



N° d'ordre 03/2016

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mme : Afaf MEGZARI

Spécialité : Chimie

Option : Molécules bioactives

Contribution à la valorisation de *Rosmarinus officinalis*: effets de la provenance et de l'individualité sur la qualité chimique et l'activité microbiologique

Thèse présentée et soutenue le 16/01/2016 devant le jury composé de :

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
OUAZZANI CHAHDI Fouad	PES	FST Fès	Président
LAKHLIFI Tahar	PES	FS Meknès	Rapporteur
MBARKI Mohamed	PES	FST Béni-Mellal	Rapporteur
FIKRI BENBRAHIM Kawtar	PES	FST Fès	Rapporteur
BOUSTA Dalila	PH	FS Dhar EL Mehraz	Examineur
IRAQUI HOUSSAINI Mohammed	PES	FST Fès	Examineur
EL HADRAMI El Mestafa	PES	FST Fès	Directeurs de thèse
FARAH Abdellah	PH	FST Fès	

Laboratoires d'accueil :

Laboratoire de Chimie Organique Appliquée

Etablissement : Faculté des Sciences et Techniques, Fès

Laboratoire d'extraction et de synthèse chimique

Etablissement : Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques, Taounate

Dédicace

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 l'homme de ma vie, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui a su guider mes pas vers un horizon plus clair, plus joyeux, à toi mon mari.

A mes chères filles pour l'espoir que vous gravez de jour en jour dans mon cœur

A toute ma famille, ma nièce Meryem et mes amis.

A ceux qui n'ont jamais cessé de veiller sur moi et qui ont essayé de me soutenir d'une manière ou d'une autre au cours de mon processus

Remerciements

Au terme de cette recherche qui a bénéficié de nombreux appuis, le devoir de reconnaissance s'impose envers les personnes, les structures de recherche et les institutions qui ont apporté leur aide et contribué à sa réalisation.

Je remercie particulièrement mon directeur de thèse, le Pr. El Mestapha EL HADRAMI, membre du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée (LCOA) à la Faculté Des Sciences et Techniques de Fès. Merci tout d'abord pour la confiance que vous m'avez accordée. Mes remerciements les plus sincères pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et pour m'avoir conseillé avec abnégation et dévouement, tout en me laissant une large marge d'autonomie. Votre direction rigoureuse, votre inestimable soutien, vos encouragements énergisants ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse.

Je remercie sincèrement le Professeur Abdellah Farah mon co-directeur de thèse, Responsable du Laboratoire des Plantes Médicinales, Aromatiques et Substances Naturelles à l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour son dévouement exemplaire et son encadrement sans faille que pour ses recommandations et avis judicieux durant nos séances de travail. Je le remercie également pour sa disponibilité, toutes ses suggestions, son soutien, sa gentillesse, ses encouragements et sa disponibilité tout en long de la réalisation de ce projet.

Je tiens donc tout d'abord à adresser mes chaleureux remerciements à l'ex-directeur de l'INPMA, Mr Abdessalam ELKHANCHOUI pour m'avoir si chaleureusement accueilli au sein de l'institut.

Je tiens également à remercier le Professeur Mohammed IRAQUI HOUSSAINI, membre du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne, de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire, de m'avoir mis dans le bain de la microbiologie et appris le métier. Ses compétences et sa disponibilité ont joué un rôle décisif dans la réalisation d'une grande partie de ce travail.

Je remercie également le Pr. OUAZZANI CHAHDI Fouad pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider cette soutenance et de juger cette thèse dans sa globalité.

A l'ensemble des membres du jury, Pr. LAKHLIFI Tahar, Pr. MBARKI Mohamed, Pr. FIKRI BENBRAHIM Kawotar, Pr. BOUSTA Dalila et Pr. IRAQUI HOUSSAINI Mohammed, je vous remercie pour avoir accepté de juger ce travail.

Cette thèse n'aurait pas abouti en bonne et due forme sans les autres membres des laboratoires qu'ils aient effectué un bref séjour ou qu'ils soient là depuis mes débuts. Merci à Mme Amina CHERIF HAOUAT, et tous mes amis.

Résumé

Les Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) constituent une richesse naturelle de première importance au Maroc et représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs. Cependant, la gestion et la conservation de ce patrimoine se trouvent confrontées à des contraintes diverses qui contribuent à la dégradation de ces ressources.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation du patrimoine naturel marocain, principalement les plantes aromatiques et médicinales et plus précisément le Romarin.

Nous nous sommes intéressés premièrement à déterminer et comparer le rendement en huile essentielle, la qualité chimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne des essences du *Rosmarinus officinalis* de quatre provenances (Jardin de Jacky d'Agadir, Sefrou, Oued Laou et Ayoun Charquia). Nous avons trouvé que les rendements moyens obtenus, varient en fonction des quatre provenances. La composition chimique des essences a été déterminée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les résultats ont montré une variabilité chimique très intéressante au sein des huiles essentielles étudiées associée à leurs origines. L'étude statistique descriptive et comparative de la composition chimique du Romarin des différentes régions par la méthode d'analyse en composantes principales a montré une bonne classification des huiles essentielles du Romarin des différentes régions selon la composition chimique. De ce fait, ces huiles peuvent être classées en fonction de leur chémotype. Les différentes huiles étudiées ont fait l'objet d'une évaluation de l'activité antibactérienne. Les résultats obtenus montrent que ces essences possèdent des pouvoirs antibactériens intéressants sur toutes les souches étudiées. Cette activité diffère d'une région à une autre statistiquement.

Une étude de l'effet de l'individualité sur la teneur, la composition chimique et l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits fixes du *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* cultivé dans le jardin expérimental de l'Institut National des Plantes Aromatiques et Médicinales de Taounate a été réalisée. Il en résulte que deux individus (5 et 7) peuvent être choisis pour une future multiplication végétative afin d'avoir des clones capables d'assurer une production standard en huile essentielle source d'activité antimycobactérienne très importante. Par contre, les deux individus (4 et 7) peuvent être choisis pour assurer une production des extraits source d'activité antibactérienne très importante vis-à-vis des souches testées y compris *Mycobacterium smegmatis*.

Mots clés : Valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales, *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus*, Huile essentielle, Composition chimique, Activité antibactérienne, Analyse en Composante Principale.

Abstract

Aromatic and Medicinal plants (AMP) are a natural resource of great importance in Morocco and represent an endless source of bioactive substances and natural compounds. However, the management and conservation of this heritage are faced with various constraints that contribute to the degradation of these resources.

This work is part of the valuation of the Moroccan natural heritage, mostly medicinal and aromatic plants and more specifically the Rosemary.

We were first interested in determining and comparing the essential oil yield, chemical quality and evaluation of antibacterial activity of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* in four provenances (Garden Jacky of Agadir, Sefrou, Oued Laou and Ayoun Charquia). We found that the obtained average yields vary based on the four sources. The chemical composition of essential oils was determined by using gas chromatography coupled with mass spectrometry. The results showed a very interesting chemical variability in essential oils studied associated with their origins. The descriptive and comparative statistical study of the chemical composition of Rosemary of different regions by the principal component analysis method showed a good classification of essential oils of Rosemary of different regions according to the chemical composition. Thus, these oils may be classified according to their chemotype. The different oils that have been studied were evaluated for antibacterial activity. The results obtained show that these essential oils possess interesting antibacterial powers on all the strains tested. This activity differs statistically from one region to another.

A study of the individuality effect on the yield, chemical composition and antibacterial activity of essential oils and fixed extracts of *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* grown in the experimental garden of the National Institute of Aromatic and Medicinal Plants of Taounate was performed. It follows that two individuals (5 and 7) may be selected for future vegetative propagation to have clones capable ensuring a standardized essential oils production which is a very important source of antimycobacterial activity. However, the two individuals (4 and 7) may be selected to provide a very important extracts source of antibacterial activity about the strains tested including *Mycobacterium smegmatis*.

Keywords: Valuation of Aromatic and Medicinal Plants, *Rosemary* var. *Prostratus*, Essential Oil, Chemical composition, antibacterial activity, Principal Composant Analysis.

ملخص

النباتات الطبية و العطرية تشكل ثروة طبيعية بالغة الاهمية بالنسبة للمغرب و تمثل موردا لا ينضب من المواد والمركبات الطبيعية البيو حيوية. بيد ان ادارة وحفظ هذا التراث يواجهان قيودا متنوعة تسهم في تدهور تلك الموارد.

وينتضم هذا العمل في اطار تقييم التراث الطبيعي المغربي وخاصة النباتات العطرية والطبية واكثر تحديدا نبتة اكليل الجبل (الروز ماري) .

ولقد اهتمنا في المقام الاول بتحديد ومقارنة الكفاءة في الزيوت العطرية و الجودة الكيميائية وتقييم النشاط المضاد للبكتيريا لزيوت اكليل الجبل الطبي أو روسمرينوس أفيسيناليس لأربعة مصادر (حديقة جاك في اكادير, صفرو, واد لاو والعيون الشرقية).

وقد وجدنا ان الكفاءات المتوسطة المحصل عليها تتباين تبعا للمصادر الاربعة. فالتركيبية الكيميائية للزيوت تم تحديدها باستخدام التركيبية الكيماوية الى جانب قياس الطيف الكتلي. وأظهرت النتائج تغيرا كيميائيا مثيرا للاهتمام في الزيوت الاساسية التي تمت دراستها على اساس الاصل. فالدراسة الاحصائية الوصفية والمقارنة للتركيبية الكيميائية لنبتة اكليل الجبل للمناطق المختلفة بمنهجية تحليل العناصر الرئيسية اظهرت حسن تصنيف الزيوت الاساسية لنبتة اكليل الجبل للمناطق المختلفة وفقا للتركيبية الكيميائية. ونتيجة لذلك, فان هذه الزيوت يمكن تصنيفها بحسب النمط الكيميائي.

مختلف الزيوت التي تمت دراستها كانت موضع تقييم للنشاط المضاد للبكتيريا. تبين النتائج التي تم الحصول عليها ان هذه الزيوت الاساسية تمتلك قوى مضادة للبكتيريا مثيرة للاهتمام بالنسبة لجميع السلالات التي تمت دراستها. هذا النشاط يختلف إحصائيا من منطقة إلى أخرى.

وقد أجريت دراسة تأثير الفردية على المحتوى، والتركيب الكيميائي والنشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الاساسية والمستخلصات الثابتة لنبتة روسمرينوس أفيسيناليس فار بروساتوس التي تمت زراعتها في الحديقة التجريبية بالمعهد الوطني للنباتات الطبية والعطرية بتاونات.

ويترتب على ذلك انه يمكن اختيار النبتتان (5 و7) في المستقبل للتكاثر النباتي من اجل الحصول على مستنسخات قادرة على ضمان إنتاج موحد من الزيوت الاساسية و تمثل مصدر مهما جدا للنشاط المضاد للبكتيريا. ومن جهة اخرى النبتتان (4 و7) يمكن اختيارهما من اجل انتاج المستخلصات التي تمثل مصدرا مضادا للبكتيريا ا في غاية الاهمية تجاه السلالات التي تم اختبارها بما فيها سلالة المتفطرة اللخنية .

الكلمات المفاتيح : تقييم النباتات الطبية و العطرية , روسمرينوس أفيسيناليس فار بروساتوس, الزيوت الاساسية, التركيبية الكيميائية, النشاط المضاد للبكتيريا , تحليل العناصر الرئيسية.

Liste des Abréviations

ACP :	Analyse en Composante Principale
AFNOR :	Association Française de Normalisation
ANOVA :	Analyse de la Variance
<i>B. subtilis</i> :	<i>Bacillus subtilis</i>
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CM :	Carré moyen
CPG :	Chromatographie en Phase Gazeuse
CP :	Composante Principale
CPG-SM :	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
Ddl :	Nombre de degrés de liberté
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DO :	Densité Optique
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
eV :	Electron Volt
HE :	Huile Essentielle
HPLC :	Chromatographie Liquide à Haute Performance.
IC :	Ionisation Chimique
IE :	Impact Electronique
IK :	Indice de kovalts
INPMA :	Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques
<i>M. smegmatis</i> :	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
M/z :	Masse / Charge
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PAM :	Plantes Aromatiques et Médicinales
<i>R. officinalis</i> :	<i>Rosmarinus officinalis</i>
SCE :	Somme des carrés des écarts

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification botanique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	42
Tableau 2: Présentation générale d'un tableau d'analyse de la variance à un facteur.....	68
Tableau 3: Rendements en huile essentielle obtenus par hydrodistillation du <i>R. officinalis</i> de différentes régions étudiées.....	70
Tableau 4: Composition chimique des huiles essentielles de <i>R. officinalis</i> des quatre Provenances.....	72
Tableau 5: Structures chimiques des composés majoritaires des HE.....	81
Tableau 6: Composés de l'huile essentielle utilisée dans les analyses statistiques.....	82
Tableau 7: Effet antibactérien des quatre huiles essentielles du <i>R. officinalis</i> par la méthode de disque.....	88
Tableau 8: Tableau d'Analyse de la variance à un facteur.....	88
Tableau 9: CMI des huiles essentielles du Romarin de différentes régions.....	91
Tableau 10: Rendements en HE obtenus par hydro-distillation des différents individus étudiés.....	95
Tableau 11: Composition chimique des huiles essentielles de sept individus de <i>Rosmarinus officinalis var. Prostratus</i>	96
Tableau 12: Composés de l'huile essentielle utilisée dans les analyses statistiques.....	104
Tableau 13 : Pourcentage de la variabilité expliquée des données.....	104
Tableau 14: Effet antibactérien des huiles essentielles des 7 individus du <i>Rosmarinus Prostratus</i> par la méthode de disque.....	109
Tableau 15: Tableau d'Analyse de la Variance à un facteur.....	109
Tableau 16: CMI des huiles essentielles du Romarin.....	110
Tableau 17: Rendement des extraits de <i>Rosmarinus officinalis var. Prostratus</i> obtenus par les ultrasons.....	114
Tableau 18: Effet antibactérien des extraits de 7 individus du Romarin par la méthode de disque.....	115
Tableau 19: Tableau d'Analyse de la variance à un facteur.....	116
Tableau 20: Concentration Minimale d'Inhibition (CMI), des extraits d'acétate d'éthyle des différents individus du <i>Rosmarinus officinalis var. Prostratus</i>	118
Tableau 21: Caractérisation phytochimique des extraits de <i>R. officinalis var. Prostratus</i> ...	120

Liste des figures

Figure 1: Les produits PAM leaders dans l'exportation mondiale (en tonnes, campagne 2012-2013).....	8
Figure 2: Les produits PAM leaders dans l'exportation mondiale (en valeur, campagne 2012-2013).	9
Figure 3: Exportation des PAM par marché et en % du volume (campagne 2012-2013).....	9
Figure 4: Exemples de structures des monoterpènes	11
Figure 5: Exemples de structures de sesquiterpènes.....	12
Figure 6: Structures de quelques composés aromatiques des HE	13
Figure 7: Structures des squelettes de base des flavonoïdes	24
Figure 8: Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)	26
Figure 9: Structure chimique des alcaloïdes (Solanine et Nicotine).....	28
Figure 10: Schéma du dispositif de l'entraînement à la vapeur d'eau.....	29
Figure 11: Schéma du dispositif de l'hydrodistillation.	30
Figure 12: Schéma de principe d'extraction par CO ₂ supercritique	31
Figure 13: Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes.....	32
Figure 14: Appareil de la technique de l'expression à froid	33
Figure 15: Extracteur Soxhlet	35
Figure 16: Aspect morphologique de <i>R. officinalis</i>	44
Figure 17: Photo du Romarin du Jardin de Jacky d'Agadir	51
Figure 18: Photo du Romarin de l'Oriental	52
Figure 19: Photo du <i>Romarinus var. Prostratus</i>	53
Figure 20: <i>Rosmarinus var. Prostratus</i> transplanté dans la parcelle expérimentale de l'INPMA	54
Figure 21: Appareil de Clevenger du centre d'INPMA	55
Figure 22: Sonicateur du centre d'INPMA	56
Figure 23: Décomposition matricielle de la PCA	64
Figure 24: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de Romarin d'Agadir	74
Figure 25: Répartition en % des principales familles de composés de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> de la région d'Agadir	74
Figure 26: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de Romarin d'Oued Laou.....	75
Figure 27: Répartition en % des principales familles de composés de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> de la région d'Oued Laou.....	75
Figure 28: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de Romarin de la prévenance de l'Ayoune Charquia	76
Figure 29: Répartition en % des principales familles de composés de l'huile essentielle de <i>Romarin officinalis</i> de la région l'Ayoune Charquia.....	77
Figure 30: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle du Romarin de la prévenance de Sefrou	77

Figure 31: Répartition en % des principales familles de composés de l'huile essentielle de <i>Romarin officinalis</i> de la région de Sefrou.	78
Figure 32: Graphe de la variance expliquée en fonction du nombre de composantes retenues .	83
Figure 33: Moyenne et écart type de chaque variable	83
Figure 34: Cercle des corrélations des variables des huiles essentielles	84
Figure 35: Graphe de distribution des individus	85
Figure 36: Graphe de distribution des variables	85
Figure 37: Graphe combinant les individus et les variables	85
Figure 38: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 1)	97
Figure 39: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 2)	98
Figure 40: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 3).....	99
Figure 41: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 4).	100
Figure 42: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 5).	101
Figure 43: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 6).	102
Figure 44: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 7).	103
Figure 45: Graphe de la variance expliquée en fonction du nombre de composantes retenues.	105
Figure 46: Graphe de la moyenne et écart type	105
Figure 47: Cercle des corrélations des variables des huiles essentielles	106
Figure 48: Graphe des variables	107
Figure 49: Graphe d'ellipse de hotteling	107
Figure 50: Graphe des individus	107

Sommaire

Introduction Générale	1
Chapitre I : Etude Bibliographique	4
I. Les Plantes Aromatiques et Médicinales.....	4
I.1. Historique	4
I.2. Les PAM au Maroc.....	6
II. Molécules bioactives des PAM (Métabolites secondaires)	10
II.1. Les huiles essentielles.....	10
II.2. Les polyphénols	21
II.3. Les Alcaloïdes	27
III. Méthodes d'extraction des molécules bioactives	29
III.1. Huiles essentielles	29
III.2. Extraits de plantes	34
IV. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	36
V. Généralités sur <i>Rosmarinus officinalis</i>	38
V.1. Histoire du Romarin	38
V.2. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du Romarin.....	40
V.3. Domaines d'utilisation du Romarin	40
V.4. Botanique et description de la plante	42
V.5. Ecologie	44
V.6. Intérêt socio-économique	45
V.7. La culture du Romarin	46
VI. Domestication	47
VI.1. Définition.....	47
VI.2. Généralités sur la domestication des plantes	47
VI.3. La domestication des PAM	48
Chapitre II : Matériels et méthodes	50
I. Présentation des stations étudiées :	50
I.1. Présentation de la région d'Agadir.....	50
I.2. Présentation de la région de l'Oriental	51
I.3. Présentation de la région de Sefrou.....	52
I.4. Présentation de la région d'Oued Laou.....	52
II. Extraction des huiles essentielles et des extraits de plantes	54

Sommaire

II.1.	Extraction des huiles essentielles.....	54
II.2.	Extraction des extraits fixes.....	55
III.	Détermination du taux d'humidité et rendement en huiles essentielles	56
III.1.	Taux d'humidité.....	56
III.2.	Masse de la matière sèche	57
III.3.	Rendement en huile essentielle	57
IV.	Analyses Chimiques	57
IV.1.	Détermination de la composition chimique des huiles essentielles	57
IV.2.	Screening phytochimique des extraits de plantes	58
V.	Activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits.....	60
V.1.	Souches bactériennes.....	60
V.2.	Procédure microbiologique	61
VI.	L'analyse en composante principale (ACP).....	62
VII.	L'analyse de variance à un facteur	66
VII.1.	Définition	66
VII.2.	Principe.....	66
VII.3.	Equation fondamentale de l'analyse de la variance	67
VII.4.	Tableau de l'analyse de la variance à un facteur	68
Chapitre III : Effet de la provenance sur la composition chimique, le rendement et l'activité antibactérienne des huiles essentielles du Romarin marocain		69
Introduction.....		69
I.	Rendement en huile essentielle	70
II.	Composition chimique des huiles essentielles.....	71
II.1.	Composition de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> de Jardin de Jacky de la région d'Agadir	73
II.2.	Composition de l'huile essentielle de <i>R. officinalis var Prostratus</i> de la région d'Oued Laou	75
II.3.	Composition de l'huile essentielle du Romarin de la région de l'Ayoune Charquia	76
II.4.	Composition de l'huile essentielle de Romarin de la région de Sefrou.....	77
II.5.	Discussion de la composition chimique des huiles essentielles des quatre provenances	78
III.	Analyse en Composantes Principales (ACP)	82
III.1.	Variabilité expliquée.....	82

Sommaire

III.2. Etude des variables.....	83
IV. Etude de l'activité antibactérienne par la méthode de disque	87
V. Détermination de la CMI	90
VI. Conclusion	92
Chapitre IV : Effet de l'individualité sur la teneur, la composition chimique et l'activité antibactérienne des huiles essentielles du <i>Rosmarinus officinalis var. Prostratus</i> cultivé dans le jardin expérimental de Taounate	94
Introduction.....	94
I. Rendement en huile essentielle	95
II. Composition chimique.....	95
II.1. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 1) de <i>R. officinalis var. Prostratus</i>	97
II.2. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 2) de <i>R. officinalis var. Prostratus</i>	98
II.3. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 3) de <i>R. officinalis var. Prostratus</i>	99
II.4. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 4) de <i>R. officinalis var. Prostratus</i>	99
II.5. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 5) de <i>R. officinalis var. Prostratus</i>	100
II.6. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 6) de <i>R. officinalis var. Prostratus</i>	101
II.7. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 7) de <i>R. officinalis var. Prostratus</i>	102
III. Analyse en Composantes Principales (ACP)	103
III.1. Variabilité expliquée.....	104
III.2. Etude des variables.....	105
III.3. Etude des huiles essentielles des différents individus	107
IV. Etude de l'activité antibactérienne par la méthode de disque	108
V. Détermination de la CMI	110
VI. Conclusion	112
Chapitre V : Etude de l'effet de l'individualité sur l'activité antibactérienne des extraits de <i>Rosmarinus officinalis var. Prostratus</i> obtenus par les ultrasons.....	113
Introduction.....	113
I. Rendement en extraits par Sonication	113
II. Etude de l'activité antibactérienne par la méthode de disque	115
III. Détermination de la CMI	118
IV. Screening Phytochimique.....	119
V. Conclusion	121
Conclusion Générale.....	123
Références	127

Introduction générale

Introduction générale

Depuis toujours, l'homme a puisé dans la nature pour assurer ses besoins en nourriture, abris, matières premières et médicaments. Donc, la survie de l'homme est liée à l'existence de ressources naturelles dont les espèces végétales constituent, à côté des espèces animales et minérales, une composante fondamentale. Dès l'origine, les êtres humains ont utilisé les plantes pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner. En effet, les plantes renferment une large variété de molécules chimiques, à propriétés physico-chimiques très diversifiées et présentent plusieurs activités biologiques (antimorales, antivirales, antimicrobiennes, antioxydantes, cicatrisantes...) (Michel, 2011).

L'augmentation alarmante du taux d'infection avec les microorganismes pathogènes, due à l'émergence de bactéries résistantes, est devenue une préoccupation majeure dans le domaine de la santé (Maugein et al., 2003). A titre d'exemple, *Mycobacterium tuberculosis*, agent principal de la tuberculose, a acquis de nombreux mécanismes de résistance à la majorité des antituberculeux connus (Chan et Iseman, 2008). Cette résistance entraîne souvent une prolongation de l'état pathologique et un accroissement du taux de mortalité. En effet, près de 2 millions de personnes meurent chaque année de la tuberculose dont 150 000 cas de décès sont dus à la tuberculose multirésistante (WHO, 2010).

La propagation de ce phénomène de résistance et le nombre limité d'antibiotiques en cours de développement font de la découverte de nouveaux agents antibactériens, plus qu'indispensable. Ces substances doivent être disponibles et moins toxiques que les antibiotiques obtenus par voie chimique qui engendrent des effets indésirables inquiétant les utilisateurs. En effet, les traitements à base de plantes médicinales et aromatiques deviennent indispensables.

De nombreuses études ont été réalisées, sur les extraits des plantes aromatiques en tant que source d'agents antimicrobiens utiles, partout dans le monde: en Australie (Prasad et Seenayya, 2000), en Iran (Bonjar, 2004), en Italie (Tampieri et al., 2005), en Turquie (Dulger et al., 2006) et au Maroc (Sqalli et al., 2009).

Le Maroc, par sa situation géographique dans le bassin méditerranéen, dispose d'une gamme très variée de bioclimats. Allant de l'humide au nord, subhumide au centre et aride au sud. A cette diversité de climats correspond une grande diversité bioécologique ainsi qu'une flore très riche, composée d'environ 4200 espèces dont 600 ont des vertus aromatiques et médicinales. Le Maroc occupe ainsi la première place parmi les pays du Sud de la Méditerranée pour sa richesse en plantes endémiques (Fennane et al., 2007).

Introduction générale

À côté de ce contexte naturel encourageant, le Maroc est l'un des pays méditerranéens qui ont une longue tradition médicale et un savoir-faire traditionnel à base de plantes médicinales (Lahsissene et al., 2009; Scherrer et al., 2005). Ces connaissances médicinales ancestrales ont permis d'orienter et de développer plusieurs travaux de recherches, particulièrement en phytothérapie (Bnouham et al., 2007 et 2002; Mekhfi et al., 2006; El haouari et al., 2007; Legssyer et al., 2004).

L'exploitation des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM), au Maroc est loin d'être rationnelle. Des cueillettes massives et répétées dans les habitats naturels épuiseraient très rapidement les PAM spontanées ce qui pourrait hypothéquer la survie et la pérennité des peuplements et compromettre le capital génétique. La domestication et la culture des PAM s'avèrent une solution adéquate pour préserver ces plantes. Il est reconnu que les PAM spontanées sont plus performantes que celles cultivées, en terme de rendement de substances naturelles. Néanmoins, l'amélioration des techniques culturales est une voie prometteuse pour hausser la performance et les rendements des PAM cultivées.

Parmi la multitude de plantes aromatiques existantes dans le Maroc, nous nous sommes particulièrement intéressés au *Rosmarinus officinalis* (Romarin), qui est l'une des plantes naturelles renfermant une huile essentielle extrêmement parfumée et reconnue pour ses vertus médicinales et aromatiques depuis l'antiquité. Il a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique et agro-alimentaire et possède d'excellentes propriétés antibactériennes (Zaouali et al., 2010), anti-inflammatoires (Gianmario et al., 2007), antispasmodiques (Al-Sereiti et al., 1999) et antioxydantes (Zaouali et al., 2010).

En vue de contribuer à la valorisation du Romarin marocain, nous avons entamé ce travail qui se situe dans le cadre d'une thèse de doctorat dont les objectifs sont :

- ❖ Étude de l'effet de la provenance sur la qualité chimique et biologique des huiles essentielles du Romarin marocain de quatre régions.
- ❖ Étude de l'effet de l'individualité sur la teneur, la composition chimique et l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits fixes de *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* cultivé dans le jardin expérimental de Taounate.

