentent une activité antioxydante très importante (Heim, 2002 ; Torres *et al.*, 2007).

De nombreuses études suggèrent que toute plante riche en composants phénoliques est responsable de l'activité antioxydante (Khady *et al.*, 2009).

Une étude faite par Kang *et al.* (2003) a montrée que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité anti radicalaire.

Le classement des extraits selon la méthode du piégeage du radical DPPH est différent du classement obtenu par la méthode de réduction du fer.

II-5-2- Méthode de réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

L'activité réductrice des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* L. a été évaluée aussi en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est une analyse d'activité antioxydante rapide, reproductible, et facile à exécuter (Benzie et Strain, 1996).

La méthode est basée sur la capacité réductrice d'un composé à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} et servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Yang *et al.*, 2008). La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (Karagozler *et al.*, 2008). Par conséquent, Fe^{2+} est évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm (Chung *et al.*, 2002).

Des travaux antérieurs ont indiqué qu'il y a une relation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (Yildirim *et al.*, 2001).

Dans cette étude, nous avons testé la méthode de FRAP, des différents extraits de la plante. Les résultats obtenus ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Nous remarquons que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons (Ozturk *et al.*, 2007 ; Su *et al.*, 2008).

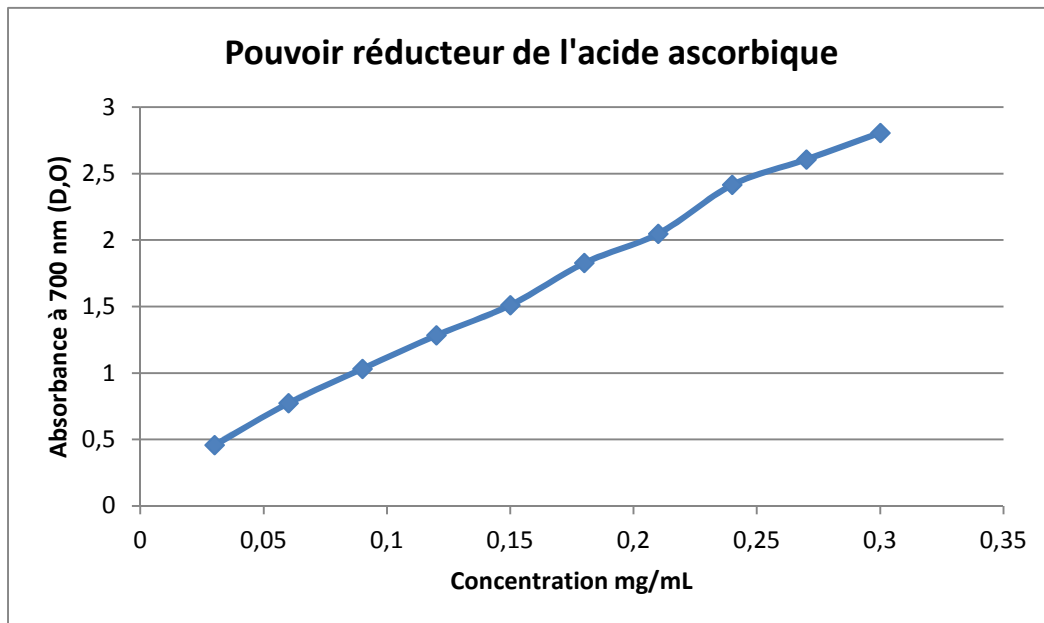


Figure 32: Pouvoir réducteur d'acide ascorbique.

D,O 1 : Densité optique du 1^{er} extrait « polyphénols totaux ».

D,O 2 : Densité optique du 2^{eme} extrait « anthocyanes ».

D,O 3 : Densité optique du 3^{eme} extrait « C-glycosides ».

D,O 4 : Densité optique du 4^{eme} extrait « aglycones ».

