

Projet de Fin d'Études

Licence Sciences et Techniques

Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

**Étude phytochimique et évaluation *in-vitro* de l'activité
antibactérienne de trois extraits de la plante
*Rosmarinus officinalis***

Présenté par:

BOUKHIRA Ikrame

Encadré par:

Dr. RAIS Chaimae

Pr. BOUCHAMMA El-Ouazna

Soutenu le: 07 Juin 2018 devant le jury composé de :

- Pr. AMRANI JOUTEI Khalid
- Pr. BOUCHAMMA El-Ouazna
- Dr. RAIS Chaimae

Année Universitaire
2017/2018

Dédicace

*A mes parents, qu'ils
trouvent ici toute ma gratitude pour leur
soutien tout au long de mes études,*

A ma sœur et mes deux frères

Et

A tous mes amis.

Remerciements

*Au terme de ce travail, j'adresse mes sentiments de reconnaissance et gratitude à mes deux encadrantes Professeur **BOUCHAMMA El- Ouazna** et Docteur **RAIS Chaimae** de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, ayant encadré et dirigé de près le présent travail*

*Je tiens aussi à remercier Monsieur **EL GHADRAOUI Lahsen** d'avoir accepté de m'accueillir au sein de Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement pendant la période de mon stage de fin d'étude.*

*Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à **SLIMANI Chaimae** Doctorante au sein du laboratoire d'Ecologie Fonctionnel et Environnement à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour son aide, sa compréhension, ses conseils, son soutien et pour sa valeur humaine.*

*Mes vifs remerciements vont aussi à Pr. **AMRANI JOUTEI Khalid** qui a accepté de sacrifier une partie de son temps pour juger ce travail.*

Je remercie également tous mes collègues du Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle Et Environnement pour leur esprit d'équipe et leur bonne humeur.

Mes remerciements vont également à l'adresse de toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Le présent travail est consacré à l'étude de l'activité antibactérienne des extraits aromatique du romarin contre quatre souches de bactérie : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*.

A partir de cette espèce, nous avons obtenus trois extraits, méthanolique, éthanolique et aqueux. La valeur maximale du rendement a été enregistrée au niveau de l'extrait méthanolique avec un pourcentage de 22,25%.

Le dosage de polyphénols, des flavonoïdes et des tanins condensés montre que l'extrait éthanolique est le plus riche en polyphénols (38,06 mg/g) et en tanins condensés (8,32mg/g). Par contre, l'extrait méthanolique contient la teneur la plus élevée en flavonoïde (14,41mg/g).

Les trois extraits montrent une activité antibactérienne efficace contre les bactéries testées. L'activité la plus importante est observée chez l'extrait méthanolique contre *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 14mm et de 13,5 mm respectivement. En outre, l'extrait éthanolique présente une activité importante contre *Escherichia coli* avec un diamètre d'inhibition de 14,5 mm.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis* ; Extraits ; Polyphénols ; Flavonoïdes ; Tanins ; Activité antibactérienne.

Liste des figures

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figure 1 : | Arbuste de <i>Rosmarinus officinalis</i> | 3 |
| Figure 2 : | Technique de la macération..... | 5 |
| Figure 3 : | Feuilles de <i>Rosmarinus officinalis</i> | 7 |
| Figure 4 : | Elimination du solvant par Rotavapeur..... | 7 |
| Figure 5 : | Tests de l'activité antibactérienne..... | 10 |
| Figure 6 : | Teneur en eau des feuilles de <i>Rosmarinus officinalis</i> | 11 |
| Figure 7 : | Rendement en extraits obtenue par différents solvants..... | 12 |
| Figure 8 : | Teneur en polyphénols des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> | 12 |
| Figure 9 : | Teneur en flavonoïde des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> | 13 |
| Figure 10 : | Teneur en tanins condensés des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> | 14 |
| Figure 11 : | Diamètre d'inhibition des E.E et E.M contre <i>E. coli</i> | 15 |
| Figure 12 : | Diamètre d'inhibition des E.E et E.M contre <i>E.faecalis</i> | 15 |
| Figure 13 : | Diamètre d'inhibition des E.E et E.M contre <i>P. aeruginos</i> | 15 |
| Figure 14 : | Diamètre d'inhibition des E.E et E.M contre <i>S. aureus</i> | 15 |

Liste des abréviations

DMSO : Diméthylesulfoxyde

DO : Densité optique

EA : Extrait aqueux

EAG : Equivalent d'acide gallique

EE : Extrait éthanolique

EM : Extrait méthanolique

EQ : Equivalent de quercétine

H% : Humidité

LB : Lysogenic Broth

MF : Matière fraîche

MS : Matière sèche

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAM : Plante aromatique et médicinale

R% : Rendement

Sommaire

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION | 1 |
| SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE | |
| I. Plantes aromatiques et médicinales | 2 |
| II. Généralités sur la plante <i>Rosmarinus officinalis</i> | 2 |
| 1. Classification..... | 2 |
| 2. Description botanique..... | 3 |
| 3. Usage traditionnels et médicinaux de <i>Rosmarinus officinalis</i> | 3 |
| 4. Composés phénoliques de <i>Rosmarinus officinalis</i> | 4 |
| III. Techniques générales d'extraction..... | 4 |
| 1. Macération..... | 4 |
| 2. Infusion..... | 5 |
| 3. Décoction..... | 5 |
| 4. Extraction par soxhlet..... | 6 |
| IV. Activité antibactérienne..... | 6 |
| MATERIEL ET METHODES | |
| I. Matériel végétal..... | 7 |
| II. Extraction des différents extraits | 7 |
| III. Humidité..... | 8 |
| IV. Rendement des extraits..... | 8 |
| V. Dosage des métabolites secondaires..... | 8 |
| 1. Polyphénols totaux..... | 8 |
| 2. Flavonoïdes..... | 9 |
| 3. Tanins condensés..... | 9 |
| VI. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits..... | 9 |
| 1. Matériel biologique..... | 10 |
| 2. Préparation de la suspension bactérienne..... | 10 |
| 3. Technique des puits..... | 10 |
| RESULTATS ET DISCUSSION | |
| I. Taux d'humidité..... | 11 |
| II. Rendement des extraits..... | 11 |
| III. Dosage des métabolites secondaires des extraits..... | 12 |
| 1. Polyphénols..... | 12 |
| 2. Flavonoïdes..... | 13 |
| 3. Tanins..... | 13 |
| IV. Activité antibactérienne..... | 14 |
| CONCLUSION | 16 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 17 |