Ces études ont été réalisées au sein du laboratoire des plantes médicinales, aromatiques et substances naturelles à l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques, du laboratoire de biotechnologie microbienne et du laboratoire de chimie organique appliquée de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès.

Introduction générale

Ce travail de cinq chapitres rassemble diverses compétences liées essentiellement au domaine de la chimie, de la phytochimie et de la chimiométrie.

Le premier chapitre est consacré à la synthèse bibliographique descriptive de l'historique des plantes médicinales et aromatiques, des généralités sur les molécules bioactives, sur leur activité antibactérienne et sur leurs méthodes d'extraction et leurs techniques d'analyse ainsi une présentation de la plante étudiée (Romarin).

Le deuxième chapitre est réservé à la présentation des stations étudiées, du matériel utilisé et des méthodologies utilisées lors de la réalisation de ce travail, ainsi qu'à la présentation de la méthode statistique d'analyse des données utilisée.

Le troisième, quatrième et cinquième chapitre sont dédiés aux résultats et discussions:

- ❖ Chapitre I : Etude de l'effet de la provenance sur la qualité chimique et biologique des huiles essentielles du Romarin marocain de quatre régions.
- ❖ Chapitre II : Etude de l'effet de l'individualité sur la teneur, la composition chimique et l'activité antibactérienne des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* cultivé dans le jardin expérimental de Taounate.
- ❖ Chapitre III : Etude de l'effet de l'individualité sur l'activité antibactérienne des extraits de *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* obtenus par les ultrasons.

Enfin, on clôt ce manuscrit par une conclusion générale et on citera des perspectives de ce travail.

Chapitre I

Etude bibliographique

I. Les Plantes Aromatiques et Médicinales

I.1. Historique

L'histoire des Plantes Aromatiques et Médicinales «PAM» est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples a montré que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires.

Dans la civilisation chinoise, indienne, aztèque et arabo-musulmane, on a trouvé la trace de l'utilisation très ancienne des plantes médicinales. En effet, les hommes n'avaient que les plantes pour se soigner, qu'il s'agissait de maladies légères, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria (Iserin, 1997).

Le premier texte sur le pouvoir des plantes a été écrit il y a cinq mille ans. D'autres ouvrages tels que, le Pen-Tsao, livre de médecine chinoise datant de 2800 av JC ou le papyrus Ebers, remontant à la sixième dynastie, pharaonique égyptienne, ont répertorié, des centaines de remèdes végétaux (Fiorini, 2006).

Dans l'antiquité, le médecin grec Hippocrate a défendu à son tour la botanique, suivi par Dioscoride, puis Galien qui a inventé la "pharmacie galénique" et ses médicaments végétaux. La médecine du Moyen-âge s'est enrichie par la suite des recherches menées par les moines dont l'abbesse sainte Hildegarde (XII^e siècle).

Au 13^{ème} siècle, les arabes avaient aussi leurs spécialités en médecine et en pharmacie : Ibn Al Bayter résuma dans une œuvre monumentale « El Jami El Moufradat », l'ensemble des connaissances dans le domaine des plantes médicinales. Cette œuvre a préparé l'avènement d'une véritable science pharmacologique. Elle contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales (Fouché et Marquet, 2000).

Ce n'est qu'à partir du 19^{ème} siècle que les grandes découvertes en phytochimie commencèrent. Les chimistes isolaient les principes actifs des plantes et établissaient leurs formules pour s'en servir de modèles et les reconstituer par la voie chimique soit en partie (hémi synthèse) ou bien totalement (synthèse totale).

En 1804, Seguin isola la morphine de l'Opium, suivi en 1805 par Vauquelin et Robiquet qui ont extrait et décrit l'asparagine puis c'est la narcotine et la codéine qui sont reconnues et identifiées par le même Robiquet respectivement en 1817 et 1832. Pendant ce temps,

Pelletier, Caventou et Runge ont mené à bien leurs travaux aboutissant à l'isolement de la caféine en 1819. Entre –temps, l'émétine était extraite de l'Ipécacuanha.

En 1818, Caventou et Pelletier, travaillant ensemble sur la Fève de Saint-Ignace et la noix vomique, ont découvert la strychnine puis, en 1819, la brucine. Quelques années plus tard, c'est autour de l'atropine d'être isolée (Hesse et Geiger, 1868) et de l'ouabaïne (Arnaud, 1988).

Le début du 20^{ème} siècle a vu la poursuite de cet effort avec l'étude des curares (King, 1935) et les recherches de Marker (1940) sur les sapogénines. A partir de cette date, la chimie de synthèse a repris le rôle des plantes dans l'émergence d'une industrie pharmaceutique prospère. Il faut attendre le milieu du 20^{ème} siècle pour qu'à nouveau l'intérêt des chimistes se reporta sur le monde végétal. La découverte, dans les Rauwolfias, de l'ajmalicine (1947) et de la réserpine(1951) représenta alors un pas important et marqua une nouvelle étape dans l'histoire des médicaments. Puis vinrent la vincalécoblastine et la vincristine (isolés en 1961), les ellipticines (à partir des *Euchrosia*, 1966), la maytansine (antitumoral extrait des *Maytenus* en 1972) et plus récemment, les structures de type quassinoides isolées des Simarubacées. Pendant la même période, une nouvelle attitude vis-à-vis des pharmacopées populaires commençait à voir le jour, un nouveau regard a été jeté sur les plantes, sources de substances actives (essences, extraits totaux, gommes, résines, etc...).

Aujourd'hui, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît suite au développement du phénomène de la résistance. La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, connaît de nos jours un progrès exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques (Iserin, 1997).

De nos jours, plus que jamais, les plantes médicinales sont à l'ordre du jour.

I.2. Les PAM au Maroc

I.2.1. Aspect sociologique

Se trouvant dans le bassin méditerranéen avec de grandes variations climatiques du Nord au Sud, le Maroc présente un terrain favorable pour le développement d'une flore prospère et variée.

Le Maroc, par la richesse et la diversité de l'origine de sa flore, constitue un véritable réservoir phylogénétique constitué de 41 écosystèmes et 7000 espèces végétales avec environ 4200 espèces de plantes sauvages dont 600 d'entre elles ont des vertus aromatiques ou médicinales (Chemonics International Inc., 2006). Certaines plantes sont abondantes mais d'autres sont rares et menacées de disparition. Plusieurs régions comme Taza, Hoceima, Taounate, Meknès Tafilalet, l'Oriental, Marrakech, Tensift El Haouz, Sous Massa Daraa...etc constituent des unités géographiques caractérisées par un cadre naturel tout à fait original. La richesse florifère de ces régions est en grande partie liée à l'hétérogénéité écologique des biotopes. En effet, on peut passer dans la région Moyen Atlas par exemple du désert à la haute montagne ce qui permet l'installation de diverses espèces de différentes souches.

À côté de ce contexte naturel prometteur, le Maroc est une nation possédant une civilisation et un savoir-faire ancestral très riche dont la médecine constituait une composante essentielle. La médecine traditionnelle marocaine, prospère d'une expérience millénaire, est partie prenante d'une culture populaire dont elle est la manifestation concrète sous forme d'un ensemble de croyance et de pratiques relatives aux soins, à l'hygiène, à la prévention et d'une façon générale à la lutte contre les maladies. Elle s'adresse aux différentes pathologies en utilisant un ensemble de méthodes et d'agents qui, en réalité, s'interpénètrent d'une façon complexe. Ceci lui permet d'occuper une place privilégiée parmi les pays méditerranéens qui ont une longue tradition médicale et un savoir-faire traditionnel à base de plantes médicinales (Scherrer et al., 2005).

Parmi les disciplines scientifiques, qui s'intéressent à cette phytothérapie traditionnelle, l'ethnobotanique est considérée comme une science permettant de traduire le savoir-faire populaire en savoir scientifique. En effet, divers travaux ont été publiés depuis les dernières décennies sur le savoir ethnobotanique marocain (Lahsissene et al., 2009; Mehdioui 2007; Bellakhdar 1997; Benchaâbane et Abbad 1997; Kahouadji 1995). Ainsi de nombreux

chercheurs ont travaillé sur la contribution de la médecine traditionnelle marocaine face à des maladies et troubles spécifiques telles que la lithiase rénale (Ghourri et al., 2014), les troubles rhumatologiques (Hmamouchi et Agoumi., 1993) et le diabète (Bnouham et al., 2002 ; Jouad et al., 2001).

Cependant, l'analyse de la bibliographie médicinale marocaine montre que les données relatives aux plantes médicinales régionales sont très fragmentaires et dispersées; de même, le savoir-faire n'est détenu actuellement que par peu de personnes. En plus, la recherche et le développement au niveau national dans le secteur des PAM laissent à désirer. En effet, la nature et les objectifs de la majorité des travaux de recherche s'inscrivent dans un cadre large ciblant la valorisation des ressources génétiques incluant les plantes supérieures, les microorganismes et organismes marins, les bactéries, les champignons,...etc.

I.2.2. Aspect économique

La filière des PAM a un rôle socio-économique non négligeable au Maroc compte tenu des recettes générées à l'export et des recettes moyennes annuelles des ventes.

Actuellement, le Maroc réalise des productions importantes en plantes aromatiques et médicinales (PAM) et leurs dérivés, ce qui lui confère une place non négligeable sur le marché international. Mais seulement 80 à 100 espèces de PAM parmi 600 plantes sont exploitées, selon les données de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques de Taounate (INPMA). En effet, chaque année, 22000 tonnes de plantes aromatiques et médicinales (PAM) sont exportées, faisant du Maroc le 12^{ème} exportateur mondial avec près de 25 millions de dollars pour les PAM cultivées et 37 millions de dollars pour les PAM sauvages.

L'activité permet de générer des revenus importants et de créer des milliers de journées de travail (500.000 JT), notamment pour les populations enclavées du milieu rural et à la consolidation de leurs équilibres commerciaux. L'importance de ce secteur pour les populations rurales a amené l'état à créer des coopératives et des associations qui opèrent dans ce secteur afin d'assurer une exploitation appropriée des ressources, encourager l'investissement privé dans le secteur et améliorer les conditions de vie des populations locales en les faisant bénéficier de la valeur ajoutée générée par la valorisation et la transformation des PAM (Chemonics International Inc., 2008).

Cependant, force est de constater qu'à peine 60 tonnes d'huiles essentielles marocaines sont vendues à l'étranger. Pour le professeur Najib AKESBI, économiste et enseignant à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat, l'état actuel de l'exploitation des PAM au Maroc est « la caricature du sous-développement ». « On se contente de brader de la matière première, regrette-t-il, prenant en exemple le Romarin ramassé dans l'Oriental et emmené dans le sud de la France ». « Elles reviennent dans des emballages sophistiqués pour être vendus à des prix élevés ».

Selon l'EACCE, pendant la campagne 2012-2013, la Caroube et ses dérivés sont, en volume, les premiers produits leaders de l'exportation (Figure 1).

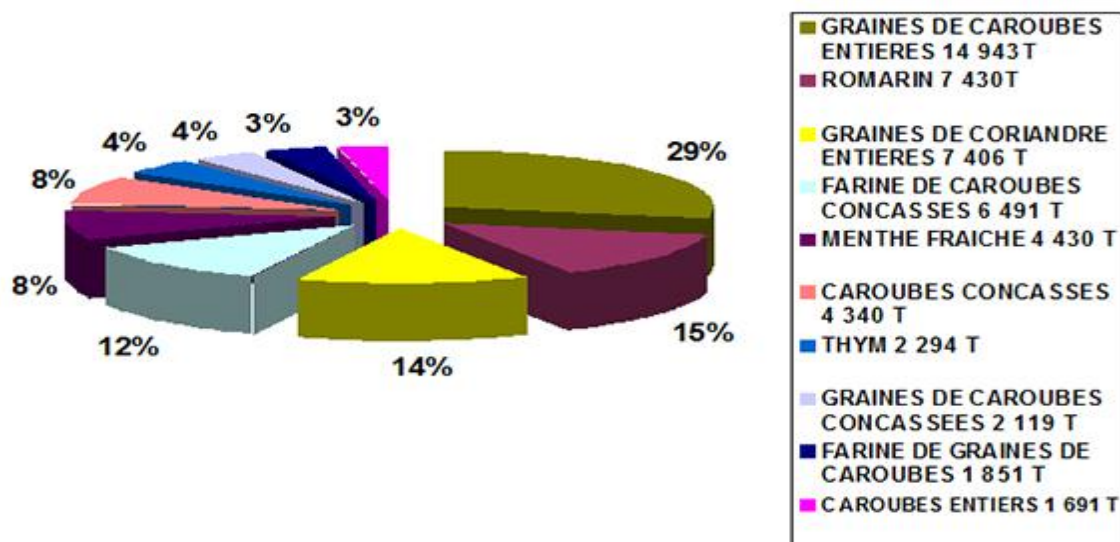


Figure 1: Les produits PAM leaders dans l'exportation mondiale (en tonnes, campagne 2012- 2013)

L'exportation en valeur de la menthe fraîche est de 90 M DH suivie par les graines de Coriandre, le Romarin et le thym avec 74,73 et 53 M DH respectivement. Les dix premiers produits leaders représentent 77% de l'export en valeur (campagne 2012-2013) (Figure 2).

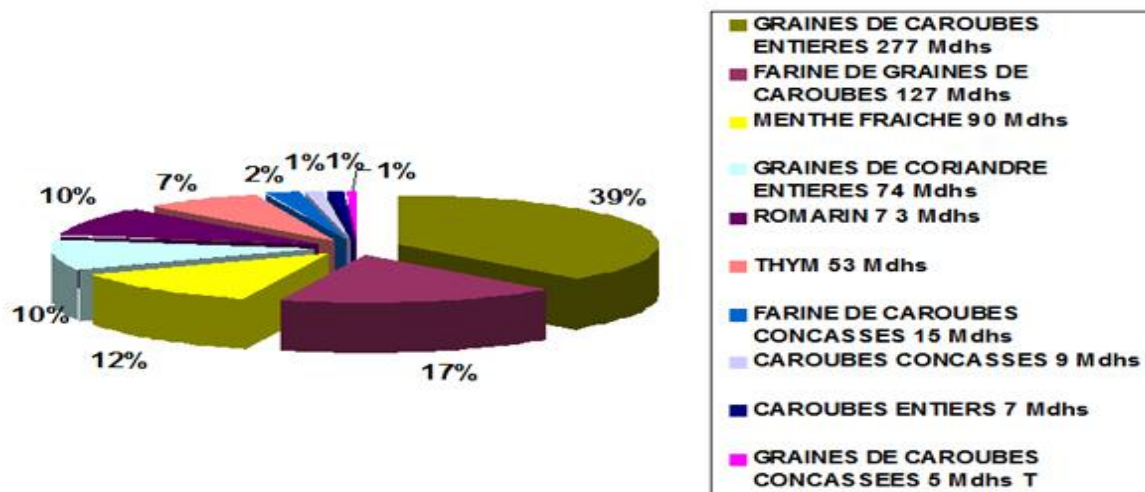


Figure 2: Les produits PAM leaders dans l'exportation mondiale (en valeur, campagne 2012-2013)

L'union européenne représente la première destination (69%), suivi de l'Asie et l'ALENA avec 12% des exportations pour chaque destination (Figure 3).

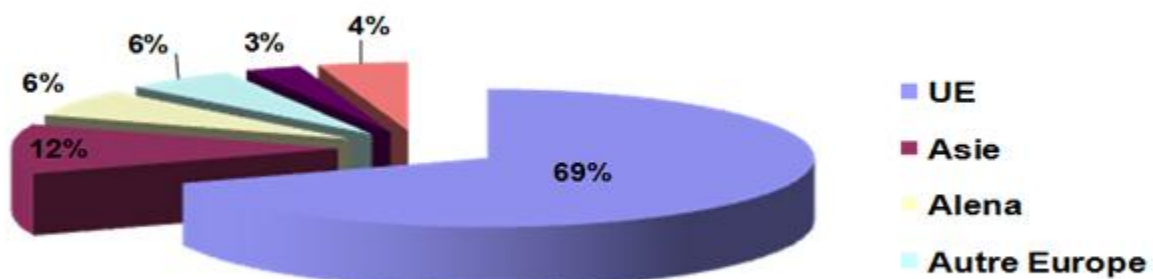


Figure 3: Exportation des PAM par marché et en % du volume (campagne 2012-2013)

Le secteur des PAM souffre encore de faiblesses à plusieurs niveaux : technique, commercial, organisationnel, ... etc. (MAROC-PAM, 2006).

En effet, le développement de la filière des PAM au Maroc est tributaire de son intervention sur tous les maillons de la chaîne : organisation de la production pour répondre aux exigences de qualité et de consistance, intégration de la filière dans un réseau de distribution optimisée, transformation des plantes qui existent à l'état sauvage par une cueillette idéale et une distillation avec un équipement répondant aux critères de propreté et de qualité; pour

avoir un produit de qualité propre à la consommation et avec une valeur ajoutée propre au terroir des plantations. C'est toute la logistique de transport, de stockage, d'emballage et les activités connexes qui vont avec. Il y a aussi l'environnement réglementaire à l'instar de la nouvelle loi sur l'appellation d'origine contrôlée qui vient de voir le jour et qui facilite l'identification d'une identité géographique et qui lui donne un label de marque tel le Romarin de l'Oriental par exemple. Cela correspond à un label de qualité qui sera plus apprécié (Kharroubi 2008).

II. Molécules bioactives des PAM (Métabolites secondaires)

II.1. Les huiles essentielles

II.1.1. Définition

Une huile essentielle (HE) selon la pharmacopée est un produit de composition complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux.

Selon l'AFNOR Net 75-006, elle désigne un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques: soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation sèche.

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante.

II.1.2. Composition chimique des HE

Les huiles essentielles peuvent être classées en plusieurs familles biochimiques. L'activité thérapeutique d'une huile essentielle est liée à sa structure biochimique, aux groupes fonctionnels de ses composés principaux et à leurs actions synergiques.

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes de composés naturels pouvant contenir jusqu'à soixante molécules à des concentrations différentes. On distingue deux groupes d'origine biosynthétique chez les HE dont le principal groupe est composé de terpènes et l'autre de constituants aromatiques et aliphatiques (Croteau et al., 2000; Betts, 2001; Bowles, 2003; Pichersky et al., 2006).

II.1.2.1. Les terpènes

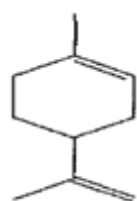
Le nom terpène dérive du térébenthine. Elles sont une classe d'hydrocarbures produits par de nombreuses plantes, représentant une grande famille de molécules du métabolisme secondaire. Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte (Connolly et Hill, 1991).

Les composés terpéniques sont formés d'unités isopréniques (en C5) et comprennent les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20) et les triterpènes (C30). Ces composés ont tous la même origine métabolique. Elles peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques.

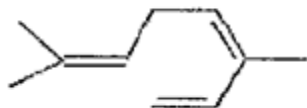
En général, seuls les terpènes de poids moléculaire faible, de 10 à 20 atomes de carbones, sont présents dans les huiles essentielles.

✓ Les monoterpènes

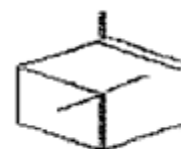
Ce sont des hydrocarbures aromatiques, en (C10). Ils représentent les constituants les plus simples des terpènes. Ils sont formés à partir du couplage de deux motifs isopréniques. Ils sont les molécules les plus représentatifs des huiles essentielles avec 90% de constituants et permettent une grande variété de structures (Bakkali et al., 2008). Ils peuvent être acycliques, monocycliques, ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales, surtout alcool et aldéhyde tels que l'ocimène, le myrcène et le géraniol. Ces derniers sont des monoterpènes acycliques, alors que le limonène et le α pinène sont des monoterpènes cycliques. (Figure 4)



Limonène



Ocimène



α -Pinène

Figure 4: Exemples de structures des monoterpènes

✓ Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont formées par l'assemblage de trois unités isoprène (C15). L'extension de la chaîne augmente le nombre de cyclisations qui permet une grande variété de structures. La structure et la fonction des sesquiterpènes sont semblables à ceux des monoterpènes (Bakkali et al., 2008). Comme dans le cas des monoterpènes, cyclisations intramoléculaires additionnelles, réarrangements et oxydations conduisent à un très grand nombre de structures. Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes puisqu'elle contient plus de 3000 molécules. Les sesquiterpènes se divisent en plusieurs catégories structurelles, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques et polycycliques (Figure 5).

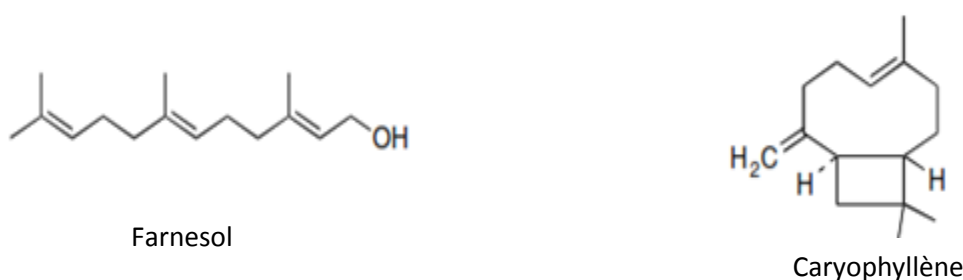


Figure 5 : Exemples de structures de sesquiterpènes

II.1.2.2. Les composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivés du phényl-propane sont moins fréquents que les terpènes. Les voies de synthèse des terpènes et des dérivés phénylpropaniques sont généralement séparées chez les plantes mais peuvent coexister dans certains cas.

Les composés aromatiques comprennent les composés aldéhydiques (cinnamaldéhyde), alcooliques (l'alcool cinnamique), phénoliques (chavicol, l'eugénol), des dérivés méthoxylés (anéthole, elemicine, estragole, méthyleugenols) et dioxyméthylène (apiole, myristicine, safrole) (Figure 6) (Bakkali et al., 2008).

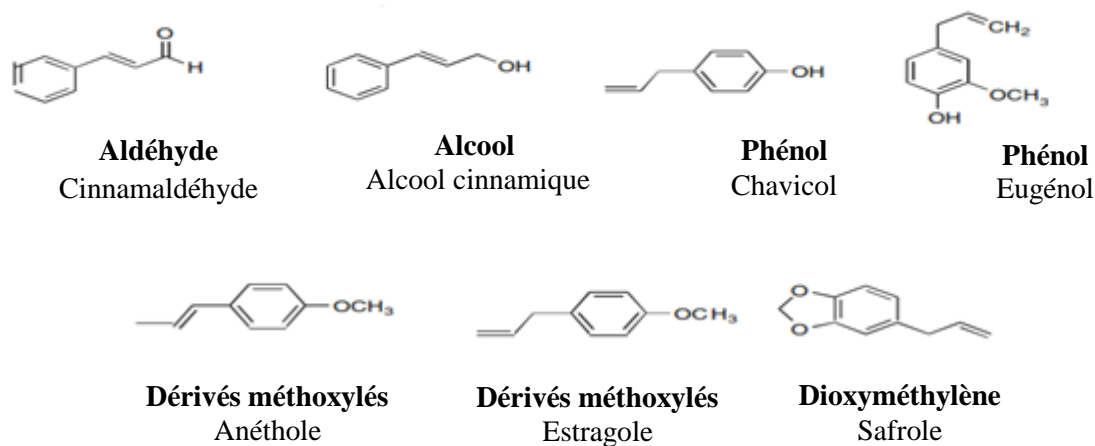


Figure 6 : Structures de quelques composés aromatiques des HE

II.1.2.3. Les chémotypes

Les composés d'une plante ne sont pas immuables. Dans une même espèce botanique, on trouve des essences dont les différences sont plus ou moins importantes. Cette variation chimique nous permet de définir précisément la nature des sous espèces, des variétés et des cultivars des plantes aromatiques. Ce qui génère la notion de : chémotype ou race chimique. Une notion capitale en aromathérapie. C'est une forme de classification chimique, biologique et botanique désignant la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle. Cette classification dépend des facteurs liés directement aux conditions de vie spécifiques de la plante. On parle d'une huile essentielle chémotypée "H.E.C.T" (Zhiri et Baudoux, 2005).

Ces différences chimiques peuvent être extrêmement importantes et peuvent changer toutes les propriétés chimiques ou biologiques de l'huile essentielle. L'exemple le plus marquant est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris*, il existe en effet huit chémotypes différents pour cette seule espèce. Ces différences sont au niveau de la nature du monoterpène majoritaire de l'huile essentielle qui peut être soit, le thymol, le Thuyanol, le géranol, l' α -terpinéol, le Linalool, le Carvacrol, le cinéole, ou Paracymène (Thompson et al., 2003). Un autre exemple est celui du *R. officinalis*, il existe trois chémotypes (Zhiri et Baudoux, 2005) :

- H.E.C.T du *R. officinalis* à camphre; cette HE contient majoritairement du camphre ayant pour propriétés une action contre les contractures musculaires ou les crampes et des actions anti-inflammatoires.

- H.E.C.T du *R. officinalis* à 1,8-cinéole; cette HE contient majoritairement du 1,8 cinéole ayant des propriétés anti-catarrhales, expectorantes. Elle a spécialement des actions antiseptiques pulmonaires et mucolytiques.
- H.E.C.T du *R. officinalis* à verbénone; cette essence contient majoritairement du verbénone avec des propriétés cicatrisantes, bactéricides, expectorantes mucolytiques, cholagogues et hépatodrainantes.

Ce polymorphisme chimique existe aussi pour bien d'autres espèces: *Origanum vulgare* (Mockute et al., 2001), *Mentha spicata* (Edris et al., 2003) en sont des exemples. Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables.

C'est la raison pour laquelle les chémotypes doivent être bien connus du praticien. Leur non connaissance ou leur non-respect peuvent être à l'origine d'échecs thérapeutiques parfois dramatiques, et d'accidents plus ou moins graves (Franchomme et al., 2001). L'absinthisme (intoxication à l'absinthe) en est un exemple frappant: *Artemisia absinthium* qui était récolté dans la région parisienne dans le but de confectionner le fameux apéritif contenait l' α -thujone, molécule fortement neurotoxique, comme composé majoritaire à 45%, alors que celle présente dans les régions alpines est une boisson originaire qui ne présentait qu'un taux de 3% en α -thujone. L'alcool préparé avec cette dernière était sans danger pour l'organisme (Franchomme et al., 1990).

Il est donc indispensable d'ajouter à la notion fondamentale d'espèce botanique celle de race chimique ou chimio-type.

II.1.2.4. Paramètres influençant la composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles est très fluctuante. En effet, elle dépend d'un grand nombre de facteurs qui sont d'origine intrinsèque ou extrinsèque :

✓ Facteurs intrinsèques

Les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles sont : Le stade végétatif (Belyagoubi., 2006), les facteurs de mutation (Belyagoubi., 2006), le génotype, et les organes producteurs des HE de la plante (Olle et Bender., 2010). Chez une même espèce, il arrive que la composition chimique de l'huile

essentielle diffère d'un organe à un autre, par exemple, le cas de la cannelle dont les feuilles donnent une huile riche en eugénol, les écorces fournissent un extrait où l'aldéhyde cinnamique est majoritaire, tandis que le camphre prédomine dans l'essence des racines (Guignard, 1983).