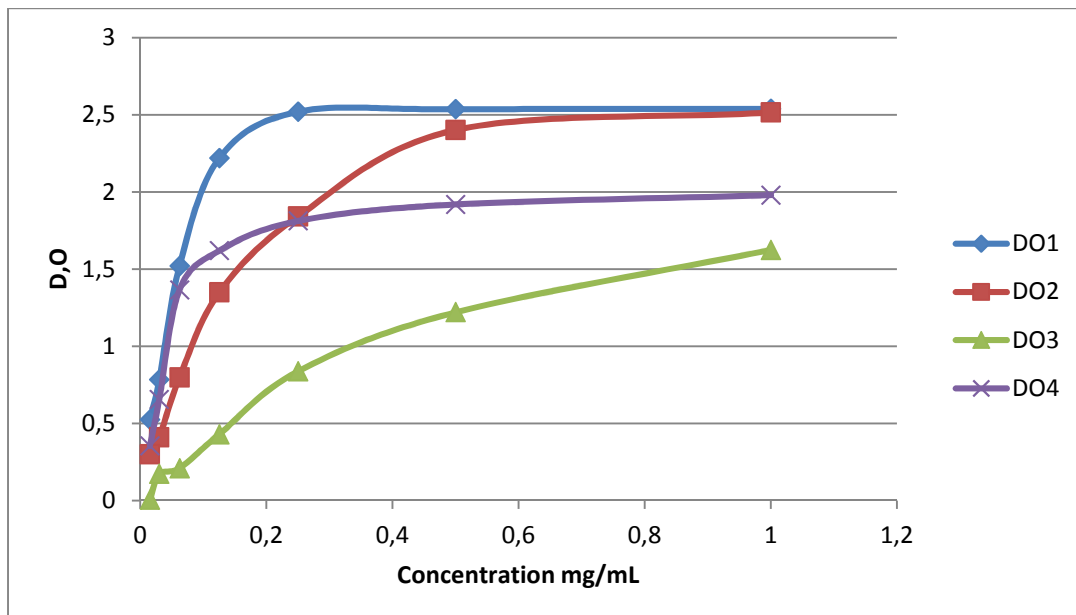


Figure 33: Pouvoir réducteur des différents extraits.

Selon la figure 33, l'extrait des polyphénols totaux présente une grande activité, qui permet la réduction du fer avec une densité optique maximale de 2,54 et une concentration de 1 mg/mL.

L'extrait des anthocyanes montre une bonne activité avec une D,O de 2,517, en comparaison aux autres extraits (les C-glycosides et les aglycones) dont les D,O sont respectivement de l'ordre de 1,62 et 1,98 à la même concentration de 1mg/mL.

Les résultats indiquent que tous les extraits de la plante présentent des activités antioxydantes nettement inférieures à celles de la référence (acide ascorbique), pour ce dernier la réduction est presque totale à partir d'une concentration de 0.3 mg/mL avec une D,O de 2,809 (Figure 32).

Nos résultats concordent avec ceux de Ozturk *et al.*, 2007 ; Su *et al.*, 2008 et Liuk *et al.*.,2009, qui ont montré que toute augmentation de concentration d'échantillon conduit à l'augmentation de la capacité de réduction de fer.

Le pouvoir réducteur des différents extraits est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électrons. Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Siddhuraju et Becker, 2007). Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Jeong *et al.*., 2004).

D'après nos résultats nous remarquons que les anthocyanes et les polyphénols totaux présentent une forte activité antioxydante, alors que les C-glycosides et les aglycones présentent une activité assez importante par rapport à ceux trouvés par la méthode DPPH, là où ils ont une activité presque nulle.

Les résultats obtenus montrent que la capacité de nos extraits à réduire le fer est inférieure à celle de l'acide ascorbique pour les quatre extraits, avec des variations. Cette réduction est beaucoup plus importante dans les extrait des polyphénols totaux et les anthocyanes qui correspond à des D,O de 2,54 et 2,517 respectivement, la capacité de réduction de ces derniers est largement supérieure aux extraits des C-glycosides et aglycones avec des densités optiques de l'ordre de 1,625 et 1,98. Nous pouvons déduire que tous les extraits du romarin ont la capacité à réduire le fer mais elle reste toujours inférieure à celle de l'acide ascorbique avec une D,O= 2,809. Si nous pouvons classé nos extraits selon la

puissance de réduction de fer par rapport à l'acide ascorbique, on obtiendra l'ordre suivant: les polyphénols totaux > Anthocyanes > C-glycosides > Aglycones.

En effet le romarin est une plante qui appartient à la famille des *Lamiaceae*, qui inclut un grand nombre de plantes qui sont bien connue pour leurs propriétés anti-oxydantes et que la plupart de leurs composants antioxydants ont été identifiés (Tepe *et al.*, 2006 ; Kivilompolo *et al.*, 2007). Le romarin fait partie des antioxydants naturels accepté en tant qu'une des épices avec l'activité anti-oxydante la plus élevée (Peng *et al.*, 2005), cette dernière est due principalement aux composés phénoliques, appartenant à trois groupes : les diterpènes phénoliques, les acides phénoliques et les flavonoïdes (Almela *et al.*, 2006).

Pendant les 10 dernières années, le romarin et ses constituants (le carnosol, l'acide carnosique, l'acide ursolique, l'acide rosmarinique, l'acide caféique) sont intensivement étudiés (Slamenova *et al.*, 2002). L'acide carnosique et le carnosol, sont responsables de 90% de l'activité anti-oxydante du romarin et représentent ensemble environ 5% du poids sec de ses feuilles (Wei et Ho, 2006) (Visanji *et al.*, 2006).

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation des composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes. Ce travail, nous a permis d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits méthanoliques des feuilles de *Rosmarinus officinalis* L. On peut conclure que :

- ✓ Le dosage quantitatif des polyphénols totaux par le réactif de Folin-ciocalteu a révélé que le romarin contient 12.87mg EAG/g d'extrait.
- ✓ Le dosage quantitatif des trois extraits flavoniques par la méthode d' $AlCl_3$ a révélé des teneurs de l'ordre de 1.13mg/g pour les anthocyanes ; 0.07mg/g pour les C-glycosides ; et 0.045mg/g pour les aglycones.
- ✓ D'une part, l'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de réduction de fer, a montré que l'extrait des polyphénols totaux possède une bonne activité avec une D.O de 2.54nm vis-à-vis du Fe^{3+} , suivi des anthocyanes avec une D.O de 2,52 nm. Les C-glycosides et les aglycones présentent respectivement des valeurs de l'ordre de 1,62nm et 1,98nm à la même concentration de 1mg/mL.
- ✓ D'autre part, la méthode de piégeage du radical libre DPPH, a montré que l'extrait des anthocyanes est le plus actif, avec une valeur d'IC50 de l'ordre de 0,122 mg/mL, comparable à celle de l'acide ascorbique (IC50 =0,045 mg/mL), suivi de l'extrait des polyphénols totaux, des C-glycosides et les aglycones, ayant respectivement des IC50 de l'ordre de 0.130mg/mL ; 0.350 mg/mL ; 0.370 mg/mL.