INTRODUCTION GENERALE

Le Maroc recèle un patrimoine végétal important riche et diversifié. Parmi ses ressources naturelles, les plantes aromatiques et médicinales (PAM) qui occupent une large et importante place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Ces dernières, constituent la source principale des molécules entrant dans la composition des médicaments pharmaceutiques (Yano *et al.*, 2006). En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches, *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels.

La résistance des microorganismes aux antibiotiques est un problème majeur de la santé publique, comme l'attestent de nombreux travaux (Soussy *et al.*, 2007). A titre d'exemple *Staphylococcus aureus*, principal agent pathogène impliqué dans des infections nosocomiales, a acquis de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques dès les années 1960. A cet effet, un intérêt accru s'est porté sur des molécules d'origine végétale ayant montré des propriétés antibactériennes (Kenpf *et al.*, 2011).

Les huiles essentielles et les extraits aromatiques de *Rosmarinus officinalis* sont largement utilisés, dans la médecine traditionnelle (Hostettmann, 1997).

Dans ce contexte, nous avons menés ce travail, a fin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits éthanolique, méthanolique et aqueux des feuilles de *Rosmarinus officinalis* en utilisant quatre souches pathogènes: *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*.

Ainsi, le présent travail se présente comme suit :

Nous avons établi dans un premier temps, une étude bibliographique de la plante *Rosmarinus officinalis*, pour pouvoir mettre l'accent sur l'importance de cette plante et de ses dérivés.

Par la suite, nous avons exposé la Méthodologie adoptée pour la recherche de l'activité antibactérienne de cette plante.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons présenté et discuté les résultats obtenus.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Plantes aromatiques et médicinales

Le Maroc, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse (El-Hilaly et *al.*, 2003). Parmi ces espèces végétales, 10% seulement sont des plantes aromatiques et médicinales, c'est-à-dire des plantes qui synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essences aromatiques par l'intermédiaire de poils, poches ou canaux sécréteurs (Pibiri, 2006).

Les plantes aromatiques et médicinales sont toujours associées aux comportements et au savoir traditionnel culturels. Selon les statistiques de 2003 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 80% de la population mondiale a recours aux médecines traditionnelles pour satisfaire des besoins en soins de santé primaire (Bhar et Balouk, 2011).

Les plantes aromatiques et médicinales ont de nombreuses utilisations. Elles sont employées, soit sous leur forme naturelle comme condiment et en pharmacopée traditionnelle, soit pour en extraire le principe actif recherché par les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (Aafi, 2003). À l'instar des autres pays méditerranéens, le Maroc se caractérise par la richesse et la diversité de ses PAM. Parmi ces derniers, on trouve: le romarin, l'armoise, le cèdre de l'Atlas, le myrte, le thym, le laurier-sauce et la camomille sauvage (El Khanchoufi, 2012).

II. Généralités sur la plante *Rosmarinus officinalis*

1. Classification

Le genre *Rosmarinus* regroupe deux espèces de plantes au Maroc : *Rosmarinus officinalis* L. et *Rosmarinus tournefortii* de Noe. Au Maroc, le nom vernaculaire de *Rosmarinus officinalis* L. est «azir» alors qu'au Moyen-Orient, il est connu sous le nom « Iklil Al Jabal » (Bhar et Balouk, 2011).

Embranchement: Spermaphytes.

Classe: Dicotylédones.

Ordre: Lamiales (Labiales).

Famille: Lamiaceae

Genre: *Rosmarinus*.

Espèce : *Rosmarinus officinalis*.

2. Description botanique

Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées, peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur, il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétioles, coriace beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous (Figure 1). La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusque avril-mai. La couleur des fleurs varie de la bleue pale ou violet. Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base. Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est tetrakène (de couleur brune) (Bekkara et *al.*, 2007).

Cette espèce très polymorphe, présente plusieurs variétés. Mais, à cette différenciation morphologique très aléatoire. Nombreux botanistes préfèrent s'appuyer sur la composition chimique de l'huile essentielle pour lister quatre chémotypes, suivant le composé dominant (Besombes, 2008) :

- Romarin à cinéole ;
- Romarin à verbénone ;
- Romarin à camphre, bornéol ;
- Et parfois romarin à mycène.



Figure 1: Arbuste de *Rosmarinus officinalis*

3. Usage traditionnels et médicinaux de *Rosmarinus officinalis*

Rosmarinus officinalis à de nombreuses utilisations traditionnelles, pharmacologiques et thérapeutiques :

- ❖ Elle stimule la circulation cérébrale, en améliorant la concentration et la mémoire (Iserin, 1996).