✓ Facteurs extrinsèques

Il existe beaucoup de facteurs extrinsèques pouvant influencer la composition chimique de l'huile essentielle. L'environnement, l'origine géographique, la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, la période de récolte, le séchage, lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites, les virus et mauvaises herbes (Svoboda et al., 1999 ; Smallfield., 2001) sont autant de facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'exercer des modifications chimiques.

Par exemple, chez *Mentha piperita*, les nuits froides favorisent la formation de menthol alors que les nuits tempérées favorisent celle du menthofuranne (Bruneton, 1999). Chez *Coriandrum sativum* le fruit mûr contient 50% de plus de linalol que le fruit vert (Crouteau., 1988), la menthe poivrée récoltée en début de floraison a une huile essentielle riche en néomenthol et en menthone tandis qu'en fin de floraison cette huile est riche en menthol (Bruneton., 1987). Le thym vulgaire, en hiver contient le géraniol alors qu'en été ce composé est remplacé par l'acétate de géranyle (Franchomme et al., 2001).

II.1.3. Propriétés physiques

Même s'il y a des différences de constitution, les huiles essentielles possèdent un certain nombre de propriétés physiques communes :

- Elles sont généralement sous forme liquides à température ambiante.
- Leur teinte est comprise dans une gamme allant de l'incolore, à jaune pâle. A l'exception de quelques huiles, comme l'huile essentielle de camomille romaine (*Anthémis nobilis*) qui possède une coloration bleu clair due à la présence du chamazulène.
- Leur densité est souvent inférieure à l'unité. Seules 3 huiles essentielles officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau: il s'agit des huiles essentielles de cannelle, de girofle et de saffras.
- Elles ont un indice de réfraction souvent élevé.

- Elles sont dotées de pouvoir rotatoire puisque qu'elles sont constituées, pour l'essentiel, de molécules asymétriques.
- Sont peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent cependant leurs odeurs (eaux distillées aromatiques) et solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques.

II.1.4. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal avec des familles à haute teneur en matières odorantes comme les conifères, les rutacées, les myrtacées, les ombellifères, les lamiacées, les géraniacées etc...

Les essences peuvent être stockées dans tous les organes (Sangwan et al., 2001) :

- Les fleurs : oranger, rose, lavande.
- Les feuilles : eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin.
- Les organes souterrains: racines (vétiver), rhizomes (gingembre, acore).
- Les fruits: fenouil, anis, épicarpes des Citrus.
- Les graines : noix de muscade, coriandre.
- Le bois et les écorces: cannelle, santal, bois de rose.

II.1.5. Les activités biologiques des huiles essentielles

La diversité moléculaire des métabolites que contiennent les huiles essentielles, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés.

II.1.5.1. Pouvoir antibactérien

L'activité antibactérienne des huiles essentielles est connue depuis l'Antiquité. La première découverte de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été mise en évidence en 1881 par Delacroix (Boyle, 1955). Au Maroc, elle a commencé avec les travaux de Benjilali et al., (1986) et Tantaoui-Elaraki et al., (1992), ces études se sont poursuivies avec les travaux de Remmal et al., (1993) étant donné que la flore marocaine est particulièrement riche en plantes aromatiques et médicinales.

De nombreuses études *in vitro* ont été réalisées par des médecins et des pharmaciens avec des résultats concluants. Dans son livre *Antiseptiques essentiels* publié en 1938, René-Maurice Gattefossé, le père de l'aromathérapie, décrit déjà la considérable avancée de la recherche dans ce domaine.

Depuis, de nombreux travaux, essentiellement de laboratoire, sont venus renforcer ces résultats et expliquer les modes d'actions de certains composants des huiles essentielles. Dès lors, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes (Burt, 2004). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba et Kunicka, 2003).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004). Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries Gram négatives *Aeromonas hydrophila* (Wan et al., 1998) et *Campylobacter jejuni* (Wannissorn et al., 2005) ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles. La croissance des bactéries, résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques, peut être inhibée par certaines huiles essentielles. Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (May et al., 2000 ; Tohidpour et al., 2010) et les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) (Fisher et Phillips, 2009). Les huiles essentielles, isolées de deux espèces de thym de Corée, *Thymus magnus* et *Thymus quinquecostatus*, sont également capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes comme *Streptococcus pneumoniae*, *Samonella typhimurium*, *Salmonella entereditis* et *S. aureus* (Shin et Kim, 2005).

Des expérimentations sur des animaux de laboratoire ont permis de montrer que l'efficacité des antibiotiques reste toujours limitée contrairement aux H.E qui sont constituées de nombreuses molécules vis-à-vis desquelles les bactéries ne peuvent pas résister (Enrico et al., 2004).

D'autres travaux ont testé l'effet des huiles essentielles sur d'autres germes, notamment ceux du genre *Mycobacterium*, qui menacent encore la santé publique, surtout avec l'avènement de

la maladie du SIDA, et dont l'espèce pathogène pour l'homme est *M. tuberculosis*. La particularité de ce germe réside dans la structure pariétale très complexe, qui est différente des autres bactéries. En effet, Rhayour (2002) a montré que les huiles essentielles du thym qui est parmi les huiles essentielles fortement bactéricides, l'huile essentielle du Romarin et l'huile essentielle d'armoise et leurs constituants majoritaires possèdent un effet direct et lytique sur les parois de *Mycobacterium phlei* et de *Mycobacterium fortuitum*.

II.1.5.2. Autres activités biologiques

- **Activité anti-oxydante** : Plusieurs auteurs ont rapporté des propriétés antioxydante et anti-radicalaire de la plupart des huiles essentielles (Fayed 2009; Karioti et al., 2006; Sacchetti et al., 2005).

- **Activité anti-inflammatoire** : de nombreux chercheurs ont décrit un effet anti-inflammatoire pour les huiles essentielles (Jenane et al., 2015; Soidrou et al., 2014; Siani et al., 1999). Par exemple, l'huile essentielle des racines de *Carlina acanthifolia* est capable d'inhiber l'inflammation induite par une injection de carraghénane chez le rat (Dordevic et al., 2007).

- **Activité antifongique** : un grand nombre de composés volatils ont été testés et ont montré une activité contre une large gamme de champignons : *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum* (Kalemba et Kunicka, 2003). D'autres études ont montré l'effet antifongique des huiles essentielles, incluant les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de l'arbre à thé, du romarin (El Ajjouri et al., 2008; Burt, 2004; Ghfir et Dargent, 1995; Garg et Siddiqui, 1992).

- **Activité anti-tumorale** : Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle, isolée des graines de *Nigella sativa* démontre une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées cellulaires tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération de métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur P815 (Mbarek et al., 2007). L'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est, quant à elle, révélée efficace contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant les cellules leucémiques HL-60 et K562 (De Sousa et al., 2004).

- **Activité antivirale :** Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent de sérieux problèmes de nos jours. Les HE constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux. En effet, les virus sont très sensibles aux HE (Shukla et al., 1989 ; Salah-Fatnassi et al., 2010 ; Tkachenko, 2006). En plus, Schnitzler et al., (2007) ont testé l'activité antivirale du thym, du gingembre, de l'hysope et du bois de santal sur le virus HSV-1.

D'autres applications médicales sont étudiées. Les travaux de Jafri et al., (2001) ont prouvé la capacité de l'huile essentielle de cardamome à limiter la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol. Il a également été démontré que les huiles essentielles facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles, comme l'Oestradiol (Monti et al., 2002).

Des travaux tentent également d'analyser les effets des huiles essentielles sur le comportement (Umezu, 1999) ou d'évaluer la possibilité de les utiliser dans la lutte contre l'addiction à certaines drogues, comme la nicotine (Zhao et al., 2005).

II.1.6. Rôle physiologique des huiles essentielles

Les huiles essentielles jouent plusieurs rôles au sein de la plante, dont on peut citer :

- Elles assurent à la plante une protection contre les prédateurs (microorganismes, champignons, insectes, herbivores) en modulant les comportements de ceux-ci vis-à-vis des plantes (Verschaffelt et Stahl 1915 ; Wink, 2003).
- Les constituants des huiles essentielles sont considérés comme des modérateurs des réactions d'oxydation intramoléculaire protégeant la plante contre les agents atmosphériques. (Vickers et al., 2009).
- Les essences favorisent la reproduction en attirant les pollinisateurs (Pichersky et Gershenzon, 2002) et les animaux qui disperseront les graines (Slaughter, 1999).
- Elles assurent aussi la communication avec les plantes voisines (Baldwin et al., 2006) et également entre ses propres organes (Heil et Silva Bueno, 2007).

II.1.7. Domaines d'utilisation :

La diversité de la composition chimique des huiles essentielles explique leur usage très vaste. En effet, elles trouvent des emplois dans de nombreux secteurs:

II.1.7.1. Aromathérapie

L'aromathérapie est une branche particulière de la phytothérapie. Ce terme est composé de deux parties: aroma signifiant parfum, et thérapie méthode visant à soigner les maladies (Lardy,2007 ; Garnier, et Delamarre., 2002).

Plusieurs ouvrages décrivent des préparations à base d'HE diverses prescrites pour le traitement de plusieurs maladies. Malheureusement, ces prescriptions ne possèdent pas de bases scientifiques rigoureuses car elles sont souvent tirées de pratiques et de tâtonnements empiriques.

Les HE sont largement utilisées pour la désinfection, la cicatrisation, le traitement des traumatismes (cardio- vasculaires, inflammatoires, cancéreuses) et également en complément d'un traitement médical chronique. Elles sont aussi utilisées en médecine dentaire. Plusieurs HE ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries (Lamendin, et al., 2004).

Les HE de thym et de romarin ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête, les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoires.

II.1.7.2. Parfumerie et cosmétologie.

L'utilisation des HE dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable (Roulier, 1992).

II.1.7.3. Industrie alimentaire

Les huiles essentielles contiennent des molécules puissantes de propriétés anti-oxydantes et antiseptiques, ce qui favorise leur utilisation comme agents de conservation dans les produits alimentaires. Elles servent à la protection de ces produits contre la dégradation

radicalaire et sont également employées comme agents antimicrobiens afin d'avoir une conservation saine et de longues durées ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure.

II.1.7.4. Désinfection des locaux

Les huiles essentielles, étant volatiles et ayant un pouvoir antiseptique, sont utilisées pour la fabrication des «para germes»; solution volatile à base d'une huile essentielle naturelle (citron, lilas), pour la désinfection des atmosphères. Ainsi elles sont utilisées comme agents de préservation pour le contrôle de l'hygiène d'air, notamment dans les hôpitaux (Rhayour, 2002).

II.1.7.5. Agents bactéricides

Les huiles essentielles sont connues pour leur large spectre d'activité sur les microorganismes. Ceci peut s'expliquer par leur caractère lipophile, leur permettant de traverser facilement les parois cellulaires et la membrane cytoplasmique, engendrant des désordres de la structure des polysaccharides, des acides gras et des phospholipides ainsi que leur perméabilité (Bakkali et al., 2008). Pour les bactéries, cette perméabilité membranaire peut être associée à une diminution des ions, à l'effondrement de la pompe à proton ainsi qu'à l'épuisement du pool d'ATP (Di Pasqua et al., 2006) et peut conduire à une fuite des macromolécules et à une lyse cellulaire (Oussalah et al., 2006). Les huiles essentielles peuvent provoquer la coagulation du cytoplasme (Gustafson et al., 1998) ainsi que des dommages des protéines et lipides (Burt, 2004).

La capacité des huiles essentielles à agir sur les microorganismes dépend considérablement de leur composition chimique ainsi que du stade de croissance des pathogènes (Bakkali et al., 2005). En général, l'huile est d'autant plus active qu'elle renferme plus de composés phénoliques, aldéhydiques et alcooliques (Bruni et al., 2003; Sacchetti et al., 2005).

II.2. Les polyphénols

II.2.1. Généralités

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal (Marten and Mithöfer, 2005; Pietta, 2000). Ils sont présentes dans toutes les parties de la plante depuis les racines jusqu'aux fruits (Beta et al., 2005). Elles sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités

fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la production. (Yuegang., 2007; Lucchesi et al., 2004).

Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (Bruneton, 1993). Selon leurs caractéristiques structurales, elles se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle et al., 2004). Elles sont divisés en plusieurs catégories: anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthones et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué .

II.2.2. Rôle physiologique des polyphénols

La présence des polyphénols dans quasiment toutes les parties du végétal, confère une protection considérable à la plante. Elle assure la survie de cette dernière dans les différentes conditions environnementales (climat, sol, sécheresse, rayon UV..., etc.). Ces métabolites jouent plusieurs rôles au sein de la plante, dont on peut citer :

- la lutte contre les agents pathogènes: des recherches récentes ont démontré que la teneur en polyphénols augmente si la plante est agressée par des bactéries, champignons ou autres comme les rayons UV et l'élévation de la température (Mohammedi 2006, Piquemal 2008) cela confirme qu'ils ont un rôle important dans la défense de la plante.
- la résistance aux maladies: comme c'est le cas de la résistance du cotonnier à la maladie de flétrissement.
- la couleur de la plante: La coloration des fleurs, fruits et des feuilles de la plante est due à la présence de la chlorophylle, des polyphénols (flavonoïde, acides phénol, ...) et des caroténoïdes.
- l'attraction et la pollinisation: les polyphénols en particulier les flavonoïdes interagissent aussi dans le phénomène d'attraction; la couleur de la plante est considérée comme un signal visuel aux insectes pollinisateurs (Marfak 2003; Mohammedi 2006). Dans certains cas, les flavonoïdes servent pour éloigner les prédateurs. Il existe même des flavonoïdes qui sont toxiques pour certains insectes néfastes pour la plante.

II.2.3. Flavonoïdes

II.2.3.1. Généralités

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Certains sont des pigments quasi-universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques (Mukohata et al., 1978).

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes (Havsteen, 2002; Edenharder et Grünhage, 2003) (Figure 7). Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires où ils peuvent être localisés dans divers organes: racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

Plusieurs milliers de molécules ont été identifiées à ce jour (Edenharder et Grünhage, 2003). Ainsi nous en absorbons chaque fois que nous consommons un aliment d'origine végétale. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones « 2-phényl-1-benzopyrane », constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par un cycle pyranique central.

Leur concentration dépend du niveau et des conditions de croissance des plantes ainsi que de leur maturité (Cao et al., 1996; Cook et Samman, 1996; Di Carlo et al., 1999) et augmente avec l'exposition au soleil et constitue, de ce fait, un écran protecteur contre la thermo-dégradation (protègent la plante des radiations UV) (Sarni-manchado et Cheynier, 2006). Ils participent aussi à la coloration des fleurs et des fruits assurant ainsi, un rôle dans l'attraction des insectes pour les charger de pollens ou de graines de façon à en assurer la dissémination nécessaire à la reproduction de l'espèce et par conséquent sa survie. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent également jouer un rôle dans la protection de ces plantes.

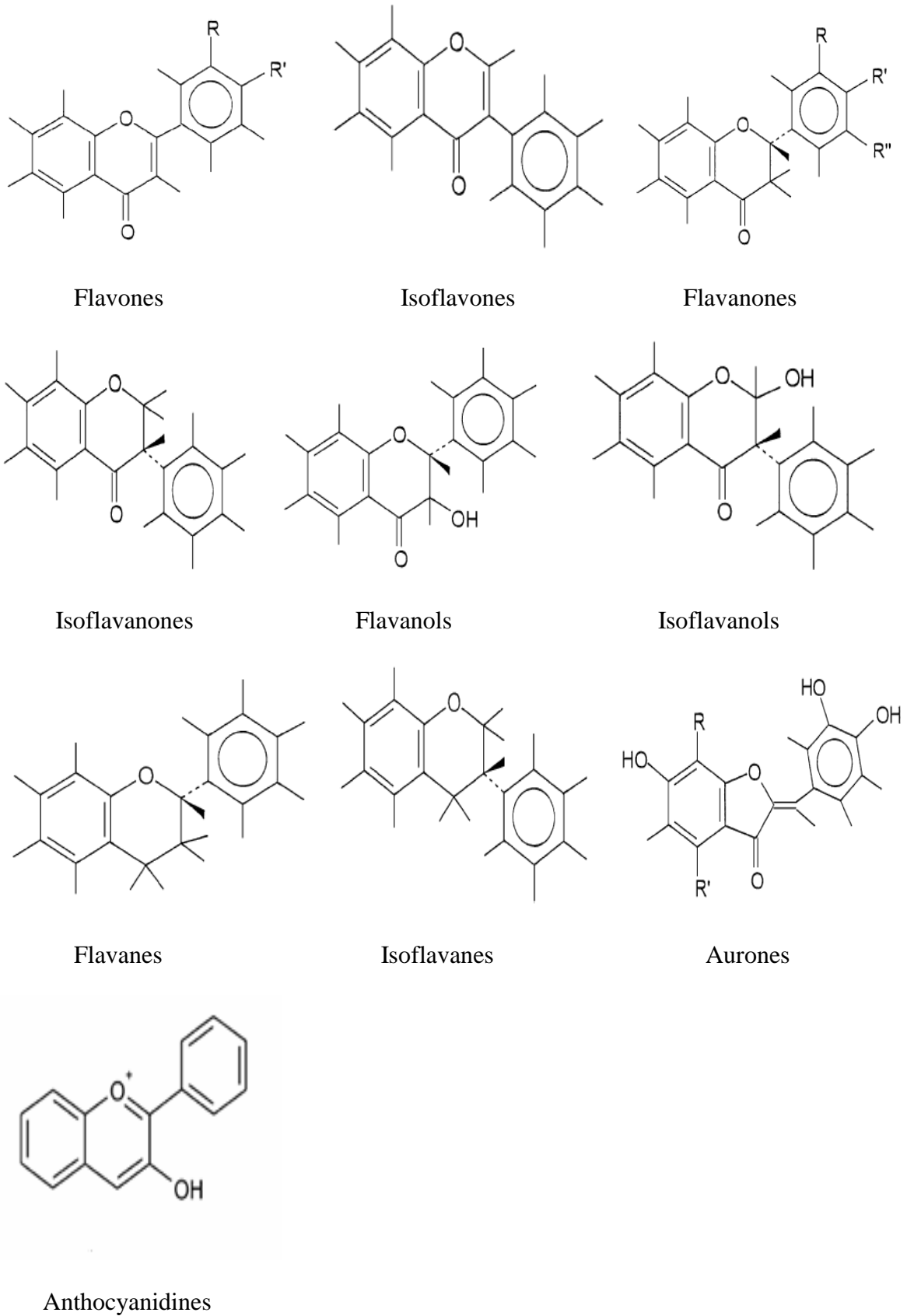


Figure 7 : Structures des squelettes de base des flavonoïdes (Havsteen, 2002)

II.2.3.2. **Activité antimicrobienne des flavonoïdes**

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antibactériennes (Cushnie et al., 2005). Certaines études ont rapporté l'effet antibactérien d'extraits et préparations phytochimiques riches en flavonoïdes (Dall'Agnol et al., 2003; Rauha et al., 2000; Quarenghi et al., 2000).

Plusieurs structures de flavonoïdes possédant une activité antibactérienne ont été isolées et identifiées (Pepeljnjak et al., 2004; Stapleton et al., 2004; Taguri et al., 2004; Cushnie et al., 2003; Arima et al., 2002; Cottiglia et al., 2001; Zhao et al., 2001; Sato et al., 2000; Basile et al., 2000). D'autres comme les flavones (Alcaraz et al., 2000 ; Rauha et al., 2000), les isoflavones (Chacha et al., 2005; Dastidar et al., 2004), flavanones (Chacha et al., 2005), les flavonols (Simin et al., 2002) et les chalcones (Chacha et al., 2005; Alcaraz et al., 2000) ont été également identifiées pour leur activité antibactérienne.

Les flavonoïdes peuvent agir sur l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques notamment ADN et ARN via une inhibition des enzymes de synthèse (Plaper et al., 2003) ou sur la membrane des micro-organismes (Tsuchiya et al., 2000).

Plusieurs travaux ont aussi montré que certains flavonoïdes sont dotés d'un effet antimycobactérien (Okunade et al., 2004; Koysomboon et al., 2006; Kuete et al., 2008 et 2010; Favela-Hernández et al., 2012). En effet, Koysomboon et al., (2006) ont montré que plusieurs flavonoïdes isolés à partir de *Derris indica* inhibent la croissance de *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. Favela-Hernández et al., (2012) ont trouvé que deux flavonoïdes isolés à partir de *Larrea tridentata* sont actifs contre des souches multi-résistantes de *M. tuberculosis* et contribuent à l'activité antimycobactérienne de cette plante.

II.2.4. **Les tanins**

II.2.4.1. **Généralités**

Les tanins sont des métabolites secondaires de la famille des polyphénols produites par les plantes, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Haslam, 1996; Cowan, 1999). Les tanins ont la propriété de tanner la peau. Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tanins et les fibres de collagène, elles sont caractérisées par une saveur astringente et assurent la

protection contre les prédateurs (herbivores et insectes) et on les trouve dans toute les parties de la plante: l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert, 1991). Ils se caractérisent par leur solubilité dans l'eau ainsi que leur faculté à se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que les glucides, les acides nucléiques, les stéroïdes et les alcaloïdes pour former avec eux des complexes stables (Zhu et al., 1997; Mc Sweeney et al., 2001; Makkar et al., 2003; Khababae and Van Ree, 2001; Haslam, 1998). Les tanins constituent un groupe chimique hétérogène avec des structures moléculaires variées. On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique (Khababae and Van Ree, 2001) :

- Tannins hydrolysables qui sont des oligos ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (Figure 8) (Bruneton, 1993; Cowan, 1999).

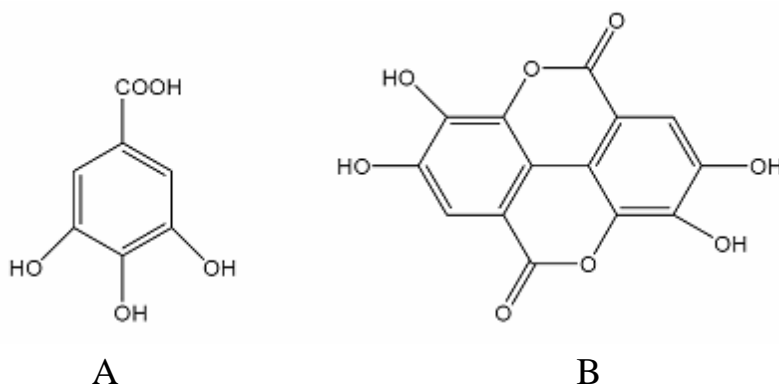


Figure 8: Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)

- Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols qui diffèrent fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit de polymères flavaniques constitués d'unité de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone.

II.2.4.2. Activité antimicrobienne des tanins

Scalbert (1991) a passé en revue les propriétés antimicrobiennes des tannins. Il relève trente-trois études qui ont documentées les activités inhibitrices des tanins. Selon ces études, les

tanins peuvent être toxiques aux mycètes, aux levures, et aux bactéries. On y trouve dans certains remèdes phyto-thérapeutiques riches en tannins des effets antimicrobiens (Chung et al., 1998; Hatano et al., 2005; Song et al., 2006). Dans leur étude Idowu et al., (2010) ont montré l'activité antibactérienne des tannins.

II.3. Les Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes; ils contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique. Depuis l'identification du premier alcaloïde, à savoir la morphine, à partir de l'opium en 1806 (Harborne et al., 1995), plus de dix mille alcaloïdes ont été isolés des plantes (Hesse, 2002).

Ce sont des composés relativement stables, stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques, la plupart du temps à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane (Harborne et al., 1995; Dewick 2001; Bhat et al., 2005). Quelques structures sont relativement simples, tandis que d'autres sont tout à fait complexes.

Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon l'espèce, ils s'accumulent uniquement dans les écorces, dans les racines, dans les feuilles ou dans les fruits. On les trouve dans plusieurs familles de plantes et on en connaît plus de mille: La morphine (1805), la strychnine (1818), la caféine, la quinine, la colchicine, le curare, l'atropine, la solanine,...etc.

Les alcaloïdes présentent généralement de puissants effets physiologiques. Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. Ce sont, pour la plupart, des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique et dangereuse comme l'atropine qui est extraite de la belladone mortellement toxique (*Atropa belladonna*) et qui peut cependant être utilisée à faible dose dans une optique thérapeutique (Hans, 2007). Les alcaloïdes sont utilisés contre le cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (Iserin et al., 2007).

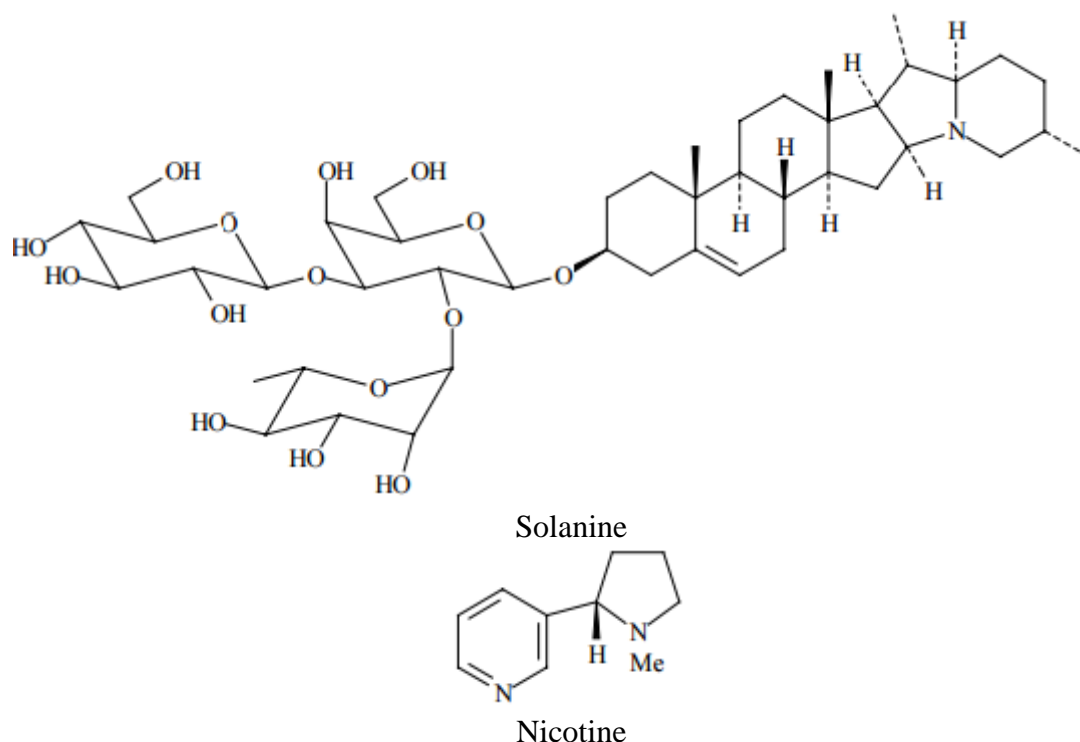


Figure 9: Structure chimique des alcaloïdes (Solanine et Nicotine)

II.3.1.1. Activité antimicrobienne des alcaloïdes

Les alcaloïdes constituent une classe de produits naturels présentant une grande diversité de propriétés biologiques. Ils figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine (Guignard, 2000). Le premier exemple de médicament utilisé, d'un alcaloïde, était la morphine isolée en 1805 de l'œillette *Papaver somniferum*. La codéine et l'héroïne sont les deux dérivés de la morphine. La berbérine isolée de *Berberis vulgaris*, est un alcaloïde qui s'avère avoir des propriétés antimicrobiennes (Rabbani, 1987). En 2005, Karou démontre l'activité antibactérienne d'un alcaloïde isolé à partir de *Sida acuta*.