Les résultats ont montré une activité antibactérienne efficace contre les bactéries testées, notamment l'extrait des polyphénols totaux a manifesté une activité modérée sur *S.aureus*, et une faible activité sur *E. coli*. En revanche les anthocyanes et les C-glycosides ont présenté des bonnes activités vis-à-vis des deux bactéries. Pour ces différents extraits, on remarque que les anthocyanes montrent une activité plus élevée que les autres l'extraits méthanoliques.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important des métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, à cet effet, et comme perspectives on propose de :

- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles qui pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.

- Développer des médicaments antibactériens à base des plantes.
- La substitution des agents antimicrobien classiques par les extraits des plantes qui ne cessent de nous étonner par leur pouvoir mal exploité mais très prometteur.
- Il serait également intéressant de réaliser d'autres études pour évaluer le potentiel in vivo sur modèle animal.
- Définir le mécanisme d'action de l'activité antimicrobienne de cette substance végétale sur les microorganismes.

Références bibliographiques

A

- Aafi A., (2014)**. Manuel des bonnes pratiques de collecte du romarin « *Rosmarinus officinalis* L ». Centre de recherche forestière. HCEFLCD. Rabat. 3p.
- Ait Youssef M., (2006)**. Plantes médicinales de Kabylie. Édition, IBIS press. Paris. 349p.
- Aliouat A., Boulkelia N., (2012)**. Activité antioxydant des extraits des graines de la plante Nigelle sativa L, Diplôme de Master en Biochimie Moléculaire et Santé : Université de Constantine. 70p.
- Almela L., Sanchez-Munos B., Fernabdez-Llopez J.A. Roca M.J., Rabe V., (2006)**. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. J chromatography A. **1120**: pp 145-153.
- Anonyme, (2008)**. staph aureus resists our naturel defenses. www.health-news-blog.com/blogs/health-.2008.
- Athmena S., Chalghem I., Kassah-laouar A., Laroui S., Khebri S., (2010)**. Activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. Lebanese Science Journal. **11** (1) : pp72.
- Atik bekkara F., Bousmaha L., Taleb bendiab S.A., Boti J.B., Casanova J., (2007)**. Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. Biologie & Santé. **7**: pp6-11.

B

- Benarba B., Meddah B., Hamdani H. (2015)**. Cancer incidence in North West Algeria (Mascara) 2000 2010: results from a population-based cancer registry. EXCLI J. 2014; 13:709-23.
- Babulka P., (2007)**. Plantes médicinales du traitement des pathologies rhumatismales, La médecine traditionnelle à la Phytothérapie ; Phytothérapie. **5**: pp137- 145.
- Bacon B ., Clifton C., Connor D., Foster O S., Grane J., Loyer J., Moorachian M., Rabb C., Sandall P., Santich S., Stybe K., Stybe R., (2013)**. 500 plantes comestibles. Histoire, botanique, alimentation. Editeurs Delachaux et Nestlé. Paris.360p.

- Baerts M., Lehmann J., Ansay M., Kasonia K., (1996).** Quelques plantes utilisées en médecine vétérinaire traditionnelle en Afrique sub-saharienne. Une banque de données, Sous-réseau PRELUDE : Santé, productions animales, environnement, CTA et Presses. Universitaires de Louvain. 154p.
- Benzie I.F.F et Strain J.J., (1996).** The ferric reducing ability of plasma as a measure of "Antioxidant power" the FRAP assay. Analytical Biochemistry.
- Berrin B., Goksel T., Derya O., (2008).** Study on polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antioxidant activity. Food chemistry, **209**: pp426-430.
- Blois M S, (1958).** Antioxidant determinations by the use of stable free radical. Nature. (181), : pp1199-1200.
- Boudiaf K., (2006).** Etude des effets anti-xanthine oxydoréductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sattu*. Mémoire de magister .Université de Sétif. 75p.
- Boudjouef M, (2011).** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de Magister en Biochimie. Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie. 99p.
- Bougandoura N., Bendimerad N., (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. Nature & Technologie. (9): 15p.
- Bouquet A et Fouret A., (1975).** Recherches chimiques préliminaires sur les plantes médicinales du congo-brazzaville. Fitoterapia, pp 175-191.
- Botineau M., (2010).** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs .Edition, Tec & Doc Lavoisier. Paris .1021p.
- Brand-williams W., Cuvelier M E., Berset C., (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie. (28): pp25-30.
- Brouillard R, (1993).** The Flavonoids, Advances in research since, 1986, Edition, J. B. Harbone, Chapman and Hall, London. pp525-538.
- Bruneton J, (1999).** Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. 3^{ème} Edition .Edition Tec & Doc et EM inter. Lavoisier. Paris. 1120p.
- Bruneton J., (1993).** Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. 2^{ème} édition. Edition, TEC & DOC., Lavoisier. Paris. 1120p.
- Burt, S. (2004)** Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods—A Review. International Journal of Food Microbiology, 94, 223-253.