- ❖ Les extraits de feuilles du romarin ont prouvé l'activité neuroprotectrice contre une neurotoxicité induite par l'acrylamide chez des rats, ceci semble être dû à l'activité antioxydante de l'acide caféique et rosmarinique (Waggas et *al.*, 2008).
- ❖ L'huile essentielle de romarin possède des propriétés antifongiques, antiseptiques et une action antispasmodique (Besombes, 2008). L'huile essentielle de romarin est également utilisée dans l'industrie cosmétique ainsi que dans l'industrie alimentaire (Besombes, 2008).
- ❖ Plusieurs auteurs ont rapporté que certains composés présents dans les extraits du romarin possèdent des propriétés antibactériennes (Geogantelis et *al.*, 2007); anti-inflammatoires et anti-métastatiques (Cheung et Tai, 2007) et anti-spasmodiques (Hannebelle et *al.*, 2004).
- ❖ Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires et de la prolifération des tumeurs cutanées (Paris et *al.*, 1993 et Huang et *al.*, 1995).

4. Composés phénoliques de *Rosmarinus officinalis*

Les composés phénoliques sont constitués de trois grandes catégories : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (Ba et *al.*, 2010). Le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence des flavonoïdes et des tanins (Gonzalez et *al.*, 2007).

Les principaux constituants du romarin responsables des différentes propriétés biologiques sont : acide phénolique, tanins condensés et flavonoïde (Sebai et Boudali, 2012 ; Chevallier, 2002).

III. Techniques générales d'extraction

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des composés bioactives des plantes aromatiques et médicinales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles,...) et la nature des composés.

1. Macération

La macération est un procédé qui consiste à laisser séjourner un solide dans un liquide froid pour en extraire les composés solubles, ou bien pour qu'il absorbe ce liquide afin d'en obtenir le parfum ou la saveur, pour le conserver ou pour qu'il s'y décompose (Figure 2).

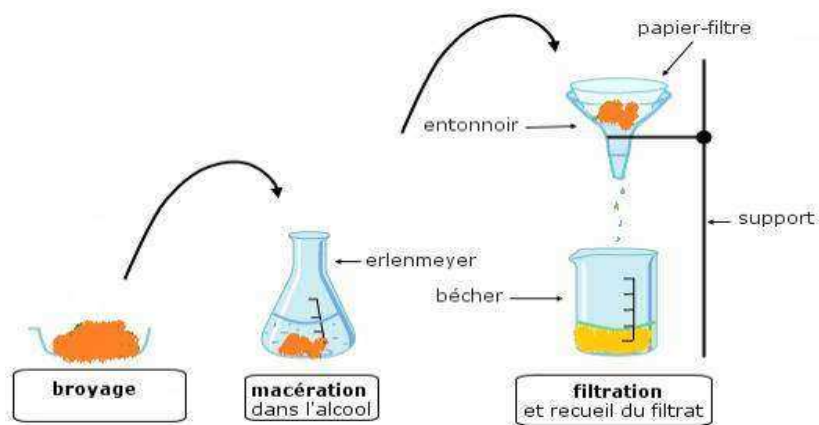


Figure 2: Technique de la macération à froid

2. Infusion

L'eau bouillante est versée sur les feuilles ou sur les fleurs finement hachées pour qu'elles libèrent l'arôme et leur principe actif. On laisse infuser une dizaine de minutes.

3. Décoction

La plante est mise dans l'eau froide et portée à ébullition. Cette méthode de transformation ne permet pas d'extraire autant de principe actifs que l'infusion, mais elle est adaptée aux racines et aux écorces pour lesquelles l'extraction est difficile.

4. Extraction par Soxhlet

L'extracteur de Soxhlet est un appareil spécialement conçu pour l'extraction continue solide liquide. Le corps de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie de matériel végétal. Cette cartouche est fixée sur un réservoir à siphon et surmontée d'un réfrigérant. Le solvant (5 à 10 fois la quantité de l'échantillon solide à extraire) est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en solutés à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec le solvant. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair, c'est-à-dire sans une proportion significative de solutés (Lagnika, 2005).

IV. Activité antibactérienne

Plusieurs études ont porté sur l'étude de l'activité biologique de certaines plantes médicinales marocaines (Remmal, 2011; Abdelrhafour et *al.*, 1993). Ces travaux ont porté sur les propriétés biologiques, pharmacologique et phytochimique des plantes issues de la médecine traditionnelle Marocaine. Ces données sur les plantes médicinales ont permis d'une part d'expliquer leur action thérapeutique et d'autre part de confirmer leurs utilisations en

médecine traditionnelle. Les huiles essentielles et les extraits des plantes sont connus pour leurs nombreuses propriétés biologiques. Plus particulièrement leurs propriétés antibactériennes (Abdelrhafour et *al.*, 1993).

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des extraits bruts et des huiles essentielles (Traoré et *al.*, 2012; Baser et Buchbauer, 2010; Tepsorn, 2009). Ainsi, les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'extrait aromatique et selon la nature du contact de l'extrait avec le microorganisme (Burt, 2004). La majorité des chercheurs ont employé une des trois analyses suivantes : diffusion sur disque, diffusion sur puits, dilution d'agar et dilution de bouillon. Celiktas et *al.*, (2007) ont testé l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques du romarin. Leurs résultats ont indiqué que les bactéries testées étaient plus sensibles aux huiles essentielles qu'aux extraits méthanolique.

Une autre étude a révélé que quatre souches d'*Escherichia coli* sont sensibles à la totalité des huiles essentielles testées. L'activité des huiles essentielles du romarin était appréciable (Moreira et *al.*, 2005).

MATERIEL ET METHODE

I. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette partie d'étude est constitué par les feuilles de *Rosmarinus officinalis* (Figure 3), récolté à partir du jardin botanique de la Faculté des Sciences et Techniques (FST, Fès). Le romarin récolté, séché à l'étuve (à 40°C), broyé et tamisé pour obtenir une poudre fine servant à la préparation de nos extraits.