Deux alcaloïdes, sanguinarine et chelerythrine, isolés à partir de *Sanguinaria canadensis* et *Psoralea corylifolia*, respectivement ont montré une activité antimycobactérienne remarquable (Newton et al., 2002). D'autres alcaloïdes isolés à partir de *Tiliacora triandra* se sont révélés actifs contre des isolats multi-résistants de *M. tuberculosis* (Sureram et al., 2012).

III. Méthodes d'extraction des molécules bioactives

III.1. Huiles essentielles

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction des huiles essentielles. Les principaux sont basés sur la distillation (l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau), l'expression à froid, la solubilité et la volatilité. Le choix de la technique la mieux adaptée se fait en fonction de la localisation histologique de l'huile dans le végétal et de son usage (Herzi, 2013).

III.1.1. Distillation par entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau est la méthode la plus répandue pour l'obtention des huiles essentielles (Benjlali., 2005), cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (Bruneton, 1999) (Figure 10). Durant le passage de la vapeur d'eau à travers la plante, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action des vapeurs pour former un mélange eau et huile essentielle en deux phases, une phase organique et une phase aqueuse. L'avantage de cette technique est d'éviter certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant affecter la qualité des huiles essentielles.

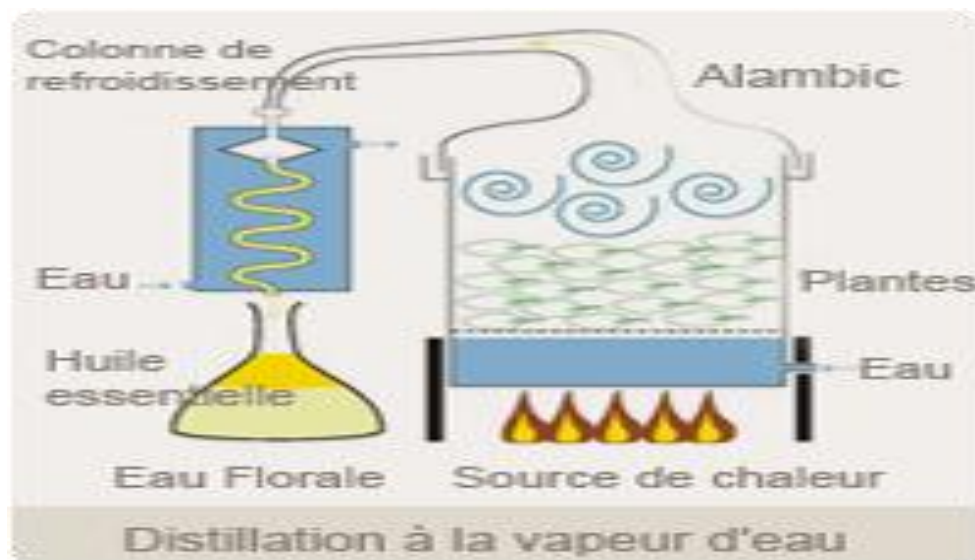


Figure 10: Schéma du dispositif de l'entraînement à la vapeur d'eau

III.1.2. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est sans aucun doute le procédé chimique le plus ancien, le plus utilisé, le plus rentable et convenant le mieux à l'extraction des molécules en vue d'une utilisation thérapeutique. Cependant, cette technique présente certains inconvénients non négligeables (Bruneton, 1999), dont le plus important est un risque de discrimination des composés les plus volatils par dégradation thermique ou par hydrolyse (Figure 11).

Le principe de cette technique consiste à immerger la matière végétale dans un ballon avec de l'eau; l'ensemble est porté à ébullition à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement des cellules et la libération des molécules odorantes, ensuite le mélange est refroidi en passant dans un réfrigérant. Une fois condensées, eau et huile essentielle sont séparées du fait de leurs différences de densité (Bruneton, 1999).

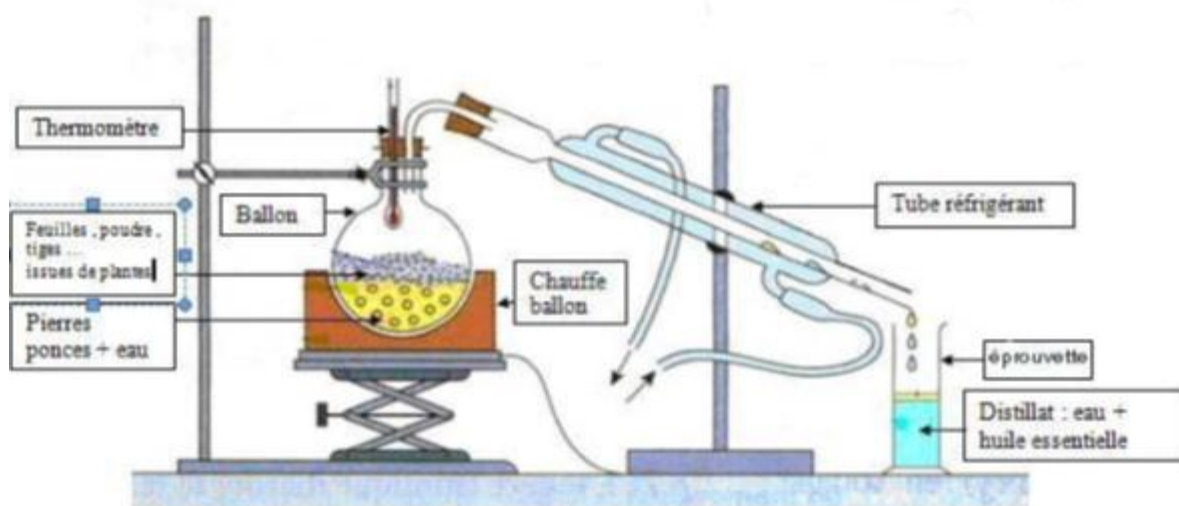


Figure 11: Schéma du dispositif de l'hydrodistillation

III.1.3. Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une technique relativement récente. Elle consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant.

La composition des produits obtenus est sensiblement différente sur le plan qualitatif et quantitatif de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes. L'avantage de cette méthode est la rapidité.

III.1.4. Extraction par CO₂ super critique

Cette technique d'extraction permet d'extraire les huiles essentielles de la plante sans chauffage. La technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone à l'état super critique qui, dans certaines conditions de pression et de température (pression = 73,8 bars et T° = 31,1°C), se comporte comme un fluide qui a une densité d'un liquide et une viscosité d'un gaz. Grâce à cette propriété, le dioxyde de carbone permet l'extraction dans le domaine liquide (supercritique) et la séparation dans le domaine gazeux. Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant (Figure 12).

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus les températures d'extraction sont basses et non agressives pour les constituants les plus fragiles (Martini et Seiller, 1999). Cette technique est utilisable pour les essences difficilement distillables.

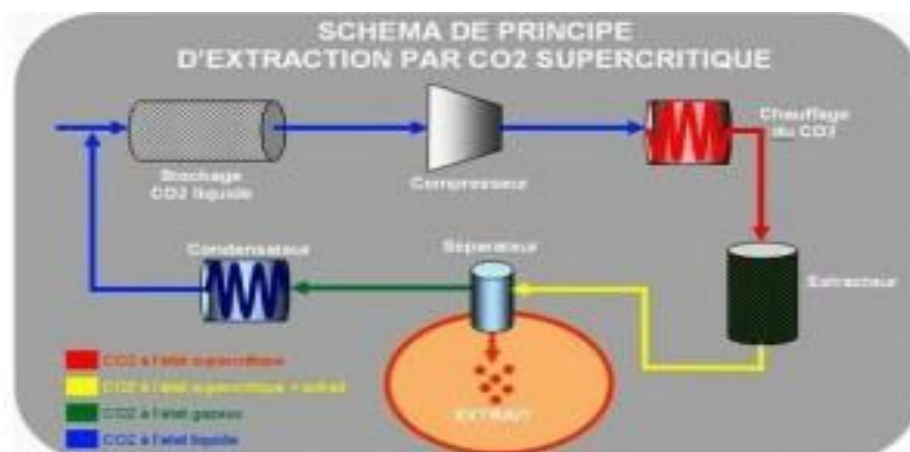


Figure 12 : Schéma de principe d'extraction par CO₂ supercritique

III.1.5. Extraction assistée par micro-onde

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide (Figure 13). Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable.

La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par microondes.

Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées (Bendahou et al., 2007; Lucchesi et al., 2007). Cette technique présente donc plusieurs avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (Mengal et al., 1993; Lucchesi et al., 2004). L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée (Chemat et al., 2006; Flamini et al., 2007; Lucchesi et al., 2007).

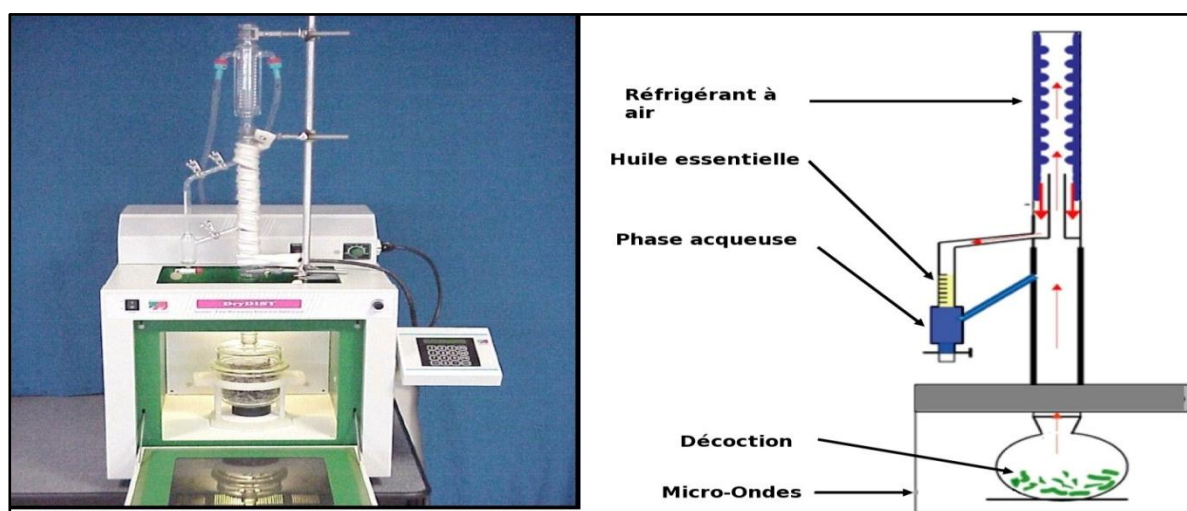


Figure 13: Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes

III.1.6. L'expression à froid

Cette technique est utilisée pour extraire les essences des agrumes; c'est une méthode assez simple qui consiste à briser mécaniquement (compression, incision, perforation) les poches à essence (souvent au niveau de l'écorce ou péricarpe du fruit) pour recueillir un mélange d'essences odorantes et de l'eau (Figure 14).

L'avantage de cette technique est sans aucun doute son faible coût de production ainsi que le fait que l'essence obtenue après écrasement des fruits ne nécessite qu'une filtration pour obtenir un produit commercialisable. Néanmoins, elle nécessite une énergie mécanique et elle est limitée aux agrumes.



Figure 14: Appareil de la technique de l'expression à froid

III.1.7. L'enfleurage

L'enfleurage est un procédé réservé aux huiles essentielles délicates qui ne supportent pas la chaleur. Les pétales fraîchement cueillies, sont étalés sur la graisse sur des châssis en verre et remplacés toutes les 24 heures. Les essences saturent progressivement la graisse. Le composé obtenu appelé pommade, est lavé avec de l'alcool qui, après évaporation, produit l'huile parfumée.

III.2. Extraits de plantes

Le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilité des composés d'un mélange dans un solvant. Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits de haute valeur ajoutée présents dans les plantes. Ces techniques peuvent être dites conventionnelles (utilisées depuis longtemps) et nouvelles (développées plus récemment).

III.2.1. Macération

La macération consiste à mettre en contact le matériel végétal avec le solvant sous agitation pendant des heures, voire des jours. L'extraction se fait à température ambiante, ce qui permet la préservation des composés thermolabiles. Cette méthode nécessite une filtration après extraction. Plusieurs extractions sont parfois nécessaires pour pouvoir faire passer le maximum de composés contenus dans la plante vers le solvant. Cette opération conduit à l'utilisation d'une grande quantité de solvant.

III.2.2. Extraction par soxhlet

L'extraction par soxhlet est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. L'échantillon entre rapidement en contact avec une portion de solvant pur, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. De plus, elle ne nécessite pas de filtration après extraction et peut être utilisée quelle que soit la matrice végétale (Figure 15).

Les inconvénients les plus significatifs de cette méthode sont la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée, ce qui limite sa rentabilité économique et la rend peu écologique. Les échantillons étant portés à haute température pendant une période relativement longue, le risque de thermodestruction de certains composés n'est pas à négliger si la matière végétale contient des composés thermolabiles. Cette technique est limitée d'un point de vue de la sélectivité du solvant et n'est pas facilement automatisable (Grigonis et al., 2005; Wang et Weller 2006).

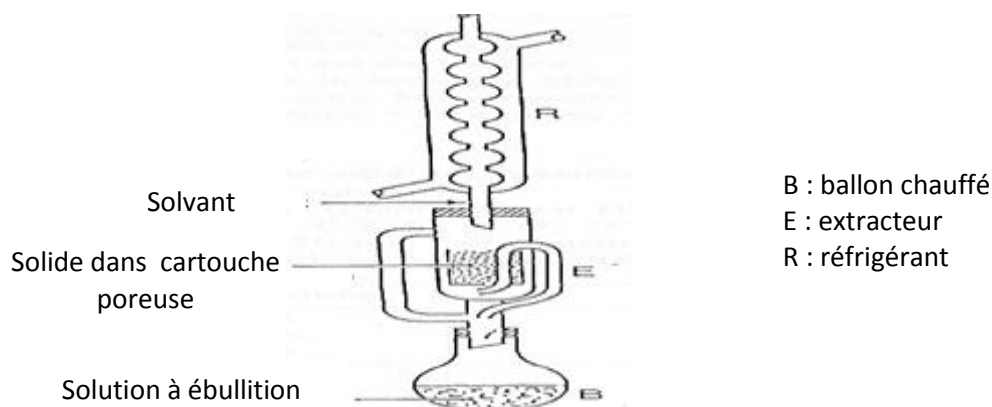


Figure 15: Extracteur Soxhlet

III.2.3. Extraction par ultrasons ou sonication

Cette technique est apparue en 1950 avec des équipements de taille laboratoire (Vinatoru, 2001). Elle représente une adaptation de l'hydrodistillation ou de l'extraction par solvant organique. En effet, la matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant et elle est soumise à l'action des ultrasons. Cette technique peut être utilisée pour l'extraction des huiles essentielles, mais elle a surtout été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique (Hromadkova et al., 1999; Vinatoru, 2001).

Les ondes sonores utilisées ont une fréquence de 20 kHz à 1 MHz induisant des vibrations mécaniques dans le solide, le liquide ou le gaz, à travers une succession de phases d'expansion et de compression, comme au cours d'un phénomène de cavitation. Les bulles, formées par l'expansion, vont se développer puis dégonfler. Si ces bulles se situent près d'une surface solide, alors le dégonflement sera asymétrique, ce qui produira des jets de liquide ultra-rapides. D'après Vinatoru (2001), les mécanismes d'extraction impliquent deux phénomènes physiques :

- Les molécules peuvent parfois traverser la paroi cellulaire par simple diffusion.
- Après destruction des parois cellulaires, le contenu de ces cellules peut être «lessivé» afin de récupérer l'ensemble des molécules emprisonnées.

Les ultra-sons permettent d'améliorer ces deux phénomènes. Cette technique permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. Elle est facile à mettre en œuvre. Comme le soxhlet, l'extraction par Sonication

permet d'utiliser une large gamme de solvants afin d'obtenir différents composés naturels. Les ultrasons permettent d'augmenter le rendement et diminuer le temps de traitement.

IV. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles

Une parfaite connaissance de la composition chimique des huiles essentielles est nécessaire pour contrôler la qualité et la régularité; et ceci dans le but d'améliorer la commercialisation et pour y déceler une éventuelle spécificité en vue de sa valorisation.

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de diverses techniques. La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle se base sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et désorptions successives sur la phase fixe, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase (Schwedt, 1993). Plusieurs méthodes existent:

- **Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique qui permet de séparer et d'analyser les molécules organiques d'un mélange complexe. Elle s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (Arpino et al., 1995). C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme.

Cette méthode est basée sur le partage du produit analysé entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte (Bouchnet et al., 2002). Les constituants des mélanges sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne.

Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules: un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur.

Il existe plusieurs types de détecteurs ; le détecteur le plus utilisé pour l'analyse des composés organiques est le détecteur à ionisation de flamme (CPG /FID): une tension de l'ordre de la

centaine de volts est maintenue entre la buse de la flamme et une électrode entourant cette dernière. Lorsque les molécules traversent la flamme, elles sont ionisées ce qui provoque entre les électrodes un courant électrique.

Le courant créé par le détecteur est ensuite amplifié, transformé et enregistré dans une station de traitement des données. Il est important de noter que les surfaces des pics obtenus sont proportionnelles aux concentrations des produits dans le mélange.

Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles.

- **Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)**

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG) est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse/charge. Cette technique permet d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances présentes en très petites quantités, voire en traces. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse qui ont tous en commun trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur.

Cette technique d'analyse se déroule en plusieurs étapes :

- **Ionisation:** les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température, il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de l'échantillon de départ.
- **Accélération:** Les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.
- **Séparation:** Les ions seront distribués suivant leur rapport masse/charge.
- **Détection:** après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées.

- Traitement du signal: le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports: masse/charge.

L'appareil est relié à un système informatique gérant, une bibliothèque de spectres de masse (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Wiley Registry of Mass Spectral Data, König-Joulain et Adams) (Julien Paolini, 2005).

En effet, le système d'indice est basé sur une notion de rétention relative. Il compare la rétention d'un produit quelconque à celle de référence disponible dans la bibliothèque. Ce qui permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondant à chaque pic chromatographique et permet par conséquent l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG.

V. Généralités sur *Rosmarinus officinalis*

Le nom « Romarin » viendrait du latin ros qui signifie “rosée” et marinus, “marins”, indiquant que le Romarin ne s'éloignait pas trop de la côte. Une autre interprétation de son nom scientifique dit que “ros” provient du grec rhops qui signifie “arbuste” et marinus dérive de myrino qui signifie “aromatique”, alors sa signification serait “arbuste aromatique”. Son odeur, très camphrée, évoque aussi l'encens, d'où en provençal son nom « encensier ».

Autres appellations :

- ✓ Azir, Aklil, ikilil ljabal, klile (Algérie, Maroc, Tunisie) (Bellakhdar., 2006).
- ✓ Herbe-aux-courounnes, rosée de mer, rose marine, romarin des troubadours, bouquet-de-la-vierge (France).
- ✓ Folia Anthos, Folia Rorismarini, Encensier, rosemary (Angletaire).
- ✓ Rosmarinblatter, Krankkrautblatter, Kranzenkrautblatter, Rosmarein (Allemand).

V.1. Histoire du Romarin

Le romarin fait l'objet de très nombreuses mentions historiques et légendaires. Les anciens Grecs lui vouaient une grande vénération. On s'en servait généreusement dans toutes les fêtes. Les mariées portaient des couronnes de Romarin, symboles d'amour et de fidélité, tandis que les invités recevaient des branches enjolivées de rubans de soie multicolores. On mettait aussi

des brins de Romarin sous les oreillers pour chasser les mauvais esprits et les cauchemars. Les étudiants grecs s'en confectionnaient des couronnes, qu'ils portaient durant les examens pour stimuler leur mémoire. Le médecin grec Dioscorides (1 an après J-C), était le premier à signaler certaines propriétés médicinales du romarin.

Il était associé aux rites funéraires de l'ancienne Egypte. Les Égyptiens plaçaient des rameaux de Romarin dans la tombe des pharaons afin de fortifier leur âme. Le Romarin est un symbole du souvenir et de l'amitié.

Pour les Romains, il était une herbe sacrée qui portait bonheur aux vivants et assurait aux morts un séjour paisible après la mort comme l'atteste-le poète Horace dans ces vers : "Si tu veux gagner l'estime des dieux, apporte leur des couronnes de romarin et de myrte". Ils en faisaient brûler dans les cérémonies religieuses en guise d'encens.

Plus tard, les chrétiens l'associèrent à la Vierge Marie qui se serait reposée au individu d'un buisson de Romarin pendant la fuite.

Durant les épidémies de peste, le romarin était très populaire : on en faisait brûler des rameaux pour purifier l'air et on portait des sachets sur soi, que l'on respirait lorsqu'on passait dans les endroits touchés par cette maladie.

Durant des siècles, les paysans croyaient que le Romarin assurait le bonheur et la prospérité aux vivants et apportait aux défunts le repos. Il est fréquemment cultivé dans les jardins comme plantes d'ornement et comme condiment.

Le Romarin a été utilisé sous forme d'extrait à base d'alcool pour les plaies et sous forme de baume pour soulager les rhumatismes et les névralgies, tant chez les humains que chez les animaux. Il était le remède contre la jaunisse, les lassitudes, les vertiges, la perte de mémoire.

L'huile essentielle est apparue plus tard. Elle aurait été isolée par Lulle en (1330) et mentionnée au 13^{ème} siècle dans les écrits d'Arnold Villanovus (Bedrossian, 1999). Elle doit son succès à « l'eau de la Reine de Hongrie », celle-ci âgée de 72 ans et paralysée, a récupéré la santé et la jeunesse grâce à une potion magique préparée à base de romarin et de vin, que l'on nommait la portion de Hongrie.

V.2. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du Romarin

Cette plante est utilisée en médecine en raison de ses différentes propriétés :

- Anti spasmolytiques, diurétiques, hépato protectrices, soulagement des désordres respiratoires (Souza et al., 2008; Lemonica et al., 1996).
- Antibactériennes (Ivanovic et al., 2012; Weerakkody et al., 2010; Romano et al., 2009), antimutagéniques, antioxydantes, chémopréventives (Ibañez et al., 2000; Pérez et al., 2007; Wang et al., 2008).
- Antimycobactérien (Abuzeid et al., 2014; Rhayour, 2002).
- Anti-inflammatoires, antimétastasiques (Cheung et Tai, 2007; Fadi, 2011).
- Antidiabétique (Fadi, 2011).
- Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires (Singletary et Nelshoppen, 1991) et la prolifération des tumeurs cutanées (Huang et al., 1994).
- D'autres études montrent que les composants du romarin inhibent les phases d'initiation et de promotion de cancérogénèse (Offord et al., 1995)
- Carnosol du romarin possède une activité antivirale contre le virus du SIDA (HIV) (Aruoma et al., 1996) alors que l'acide carnosique a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1 (Paris et al., 1993).

V.3. Domaines d'utilisation du Romarin

Le Romarin est utilisé en médecine (phytothérapie), dans l'industrie cosmétique et parfumerie et il est aussi utilisé dans l'industrie alimentaire.

✓ Phytothérapie

L'extrait alcoolique du Romarin agit sur les ulcères, les plaies, les dermatoses parasitaires.

La décoction aqueuse s'utilise en gargarismes (angines) et bains de bouche (aphtes) et pour traiter les diabétiques (Bakirel et al., 2008).

Les parties aériennes du Romarin sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique (Gonzalez et al., 2007).

L'infusion des feuilles est utilisée comme apéritif, cholagogue, stomachique et emménagogue.

L'huile essentielle de Romarin soulage les troubles rhumatismaux de la circulation sanguine, soigne les blessures, soulage les maux de tête, améliore la mémoire et la concentration, fortifie les convalescents, combat les effets du stress et de la fatigue, traite l'inflammation des voies respiratoires et de la sphère ORL (Dias et al., 2000).

Le Romarin contient de l'acide carnosique qui a fait l'objet de plusieurs études ayant conclu qu'il pouvait s'agir d'un composé anti-cancer puissant. Les chercheurs ont donné des résultats prometteurs dans des études de son efficacité contre le cancer du sein, le cancer de la prostate, le cancer du côlon, la leucémie et le cancer de la peau (Offord et al., 1995). Le Romarin est également souvent utilisé pour les problèmes de digestion y compris les brûlures d'estomac, les gaz (flatulences), les problèmes de foie et la perte d'appétit.

Le Romarin contient des substances qui sont utiles pour la stimulation du système immunitaire et pour l'amélioration de la circulation et la digestion.

Le Romarin contient également des composés anti-inflammatoires qui peuvent le rendre utile pour réduire la sévérité des crises d'asthme.

En sa qualité d'antispasmodique, il est bénéfique dans la catarrhe chronique des bronches, la coqueluche et les vomissements nerveux.

C'est un bon cholagogue utilisé dans les cholécystites chroniques, certaines ascites et cirrhoses, les ictères; c'est aussi un emménagogue (aménorrhée dysménorrhée) et un diurétique (hydropisies) (Chang et al., 1977; Aqel, 1991; Leung et Foster, 1996; Haloui et al., 2000).

✓ **Industrie cosmétique et parfumerie**

L'utilisation du Romarin en parfumerie est très ancienne. On connaît en particulier l'eau de la Reine de Hongrie, alcoolat fréquemment utilisé au 19^{ème} siècle.

Le Romarin entre dans la composition de parfums, de savons, détergents ainsi que dans la formulation des pommades dermiques. Calabres et al., (2000), ont étudié la faculté des extraits de Romarin à protéger la peau des lésions cutanées induites par les radicaux libres. Ils ont montré la validité réelle de la biotechnologie des antioxydants naturels dans la gestion de l'antivieillessement de la peau.

✓ Industrie alimentaire

Les extraits végétaux de Romarin présentent un pouvoir antioxydant important. Il est largement utilisé dans l'industrie alimentaire pour prévenir une éventuelle dégradation oxydative et microbienne des aliments (Donald et Mckeague, 2015; Ivanovic et al., 2012; Ponce et al., 2008; Georgantelis et al., 2007; Zivanovic et al., 2005; Shylaja et Peter, 2004; Dorman et al., 2003; Sotelo-Felix et al., 2002; Takenaka et al., 1997; Richeimer et al., 1996; Haraguchi et al., 1995; Aruoma et al., 1992; Houlihan et al., 1985; Inatani et al., 1983).