C

- Carter G.R et Wise D.J., (2004).** Essentials of veterinary bacteriology and mycology. 6^{ème} Edition. Iowa state press. Iowa, USA. pp 158-169.
- CCE, (2001).** Commission des Communautés Européennes: propositions de la commission en matière de lutte contre la résistance antimicrobienne. Bruxelles, **885**.
- Chambers H. F., (1997).** Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**: pp781-791.
- Chung Y.C., Chang C.T., Chao W.W., Lin C.F., Chou S.T., (2002).** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMRNK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Congo M., (2012).** Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica L.* (Salvadoraceae). Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso . 42p.
- Contin A., Heijden R., Hoopen H.J.G., Verpoorte R., (1998).** The inoculum size triggers tryptamine or secologanin biosynthesis in a *Catharanthus roseus* cell culture. *Plant Science*, **139**: pp205-211.
- Cowan N. M., (1999).** Plant products as anti microbial agents. *Clinical microbiology Reviews*. **12**(4): pp 564-582.
- Cronquist A., (1981).** An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press. New York. 1262p.
- Cruz J.M., Dominguez J.M., Ddominguez H., Parajo J.C., (2001).** Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49** (5): pp2459-2464.
- Cushnie T.P et Lamb A.J., (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal Antimicrobial Agents*, **26**(5): pp343-356.

D

- Debray M., Jacquemin H., Razafindrambo R., (1971).** Phytochemical screening of pentadesmabutyrea sabine (clusiaceae) Acclimated in benin by GC/MS. *Travaux et documents de l'orstom, paris. France*. **2013** (2013). p8.
- Delarras C., (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris. 476p.

-Djadouri D., Ben Dahra I., (2014). Effets potentiels antioxydants et anti inflammatoire de l'homogénat d'Hélix aspersa dans un modèle expérimental de colite chimio-induite. 68p.

-Djerroumi A et nacef M., (2014). 100 plantes d'Algérie. 3^{ème} Edition. Alger. 160p.

E

-El hajaji H., Lachkar N., Alaoui K.,Cherrah Y., Farah A., Ennabili A., El-bali B., Lachkar M.,(2011). Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of carob tree barks growing in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry* ,4: pp321–324.

-Elqaj M., Ahami A et Belghyti D., (2007). La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique, ressources naturelles et antibiotiques. Maroc.

-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 Chem.* **110**: pp76-82.

F

-Fabri R. L., Nogueira M. S., Braga F. G., Coimbra E. S. and Scio E., (2009). *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial and antioxidant effects, *Bioresource Technolog* , **100**: pp 428-433.

-Fecka I., Turek S., (2008). Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chem.* **108**: pp1039-1053.

-Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies.* **331**: pp372-379.

-Farnsworth N.R., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D et Guo Z ., (1986). Place des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé.* **64** (2) : pp159-175.

-Favier A, (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chilique,* **6** : pp108-115.

G

- Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M., (2001).** Le préparateur en pharmacie, dossier 2. Botanique, pharmacognosie, phytothérapie, homéopathie .Edition, tec & doc. Lavoisier. Paris. 460p.
- Gilly G., (2005).** Les plantes aromatiques et huiles essentielles à grasse. Edition, l'harmattan. Paris. 475p.
- Gomez-caravaca A.M., Gomez-romero M., Arraez-roman D., Segura-carretero A., Fernandez-gutierrez A., (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. J Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **41**: pp1220-1234.
- Gorham J, (1977).** Lunularic acid and related compound in liverworts, algae and hydrangea. *Phytochemistry*. **62** (16): pp249-253p.
- Gortzi O., Lalas S., Chinou I., Tsaknis J., (2007)** .Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Origanum dictamnus Extracts before and after Encapsulation in Liposomes. *Molecules*. **12**: pp932-945.
- Guignnard J.L., (1983).** Abrège de botanique. 2ém Edition., Edition, Masson. Paris. 247p.

H

- Halmi S., (2015).** Etude botanique et phytochimique approche biologique et pharmacologique d'opuntia ficus, diplôme de doctorat, biotechnologie végétale. pp17- 25.
- Hamidi A, (2013).** etude phytochimique et activité biologique de la plante *limonizstrum guyonianum*. Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de magister en chimie organique. Université kasdi Merbah-Ourgla. 111p.
- HAMIDI A. (2012)** Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianium*. Mémoire de magistère en chimie organique, Université Kasdi Merbah de Ouargla, 86 p.
- Harrar A.E.N., (2012).** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Thèse de Magister Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbas, Sétif. 73p.
- Haslam E, (1994).** Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod.* **11** (3): pp41-66.
- Haslam E, (1998).** Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. Edition.,Cambridge University Press, Cambridge. UK. 422p.