Figure 3 : Feuilles de *Rosmarinus officinalis*

II. Extraction des différents extraits

La préparation des extraits est effectuée par macération à froid. Ainsi une quantité de 10g de la matière sèche de romarin est mélangé avec 100 ml (P/10V) de solvant approprié (éthanol, méthanol et eau). Après 24h, l'extrait final a été récupéré, filtré et séché à sec à l'aide d'un Rotavapeur (Figure 4) à une température de 40°C.



Figure 4 : Elimination du solvant par Rotavapeur

III. Humidité

La teneur en eau du matériel végétal a été déterminée par la formule suivante :

$$H(\%) = \frac{MF - MS}{MF} \times 100$$

Avec:

H(%): Taux d'humidité.

MF: Matière Fraiche (g).

MS: Matière Sèche (g).

IV. Rendement des extraits

Le rendement est déterminé par le rapport du poids de l'extrait sec après évaporation (m) sur le poids de la matière végétale sèche (ms) utilisée pour l'extraction, multiplié par 100 (Bekhechi, 2001).

$$R\% = \frac{P.E}{MS} \times 100$$

Avec:

R: Rendement en extraits en pourcentage (%).

P.E: Poids de l'extrait (g) recueilli

MS : Matière sèche en (g).

V. Dosage des métabolites secondaires

1. Polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1985). Le dosage consiste à mélanger un volume de 200µl de l'extrait (1mg/1ml) avec 1,5 ml de Folin. Ensuite, 1,5ml de carbonate de sodium (5%) ont été ajoutés à la solution, puis les tubes sont placés à l'obscurité pendant 2 heures à une température ambiante. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde 725nm.

Les concentrations des polyphénols sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec l'acide gallique de 1mg/ml et sont exprimées en microgramme d'équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme d'extrait ($\mu\text{g EAG/g}$).

2. Flavonoïdes

La détermination des flavonoïdes totaux est effectuée par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Chang et *al.*, 2002). Le dosage consiste à mélanger un volume de 1ml de l'extrait, avec 0,3ml de nitrite de sodium NaNO_2 (5%), après incubation pendant 5min, un volume de 0,3ml d' AlCl_3 (10%) et 2 ml de NaOH (1M) a été ajouté. ainsi le volume est complété à 10ml avec de l'eau distillée.

Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesuré à 510nm. Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la quercétine par référence et sont exprimées en microgramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/g}$).

3. Tanins condensés

Le dosage de tanins condensés consiste à mélanger un volume de 1ml de l'extrait (dilué deux fois) avec 1,5ml d'acide chlorhydrique HCl et avec 0,5ml de l'eau distillée (Ribereau-Gayon, 1966).

Deux séries sont préparées :

Série 1 : Température ambiante pendant 30 min;

Série 2 : Ebullition pendant 30 min.

Les absorbances des deux séries ont été mesurés à 550 nm et les résultats ont été exprimés par la relation suivante :

$$T_{(g/l)} = (\text{DO}_{S2} - \text{DO}_{S1}) \times 19.33$$

VI. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits

Le principe de la détection de l'activité antibactérienne est basé sur la diffusion de l'agent antimicrobien dans un milieu de culture solide ou semi-solide pour inhiber la croissance d'un micro-organisme indicateur sensible.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits est réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, méthode décrite par Vincent (Benyagoub et *al.*, 2015).

L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflètent l'impact des extraits sur les souches bactériennes.

1. Matériel biologique

Les souches bactériennes utilisées dans le présent travail sont largement rencontrées dans diverses pathologies chez l'homme. Ces souches appartiennent au laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement à la FST-Fès :

- Deux souches à Gram négative: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*
- Deux souches à Gram positif: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*

2. Préparation de la suspension bactérienne

A partir des colonies jeunes (18-24h), une suspension bactérienne, ajusté à une turbidité de 0,5 McFarland, est préparée dans l'eau physiologique. La densité bactérienne de la suspension obtenue est d'environ 10^8 UFC/ml.

3. Technique des puits

Le milieu de culture LB solide estensemencé par inondation de la suspension bactérienne de façon à recouvrir toute la surface gélosée (Figure 5). Ainsi à l'aide d'une pipette pasteur, des puits de 6 mm de diamètre sont effectués. Chaque puits reçoit 60 μ l de la substance à tester à une concentration de 200 mg/ml dissous dans le diméthylesulfoxyde (DMSO). Les boites sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 h.



Figure 5: Test de l'activité antibactérienne

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Taux d'humidité

Les résultats obtenus de la teneur en eau des feuilles, présente un taux d'humidité important avec un pourcentage de 74% (Figure 6), ce qui signifie que plus de la moitié du poids frais des feuilles de *Rosmarinus officinalis* est constitué par l'eau.

Les cellules végétales possèdent de l'eau qui est une source de dégradation des polyphénols par oxydation (Ribereau-gayon, 1968). Pour éviter cette dégradation on procède à un séchage pour éliminer l'eau, tout en préservant la composition chimique des cellules (Tomas-Babera et Espin, 2001).

Les résultats obtenus diffèrent de celle obtenus par Albu et ses collaborateurs (2004), qui ont trouvé une teneur en eau de 40% dans les feuilles fraîches du romarin. Cette différence pourrait être due à certains facteurs écologiques, à l'âge de la plante, à la période du cycle végétatif, ou même à des facteurs génétiques.