Le Romarin est utilisé dans l'industrie alimentaire comme alternative aux additifs chimiques pour la préparation de la volaille, de l'agneau, du veau, des fruits de mer, des saucisses et des salades ainsi que des soupes et chapelures.

Le Romarin est également utilisé comme épice dans les croustilles, les chips et les frites françaises (Moino et al., 2008; Georgantelis et al., 2007; Janz et al., 2007; O'Grady et al., 2006; Sebranek et al., 2005; Djenane et al., 2002 ; Sanchez-Escalante et al., 2001).

V.4. Botanique et description de la plante

La classification de la plante de la famille des Lamiaceae est la suivante (Tableau 1)

Tableau 1: Classification botanique de *Rosmarinus officinalis*

Règne	Plante
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i>
Noms communs	Romarin, Encensier, Herbe aux couronnes, Rose des marins, Rose de la mer, Rose-marine

R. officinalis appartient à la famille botanique des Lamiacées au sein du genre *Rosmarinus*. Il possède les caractéristiques suivantes (Bellakhdar, 2006; Besombes, 2008) (Figure 16):

- Arbuste toujours vert, de 60 cm à 2 m de haut et pouvant vivre jusqu'à 30 ans.
- Arbrisseau aromatique touffu, rameux, d'environ 1 m de hauteur, à tiges ligneuses.

- Tige, à l'écorce grisâtre, écailleuse et fissurée, se divisant en rameaux opposés tortueux, nœuds distancés de 0,5 à 2 mm.
- Les feuilles pouvant atteindre 3 cm de long et 4mm de large, sont étroitement lancéolées, acaules et friables; le bord est involuté vers le bas (rangée supérieure). Les jeunes feuilles sont pubescentes sur la face supérieure, alors que les plus âgées sont glabres. Elles sont ridées et striées en raison d'une nervure médiane enfoncée, en revanche très proéminente sur la face inférieure, recouverte d'une pubescence blanche dense.
- Les fleurs apparaissant dès janvier, bleu pâle ou lilas, sont groupées en grappes axillaires et terminales dans la partie supérieure des rameaux.
- Ces inflorescences spiciformes portent en toute saison des fleurs subsessiles. Le calice gamosépale, bilabié en forme de cloche, possède 3 lobes.
- La corolle gamopétale est longuement tubuleuse avec une lèvre supérieure en forme de casque à 2 lobes et une lèvre inférieure à 3 lobes. Les 2 étamines saillantes dépassent largement la corolle; 2 autres sont réduites à des crochets.
- Le fruit est un akène brun de forme ovoïde, entouré par un calice brun et persistant.

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 :

- ✓ Romarin à cinéole.
- ✓ Romarin à verbénone.
- ✓ Romarin à camphre, bornéol.
- ✓ Romarin à myrcène.

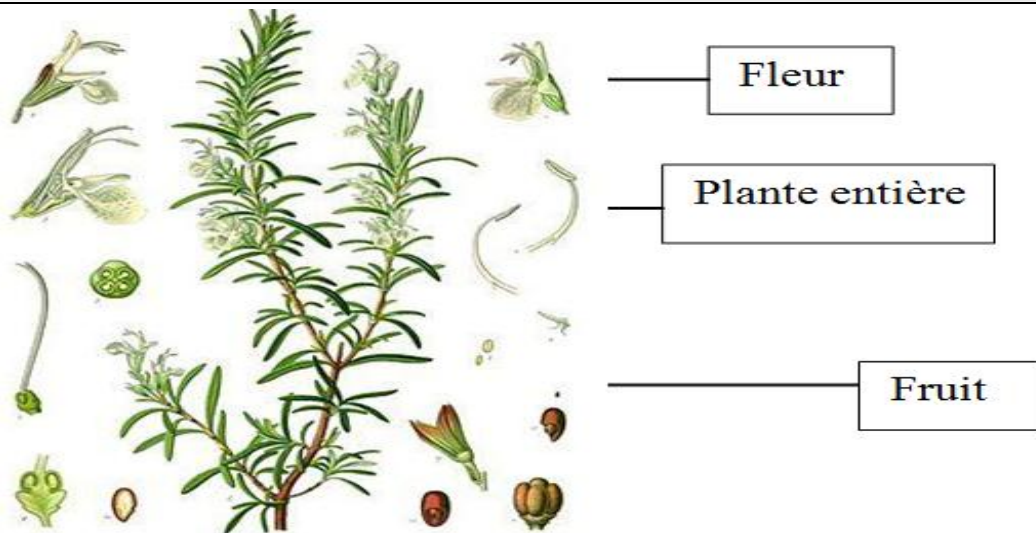


Figure 16: Aspect morphologique de *R. officinalis*

V.5. Ecologie

Le Romarin se trouve dans tout climat méditerranéen, de préférence dans les lieux secs et arides, exposés au soleil. C'est la plante la plus populaire dans le bassin méditerranéen (Emberger 1960). Sa multiplication se réalise à l'automne ou au printemps par semis des graines, des boutures ou par des divisions des pieds. Plusieurs récoltes peuvent se faire dès le printemps, en mai, juillet et septembre. On suspend les tiges réunies en bouquets, dont on détache les feuilles après séchage complet. Il peut y avoir des fleurs toute l'année, mais la période de floraison maximum se situe au printemps (mars à mai), puis, dans une moindre mesure, à l'automne (septembre). Le Romarin se développe complètement en pleine lumière uniquement.

Le Romarin se répartit tout au long de la mer méditerranéenne et le reste de l'Europe (Guinochet, 1973), il est typiquement méditerranéen qui n'existe pas à l'état sauvage en Belgique, (Angeno et al., 1981). D'après Perrot et Paris, (1971) cette plante existerait aussi en Corse et au Portugal. En France, elle pousserait abondamment dans les terrains calcaires du midi en particulier sur le littoral méditerranéen (aux faibles altitudes) d'où il remonte même jusqu'au massif central (Provence, Roussillon, Languedoc) (Garnier et al., 1961). Cette plante est également cultivée dans de nombreux pays tel que l'Espagne, l'Italie, la Tunisie, l'Algérie et le Maroc.

Au Maroc, le Romarin se développe dans le col de Feggous, Taouarirt, Tamokrant, chaînes du Gueb-er-Rahal et du Bou-Iblane, le mont Ouarirt au Sud Est de Taza et vallée de l'Oued Atchane près de Boulmane. Dans le Haut Atlas, il est fréquent dans la partie orientale à partir de Titahouine et Tizi-n-Telghemt. Le Romarin est rencontré sur les hauts plateaux (Figuig). Il est aussi abondant dans la région de Midelt et dans la forêt de Debdou et rare dans la partie occidentale. Il est présent dans les peuplements clairs et matorrals des basses et moyennes altitudes. On le rencontre depuis l'aride supérieur au subhumide de type chaud à frais dans le thermo-méditerranéen et le méso-méditerranéen. Il est indifférent aux qualités chimiques du sol, cependant il présente une certaine préférence pour les sols carbonatés et bien drainés (Benabid, 2000; Takeoka, 1998).

V.6. Intérêt socio-économique

Le Maroc exploite un potentiel de 1 million d'hectares de *Rosmarinus officinalis* qui produisent un rendement annuel de 60 tonnes d'huile essentielle, destinée à l'exportation. Une tonne de Romarin sous forme de biomasse ou de feuilles séchées est vendue à 350 DH et produit entre 22 et 25 litres d'huile essentielle de romarin. Les prix de vente par litre d'huile distillée varient entre 200 et 250 DH le litre en gros et oscille entre 400 et 800 DH, le litre en détail. Un flacon de 60 millilitres est vendu dans des coopératives à 30 DH et dans les boutiques spécialisées en cosmétique à plus de 75 DH.

Pour répondre aux attentes des clients, les exploitants marocains doivent respecter les bonnes pratiques de récolte (identification systématique de la plante, technique de distillation, stade phonologique de la plante,...etc.) pour produire des huiles essentielles de bonne qualité. L'amélioration de la qualité des huiles essentielles exportées permet au Maroc de gagner la confiance des demandeurs et d'augmenter le niveau de vie de la population locale et de l'économie nationale (Ghanmi et al., 2011). Quant à l'adjudication elle est payée par lot, ainsi des coopératives qui exploitent une superficie de 20.300 ha versent 65 000 DH aux Eaux et Forêts.

V.7. La culture du Romarin

A l'état sauvage, le Romarin se rencontre sur l'ensemble du pourtour méditerranéen, de préférence sur sols calcaires et jusqu'à 2000 m d'altitude. Le développement de cette plante est influencé par les conditions climatiques, édaphiques et biotiques du milieu.

Le Romarin est une plante héliophyte; il demande une sécheresse estivale accusée et un ensoleillement important et nécessite un hiver doux, des conditions hivernales clémentes, avec des précipitations neigeuses rares et peu abondantes. Si les températures hivernales sont trop basses, les plants d'un an sont plus résistants, mais les plantules périssent (surtout celles situées dans des endroits humides).

Les vents provoquant un brassage important de l'atmosphère, pouvant permettre d'égaliser les températures macro et microclimatiques, sont d'une action positive sur le Romarin qui résiste fort bien à leur action mécanique. Par contre, la présence de sels dans ces courants empêche leur installation trop près du rivage. Le Romarin ne se développe que sur des sols secs et bien drainés. Il est beaucoup plus rare dans des régions où le sol est asphyxié (par la présence d'eau) pendant presque toute l'année.

Cette plante recherche les sols riches en ions calcium, d'un pH entre 6 et 8,4 et ayant une texture argilo-limonosableuse. Par contre, elle est peu abondante sur les sols saturés en ions magnésium.

Le Romarin a un besoin accru en luminosité. Si cette dernière est faible car la lumière est interceptée par des essences concurrentes, alors les tiges s'allongent, deviennent plus frêles, les fleurs sont plus rares voire absentes et les parasites sont plus nombreux. Le piétinement par les ovins a un impact négatif car il diminue la quantité d'air dans le sol, ce qui gêne le développement des plantules.

La présence d'abeilles et de fourmis moissonneuse a un effet positif car, par leurs activités, ces animaux facilitent la pollinisation croisée (absolument nécessaire chez cette espèce) (Abdoulhousen, 1990).

La multiplication s'effectue par semis des graines, division des pieds ou boutures. Cette dernière technique est rapide et sûre. Des tronçons de 15 cm sont enterrés à mi-hauteur en Mars-Avril. L'enracinement se produit dans les deux mois suivants. La mise en place définitive a lieu à l'automne ou au printemps suivant, dès que les pieds ont suffisamment de

racines. L'espace varie de 0,75 à 1,5 m pour les interlignes et il est de 0,5 cm entre les pieds d'un même rang.

La récolte mécanique est réalisée à l'aide d'une faucille, débute 18 mois après la plantation, à raison d'une coupe par an; elle consiste à couper les brins à 30 cm du sol, les réunir en bouquets pour les suspendre ensuite. Elle se fait soit en Mai avant floraison ou en Septembre si l'on recherche le feuillage pour l'herboristerie ou l'industrie alimentaire, soit en pleine floraison (Juillet) si le romarin est destiné à la distillation (Abdoulhousen, 1990).

VI. Domestication

VI.1. Définition

La domestication (du latin *domus*, « maison ») est un processus par lequel des végétaux, des animaux ou des microbes recueillis à l'état naturel s'adaptent à un habitat particulier créé à leur intention par l'être humain. C'est aussi un procédé qui consiste à amener une espèce sauvage sous gestion humaine. D'un point de vue génétique, c'est le processus par lequel des modifications de fréquences de gènes et de performances sont obtenues lorsqu'une population est soumise à un nouvel ensemble de pressions de sélection.

La domestication des plantes est un processus de sélection artificielle de caractères phénotypiques réalisé par l'homme à partir de plantes sauvages, qui est à l'origine des premières espèces cultivées.

VI.2. Généralités sur la domestication des plantes

Pour se nourrir, s'habiller, ou encore se soigner, l'Homme met à profit la biodiversité végétale. Il a d'abord utilisé des plantes sauvages, puis, il y a environ 10 000 ans, il a commencé à domestiquer les plantes afin de pouvoir les cultiver. Toutes les plantes cultivées descendent des individus sauvages. Ainsi, les principales plantes domestiquées sont au Proche-Orient (blé, orge et céréales secondaires), en Amérique centrale (maïs) et en Asie (riz) (Jahier et al., 2006).

De nos jours, les espèces cultivées sont sélectionnées artificiellement à partir des espèces sauvages dans des régions appelées foyers de domestication.

Pendant la domestication, l'homme identifie dans les populations sauvages les individus qui présentent les caractéristiques intéressantes pour la culture.

Par rapport à leurs parents sauvages, les plantes domestiquées montrent généralement une synchronisation de la période de floraison, un élargissement des organes reproducteurs (fruits ou graines), une perte de la dispersion des graines et d'autres caractéristiques connues sous le nom de « syndrome de domestication » (Hammer, 1984).

VI.3. La domestication des PAM

En Afrique comme ailleurs les forêts sont menacées par l'exploitation abusive, les coupes sauvages et la conversion des terres (CTA, 2007). Les plantes médicinales qui y poussent à l'état sauvage disparaissent. L'alternative pour l'utilisation durable des plantes reste leur domestication. Dans ce cas précis, la voie la plus simple est la culture des plantes médicinales (IMPB., 2008; Purohit et Vyas, 2004; Hirt et al., 2003; Amposah et al., 2002).

De ce fait, la domestication soutient la filière des PAM et permet de développer des produits à haute valeur ajoutée correspondant à la demande du marché. La mise en culture permet en outre d'éviter la cueillette sauvage d'espèces rares et ainsi de maintenir la biodiversité.

Les techniques de culture des plantes médicinales sont similaires à celles des plantes alimentaires, en considérant le type de sol, la disponibilité en eau, la vulnérabilité aux parasites, etc... (Purohit et Vyas, 2004; Amposah et al., 2002). Cependant, certaines plantes médicinales sont particulièrement difficiles à cultiver comme *Artemisia Annuua* (Hirt et al., 2003), très efficace pour prévenir le paludisme mais qui exige beaucoup d'eau, de soins et la culture biologique.

VI.3.1. Avantages et inconvénients de la domestication des PAM

La domestication des PAM a fourni de multiples avantages (Hirt et al., 2003) tels que :

- Disponibilité des plantes sans besoin d'aller dans la forêt.
- Identification botanique fiable.
- Apports substantiels de revenus pour les paysans qui les cultivent.
- Disponibilité prévisible des plantes médicinales au moment voulu et en quantité voulue.

- Disponibilité et protection des plantes actuellement rares ou en voie de disparition dans la nature.
- Contrôle plus facile de la qualité, de la sécurité et de la propreté des plantes.
- La sélection et le développement des génotypes avec des traits désirables commercialement.
- Matériel cultivé peut être facilement certifié « biologique ».

Comme la domestication a des avantages elle a des inconvénients:

- Perte possible des valeurs culturelles associées à la cueillette des plantes médicinales.
- Réduction possible de l'efficacité du principe actif des plantes cultivées par rapport aux plantes poussant à l'état sauvage.
- Contamination génétique possible des espèces locales à travers l'introduction de plantes étrangères au pool génétique local (CTA, 2007; OMS, 1993).

Chapitre II

Matériel et méthodes

I. Présentation des stations étudiées :

Les échantillons de la partie aérienne du Romarin (tiges, feuilles et fleurs) ont été récoltés au stade de floraison. Ces échantillons proviennent des régions du Sud (Jardins de Jacky), de l'Oriental (Ayoun Charkiya), du Moyen Atlas (Sefrou) et du Nord (Oued Laou) du Maroc. Ces espèces ont été identifiées par le Pr. Abdesslam ENNABILI de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques de Taounate (INPMA).

I.1. Présentation de la région d'Agadir

L'exploitation « Jardin de Jacky » est située à 35 km d'Agadir dans la localité de douar El Kharba, de la commune Oued Essafa de Biougna dans la province Chtouka Ait Baha. Elle a été créée par Jean-Jacques Descamps et un agriculteur marocain Hajj Larbi Rada. C'est une exploitation unique en son genre pour la production des plantes médicinales et aromatiques bio, qui sont destinées aux curistes de « Thermalp, les bains d'Ovronnaz », grand centre de remise en forme, les plus réputés en Suisse et à d'autres partenaires suisses dans le domaine du bien-être.

Convaincu, comme le professeur Jean-Marie phytothérapeute, que les pesticides sont très dangereux, Descamps a choisi de cultiver les plantes au Maroc, selon des règles très strictes, dans cette exploitation qui est un exemple en matière d'agriculture biologique spécifique de la production de plantes aromatiques et médicinales. Ce domaine compte 5 hectares (de Sauge, Bigaradier, Menthe, Romarin,... etc.) qui sont cultivés en pleine nature vierge et dépourvue de toute pollution et de tout produit chimique.

Ainsi, les recherches de Jean-Jacques Descamps ont prouvé que la région de Biougra d'Agadir, était le meilleur endroit permettant d'obtenir des plantes d'une qualité incomparable, grâce à la conjonction d'une terre d'une composante unique, d'un ensoleillement exceptionnel et d'un environnement encore protégé de toutes les pollutions environnantes.

Selon Larbi Rada, c'est la seule exploitation dans la région qui produit des plantes médicinales bio. Aujourd'hui, dans son plan de développement, l'entreprise s'ouvre sur de nouveaux marchés. Déjà, outre la Suisse, la production de l'établissement est exportée à hauteur de 25% sur le marché Polonais.



Figure 17 : Photo du Romarin du jardin de Jacky d'Agadir

I.2. Présentation de la région de l'Oriental (Province de Jerada)

La Province de Jerada qui s'étend sur une superficie de 9300 km² est géographiquement située au Nord-Est du Maroc. Elle fait partie de la région de l'Oriental et délimitée :

- Au nord par la préfecture d'Oujda-Angad;
- A l'est par l'Algérie;
- Au sud par la province de Figuig;
- A l'ouest par la province de Taourirt.

Le relief de la province de Jerada se caractérise par sa diversité. Il est formé essentiellement de montagnes et de hauts plateaux divisés dans la partie Nord de la province, de vallées et des plaines vastes au Sud.

Sur le plan climatologique, les précipitations moyennes dans la province sont modestes (entre 80 et 150 mm) favorisant ainsi au Nord le maintien et le développement d'une arboriculture naturelle variée (glandes vertes, tagga, romarin, araâr) et au sud où se développent certaines cultures désertiques comme l'alfa et le Chih. En outre, la région dispose de nombreuses sources hydrauliques comme la nappe d'eau de Ain Béni Mathar et les sources des eaux de surface dont notamment Ras Al Ain, les sources de Guafait et l'Oued Za se caractérisant par un écoulement permanent avec un débit moyen de 3m³/s.



Figure 18 : Photo du Romarin de l'Oriental

I.3. Présentation de la région de Sefrou

La région de Sefrou est une zone de contact entre le Moyen Atlas tabulaire et le Sais. C'est un type de contact d'aspect confus entre le causse moyen atlasique et la plaine du Sais. Elle présente un climat semi-aride à subhumide, recevant en moyenne 400 à 700 mm de précipitation par an. Celles-ci varient en fonction de l'altitude et de l'exposition.

I.4. Présentation de la région d'Oued Laou

Le bassin d'Oued Laou se trouve dans la région Nord- Ouest du Maroc dans les provinces de Tétouan et Chefchaouen. Il est situé dans la partie centrale de la chaîne rifaine appelée aussi le haut Rif. C'est une station subhumide. Cette station est caractérisée par la présence de la variété du *Rosmarinus var. Prostratus*. Cette variété est caractérisée par une taille basse, de forme rampante, des feuilles linéaires mesurant jusqu'à 5 cm de longueur, le dessus de couleur vert foncé et le dessous de couleur blanche et duveteuse. Petites fleurs tubulaires de 1 cm de longueur, réparties sur les rameaux, de couleur bleu clair à blanche (Figure 19).



Figure 19: Photo du *Rosmarinus var. Prostratus*

En vue de tester l'effet de l'individualité de cette variété du Romarin , des échantillons de la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de sept individus de *Rosmarinus Prostratus* ont été récoltés d'une parcelle expérimentale du jardin de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques de Taounate (INPMA). La récolte de ces échantillons a été réalisée en février 2012, en pleine floraison.

Ces individus ont été multipliés par bouturage à partir des pieds provenant de la région de Oued Laou et transplantés dans le jardin de l'INPMA. Ces pieds ont été récoltés en mars 2010. Ils ont été acclimatés aux conditions climatiques de la région de Taounate , ils ont subi par la suite des multiplications végétatives par bouturage puis ils ont été mis en plein terre sur une parcelle de 18 m². Le sol de la parcelle est composé d'un mélange de 1/3 de sable et 2/3 d'argile- limoneux. Ce sol fixe peu d'eau, ne gonfle pas et ne fissure pas.

A noter que l'INPMA n'utilise pas des moyens de lutte contre les ravageurs, tout ce qui se trouve dans cet établissement est 100% Bio et les moyens de lutte sont des moyens culturaux.



Figure 20: *Rosmarinus var. Prostratus* transplanté dans la parcelle expérimentale de l'INPMA

II. Extraction des huiles essentielles et des extraits de plantes

II.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation en utilisant l'appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928) (Figure 21). Trois distillations ont été réalisées par ébullition pendant 2 h 30 de 150 g de matériel végétal frais avec 1 litre d'eau dans un ballon de 2 litre surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant.

L'ébullition de l'eau crée un courant de vapeurs qui, en traversant la plante, fait éclater les cellules et entraîne avec lui les molécules volatiles contenues dans cette plante. Après condensation, le mélange obtenu, appelé distillat, est décanté. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par différence de densité. L'huile essentielle a été stockée à 4 °C à l'obscurité.



Figure 21 : Appareil de Clevenger du centre d'INPMA

II.2. Extraction des extraits fixes

L'extraction a été faite selon un procédé d'extraction par solvant utilisant un sonicateur (Elma–Transsonic TI-H-15) (Power: 100 W) (Figure 22).

C'est une technique utilisée pour isoler les composés d'origine végétale. Cette méthode d'extraction assistée par les ultrasons a été choisie pour ses différents avantages en termes d'économie d'énergie, de solvant et de temps (Biesaga, 2011; Schinor et al., 2004; Jennan et al., 2014). Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés.

La technique consiste à introduire une masse de 50 g de plante broyée dans une cartouche filtrante et 200 mL de solvant dans un bécher.

Quatre solvants de polarités croissantes ont été successivement utilisés de manière à séparer les composés polaires, les moins polaires, les moyennement polaires et les apolaires. Ces

solvants sont l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Dans cet ordre, l'hexane extrait les composés apolaires, le dichlorométhane extrait les composés moins polaires, l'acétate d'éthyle les composés moyennement polaires et le méthanol les composés polaires.



Figure 22: Sonicateur du centre d'INPMA

III. Détermination du taux d'humidité et rendement en huiles essentielles

III.1. Taux d'humidité

L'humidité est la quantité d'eau qui existe dans un kilogramme de matière végétale. Pour chaque distillation, un échantillon de matériel végétal (20 g) a été mis à sécher dans une étuve réglée à 100°C pendant 24h. Après refroidissement, une deuxième pesée a été effectuée. Trois répétitions ont été réalisées et une moyenne a été calculée pour chaque plante.

Le pourcentage d'humidité a été déterminé à partir de la relation suivante :

$$H(\%) = \left[\frac{(m_1 - m_2)}{m_1} \right] \times 100$$

m_1 : masse de la matière végétale à l'état frais

m_2 : masse de la matière végétale à l'état sec

H : pourcentage d'humidité

III.2. Masse de la matière sèche

Le calcul de la masse de la matière sèche de la plante a été réalisé après le calcul d'humidité, en utilisant la relation suivante :

$$m_s = m_1 - \frac{H\% \times m_1}{100}$$

m_s : masse de la matière sèche

m_1 : masse de la matière végétale à l'état frais

% H : pourcentage d'humide

III.3. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huiles essentielles des différents échantillons a été exprimé par rapport à la matière sèche en utilisant la formule suivante :

$$RDT(\%) = \left[\frac{V}{m_s} \times 100 \right] \pm \left[\frac{\Delta V}{m_s} \times 100 \right]$$

Avec :

Rdt (%) : rendement en huiles essentielles (mL/g)

V : volume d'huiles essentielles récupéré en mL

ΔV : erreur sur la lecture

m_s : masse végétale sèche

Pour chaque essai, trois distillations ont été réalisées et une moyenne a été calculée.

IV. Analyses Chimiques

IV.1. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles

L'identification des constituants des huiles essentielles étudiées a été réalisée en se basant sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Cette analyse chimique a été effectuée au sein du CNRST de Rabat.

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Trace GC ULTRA couplé à un spectromètre de

masse de type (Polaris Q MS à trappe ionique). L'appareil de chromatographie en phase gazeuse est équipé d'une colonne de type VB-5 (Methylpolysiloxane à 5% phenyl), 30 m x 0,25 mm avec une épaisseur du film de 0,25 μm , le gaz utilisé est l'hélium avec un débit de 1.4 ml/min. Les échantillons sont injectés en split mode, la température d'injection est 220° C. Le volume injecté est 1 μl . La température de la colonne est programmée de 40 à 180°C à raison d'une montée de 4°C/min pendant 5 min. L'appareil de spectrométrie de masse fonctionne sous les conditions suivantes : La fragmentation a été effectuée par impact électronique sous un champ de 70 e v. La température de la source d'ionisation est égale à 200°C.

L'appareil est piloté par un système informatique de type « HP ChemStation », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques. L'identification des constituants est basée sur la comparaison de leurs spectres de masse respectifs avec les spectres de la bibliothèque (NIST 98) et de la bibliographie (Adams, 1995) ainsi que sur le calcul des indices de Kováts.

IV.2. Screening phytochimique des extraits de plantes

Dans l'objectif d'avoir des informations sur la composition chimique des différents extraits, un test qualitatif basé sur les réactions colorimétriques et la précipitation par différents réactifs a été réalisé.

IV.2.1. Mise en évidence des polyphénols

Pour révéler la présence des polyphénols, on a utilisé le réactif de Folin ciocalteu (Singleton et al, 1999).

Le principe consiste à ajouter à 100 μL de l'extrait, 500 μL du réactif de Folin ciocalteu (dilué dix fois) et 400 μl d'une solution de Na_2CO_3 (75 mg/ml d'eau distillée). La présence des polyphénols se traduit par l'apparition d'une coloration bleu foncé après incubation de 2 h à une température ambiante.

IV.2.2. Mise en évidence des flavonoïdes

La caractérisation des flavonoïdes dans nos extraits a été faite en utilisant la réaction à la cyanidine (Karumi et al., 2004).

Le test consiste à ajouter à un minimum de volume de l'extrait quelques gouttes d'alcool chlorhydrique (2N) et 0,5 g de magnésium, On laisse agir 3 min. Ensuite, les flavonoïdes sont mis en évidence par l'apparition d'une coloration allant de l'orangé au rouge :

- Rose orangée indique la présence des flavones.
- Rose violacée indique celle des flavanones.
- Rouge indique la présence des flavanols et flavanonols.