- Hassan S.W., Umar R.A., Lawal M., Biblis L.S., Muhammed B.Y., Dabai Y.U., (2007).** Evaluation of antibacterial activity and phyto chemical analysis of root extracts of *Boxiaangustifolia*. *African Journal of Biotechnology*, 5 (18): pp1602-1607.
- Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M., (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.* (in press).
- Heim K-E., Tagliaferro A-R., Bobilya D-J., (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, **13**: pp572–584.
- Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleur F., (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. **1**: pp 3-6.
- Hess M., (2002).** Alkaloids, Nature's Curse or Blessing. 1ère Edition. Edition, Wiley-VCH, New York. USA. 297p.
- Ho S.C., Tsai T.H., Tsai P.J., LIN C.C., (2008).** Protective capacities of certain spices against peroxynitrite-mediated biomolecular damage. *Food and Chemical Toxicology*.**46**: pp920-928.
- Hua Li, Xiaoyu Wang, Peihong Li, Yong Li, Hua Wang., (2008).** Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, **16** (6): pp67-73.
- Huang M.T., Ho C.T., Wang Z.Y., Ferraro T., Lou Y.R., Stauber K., Ma W., Georgiadis C., Laskin J.D. and Conney H., (1994).** Inhibition of Skin tumorigenesis by Rosemary and its constituents carosol and ursolic acid. *Cancer Research*; **54** :pp701-708.

I

- In Karumi Y., Onyeyili PA et Ougduaja VO., (2004).** Identification des principales actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (Baume de la pomme). *Journal of Medicine and scientific. Nigeria*. **4** (3): pp179-182.

J

- Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., Lee S.C., (2004).** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **52**: pp3389–3393.

-Judith M.D., (2005). Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* utilisé dans le traitement des dermatoses au TCHAD; Thèse de doctorat en pharmacie de l'Université de BAMAKO, MALI. pp57- 64.

K

-Kamra D.N., Agarwal N., Chaudhary L.C., (2006). Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series.* **1293** : pp156–163.

-Kang D-G., Yun C-K., Lee H-S., (2003). Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology*, **87**: pp231-236.

-Karagözler A., Erdag C.S., Çalmaz Emek Y., (2008). Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, **111** : pp400- 407.

-Khady B., Emmanuel T., Jacqueline D., Ndiaga C., Philippe T., (2009). Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14**(1): pp131-139.

Khatkar, A., Nanda, A., Kumar, P and Narasimhan, B. (2014). Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies of p-coumaric acid derivatives. *Arabian Journal of Chemistry.* Sous press.

-Khenaka K, (2011). Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogènes ruminale chez l'ovin. Thèse de Magister En Microbiologie Appliquée. Université Mentouri- Constantine. Algérie. 81p.

-Khorsi K, (2013). Contribution à l'étude chimique du Romarin (*Rosmarinis officinalis* L) algérien .faculté des sciences et de la technologie. Département de chimie. Université Moulay tahar-said.

-Kivilompolo M., Hyotylainen T., (2007). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: characterization and quantification of antioxidant phenolic acids. *J chromatography A.* **1145**: 155-164.

-Kone W.M., Kamanzi Atindehou K., Terreaux C., Hostettmann K., Yraore D., Dosso M., (2004). Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* **93**: pp43-49.

-Kosalec I .,Bakmaz M .,Pepeljnjak S .,Vladimir-knez E ., (2013). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm*, (54): pp65-72.

L

-Lapare M., Collin G., (2000). Parfums du Maroc, et le vase florentin. INFOESSENCES. Bulletin sur les huiles essentielles. Numéro 14.

-Lapornik B., Prosek M., Wondra A.G., (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, 71: pp210-222.

-Lebreton PH ., Jay M .,Voirin BetBouchez M.P ., (1967).Chim. Anal. Fr., 49 (7) : pp375-383.

-Leybros J., Fremeaux P., (1990). Extraction solide-liquide aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur, Génie des procédés. 2J2780 (J2780).1-J2780.22.*

-Locatelli M., Travaglia F., Coisson J.D., Martelli A., Stevigny C., Arlorio M., (2010). Total antioxidant activity of hazelnut skin (Nocciola Piemonte PGI) : Impact of different roasting conditions. *Food Chemistry*.

-Lopes-Lutz, D., S. Alviano, D., S. Alviano, C., P. Kolodziejczyk, P., (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry*, 69: pp1732-1738.

-Lucienne A., (2010). Les plantes médicinales d'Algérie. 2^{ème} Edition .Berti. Alger. 210p.

M

-Maataoui B S., Hmyene A., Hilali S., (2006). Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. (1): pp3-8.

-Macheix J.J., A. Fleuriet A., Jay-Allemand C., (2005). Nature et diversité des composés phénoliques des végétaux. In : Les composés phénoliques des végétaux. Edition, Technique et documentation. Lavoisier. 192p.

-Maisuthisakul P., Pasuk S., Ritthiruangdej P., (2008). Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J Food Composition and Analysis*. 21. P: 229-240.