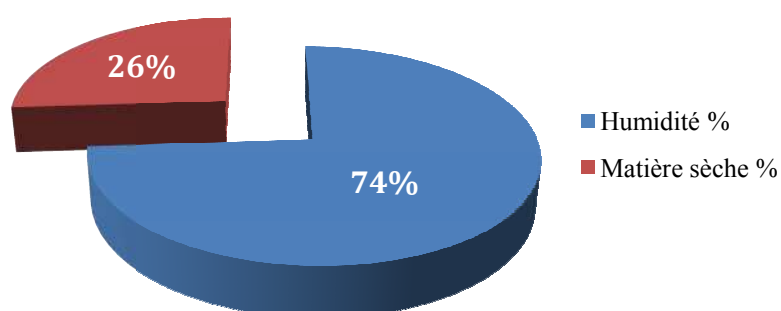


Figure 6 : Teneur en eau des feuilles de *Rosmarinus officinalis*

II. Rendement des extraits

Les résultats des rendements obtenus montrent que l'extrait méthanolique présente le rendement le plus important (22,25%) par rapport aux deux autres extraits éthanolique (11,72%) et aqueux (4,63%) (Figure 7).

Le méthanol est le solvant qui permet l'extraction d'une grande fraction des composés organiques à partir de la matière végétale (Rosangela et *al.*, 2007). Ce qui explique le rendement supérieur à ceux obtenus par l'éthanol et l'eau.

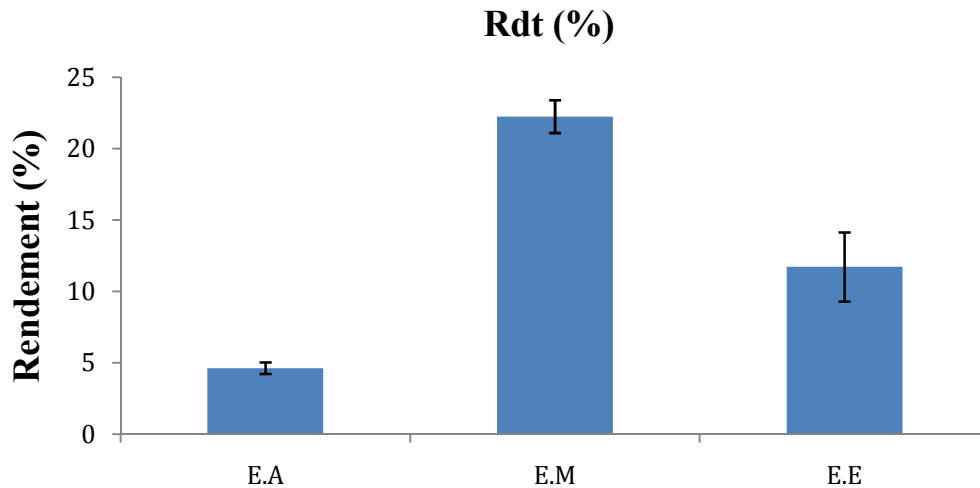


Figure 7 : Rendement des extraits de *Rosmarinus officinalis*

III. Dosage des métabolites secondaires

1. Polyphénols

Les résultats obtenus de la teneur en polyphénols sont donnés par les figures 8. Ainsi, nous avons constaté que la teneur en polyphénols de l'extrait éthanolique (38,06 mg/g) est plus importante par rapport à l'extrait méthanolique et aqueux (28,23 μ g/g et 23,58mg/g respectivement).

Des études menées par Sobhy et Ammar, 2009 montre que l'éthanol était le meilleur solvant pour extraire les composés phénoliques, suivi du méthanol et finalement de l'eau. Ce qui pourrait expliquer la différence mentionnée dans notre résultat.

Des études menées par Muchuweti et ses collaborateurs (2007) ont trouvé une teneur en polyphénols de 10,83mg/g dans l'extrait méthanolique des feuilles de romarin.

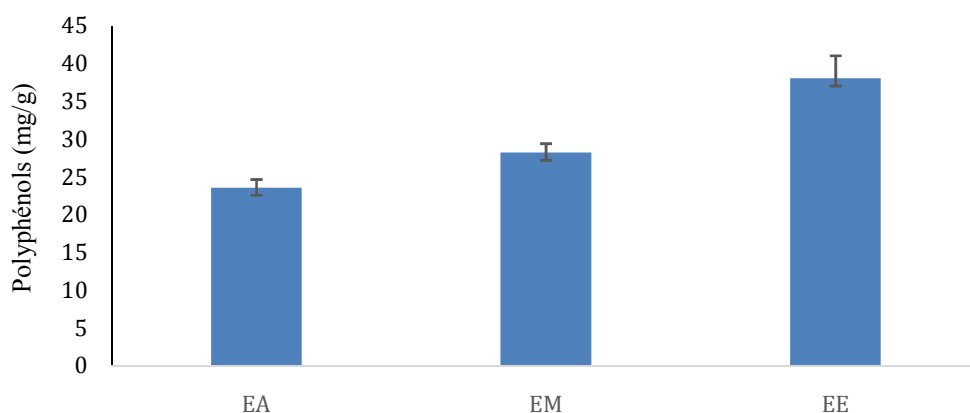


Figure 8 : Teneur en polyphénols des extraits de *Rosmarinus officinalis*

2. Flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes obtenues en fonction des différents extraits utilisés sont données par la figure 9. Ainsi, l'analyse des résultats montre que la teneur maximale en flavonoïdes a été enregistrée chez l'extrait méthanolique (14,41mg/g). Par contre, la valeur minimale a été enregistrée au niveau de l'extrait éthanolique (11,33mg/g).

Les résultats obtenus sont proches de ceux trouvés par Muchuweti *et al.*,(2007), qui ont obtenus une teneur en flavonoïdes de 8,83 mg EQ/g dans l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis*.