IV.2.3. Mise en évidence des tanins

La mise en évidence des tanins repose sur leur réactivité en présence du chlorure ferreux (Soidrou 2013). La réaction consiste à introduire 5 ml d'extrait dans un tube à essais auquel on ajoute 1 ml de solution aqueuse de chlorure ferrique à 2%. La présence de tanins est caractérisée par la formation d'une coloration verdâtre ou bleu noirâtre pouvant aller jusqu'au précipité.

IV.2.4. Mise en évidence des alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été mis en évidence dans les extraits avec le réactif de précipitation Dragendorff (Békro et al., 2007).

Le principe consiste à introduire 0,1g d'extrait dans un tube à essai contenant 6 ml d'éthanol à 60%, auquel on ajoute 2 gouttes de réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité rouge orangé ou brun - rougeâtre indique un test positif.

Pour tous ces tests, on prépare un blanc dans les mêmes conditions mais sans extrait. Les tests sont répétés trois fois.

V. Activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits

V.1. Souches bactériennes

L'activité antibactérienne des huiles essentielles des plantes a été évaluée sur deux souches (*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*) et l'activité antimycobactérienne a été déterminée en utilisant une souche mycobactérienne (*Mycobacterium smegmatis*).

- *E. coli* : est une bactérie intestinale à Gram négatif dont certaines souches sont connues pour leur forte antibiorésistance et leur pouvoir invasif et toxique chez l'homme. Ces souches sont responsables de maladies intestinales qui varient en gravité, des formes bénignes jusqu'à des formes graves même mortelles.

- *B. subtilis* : est une bactérie à gram positif non pathogène pour l'homme, mais peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire. Elle est considérée comme un excellent modèle pour l'étude de bactéries pathogènes, telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*.

- *M. smegmatis* MC2 155 : mycobactérie atypique non pathogène, elle présente une sensibilité aux antituberculeux similaire à celle de *M. tuberculosis* (Mitscher et Baker., 1998 ; Chaturvedi et al., 2007), et à croissance plus rapide que celle du bacille tuberculeux. En effet, elle est utilisée comme modèle pour évaluer l'effet des substances actives sur la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* (Newton et al., 2000 et 2002).

Cette mycobactérie a été aimablement fournie par Dr. S. David (Centro de Tuberculose Micobactérias, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge Delegação do Porto, Portugal). Elle a été cultivée sur le milieu Sauton à 37°C (Papa et al., 1987 ; Nigou et Besra, 2002).

Ces bactéries appartiennent à la collection des bactéries du laboratoire de Biotechnologie Microbienne de la FST Fès.

V.2. Procédure microbiologique

V.2.1. Méthode de disque

Pour mettre en évidence l'activité antibactérienne et antimycobactérienne des huiles essentielles, on a utilisé la méthode de diffusion sur disque (Bayoub et al., 2010; Bauer et al., 1966).

Cette méthode se réfère à la diffusion d'un agent antimicrobien d'une concentration spécifique à partir de disques dans le milieu de culture solide, qui a étéensemencé avec l'inoculum choisi et isolé en culture pure. Elle est basée sur la détermination d'une zone d'inhibition proportionnelle à la sensibilité bactérienne à l'antimicrobien présent dans le disque (Threlfall et al., 1997 ; Walker, 2000).

Cette technique présente l'intérêt d'être facile à mettre en œuvre, reproductible et à faible coût.

Cette technique consiste à déposer des disques stériles de papier Whatman de 6 mm de diamètre au centre des boîtes de 90 mm de diamètre contenant le milieu LB agar préalablement inoculées par 100 µl des cultures liquides des souches bactériennes à tester. Les disques sont ensuite imprégnés de 10 µl d'HE. Le témoin correspond à un disque imbibé de 10 µl d'eau distillée stérile. Après incubation, les zones d'inhibition formées autour des disques sont mesurées. Pour chaque souche trois répétitions ont été réalisées.

Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque de l'antimicrobien est corrélé avec la concentration minimal inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien. La zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai. Généralement, plus la zone d'inhibition est importante, plus la concentration de l'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne est faible.

V.2.2. Détermination de la CMI

V.2.2.1. Milieu solide

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles ont été déterminées selon la méthode rapportée par Zaouali et al., (2010) avec une légère modification au niveau de la dilution. En effet, le DMSO a été substitué par l'agar à 0,2 %.

Une gamme de dilutions a été préparée dans cette solution d'agar, pour obtenir les concentrations suivantes: 1/2, 1/4, 1/5, 1/8 et 1/10 (v/v). 10 µl de chaque dilution ont été ensuite posés sur des disques stériles de papier Wattman (6 mm diamètre) placé sur la surface de Boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre contenant le milieu LB préalablement inoculées par 100 µl des cultures liquides des souches à tester. Le témoin correspond à un disque imbibé de 10 µl d'une solution stérile d'agar à 0,2 %. Après incubation, les zones d'inhibition formées autour des disques sont mesurées. Pour chaque souche trois répétitions ont été réalisées

V.2.2.2. Milieu liquide

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits ont été déterminées en milieu liquide par la méthode de dilution (Rastogi et al., 1991). La CMI est la plus faible concentration de substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation. Sa détermination a été faite par observation du trouble induit par la croissance des bactéries dans chaque tube.

Cette technique consiste à ajouter des volumes variables de l'extrait des plantes dans des tubes contenant du milieu LB liquide inoculé par 250 µl des cultures liquides des souches à tester, de façon à obtenir des concentrations finales en résidu d'acétate d'éthyle allant de 0,94 à 9,43 mg /ml (Concentration en résidu soluble). Le tube témoin correspond à un tube dépourvu de l'extrait de plante. L'étude a été reprise trois fois. Ainsi, la CMI a été donc la concentration en résidu du premier tube à partir duquel aucun trouble à l'œil nu n'a été observé.

Le volume total des tubes est de 6 ml et le pourcentage en DMSO dans tous les tubes est inférieur ou égale à 2%, concentration qui n'inhibe pas la croissance des bactéries utilisées (Molina-Salinas et al., 2006).

VI. L'analyse en composante principale (ACP)

L'analyse en composantes principales est une méthode statistique d'analyse des données, elle est à la base de la plupart des méthodes de l'analyse multivariée. C'est une méthode qui vise à trouver les directions de plus grande dispersion des individus dans cet espace, l'idée étant que les directions de plus grande dispersion sont les directions les plus intéressantes. Si les

variables ne contiennent que du bruit, les individus seront dispersés de façon homogène et uniforme dans toutes les directions. Une direction qui s'écarte d'une telle répartition sphérique risque donc de contenir de l'information.

L'ACP est donc une méthode statistique descriptive multivariée qui permet de représenter un grand nombre de données de façon synthétique. Elle est utilisée pour repérer des groupes d'individus dont l'ensemble des variables est homogène et de visualiser des différences de variables entre les individus. Elle a aussi pour objectif de mettre en avant des individus au comportement atypique par rapport au reste de la population.

Mathématiquement, l'ACP calcule des combinaisons linéaires des variables de départ donnant de nouveaux axes qui contiennent la plus grande partie de la variabilité de la matrice de données de départ. L'ACP est une méthode non-supervisée où aucune hypothèse n'est faite concernant des relations éventuelles entre les individus et entre les variables. Elle fait simplement l'hypothèse optimiste, mais raisonnable, que les directions (Composantes Principales) de plus grandes dispersions des échantillons sont les directions les plus intéressantes et que la variabilité associée avec ces directions correspond à de l'information.

De plus, pour éviter d'avoir la même « information » dans plusieurs Composantes Principales, elles doivent toutes être orthogonales.

Pour faire une ACP, on part d'une matrice M de données à K lignes (individus ou échantillons) et N colonnes (variables).

$$M = \begin{bmatrix} X_{1,1} & \dots & X_{N,1} \\ \vdots & \dots & \vdots \\ X_{1,K} & \dots & X_{N,K} \end{bmatrix}$$

Chaque variable $X_N = (X_{N,1}, \dots, X_{N,K})$ a une moyenne $\overline{X_N}$ et un écart-type σ_{X_N} .

En fonction de l'origine et de la diversité des données à traiter, l'ACP peut être normée ou non normée. La normalisation consiste à transformer des données lorsque celles-ci sont d'origine différente afin de les ramener à des espaces comparables. Il est donc nécessaire de normaliser les données lorsqu'elles sont de mesure, de moyenne ou de variabilité différente. La normalisation consiste à transformer la matrice de variables brutes M en une matrice de variables centrées réduites M pour laquelle les variables sont représentées par:

$$Y_N = (Y_{N,1}, \dots, Y_{N,K}) \text{ avec } Y_{N,1} = \frac{X_{N,1} - \overline{X_{N,1}}}{\sqrt{V(X_{N,1})}}$$

Avec:

- X : valeur de la variable
- \bar{X} : moyenne
- $V(X)$: variance

La décomposition matricielle de la PCA permet d'obtenir des matrices des coordonnées factorielles (ou «scores») et des contributions factorielles (ou «loadings»), selon l'équation (1) et la Figure 23:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

Avec \mathbf{X} (n, p) la matrice de données originale, \mathbf{T} (n, k) les coordonnées factorielles des individus sur les Composantes Principales, \mathbf{P}^T (k, p) les contributions factorielles des variables du départ aux Composantes Principales. Si l'on calcule k Composantes Principales (PC), on n'obtient qu'une approximation de la matrice de départ \mathbf{X} où \mathbf{E} (n, p) est la matrice des écarts entre les valeurs originales et cette approximation.

Dans beaucoup de cas simples, un maximum de 3-4 CPs est suffisant pour expliquer la variabilité intéressante des données. Cependant, le nombre de CPs peut être choisi par différentes procédures, notamment la validation croisée.

$$\boxed{X} = \boxed{T} \cdot \boxed{P^T} + \boxed{E}$$

Figure 23: Décomposition matricielle de la PCA

Les coordonnées T et les contributions factorielles P contiennent toute l'information importante par rapport aux objets et aux variables, respectivement. Les écarts E contiennent la variabilité résiduelle qui n'est pas importante pour décrire le comportement des échantillons.

Les CPs sont simplement des entités mathématiques qui peuvent représenter, après un choix intelligent d'un ensemble représentatif, la matrice X . Au même temps, tout ce qui n'est pas important pour la description des données se trouve dans la matrice des résidus. Les CPs ne

représentent pas forcément des entités physico-chimiques réelles présentes dans les données, mais plutôt des directions orthogonales de plus grande variabilité.

D'un point de vue géométrique, la PCA peut être plus facilement comprise comme une méthode de rotation des données pour que l'observateur soit le mieux placé pour comprendre les relations entre les individus. Les coordonnées factorielles permettent de projeter les individus sur des plans construits à partir des CPs, où l'on peut éventuellement détecter des repartitions structurées des objets, la formation de groupes ou la présence d'individus aberrants.

Actuellement, il existe plusieurs algorithmes pour le calcul de l'ACP, dont le plus utilisé est le NIPALS («Nonlinear iterative partial least squares»).

L'algorithme itératif NIPALS pour calculer l'ACP est présenté ci-dessous. Le vecteur des coordonnées factorielles t et les vecteurs propres p sont déterminés de façon à minimiser la somme des carrés des résidus E . Une contrainte doit être observée, c'est-à-dire que la norme de p soit égale à 1. Les CPs sont calculées successivement l'une après l'autre. En considérant une matrice de données X prétraitée de la façon souhaitée, et centrée par variable:

(1) $t = x_i$ on définit initialement t égal à une colonne de la matrice X

(2) $p = (X^T \cdot t) / (t^T \cdot t)$ Calculer le poids de chaque variable de X dans cette CP par projection de chaque colonne de X sur t

(3) $p = p / \|p\|$ on normalise le vecteur des poids pour chaque variable

(4) $t_{\text{ancien}} = t$ on garde cette valeur de t pour comparaison ultérieure

(5) $t = (X \cdot p) / (p^T \cdot p)$ on calcule la projection de chaque échantillon sur cette PC

(6) $d = \|t - t_{\text{ancien}}\|$ on vérifie la convergence. Si t ne change plus ($d < \text{seuil}$), on continue vers l'étape (7), sinon on revient à (2)

(7) $E = X - t \cdot p^T$ On enlève la partie de X expliquée par les vecteurs t et p calculée pendant cette itération

(8) $X = E$ Pour calculer une nouvelle CP, on met X égal aux résidus, et on recommence à partir de (1)

Les variances des CPs peuvent finalement être obtenues sur la diagonale de $S = T^T \cdot T$

VII. L'analyse de variance à un facteur

La mise en évidence des différences significatives entre les moyennes de diamètre d'inhibition des individus testés a été réalisée au moyen d'une Analyse de la variance en utilisant le logiciel statistique statgraphics.

VII.1. Définition

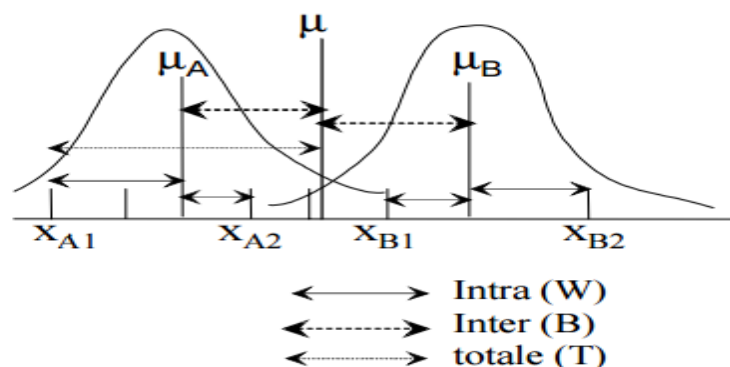
L'analyse de la variance (expression souvent abrégée par le terme anglais ANOVA : Analysis Of Variance) est une technique statistique fondamentale. Elle vise à comparer des moyennes sur plusieurs échantillons. Dans tous les cas, la variable étudiée est un caractère quantitatif de type continu qui suit la loi normale.

VII.2. Principe

Le principe est celui de la décomposition de la variance (dispersion) totale observée sur les variables suivant différentes sources de variation : intragroupe et intergroupe.

Une variation intergroupe qui est due aux écarts entre les moyennes de chaque échantillon et la moyenne générale, et qui traduit l'effet du facteur : variation factorielle.

Une variation intra-échantillon qui cumule les écarts de chaque valeur individuelle de la variable à leur moyenne d'échantillon : Variation résiduelle.



L'ANOVA est une méthode qui teste l'effet d'un facteur contrôlé A ayant p modalités sur les moyennes d'une variable Y.

- l'hypothèse nulle testée est:

H_0 : il n'y a pas d'effet du facteur A et les p moyennes sont égales à une même moyenne

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_i = \dots = \mu_p = \mu$$

- l'hypothèse alternative est:

H_1 : les moyennes diffèrent les unes des autres. Autrement dit, le facteur testé a un effet significatif sur la variable mesurée.

VII.3. Equation fondamentale de l'analyse de la variance

Soit l'équation de décomposition de la variation totale :

$$\sum_{j=1}^j \sum_{n=1}^n (y_{ij} - \bar{y})^2 = \sum_{j=1}^j \sum_{n=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_j)^2 + \sum_{n=1}^n (\bar{y}_j - \bar{y})^2$$

Est équivalente à l'égalité

$$\mathbf{SCE}_{\text{totale}} = \mathbf{SCE}_{\text{inter}} + \mathbf{SCE}_{\text{intra}}$$

Les estimations des variances associées ou carrés moyens sont :

$$\text{Variance totale : } CM_t = \frac{\mathbf{SCE}_{\text{totale}}}{N-1} \quad \text{Avec } N = \sum_1^p n_i$$

$$\text{Variance factorielle : } CM_{\text{inter}} = \frac{\mathbf{SCE}_{\text{inter}}}{p-1}$$

$$\text{Variance résiduelle : } CM_{\text{intra}} = \frac{\mathbf{SCE}_{\text{intra}}}{N-p}$$

VII.4. Tableau de l'analyse de la variance à un facteur

Les résultats de l'analyse de la variance sont généralement présentés sous la forme du tableau suivant:

Tableau 2: Présentation générale d'un tableau d'analyse de la variance à un facteur

Source de la variance	Sommes des carrés des écarts	Degrés de liberté	Carré Moyen	F	P-value
Inter-groupe	SCE _{inter}	p-1	$CM_{inter} = \frac{\mathbf{SCE\ inter}}{p - 1}$	$F = \frac{CM_{inter}}{CM_{intra}}$	P
Intra-groupe	SCE _{intra}	N-p	$CM_{intra} = \frac{\mathbf{SCE\ intra}}{N - p}$		
Total	SCE _{totale}	N-1			

Si la valeur de P étant largement supérieure au seuil de signification 0,05, on conserve donc l'hypothèse nulle (pas de différence significative entre les échantillons).

Chapitre III

Effet de la provenance sur la composition chimique, le rendement et l'activité antibactérienne des huiles essentielles du Romarin marocain

INTRODUCTION

En vue de contribuer à la valorisation des plantes aromatiques et médicinales du Maroc et précisément le Romarin marocain nous nous sommes intéressés d'une part à étudier la composition chimique des huiles essentielles du Romarin de quatre provenances; Il s'agit de *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* provenant de la région du Nord du Maroc (Oued Laou), *Rosmarinus officinalis* provenant de l'Oriental (Ayoun Charkiya), le *Rosmarinus Officinalis* provenant de Sefrou et le *Rosmarinus officinalis* provenant des Jardins de Jacky d'Agadir. D'autre part et en vue de la valorisation de ces huiles essentielles, nous avons évalué leurs activités antimicrobiennes.

En général, le *Rosmarinus* (Romarin) est l'une des plantes naturelles du Maroc qui est reconnue pour ses vertus médicinales et aromatiques depuis l'antiquité. Les huiles essentielles de cette plante ont fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique et agro-alimentaire et possèdent d'excellentes propriétés antimicrobiennes (Zaouali et al., 2010; Delcampo et al., 2000; Rožman et Jeršek, 2009), anti-inflammatoire (Ghanmi et al., 2010; Gianmario et al., 2007), antispasmodique (Al-Sereiti et al., 1999), et antioxydant (Zaouali et al., 2010; Wang et al., 2008; Eva et al., 2003). Cependant peu de travaux existent sur les huiles essentielles choisies pour cette étude, en plus aucune étude n'a été faite sur le *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* qui est une variété rare au Maroc poussant au Nord, dans la région d'Oued Laou.

En effet, le Maroc exploite un potentiel de 1 million d'hectares de Romarin qui produisent un rendement annuel de 60 tonnes d'huile essentielle destinée à l'exportation. L'amélioration de la qualité des huiles essentielles exportées permet au Maroc de gagner la confiance des demandeurs et d'augmenter le niveau de vie de la population locale et de l'économie nationale (Ghanmi et al., 2011).

Notre travail cerne plusieurs volets, à savoir :

- Une étude qualitative incluant l'évaluation de l'effet antibactérien de l'huile essentielle du Romarin des quatre régions, une étude quantitative qui a permis la détermination de la CMI de ces huiles.
- Une analyse et une identification des constituants des huiles essentielles de chaque provenance par la technique de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

- Une étude statistique descriptive et comparative de la composition chimique du Romarin des différentes régions par la méthode d'analyse de données multidimensionnelles: L'Analyse en Composantes Principales (ACP).

Le détail de ces expériences ainsi que la discussion des résultats sont présentés dans les différentes parties de ce chapitre.

I. Rendement en huile essentielle

Les rendements moyens en huile essentielle de quatre provenances du *R. officinalis* ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 3.

Tableau 3: Rendements en huile essentielle obtenus par hydrodistillation du *R. officinalis* de Différentes régions étudiées.

Echantillons	Rendement en huile essentielle (%)
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Jardin de Jacky)	1,45±0,02
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Ayoune Charkiya)	1,8±0,03
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Oued Laou)	1,9±0,02
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Sefrou)	2,4±0,1

Les rendements moyens obtenus, varient en fonction des quatre provenances (Tableau 3). En effet, les échantillons du Romarin de la provenance de Sefrou ont donné un meilleur rendement en huile essentielle (2,4 %) par rapport à ceux de l'Ayoune Charquia, d'Oued Laou et de Jardin de Jacky d'Agadir, avec respectivement des teneurs de 1,8%, 1,9% et 1,45%.

Ces résultats sont proches de ceux trouvés par Khia et al., (2014) et qui ont trouvé que les rendements en huile essentielle du Romarin marocain de trois provenances (Rachidia, Berkine et d'Aknoul) sont respectivement 2,21%, 1,87% et 1,29%. Fechtal et al., (2005) ont indiqué que les rendements en huile essentielle de deux provenances de l'Oriental (El Ayat et Debdou) varient de 0,5% à 2,9%. Par contre d'autres études présentent des rendements qui ne dépassent pas 1%. En effet Derwich et al., (2011) ont trouvé que le rendement du Romarin de la région Taferdoust est de 0,5% et Tahiri (1994) a trouvé que le Romarin de Souk El Had et de Beni Boudass présentent des rendements de 0,65% et 0,82% respectivement.

Cependant, les rendements des quatre provenances du Maroc sont légèrement supérieurs à ceux de trois localités de Tunisie. En effet, Ayadi et al., (2011) ont obtenu des rendements variables selon la région de récolte, soit 1,35% dans la région de Sidi Bouzid, 1,25% à Bizerte, et 1,27 % pour la région de Zaghuan.

En Algérie, les études ont enregistré des rendements très inférieurs par rapport à ceux obtenus dans cette étude avec un rendement de 0,8 % pour le Romarin de la station Honaine et 0,6% pour le Romarin de la station Tlemcen (Tomi et al., 1995). Par contre, nos rendements sont légèrement inférieurs à ceux obtenus par Jashmidi et al., (2009) qui sont de 2,1 et 2,6% respectivement dans les régions de Kerman et de Lalehzar d'Iran. En Turquie, Ozcan et Chalchat, (2008) ont trouvé un rendement de 1,9%.

La variabilité des rendements du Romarin des différentes régions peut provenir de l'origine de la plante (Jamshidi et al., 2009), du climat (Jordan et al., 2013), des conditions environnementales et agronomiques (Moghtader et Afzali., 2009), du moment de la récolte (Celiktas et al., 2007), du stade de développement des plantes (Ruberto et Barata., 2000) ou de la méthode d'extraction (Okoh et al., 2010).

II. Composition chimique des huiles essentielles

Les résultats relatifs à la composition chimique des huiles essentielles de *R. officinalis* de quatre provenances (Jardin de Jacky d'Agadir, Oued Laou, Ayoune Charquia et Sefrou) sont regroupés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Composition chimique des huiles essentielles de *R. officinalis* des quatre provenances

Composés	IK	Agadir	Oued Laou	Ayoune Charquia	Sefrou
Monoterpènes					
Tricyclène	926	-	-	-	0,29
α -Thujène	931	0,21	0,49	0,53	0,12
α -Pinène	939	36,15	15,79	16,61	12,19
Camphène	953	6,10	13,06	13,67	6,81
Sabinène	976	3,40	7,11	6,04	0,4
β -Pinène	980	-	-	-	4,05
β -Myrcène	986	-	-	-	5,1
α -Phéllandrène	1005	0,12	-	-	1,3
δ -3-Carène	1011	-	4,54	1,43	-
Limonène	1031	-	-	-	4
Formate isobornyle	1233	0,13	-	0,2	-
Total		46,11%	40,99%	38,48%	34,26%
Monoterènes oxygénés					
1,8 - Cinéole	133	33,93	1,24	35,91	18,35
Trans – Sabinene – hydrate	1068	0,44	0,15	-	1,6
Chrysanthenone	1123	0,71	0,42	-	-
Camphre	1143	5,08	3,31	6,40	22,1
Trans-verbénol	1144	0,46	0,58	-	-
Bornéol	1165	4,18	3,59	4,84	-
Terpinén - 4- ol	1177	-	0,41	0,56	0,8
Myrtenol	1194	-	1,14	1,39	-
Verbénone	1204	4,30	0,25	-	-
Trans-2-Carén-4-ol	1227	-	-	0,2	-
Acétate de Bornyle	1285	-	31,21	-	0,8
Acetate d' α -Terpinényle	1354	1,51	2,88	-	-
Total		50,61%	45,18%	49,3%	43,65%

Composés (suite)	IK	Agadir	Oued Laou	Ayoune Charquia	Sefrou
Sesquiterpènes hydrocarbonés					
α -copaène	1376	-	0,10	0,15	-
β -Caryophyllène	1418	0,83	4,09	2,60	-
γ -gurjenène	1473	0,44	0,2		-
Germacrène-D	1480		0,22	1,4	-
α -cadinène	1512	-	-	0,42	-
γ -Cadinène	1513	0,13	0,8	0,46	0,78
Total		0,96%	5,41%	5,03%	0,78%
Sesquiterpènes oxygénés					
Oxide de Caryophyllene	1581	-	4,71	3,80	6,3
γ -eudesmol	1630	-	0,21	0,14	-
α -eudesmol	1652	-	0,1	0,13	-
τ -Cadinol	1653	-	-	0,72	-
Total			4,92%	4,79%	6,3%
	TOTAL	97,7	96,5	97,6	85,07

En vue de mieux analyser les résultats obtenus, on a adopté une étude séparative de chaque provenance.

II.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* du Jardin de Jacky de la région d'Agadir

Les résultats relatifs à la composition chimique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* du Jardin de Jacky de provenance d'Agadir sont présentés dans la figure 24. Les répartitions en % des principales familles de composés de cette huile essentielle sont présentées dans la figure 25. Les structures chimiques des composés majoritaires sont présentées dans le tableau 5.