- Makkar H.P.S, (2003).** Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*. **49**: pp241-256.
- Malešev D. and Kunti V., (2007).** Investigation of metal–flavonoidchelates and the determination of flavonoidsvia metal–flavonoidcomplexingreactions. *Journal of serbianchemical society*, **72** (10): pp 921–939.
- Mangan J.L., (1988).** Nutritional effects of tanins in animal feeds. *Nutr. Res.rev.* **1** : pp209-231.
- Mann C.M., Cox S.D. et Marham J.L. (2000) :** The outer membrane of pseudomonas aeruginosa NCTC6749 contributes to its tolerance to the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). *Lett. In Appl. Microbial.*, Vol.30, pp : 294-297.
- Mariod A.A., Ibrahim R.M., Ismail M., Ismail N., (2009).** Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, **116**: pp306-312.
- Martin S., Tsitohaina R., (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. **51**: pp304-315.
- Max R et Dominique R., (2015).** Le dictionnaire des plantes médicinales. Ed.Alpen. Monaco. 730p.
- Mcsweeney C.S., Palmer B., Mcneill D.M. and Krause D.O., (2001).** Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. **91** : pp83-93.
- Michel CM., Thut G., Morand S., Khateb A., Pegna A.J., Grave de Peralta R., Gonzales S., Seeck M., Landis T., (2001).** Electric source imaging of human cognitive brain functions (Review).*Brain Res Rev* 2001; **36**: pp108-118.
- Millogo H., Guisson I.P., Nacoulma O. et Traore A. S., (2005).** Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire –Lyon.
- Mohammedi, (2013).** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie. 169p.

-Molyneux P., Songklanakarin J., (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *SciencesTechnology* .Vol 26 (2), P : 211-219.

-Mostafa S. F., (2011). Extraction et caractérisation de l'huile essentielle et de quelques métabolites secondaires actifs d'une plante à caractères thérapeutiques, *Thymus vulgaris L.*, et étude de quelques activités pharmacologiques. Thèse de magistère. Blida.67p

-Murry R. D. H., Mendez J., Brown S.A., (1982). The natural coumarins Occurrence Chemistry and Biochemistry. Ed. Chichester John Wiley and Sons, UK. New York. England. P702.

N

-Nacoulma AP., (2012). Reprogrammation métabolique induite dans les tissus hyperplasiques formés chez le tabac infecté par *Rhodococcus fascians*: aspects fondamentaux et applications potentielles. Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Université Libre de Bruxelles Europe. Belgique. 92p.

-Nataro J. P et Kaper J. B., (1998). Diarrheogenic *E. coli*. *Clin MicrobiolRev.* **11**, P : 142-201.

-Newman D.J., Cragg G.M., (2012). Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **75**: pp311-335.

O

-Ou B., Hamosch-woodill M., Prior R. L., (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (49), P: 4619-4626.

-Ouici Asma , (2012). Pouvoir antioxydant des polyphénols du fruit de caroubier(*ceratonia siliqua* l),Mémoire Master en Biologie; Option physiopathologie. Université Sétif. 85p.

-Ozçelik B., DeliormanOrhan D ., Ozgen S. and Ergun, F., (2008).Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum β -Lactamase (ES L) Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **7**(4): pp1151-1157.

-Öztürk M, Aydo mus-Öztürk F, Duru ME, Topçu G., (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant. *Food Chem.* **103** : pp623-630.

P

-Padrini F et Lucheroni M.T ., (1997). Les huiles essentielles, Edition de vecchi S.A. paris .78p.

-Pandey KB et Rizvi SI., (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* **2** (5): pp270 -278.

-Pawlowska AM., Deleo M., Braca A. (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **54** (26): pp10234-10238.

-Peeking A., Picand B., Hacene K., Lokiec F., Guerin P., (1987). Oligomères procyanidoliques (Endotélon) et système lymphatique. *Artères et Veines. Publications médicales AGCF.* **6**: pp512-513.

-Peng Y., Yuan J., Liu F., Ye J., (2005). Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J pharmaceutical and biomedical analysis.* **39**: 431-437.

-Perret C, (2001). Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea*. Thèse de Doctorat .Université de Neuchâtel. Suisse. 184p.

-Pokorny J., Yanishlieva N and Gordon M., (2001). Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing. Ing Limited. ISBN: pp16-18.

-Popovici C., Saykova I., Tylkowski B., (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel.*

-Prakash, D., Suri, S., Upadhyay, G. and Singh, B.N., (2007). Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **58**, P: 18-28.

-Prior R L., Wu X., Schaich K., (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements . Agric. Food Chem. (53): pp4290-4302.

-Privas E, (2013). Matériaux ligno-cellulosiques «Élaboration et Caractérisation laboration ». Thèse de Doctorat en Science et génie des matériaux, l'École Nationale Supérieure des Mines, Paris. France. 166p.

Q

-Quettier-deleu C., Gressier B., Vasseur J ., Dine T., Brunet C., Luyckx M.,(2000).phenolic compounds and antioxidant activities of buckxheat (fagopyrum esculentum moench) hulls and flour. Journal of ethnopharmacology, **72**: pp35-42.

-Quezel P et Medail L F., (1995). La région circumméditerranéen, centre mondial majeur de biodiversité végétale. Institut méditerranéen d'écologie et de la paléoécologie, France. 152-155.

-Quszel P et santa S., (1963). La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris: tome II. CNRS. 1170p.