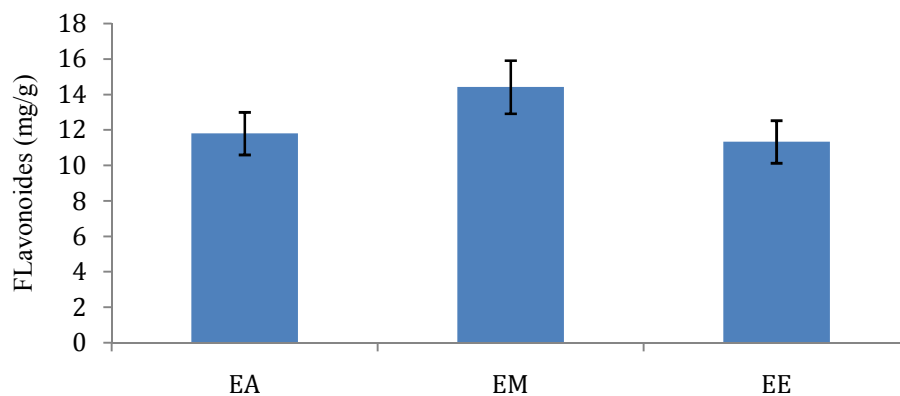


Figure 9 : Teneur en flavonoïdes des extraits de *Rosmarinus officinalis*

3. Tanins condensés

D'après la figure 10, nous avons constaté que la teneur en tanins condensés de l'extrait éthanolique est plus importante (8,32mg/g) par rapport à l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux (4,552 et 0,957 mg/g respectivement).

D'après ces résultats, on constate qu'il y a d'autres composés phénoliques qui n'ont été pas détectés. Les résultats obtenus sont comparables avec plusieurs travaux qui ont montré que *Rosmarinus officinalis* est très riche en tanins condensés, en flavonoïdes et en polyphénols (Peng *et al.*, 2005; Paniwnyk *et al.*, 2009).

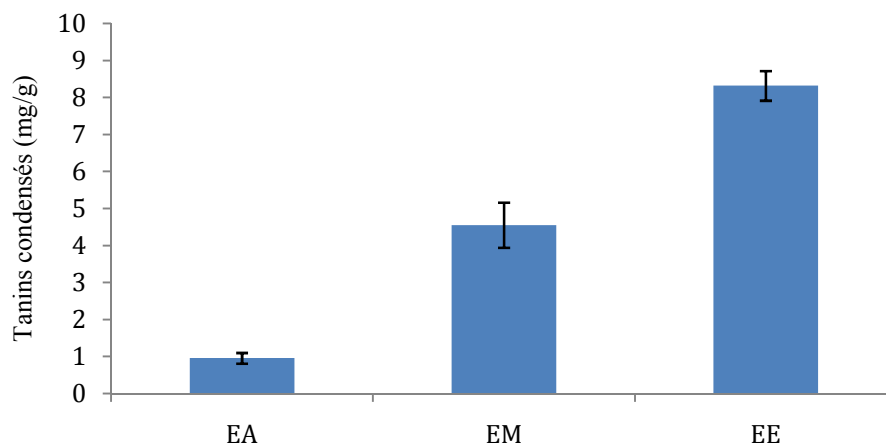


Figure 10: Teneur en tanins condensés des extraits de *Rosmarinus officinalis*

IV. Activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits de *Rosmarinus officinalis* sont résumés dans le tableau 1. En effet, l'analyse des résultats nous a permis de constater que les diamètres d'inhibition varient de 9,5 à 14,5 mm pour l'extrait éthanolique, 11 à 14 mm pour l'extrait méthanolique et de 12 à 13 mm pour l'extrait aqueux. Ainsi, les extraits méthanoliques et aqueux, possèdent un pouvoir antibactérien relativement supérieur à celui de l'extrait éthanolique contre les bactéries *Enterococcus faecalis* (Gram⁺) et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram⁻). En outre, l'extrait éthanolique et aqueux semble être actifs contre *Escherichia coli* (Gram⁻) par rapport à l'extrait méthanolique.

Les résultats ont montré que les souches bactériennes testées sont plus ou moins sensibles vis-à-vis des extraits du romarin. Nous pouvons donc déduire, que les différents extraits étudiés sont actifs contre les souches bactériennes testées.

Les résultats obtenus sont proches de ceux de Mouas et ses collaborateurs qui ont trouvé que l'extrait méthanolique du romarin inhibe la croissance bactérienne d'*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* avec des diamètres d'inhibition de 14mm, 13,25 mm et 7 mm respectivement.

Plusieurs études ont prouvé que les acides phénoliques, flavonoïdes et les tanins sont des substances antibactériennes importantes (Askunet *al.*, 2009). Ils sont capables d'inhiber la croissance de plusieurs souches bactériennes (Babayi, 2004; Ulanowska, 2006). La différence

de l'activité antimicrobienne des extraits de *Rosmarinus officinalis* semble être directement lié à la diversité quantitative et/ou qualitative des composés qui présents dans ces extraits.