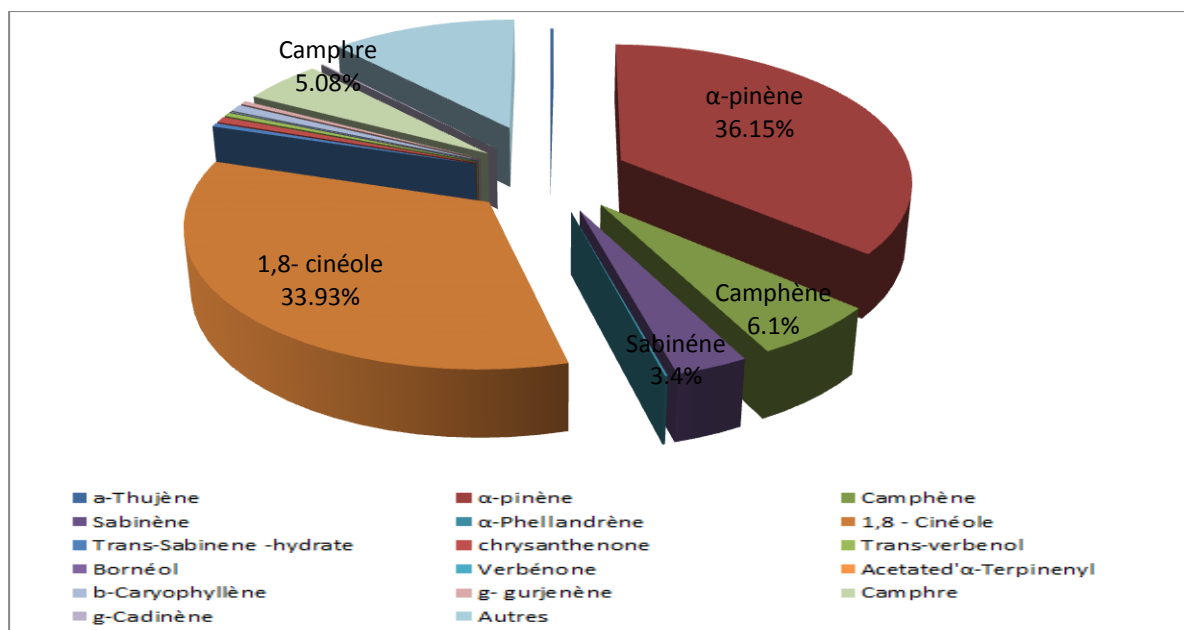


Figure 24 : Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle du Romarin d'Agadir

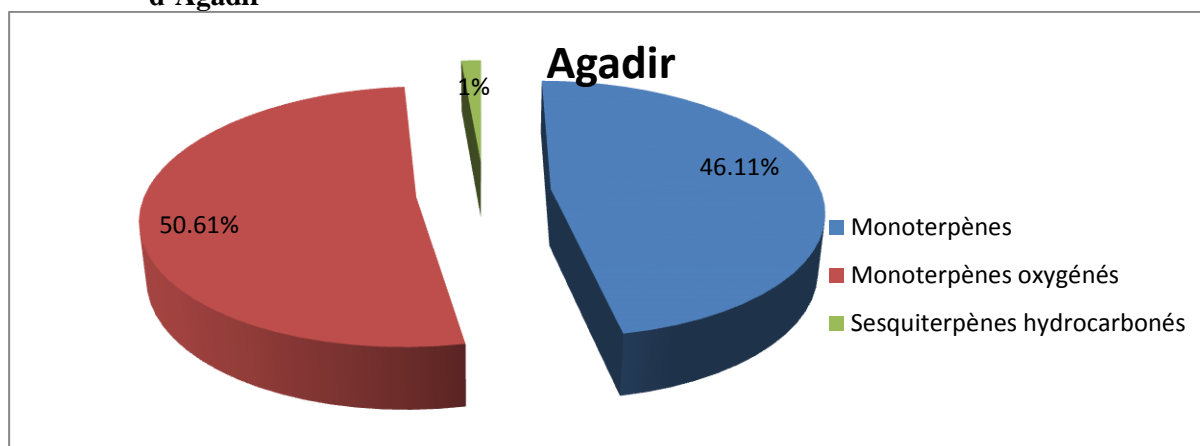


Figure 25 : Répartition en % des principales familles de composés de l'huile essentielle de *R. officinalis* de la région d'Agadir

L'analyse chimique par CPG /MS a permis d'identifier au total 17 composés qui représentent 97,7% de l'huile essentielle du *R. officinalis* du Jardin de Jacky d'Agadir, (tableau 4, figure 24). Les composés majoritaires sont : l' α -pinène (36,15%), 1,8-cinéole (33,93%), Camphène (6,1%), Camphre (5,08%) et Sabinène (3,4%). On remarque que cette huile essentielle est riche en monoterpènes oxygénés qui représentent (50,61%) de la composition totale de l'huile suivi par les monoterpènes hydrocarbonés représentant 46,11% de la composition totale. Tandis que les sesquiterpènes hydrocarbonés ne représentent que 1%.

II.2. Composition de l'huile essentielle de *R. officinalis* var *Prostratus* de la région d'Oued Laou

Les résultats relatifs à la composition chimique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* de provenance d'Oued Laou sont présentés dans la figure 26. La répartition en % des principales familles de composés de cette huile essentielle est présentée dans la figure 27.

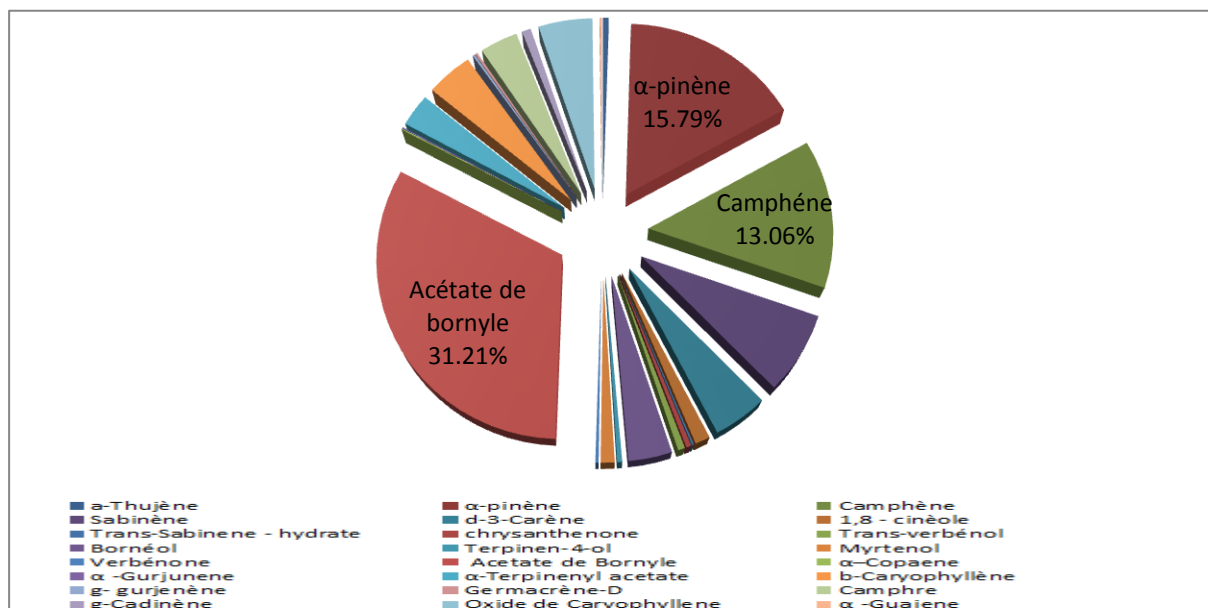


Figure 26: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle du Romarin d'Oued Laou

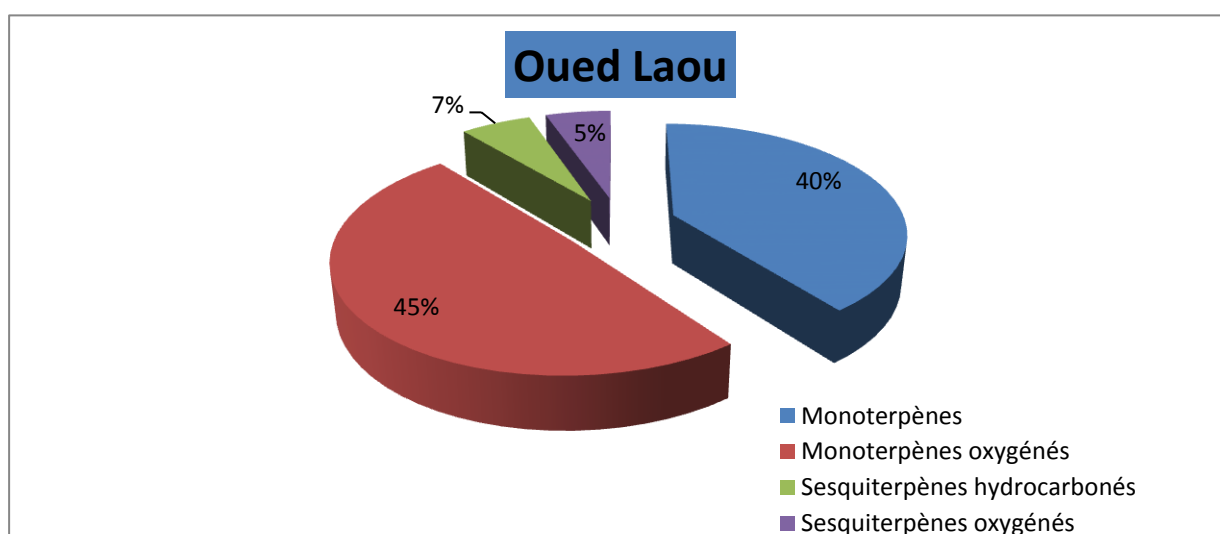


Figure 27 : Répartition en % des principales familles de composés de l'huile essentielle de *R. officinalis* de la région d'Oued Laou

Vingt-quatre composés ont été identifiés représentant 96,5 % de l'huile essentielle du Romarin de provenance d'Oued Laou. Cet échantillon est caractérisé par la présence importante d'Acétate de Bornyle (31.21%) qui est le composé majoritaire suivi par l' α -Pinène (15,79%), camphène (13.06%), Sabinène (7,11%), δ ,3-Carène (4,54%), Oxyde de Caryophyllène (4,71%), β -Caryophyllène (4.09%), Bornéol (3.59%), Acétate d' α -Terpinenyle (2,88%). Il est à noter que la classe des monoterpènes oxygénés représente le pourcentage le plus élevé (\approx 45%) suivi des monoterpènes hydrocarbonés (\approx 40%). Les sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés ne représentent que 7% et 5% respectivement.

II.3. Composition de l'huile essentielle du Romarin de la région de l'Ayoune Charquia

Les résultats relatifs à la composition chimique des huiles essentielles de *R. Officinalis* de provenance de l'Ayoune Charquia sont représentés dans la figure 28. Les répartitions en % des principales familles de composés de cette huile essentielle sont illustrées dans la figure 28.

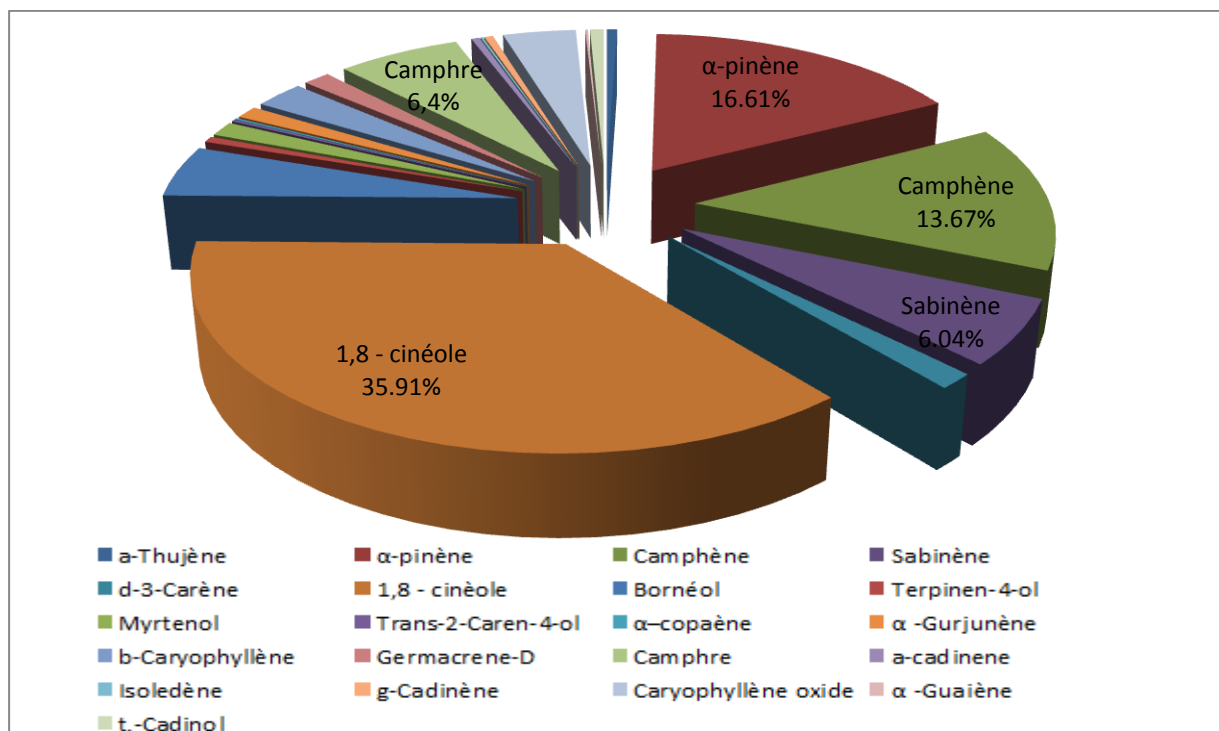


Figure 28 : Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de Romarin de la provenance de l'Ayoune Charquia

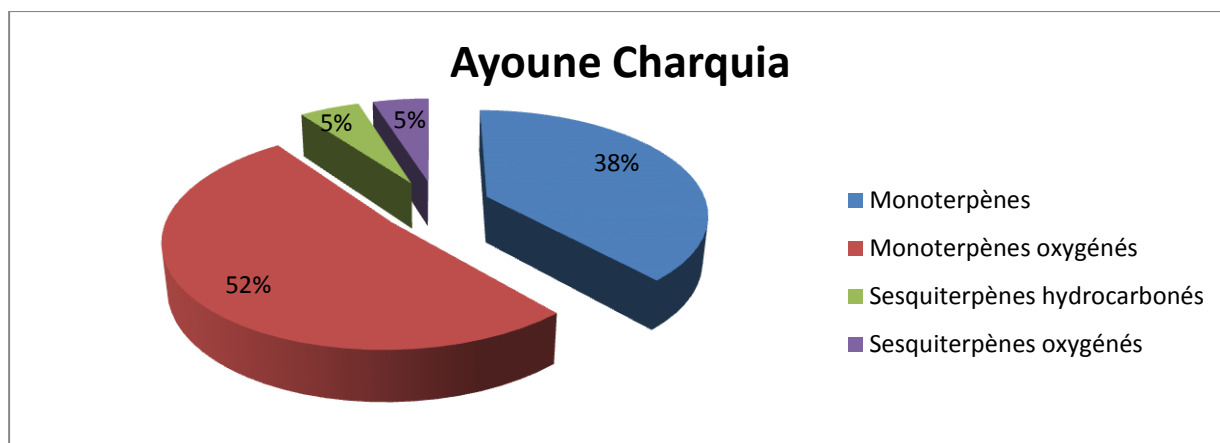


Figure 29: Répartition en % des principales familles de composés de l'huile essentielle de R. officinalis de la région l'Ayoune Charquia

Les 97,6% de l'huile essentielle totale du Romarin de la provenance de l'Ayoune Charquia sont réparties comme suit: 1,8-Cinéole comme produit majoritaire (35,91%), suivi par l' α -Pinène (16,61%), Camphène (13,67%), Camphre (6,4%), Sabinène (6,04%), Bornéol (4,84%), Oxyde de caryophyllène (3,8%), β -caryophyllène (2,6%). On remarque que cette huile est prédominée par les composés monoterpéniques avec environ 52% de monoterpènes oxygénés et 38% de monoterpènes hydrocarbonés. Les sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés, quant à eux, ne représentent que 10% environ de la composition totale de l'huile essentielle du Romarin de la région de l'Ayoune Charquia.

II.4. Composition de l'huile essentielle du Romarin de la région de Sefrou

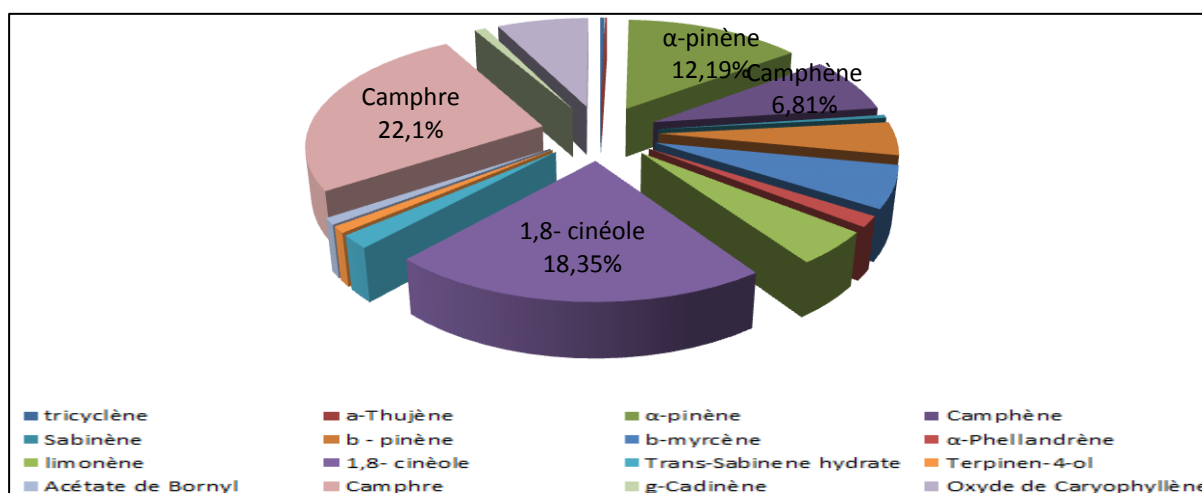


Figure 30: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle du Romarin de la provenance de Sefrou

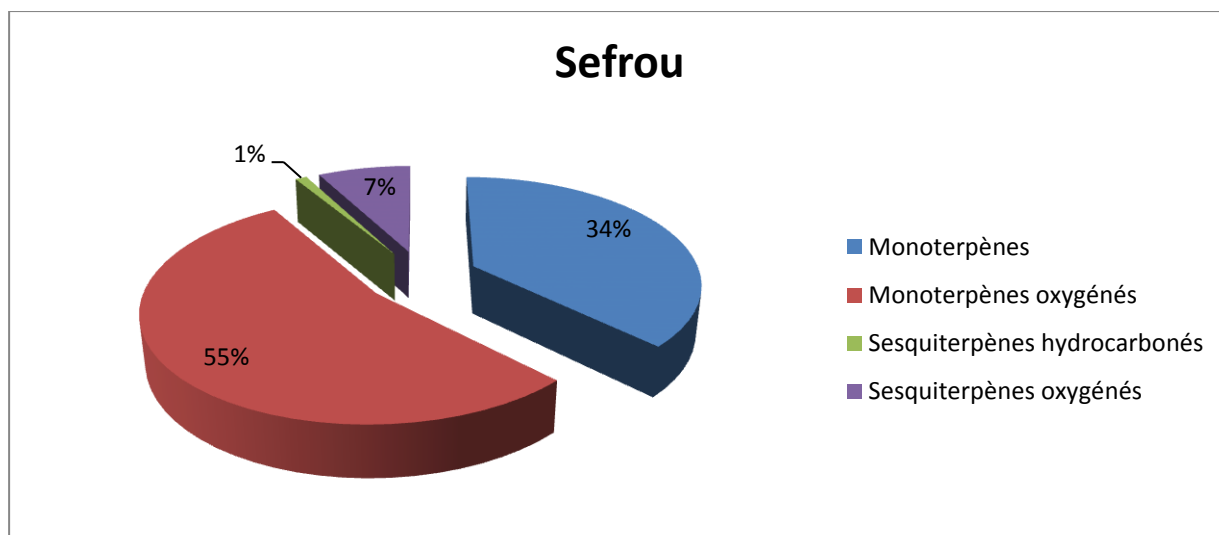


Figure 31: Répartition en % des principales familles de composés de l'huile essentielle de *R. officinalis* de la région de Sefrou

L'analyse de l'huile essentielle du Romarin de provenance de Sefrou indique la présence de 16 composés avec un pourcentage total d'environ 85% (tableau 4, figure 30). On remarque que cette huile est riche en monoterpènes oxygénés qui représentent environ 54%, suivis par les monoterpènes hydrocarbonés qui représentent environ 37% de la composition totale. Tandis que les sesquiterpènes oxygénés et hydrocarbonés ne représentent que $\approx 8\%$ et $\approx 1\%$ respectivement. Le Camphre représente 22,1%, c'est le produit majoritaire, 1,8-Cinéole représente 18,35%, α -Pinène représente 12,19%, Camphène représente 6,81%, Oxyde Caryophyllène représente 6,3%, β -Myrcène représente 5,1%, β -Pinène et Limonène représentent presque 4% et α -Phéllandréne, hydrate de Trans-Sabinène représentent environ 1,4%.

II.5. Discussion de la composition chimique des huiles essentielles des quatre provenances

La chimiotaxonomie du Romarin a été déjà étudiée par de nombreux auteurs. Tuberoso et al., (1998), ont rapporté que les monoterpènes constituaient 50 % de l'huile essentielle du Romarin, spécialement l' α -pinène ($>30\%$), camphène et limonène ; alcools $\approx 7\%$ et cétones $\approx 10\%$.

Au Maroc, Fechtal et al., (2001) et Khia et al., (2014) confirment la richesse des huiles essentielles de l'Oriental en 1,8-Cinéole, α et β -pinènes, Camphène et Camphre. Derwich et al., (2011) ont montré que le Romarin de la provenance Taferdoust (sud-est de la ville de Sefrou, Moyen Atlas) est constitué principalement d' α -Pinène (18,25%) suivi du Camphre

(6,02%), le 1,8-Cinéole (5,25%), Camphène (5,02%) et le β -Pinène (4,58%). Elamrani et al., (2000) ont montré que les Romarins marocains présentent une teneur importante en l'un des 3 composés: α -Pinène (37,0-40,0%, Rabat), Cinéole (58,7-63,7%, El Ateuf), Camphre (41,7-53,8%, Taforhalt).

En Algérie, Benhabiles et Aït Ammar (2001) ont étudié les essences de deux espèces de Romarin provenant d'une région de l'Est Algérien. Ils ont trouvé deux chémotypes différents: *Rosmarinus Eriocalyx* à type Eucalyptol (1,8-Cinéole = 42,8 %) et *R. officinalis* à type β -Caryophyllène (13,9%), Camphre (12,1 %) et Bornéol (10,1 %). Une autre étude sur un échantillon provenant de Bordj-Bou-Arredj qui ne contient que 7,5% de Cinéole en plus du Camphre (12,1%), du Bornéol (10,1%), de l' α -Terpinéol (9,5%) et surtout du β -Caryophyllène (13,9%). Bekkara et al., (2007) ont étudié deux types d'huile essentielle du Romarin, provenant de Honaine, selon l'origine de la plante (sauvage ou cultivée). Ils ont démontré que le composé majoritaire chez le Romarin spontané est l' α -Pinène (23,1%), suivi par le Camphre (15,3%) et le β -Pinène (12,2%), alors que le composé principal pour le Romarin cultivé est le Camphre (13,8%), suivi de l' α -Pinène (12,6%), le Cinéole (11,8%) et le Bornéol (10,8%).

En Egypte, une étude sur deux échantillons du Romarin a révélée deux compositions différentes, dont l'une est dominée classiquement par le Camphre, l' α -Pinène et le Cinéole, et l'autre est riche en Verbénone et en Camphre (Soliman et al., 1994).

En Liban, Diab et al., (2002) ont trouvé que le Romarin est caractérisé par le 1,8-Cinéole (\approx 20%), et l' α -Pinène (\approx 18,8 – 38,5 %).

En Turquie, le Romarin est composé principalement de l' α -Pinène (7,8%); 1,8-Cinéole (60,9%) et du Camphre (7,1%) (Yesil et al., 2007). Dans une autre région de la Turquie, Özcan et Chalchat (2008), ont identifié 20 composés, avec le Π -Cymène (44 %), le Linalol (21%), le γ -Terpinène (17 %), le β -Pinène (3,6 %), α -Pinène (2,8 %), le 1,8 Cinéole (2,6 %) et le Thymol (1,8 %) qui sont des composés majoritaires.

Au Japon, Masatoshi et Hiroaki (1997) ont montré que le Romarin est caractérisé par des teneurs élevées de 1,8 Cinéole (\approx 50 %) et de faibles teneurs en α -Pinène et en Camphre (\approx 10 %).

Au Portugal (Serrano et al., 2002), le Romarin récolté est riche en Myrcène (25 %), en 1,8-Cinéole, et en Camphre. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés pour les huiles du Romarin d'Argentine et du Brésil (Porte et al., 2000 ; Larran et al., 2001).

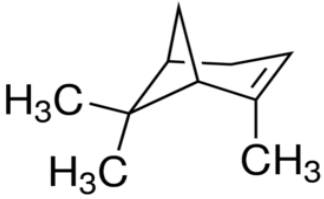
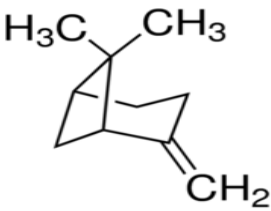
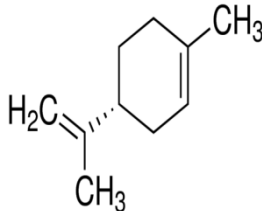
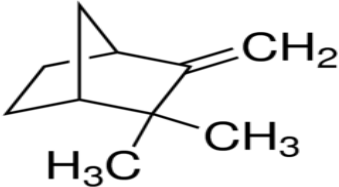
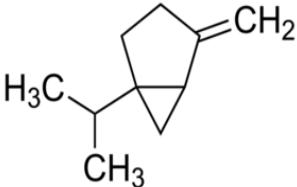
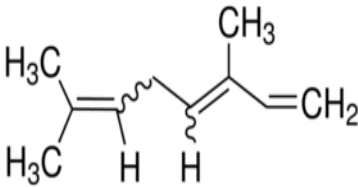
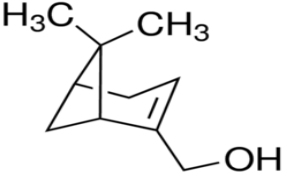
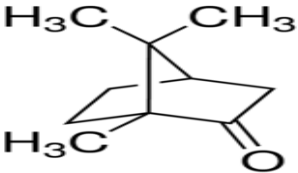
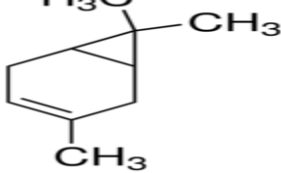
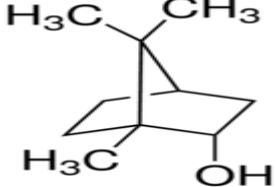
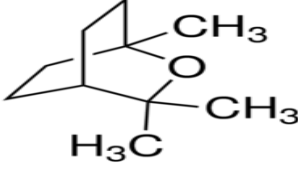
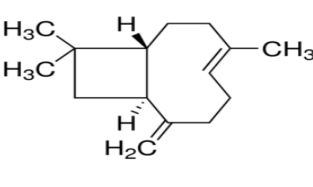
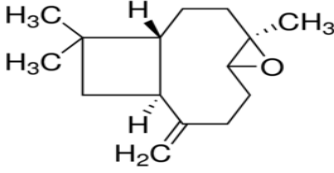
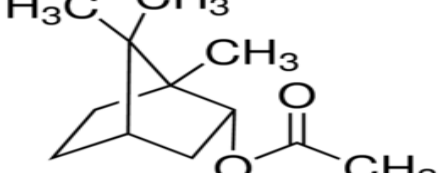
En Inde (Jaganmohan et al., 1997) ont trouvé que les huiles essentielles du Romarin sont caractérisées par la présence du 1,8-Cinéole (30 %), et du camphre (\approx 30 %).