R

-Rached W., Benamar H., Bennaceur M., Marouf A., (2010). Screening of the Antioxidant Potential of Some Algerian Indigenous Plants. Journal of Biological Sciences, **10**: pp316-324.

-Rebaya A., Igueld-Belghith S., Baghdikian B., Mahiou Leddet V., Mabrouki F., Olivier E., Cherif J.K., Trabelsi Ayadi M., (2015)(. Total Phenolic, Total Flavonoid, Tannin Content, and Antioxidant Capacity of Halimiumhalimifolium (Cistaceae). Journal of Applied Pharmaceutical Science. **5** (01): pp052-057.

-Rhayour K., (2002)(. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *MycobacteriumFortuitum*. Thèse de doctorat en biologie. Université de Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc. 158p.

-Ribereau-gayou P., (1968). Notions générales sur les composés phénoliques. phénoliques des végétaux. Edition Dunod, Paris. 254p.

-Ribéreau-gayon P, (1982). incidences oenologiques de la pourriture du raisin. Bull. OEPP. dunod . paris. **12** (2) : pp 201-214.

-Rira M, (2006). Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Thèse de Magister en biochimie et microbiologie appliquées, Université Mentouri Constantine, Algérie. 94p.

- Roux D., Catier O., (2007). Botanique, pharmacognosie, phytothérapie. 3ème édition. Ed. Wolters Kluwer, Dalian. China. 141p.

S

-Sanchez-morino C., (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems; International Journal of Food Science and Technology .**8**: pp121-137.

-Schauenberg P., Paris F., (2005). Guide des plantes médicinales. Analyse, description et utilisation de 400 plantes. 2ème édition. Ed. Delachaux et Niestlé, Neuchâtel. Suisse. 355p.

-Scherer R. and Godoy H. T., (2009).Antioxydant Activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1 picrylhydrazyl method. Food Chemistry . **112**: pp654-658.

-Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D., Corke H., (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. International J Food Microbiology. **117**: pp 112-119.

-Siddhuraju P et Becker K., (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. Food Chemistry, **101**(1): pp10-19.

-Singleton V L., Rossi J A., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Technology and Viticulture. (16): pp144-153.

-Slamenova D., Kuboskova k., Horvathova E., Robichova S., (2002). Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and FPG sensitive sites in mammalian cells treated with H₂O₂ or visible light-excited Methylene blue. Cancer Letters. **177**: pp145-153

-Stojkovi , D., Petrovi , J., Sokovi , M., Glamo lija, J., Kuki -Markovi , J and Petrovi , S. (2013). In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid,

p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13):3205-3208.

-Sutra L., Federighi M and Jouve J.L., (1998). Manuel de Bactériologie Alimentaire. Edition, Polytechnica, paris. 308p.

-Su Y., Blake-palmer KG., Sorrell S., Javid K., Bowers K., Zhou A ., Chang S.H., Qamar S., Karet F.E., (2008). Human H⁺ATPase α 4 subunit mutations causing renal tubular acidosis reveal a role for interaction with phosphofructokinase-1. *Am J Physiol Renal Physiol* .295(4): pp950-958.

T

-Tahrouch S., Rapior S., Mondolot C.L., Idrissi H.A., Bessiere J.M., et Andary C., (2002). Peganum harmala: Source combinée d'arômes et de colorants. *Reviews in Biology and Biotechnology by the Moroccan Society of Biology in Canada*, 2 (2): pp33-37.

-Taiz L et Zeiger E., (1998). *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, 2nd Edition, Sunderland.

-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 Chem.* (in press).

-Tajkarimi M M., Ibrahim S A and Cliver D O., (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 21: pp1199-1218.

-Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Sokmen A., (2006). Screening of the antioxidant potentials of six salvia species from turkey. *Foodchem*. 95: 200-204.

-Teuscher E., Anton R., Lobstein A., (2005). *Plantes aromatiques. Épices, aromates, condiments et huiles essentielles* .Ed Tec &Doc. Lavoisier. Paris. 560p.

-Torres de pinedo A., Pen alver P., Morales J.C., (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant : structureactivity relationship. *Food Chemistry*, 103: pp55-61.

-Trease E et Evans W.C., (1987). *Pharmacognosie*, BilliaireTindall. London 13 th Edition. 255p.

-Tsai P., Tsai T., Ho S., (2007). In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chem.* (in press).

-Turkmen N., Velioglu Y.S., Sari F., Polat G., (2007). Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. 12: pp484-496.

V

- Valnet J., (1984).** Aromathérapie traitement des maladies par les essences de plantes. 10^{ième} Edition. Maloine S.a paris. 544p.
- Veillet S., (2010).** Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation, thèse de doctorat, université d'Avignon. 160p.
- Visanji J.M., Thompson D.G., Padfield P.J., (2006).** Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Letters*. 237: 130-136.
- Volka J et Stdola J., (1993).** Plantes médicinales. GRÜND, Paris. 350p.
- Vuorela S., (2005).** Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki.

W

- Wafa G, (2015).** Etude phytochimique des extraits de deux euphorbiacées: *Ricinus* et *Jatropha curcas*. Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholin estérase. Thèse de doctorat. Université de Lorraine (France) et université de Carthage (Tunisie). 244P.
- 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 chem.* **96**: 471-476.
- Wendakoon CN, Sakaguchi M (1995),** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J Food Prot* 58, 280–283.