Tableau 1 : Diamètre d'inhibition en (mm)

| Souches Extraits | <i>S. aureus</i> (mm) | <i>P. aeruginos</i> (mm) | <i>E. coli</i> (mm) | <i>E. faecalis</i> (mm) |
|---------------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------|----------------------------|
| E. éthanolique | 12 | 9,5 | 14,5 | 10 |
| E. méthanolique | 12,5 | 14 | 11 | 13,5 |
| E. aqueux | 12 | 12,5 | 13 | 12,5 |

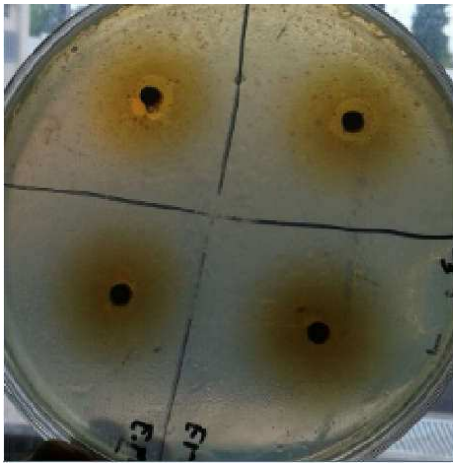


Figure 11 : Diamètre d'inhibition d'E E et E.M contre *E. coli*

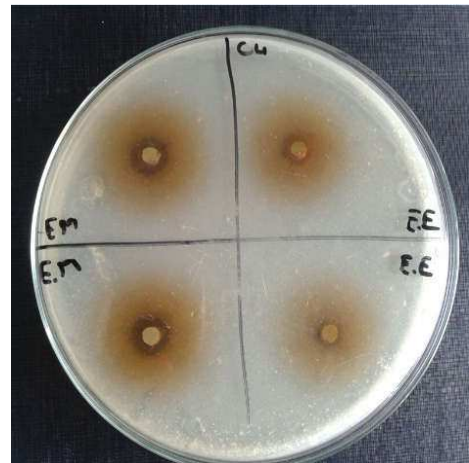


Figure 12 : Diamètre d'inhibition d'EE et E.M contre *E. faecalis*

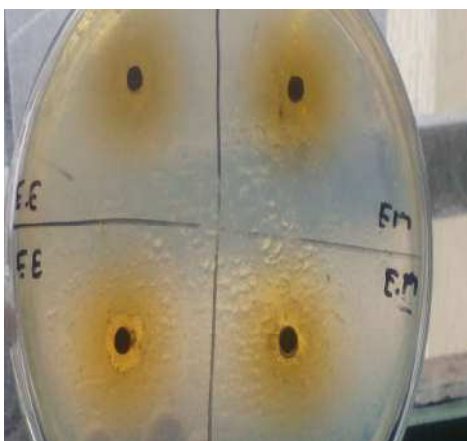


Figure 13 : Diamètre d'inhibition d'E.E et E.M contre *P. Aeruginos*

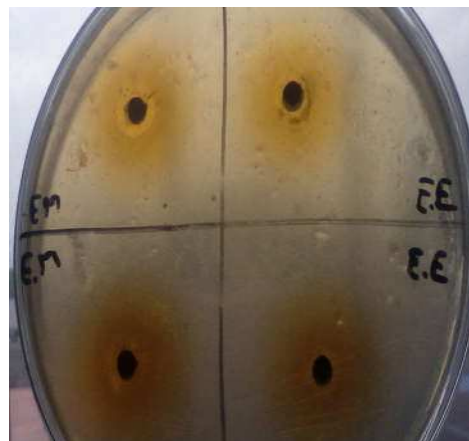


Figure 14 : Diamètre d'inhibition des E.E et E.M contre *S. aureus*

Conclusion

Le romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) est une plante médicinale. Il est intéressant de connaître ses vertus thérapeutiques, afin de remplacer les produits synthétiques par des molécules bioactives à base de plantes.

L'étude des propriétés antimicrobiennes des extraits des feuilles de *Rosmarinus officinalis* nous a permis d'obtenir des résultats intéressants.

L'analyse quantitative de chacun des trois extraits obtenus des feuilles de *Rosmarinus officinalis* a mis en évidence la présence des polyphénols et des tanins condensés abondants dans l'extrait éthanolique, alors que l'extrait méthanolique permet une meilleure extraction des flavonoïdes. Pour les extraits aqueux, la teneur reste faible pour la plupart des métabolites secondaires dosés.

En outre, les trois extraits éthanolique, méthanolique et aqueux ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis des quatre souches bactériennes étudiées.

En fin, l'ensemble des résultats obtenus *in-vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir valoriser d'avantage l'espèce *Rosmarinus officinalis*.

Références bibliographiques

- A. Bekkara, F. Bousmaha, L. Taleb bendiab, S. Boti, J. Casanova. (2007). Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Bio & San.* (7): 6-11.
- A. El Khanchoufi. (2012). Plantes aromatiques & médicinales une richesse à valoriser; journal LE MATIN 06 Décembre 2012 à 11:48.
- C. Bekhechi-benhabib. (2001). Analyse d'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata* (Nûnkha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. Thèse de magister de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, Algérie.
- C. Besombes. (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat.
- C. Chang, M. Yang, H. Wen et J. Chern. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10, 178–182.
- C. Leonard, S. Virijevic, T. Regnier, S. Combrinck. (2010). Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms; *South African Journal of Botany.* 76, 676–680.
- Chevallier. A. Larousse. (2001). *Encyclopedia of Medicinal Plants* (2nd Edition).
- D. Hrikrishna. A. Appa Rao et M. Prabhakar. (2004). Pharmacological investigation of prunin-6-O-p-coumarate : A flavonoid glycoside. *Indian J Pharmacol.* 36 (4), 244-250.
- H. Bhar et A. Balouk. (2011). *Les Plantes Aromatiques et Médicinales: ces plantes odorantes qui soulagent la douleur!*, collaboration avec le Centre de Recherche Forestier et l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques.
- Inc. Chemonics International. (2005). *Filière des Plantes Aromatiques et Médicinales.* Contract No. 608-M-00-05-00043-01, Submitted to: USAID/Morocco Mission U.S. Agency for International Development.
- J. Belakhdar. (1997). *La pharmacopée marocaine traditionnelle.* Idis PRESS (Ed). Paris, 764p.
- J. Bellakhdar. (2006). *Précis de phytothérapie moderne; plantes médicinales au Maghreb et soin de base / Ed le Fennec.* P : 294-295
- J. Bruneton. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales.* Technique et Documentation, Paris, 721-741.
- J. Bruneton. (2009). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales.* Lavoisier Technique et Documentation, 4ème Edition. Paris.
- J. Decoussera, B. Lamyb, P. Pinac, P. Allouchd. (2010). The Collège de bactériologie virologie hygiène study Group (ColBVH). Trends in antibiotic susceptibility of blood stream pathogens in hospitalized patients in France, 1996 to 2007. *Diag Microbiol Infect Dis.* 66:292–300.