X

- Xiao Z.T., Zhu Q and Zhang H.Y.,(2014).** Identify inganti bacterial targets of flavonoids by comparative genomics and molecular modeling. *Open journal of genomics*, **3**: pp2075-9061.

Y

- Yang R.Y., Lin S et Kuo G., (2008).** Content and distribution of flavonoids among 91 Edibles plant species. *Asia of pacific journal of clinical nutrition*. **17** (S1): pp275-279.
- Yang Y et al., (2008).** Hypermutability of damaged single-strand DNA formed at double-strand breaks and uncapped telomeres in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **4**(11): pp100-264.

-Yildirim A., Mavi A. et Kara A. A., (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* extracts; Journal of Agricultural and Food Chemistry. **49**: pp411-420.

-Yildirim A., Mavi A., Kara AA.,Oktay M., Algur OF., (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **9**: pp4083-4089.

Z

-Ziegler J., Facchini P.J., (2008). Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. Annu Rev Plant Biol. Vol (59). P

Résumé

L'émergence de microorganismes pathogènes, pose actuellement un problème de santé publique. En effet, la résistance des germes aux antibiotiques rend quelques fois le traitement thérapeutique inefficace et impose la recherche de nouvelles pistes à explorer. Le recours aux plantes médicinales constitue alors une intéressante piste à explorer. C'est dans cette perspective que nous nous sommes intéressées à l'étude des activités biologiques de la plante du romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) qui a pour objectif d'identifier les différentes familles de composés chimiques par un screening phytochimique. Quatre extraits bruts ont été préparés à partir des feuilles du romarin (les polyphénols totaux, et les trois classes de flavonoïdes : les anthocyanes, les C-glycosides et les aglycones).

Les dosages quantitatifs des polyphénols totaux sont déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu à partir des courbes d'étalonnage d'acide gallique. Les résultats obtenus sont relativement importants de l'ordre de (12,87 mg EAG/g Ex). Par contre ceux des flavonoïdes (les anthocyanes, les C-glycosides et les aglycones) ont montré des quantités assez faibles avec des teneurs de 1,13mg/g, 0,07mg/g et 0,045mg/g respectivement.

Les polyphénols totaux et les anthocyanes ont manifestés un pouvoir antioxydant plus important. Avec des valeurs de D,O de 2,54 et 2,517 par la méthode de réduction de fer (FRAP), et avec des pourcentages (70,25%) et (60,63%) par la méthode de piégeage du radical libre DPPH .

L'effet antimicrobien a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton pour les bactéries-tests *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. L'extrait des polyphénols totaux a montré un résultat uniquement contre *S.aureus* avec un diamètre de zone d'inhibition **de 13,75mm**. En revanche les anthocyanes et les C-glycosides ont présenté des **bonnes activités antibactériennes avec des diamètres atteignant (13,75 mm et 14,5 mm respectivement vis à vis des deux souches.**

Mots clés : *Rosmarinus officinalis L.*, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Summary

The emergence of pathogenic microorganisms currently poses a public health problem. Indeed, the resistance of germs to antibiotics renders therapeutic treatment sometimes ineffective and requires the search for new antimicrobial agents. The appeal to healing plants establishes then one interesting tracks to be explored; it is in this perspective that we were interested in the study of the biological activities of the rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) which has for objective to identify the various families of chemical compounds contained in sheets by a phytochemical screening. Four raw extracts were prepared from the sheets of the rosemary among the total polyphenols and three classes of flavonoids (the total polyphenols, the anthocyanins, the C-glycosides and the aglycones).

The colorimetric quantitative dosages of the total polyphenols by the method of Folin-Ciocalteu is determined from the curves of calibration of Gallic acid, the obtained results (profits) indicate that their quantity is relatively important in the sheets (leaves) of the rosemary (12,87 mg EAG / g Ex). As well as the rate of three classes of flavonoids by the method of AlCl₃, the results (profits) showed low (weak) quantities with 1,13 mg / g for anthocyanins and 0,07 mg / g for C-glycosides and 0,045 mg / g concerning aglycones.

The evaluation of the antioxidizing activity of extracts méthanoliques by the method of iron reduction (FRAP) with D, O of the order of 2,54 and 2,517 found and the method of the trapping of free radical DPPH with (70,25 %) and (60,63 %) for the total polyphenols and the anthocyanins respectively show a more important antioxidant power.

The antimicrobial effect in summer determined by the method of distribution (broadcasting) on gélose Mueller-Hinton for bacteria-tests *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. The results (profits) highlight that the extract of the total polyphenols showed an activity moderated against *S. aureus* with a diameter of 13,75 mm, and a low activity against *E. coli* (6 mm). On the other hand anthocyanins and C-glycosides presented good one (maid) sactivités closed view (counterpart) both bacteria with reaching (affecting, achieving) diameters (13,75 mm and 14,5 mm).

The expression of the result of the antioxidant and antibacterial activity showed that the extracts of the rosemary were more active, as antioxidant and antibacterial agents.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L., phytochemical study, consisted phenolic, antioxidizing activity, antibacterial activity.