J. El-Hilaly, Hmammouchi. M, Lyoussi. B. (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco); *Journal of Ethnopharmacology*. 86,149–158.

K. Ba, E. Tine, J. Destain, N. Cissé, P. Thonart. (2010). 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), 131-139.

K. Hostettmann. (1997). *Tout savoir sur le pouvoir des plantes*. Ed. Favre. S.A. Lausanne. Suisse.

L. Bermness, Larousse, (2005). *Plantes Aromatiques et Médicinales*.

L. Paniwnyk et al; (2009). The enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from

Rosmarinus officinalis using ultrasound; *Ultrasonics Sonochemistry*, 1: 287–292.

L.Lagnika. (2005). Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises.

M. Gonzalez-Trujano, Pena. E, Martinez. A, Moreno. J, Guevara-Fefer. P, Deciga-Campos. M, Lopez-Munoz. F. (2007). Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *JEthnopharmacol.* 111, 476-482.

M. Huang, C. Ho, Z. Wang, T. Ferraro, Y. Lou, K. Stanber, L. Hoffman, S. Besseau, P. Geoffroy, C. Rizenthaler, D. Meyer, C. Lepierre, E. Offord, K. Macé, C. Ruffieux, A.Malnoë et A. Pfeifer. (1995). Rosmary components inhibit benzo [a] pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis*. 16(9): 2057-2062.

M. Kempf, F. Eveillard, E. Kowalczyk, G. Rossines et M. Panhelleux. (2011). Antibacterial activity against 224 clinical bacterial strains of JCA 250 and JCA 251 compounds containing essential oils provided from Aroma Technologies research; *PathologieBiologie*. 59, 39–43.

M. Perez. (2008). *Caractérisation de Composés Phenoliques des extraits de ramilles du bouleau jaune : étude de leur capacité antioxydante*; Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en Sciences du bois pour l'obtention du grade de maîtres sciences (M.Se).

M. Pibiri. (2006). *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles*. Thèse N° 3311, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne.

M. Sebai et M. Boudali. (2012). Chevallier. A. (2001). Sebai. M et Boudali. M. (2012). *La Phytothérapie entre la confiance et méfiance*. Mémoire professionnel, infirmier de la sante publique. Institut de formation paramédical CHETTIA. 56p.

M.Sobhyet A. Ammar, (2009) Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chem.* 112: 595-598.

M. Waggaset A. Balawi. (2008). Neurophysiological Study on Possible Protective Effect of Rosemary (*Rosmarinusofficinalis*) Leaves Extract in Male Albino Rats Treated with Acrylamide; *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 3 (2): 163-171.

N. Mouhssine. (2012). *Plantes aromatiques & médicinales Une richesse à valoriser*. Le Matin Weekend 7-13 décembre. P : 12-15.

N. Okamura, H. Haraguchi, K. Hashimoto et A. Yaghi. (1994). Flavonoids in *Rosmarinusofficinalis* leaves. *Phytochemistry*, 37(5): 1463- 1466.

- P. Iserin. (1996). Encyclopedie des plantesmédicinales, identification, préparations, soins ; (2ndEdition) ; 1996, 2001 DorlingKindersiey Limited, Londres ; Text copyright 1996, 2001 Andrew Chevallier ; ISBN: 2-03-560252-1).
- P. Quezel, S. Santa. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. C.N.R.S. (Ed). Paris, 565p.
- R. Grayer et J. Harborne. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1993. *Phytochemistry*, 37, 19-42.
- R. Lagunez. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe ; thèse doctorat.
- S. Cheung et J. Tai. (2007). Anti-proliferative and antioxidant proprieties of *Rosmarinus officinalis*. *Oncology reports*. 17 (6): 1525-1531.
- S. Martin et al., (2002). Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium; *Annales de cardiologieetd'angéiologie*. 51, 304–315.
- S. Salhi, M. Fadli, L. Zidane et A. Douira. (2010). Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc), *Lazaroa*. 31: 133-146.
- S. Sati et S. Joshi. (2011). Aspects of antifungal Potentiel of Ethnobotanically Known Medicinal Plants. *Research Journal of Medicinal Plant* 5 (4): 377-391.
- SNDS Des PAM. (2008). Stratégie nationale de développement du secteur des plantes aromatiques et médicinales au Maroc. Coordination: HCFLCD, Assistance Technique: USAID. 70 p.
- T. Askun, G. Tumen, F. Satil, M. Ates. (2009). *In vitro* activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *Food Chem*. 116: 289-294
- T. Hennebelle, Sahpaz. S, Bailleul. F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. (1), 3-6.
- V. Singleton et J. Rossi. (1985). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3), 144–158.
- Y. Celiktas. (2007) Antimicrobialactivities of methanolextracts and essential oils of *Rosmarinusofficinalis*, depending on location and seasonalvariations; *Food Chemistry*, 553-559.
- Y. Yano, M. Satomi et H. Oikawa. (2006). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal Food Microbiology*, 11: 6-11.