En Italie, le Romarin est constitué par l' α -Pinène (13,7%), 1,8-Cinéole (3,4%), Camphre (2,9%) et Verbénone (20,3%) (Pintore et al., 2002).

En Espagne, Varela et al., (2009) ont étudié 87 populations spontanées de *R. officinalis* et ils les ont classées en prenant en considération la composition chimique de leurs huiles essentielles. Parmi tous les échantillons, trente-huit ont une teneur élevée en 1,8 Cinéole ($>$ 24%) et un rendement en huile essentielle supérieur à 2%; six populations ont présenté un rapport 1,8 Cinéole / Linalol élevé ; trois échantillons ont une teneur élevée en Linalol et seulement deux échantillons présentent des teneurs élevées en Verbénone (\approx 5%).

La variation détectée dans la composition chimique de l'huile essentielle de *R. officinalis* issue de différents pays est liée à plusieurs paramètres tels que: le facteur environnemental (Bernath, et al., 1991 ; Grella, et al., 1988), les conditions climatiques et géographiques qui changent d'un pays à un autre et la période de la cueillette (Fellah et al., 2006). La méthode d'extraction influe considérablement la composition de l'huile essentielle (Bruneton 1993) et les procédés, qui utilisent l'eau, peuvent induire l'hydrolyse des esters...etc.

Tableau 5: Structures chimiques des composés majoritaires des HE

<p>α-Pinène</p> 	<p>β-Pinène</p> 	<p>Limonène</p> 
$C_{10}H_{16}$	$C_{10}H_{16}$	$C_{10}H_{16}$
<p>Camphène</p> 	<p>Sabinène</p> 	<p>Ocimène</p> 
$C_{10}H_{16}$	$C_{10}H_{16}$	$C_{10}H_{16}$
<p>Myrtenol</p> 	<p>Camphre</p> 	<p>δ,3-Carène</p> 
$C_{10}H_{16}O$	$C_{10}H_{16}O$	$C_{10}H_{16}$
<p>Bornéol</p> 	<p>1,8-cinéole</p> 	<p>β-Caryophyllène</p> 
$C_{10}H_{18}O$	$C_{10}H_{18}O$	$C_{15}H_{24}$
<p>Oxyde de Caryophyllène</p> 	<p>Acétate de bornyle</p> 	
$C_{15}H_{24}O$	$C_{12}H_{20}O_2$	

III. Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'étude de l'effet de la provenance sur la qualité chimique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* des quatre régions du Maroc montre des différences de leurs compositions chimiques. Afin de mettre en évidence une éventuelle variabilité de la composition chimique de ces huiles essentielles et d'étudier statistiquement les similitudes existantes entre les différentes huiles et les corrélations existantes entre les variables, nous avons procédé à une Analyse en Composantes Principales (ACP). Nous avons considéré chaque composé comme une variable quantitative à expliquer (Tableau 6).

III.1. Variabilité expliquée

Sur le graphe de la variance expliquée en fonction du nombre de composantes retenues (figure 32), nous notons que la première composante explique 67,17% de la variabilité des données ; alors que la deuxième explique seulement 24 %. Nous pouvons donc nous contenter de retenir ces deux composantes expliquant 91,41% de la totalité de la variabilité.

Tableau 6: Composés de l'huile essentielle utilisée dans les analyses statistiques

Var 1	Tricyclène	Var 18	Terpinén - 4- ol
Var 2	α -Thujène	Var 19	Myrtenol
Var 3	α -Pinène	Var 20	Verbénone
Var 4	Camphène	Var 21	Trans-2-Caren-4-ol
Var 5	Sabinène	Var 22	Acétate de Bornyle
Var 6	β -Pinène	Var 23	Acétate d' α -Terpinenyle
Var 7	β -Myrcène	Var 24	α -Copaène
Var 8	α -Phéllandrène	Var 25	β -Caryophyllène
Var 9	δ -3-Carène	Var 26	γ - Gurjenène
Var 10	Limonène	Var 27	Germacrène-D
Var 11	Formate-Isobornyle	Var 28	α -Cadinène
Var 12	1,8 - Cinéole	Var 29	γ - Cadinène
Var 13	Trans – Sabinene -hydrate	Var 30	Oxyde de Caryophyllène
Var 14	Chrysanthenone	Var 31	γ -Eudesmol
Var 15	Camphre	Var 32	α -Eudesmol
Var 16	Trans-Verbénol	Var 33	τ -Cadinol
Var 17	Bornéol		

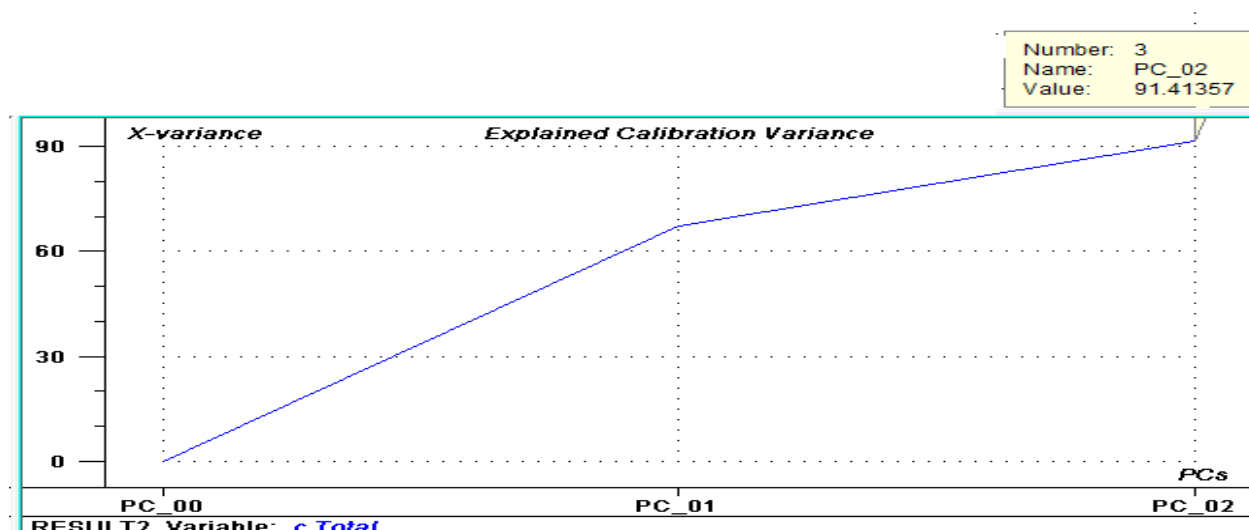


Figure 32 : Graphe de la variance expliquée en fonction du nombre de composantes retenues

III.2. Etude des variables

❖ Moyenne et écart type

L'examen statistique (moyenne et écart type) nous a servi pour déterminer les variables ayant la plus grande variance (Figure 33).

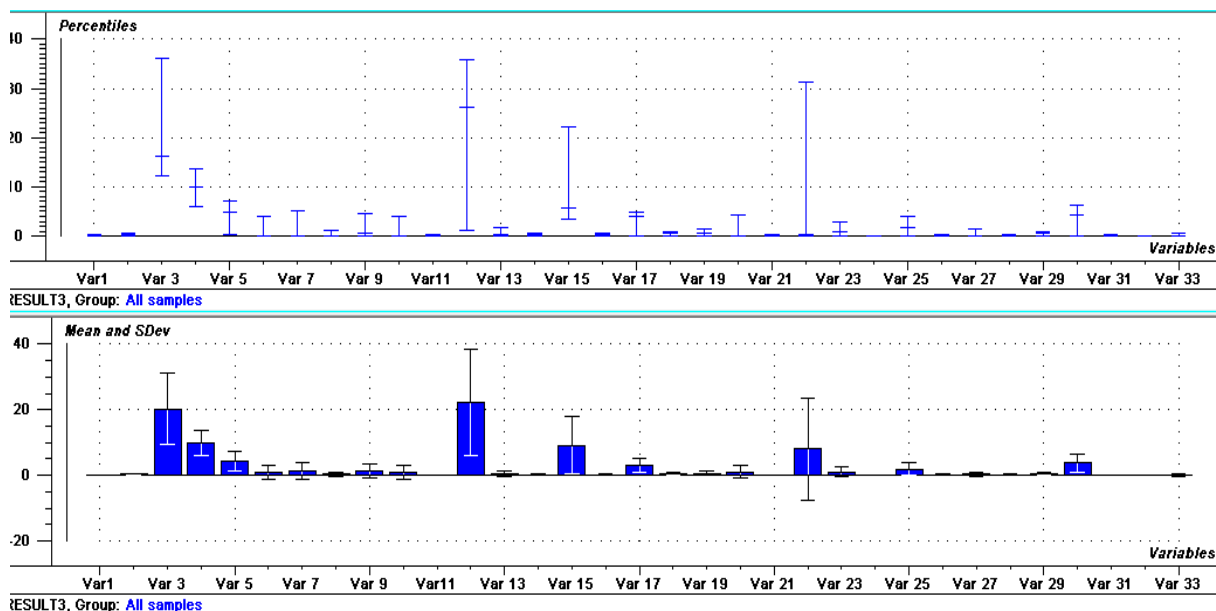


Figure 33: Moyenne et écart type de chaque variable

La composition de l'huile essentielle du Romarin de quatre provenances présente une différence notable. Les composants identifiés montrent une grande variabilité (Figure 34). Le 1,8-Cinéole (Var 12) est le composant qui présente le plus de variation au sein des échantillons, suivi de α -Pinène (Var 3), Camphène (Var 4), Camphre (Var 15), Acétate de

Bornyle (Var 22) et Oxyde de Caryophyllène (Var 30). Les autres composants présentent peu de variabilité.

❖ Cercle des corrélations

Dans notre étude, nous pourrions déduire, de la Figure 34 représentant le cercle des corrélations des variables des huiles essentielles, que les axes F_1 et F_2 véhiculent respectivement 67% et 24% de l'information totale. Le cercle des corrélations est aussi utile pour interpréter la signification des axes. Cette représentation montre que l'ensemble des composants de l'huile essentielle contribue fortement à la formation de l'axe 1 et révèle l'existence de corrélation entre certaines variables étudiées telles que la corrélation entre Bornéol (Var 17), Chrysanthénone (Var 14), γ -Gurjénène (Var 26).

La partie positive de l'axe 1 est expliquée par les variables : 1.8-Cinéole (Var 12), Isobornyle Formate (Var 11) par contre la partie négative de l'axe est expliquée par les composés : Acétate de Bornyle (Var 22), δ -3- Carène (Var 9), γ -Cadinène (Var 29). Le Caryophyllène (Var 30), Terpinen-4-ol (Var 18), α -Phéllandrène (Var 8), Camphre (Var 15) expliquent la partie négative de l'axe 2, alors que sa partie positive est expliquée par : Bornéol (Var 17), γ -gurjénène (Var 26) et Chrysanthénone (Var 14).

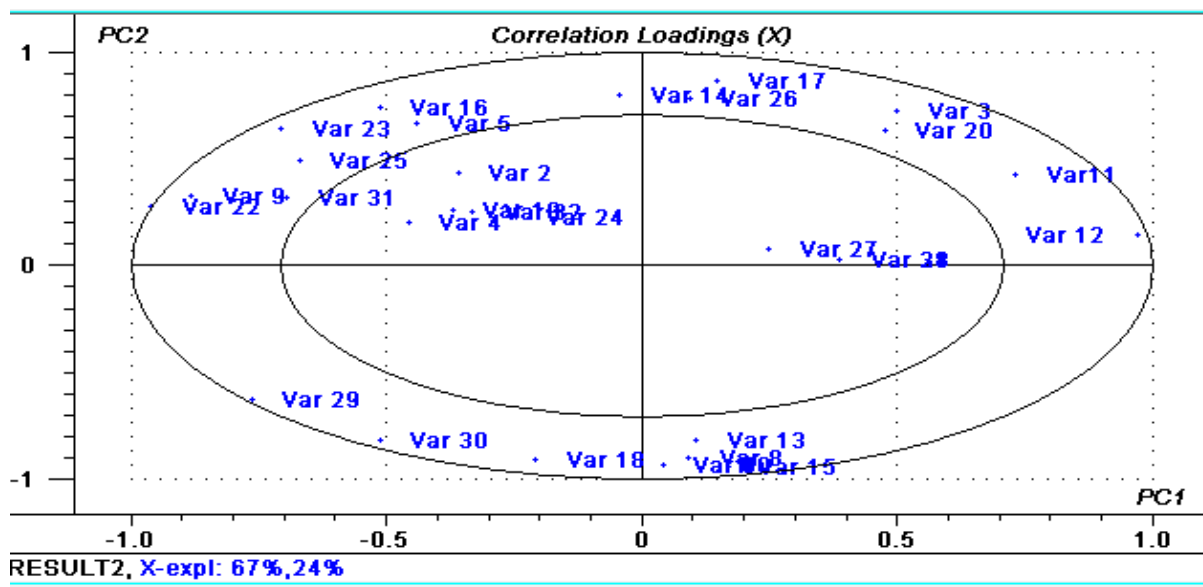


Figure 34 : Cercle des corrélations des variables des huiles essentielles

❖ Etude des huiles essentielles des quatre provenances de Romarin du Maroc

Afin d'identifier les variables caractérisant chaque HE, nous avons représenté les variables et les individus des quatre provenances en fonction de la CP 1 et 2 (Figures 35, 36 et 37).

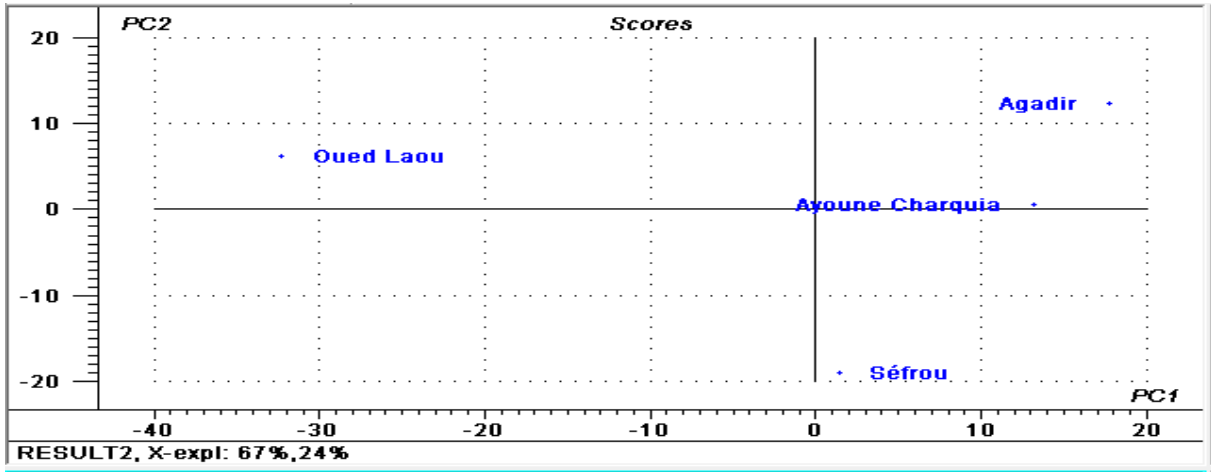


Figure 35: Graphe de distribution des individus

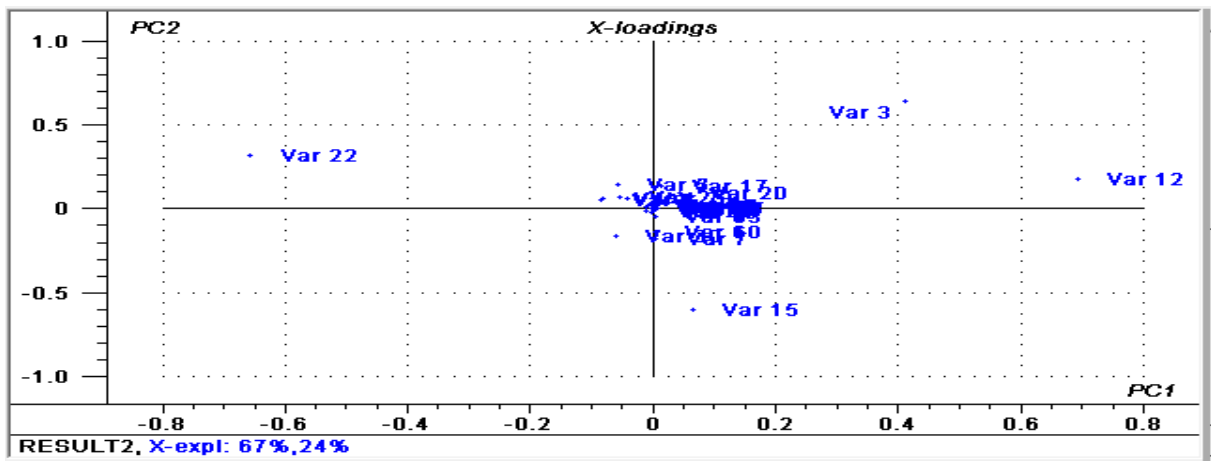


Figure 36: Graphe de distribution des variables

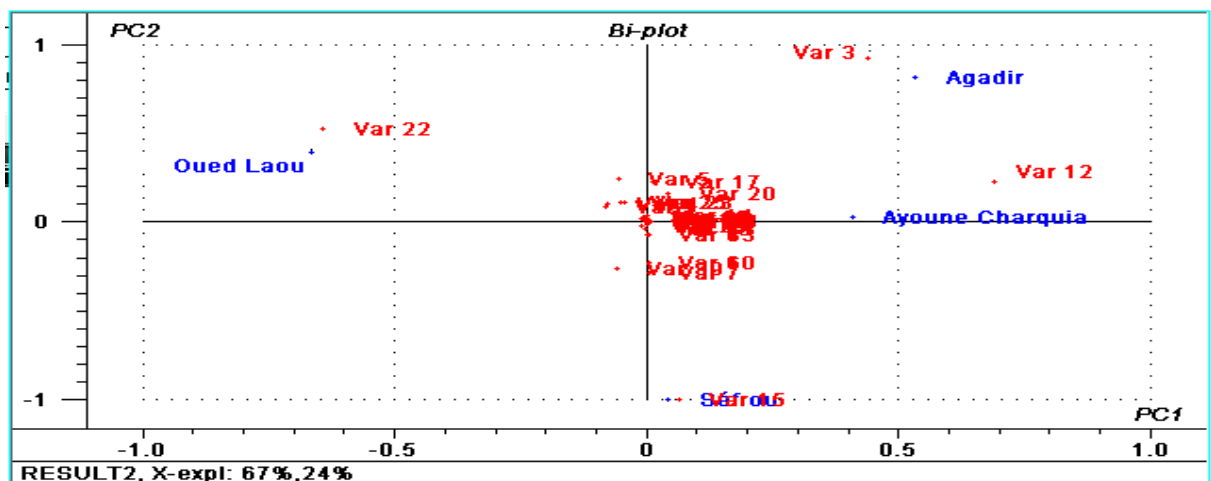


Figure 37: Graphe combinant les individus et les variables

Le Romarin de provenance de l'Oued Laou est localisé sur la partie négative de l'axe 1; Il est caractérisé par l'Acétate de Bornyle. Cet échantillon s'oppose au Romarin de provenance de l'Ayoune Charquia qui est localisé sur la partie positive de l'axe 1 et caractérisé par le 1,8-Cinéole.

L'axe 2 oppose le Romarin de deux provenances, sur sa partie positive on retrouve le Romarin de provenance d'Agadir, qui se caractérise par la présence abondante de α -Pinène, alors que sur la partie négative on trouve le Romarin de la provenance de Sefrou qui est caractérisé par la présence de Camphre (Figure 37).

L'analyse en composante principale a montré une bonne classification des huiles essentielles du Romarin des différentes régions selon la composition chimique. Nous notons aussi l'existence des corrélations remarquables entre les variables.

De ce fait, on peut classer ces huiles en fonction de leur chémotype :

- Dans la région l'Ayoune Chaquia, on trouve le *R. officinalis* à 1,8-Cinéole (cineoliferum).
- Dans la région Sefrou, on trouve le *R. officinalis* à camphre (Camphoriferum).
- Dans la région d'Agadir, on trouve le *R. officinalis* à α -Pinène.
- Dans la région d'Oued Laou, on trouve le *R. officinalis* var. *Prostratus* à Acétate de Bornyle.

Le chémotype d'une huile essentielle est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif présent dans l'H.E. C'est l'élément qui permet de distinguer une huile essentielle extraite d'une même variété botanique mais d'une composition biochimique différente. Cette classification capitale permet de sélectionner les H.E pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace.

Elamrani et al., (2000) ont étudié la chimiotaxonomie de l'huile essentielle du Romarin marocain provenant de différentes régions. Ils ont défini trois chémotype : α -Pinène (37 – 40 %), Camphre (41 – 53 %), et 1,8-Cinéole (58 – 63 %).

Pintore et al., (2002) ont comparé les Romarins de Sardaigne et de la Corse et ont pu identifier respectivement les chémotypes α -Pinène, Verbénone et Acétate de Bornyle. Ce dernier chémotype démontre la ressemblance avec celui de la provenance d'Oued Laou.

Tucker et Maciarello (1986), ont examiné les huiles essentielles de Romarin (*Rosmarinus Officinalis L.*), provenant de 23 cultivars. Ces auteurs ont montré que ces cultivars dérivait de cinq variétés botaniques montrant de larges variations dans leur composante principale : α -Pinène (0,06 – 57,45 %), 1,8-Cinéole (3,55 – 42,69 %), Camphre (0,20 – 56,45 %), Acétate de bornyle (0,66 – 21,03 %) et Bornéol (0,40 – 14,69 %). Les essences ont alors été regroupées dans six groupes chimiques (chémotypes):

- (1) α -Pinène > 1,8-Cinéole,
- (2) 1,8-Cinéole > α -Pinène,
- (3) α -Pinène > Camphre + Camphène > 1,8-Cinéole,
- (4) Camphre + Camphène > α -Pinène > 1,8-Cinéole,
- (5) Camphre + Camphène > 1,8-Cinéole > α -Pinène,
- (6) Bornéol + Acétate de bornyle > Camphre.

Cette procédure est intéressante lorsqu'on utilise les huiles essentielles en aromathérapie. Le chémotype permet de différencier les propriétés thérapeutiques de plusieurs cultivars ou variétés comme dans le cas du Romarin qui se caractérise par les mêmes formes de feuilles, de tiges, de fleurs, de couleur et d'odeur.

IV. Etude de l'activité antibactérienne par la méthode de disque

Dans cette étude, l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *R. officinalis* de quatre régions marocaines est évaluée vis-à-vis de trois souches bactériennes (*E. coli*, *B. subtilis* et *M. smegmatis*).

L'étude de cette activité a été, en premier lieu, évaluée qualitativement par la technique de diffusion sur disque dans l'objectif de sélectionner parmi les huiles essentielles testées, celles qui sont les plus actives. Les résultats obtenus sont exprimés en terme de diamètres de zones d'inhibition mesurés. Ils sont représentés dans le tableau 7.

Tableau 7: Effet antibactérien des quatre huiles essentielles du *R. officinalis* par la méthode de disque

Provenance	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)*		
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. smegmatis</i>
R. Sefrou	15,66 ± 0,57	30,33 ± 2,08	37 ± 1
R. Ayoun	18 ± 1	22 ± 2	26,3 ± 1,52
R. Oued Laou	16,33 ± 1,15	27,0 ± 1,1	18,66 ± 2,08
R. Agadir	12 ± 1	13,33 ± 1,15	16,66 ± 1,52

*Les résultats correspondent à la moyenne de trois répétitions

Dans le but de vérifier s'il y a des différences significatives entre les moyennes des diamètres des zones d'inhibition pour les quatre différentes régions du *R. officinalis* testé sur trois souches (*E. coli*, *B. subtilis* et *M. smegmatis*), on a utilisé l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur. Les résultats de ce test sont représentés dans le tableau 8.

Tableau 8: Tableau d'analyse de la variance à un facteur

Souches	Analyse de variance					
	Source	somme des carrés	Ddl	Carré moyen	F	probabilité
<i>M. smegmatis</i>	Inter-groupes	764,667	3	254,889	101,96	0,0000
	Intra-groupes	20,0	8	2,5		
<i>B. subtilis</i>	Inter-groupes	503	3	167	60,97	0,0000
	Intra-groupes	22	8	2,75		
<i>E. coli</i>	Inter-groupes	367	3	122	146	0,0000
	Intra-groupes	6,66	8	0,83		

Ce tableau d'ANOVA décompose la variance en deux composants: un composant inter-groupes et un composant intra-groupes. Comme la valeur de la probabilité pour le test F est inférieure à 0,05, il y a une différence statistiquement significative entre les moyennes des diamètres d'inhibition d'une région à une autre au niveau de confiance de 95,0% et ceci pour les trois souches utilisées.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *R. officinalis* des quatre régions ont révélé un pouvoir inhibiteur sur toutes les souches étudiées. Cette activité diffère d'une région à une autre statistiquement.

En effet, l'activité antibactérienne la plus élevée a été observée pour le Romarin de la région de Sefrou et l'activité la plus faible a été observée pour le Romarin de la région d'Agadir (Tableau 7) et ceci pour les trois souches utilisées.

L'huile essentielle de Romarin de la région de Sefrou montre l'activité la plus importante avec des halos de $15,66 \pm 0,57$ et $30,33 \pm 2,08$ pour la bactérie *E. coli* et *B. subtilis* respectivement et de 37 ± 1 mm pour *M. smegmatis*.

Pour l'huile essentielle du Romarin de l'Ayoune charkiya, la plus grande activité a été observée contre *M. smegmatis* avec des diamètres d'inhibition de $26,3 \pm 1,52$ alors que l'activité la plus faible a été observée contre *E. coli* avec des diamètres d'inhibition de 18 ± 1 mm.

Les mêmes résultats ont été rapportés pour l'huile essentielle du Romarin d'Agadir. En effet, les diamètres des zones d'inhibition obtenus pour *M. smegmatis* sont plus élevés que ceux obtenus pour *B. subtilis* et *E. coli*. Ces diamètres sont de $12 \text{ mm} \pm 1$; $13,33 \text{ mm} \pm 1,15$ et $16,66 \text{ mm} \pm 1,52$ pour *E. coli*, *B. subtilis* et *M. smegmatis* respectivement.

Il ressort des résultats présentés dans le tableau 7 que l'huile essentielle de *R. officinalis* de l'Oued Laou a exercé une activité inhibitrice importante sur toutes les souches étudiées. Par ailleurs, la bactérie à Gram+ s'est révélée la plus sensible à l'action de cette huile en comparaison avec les autres bactéries, avec un diamètre d'inhibition important de l'ordre de $27,66 \text{ mm} \pm 1,1$. Alors que *E. coli* à Gram- est la plus résistante avec un diamètre d'inhibition de $16,33 \pm 1,15$ mm.

Ces huiles essentielles ont été testées contre les bactéries Gram+ (*B. subtilis*) et Gram- (*E. coli*). Cette dernière a révélé une certaine résistance contre le pouvoir inhibiteur de cette huile essentielle. La même observation a été signalée par Delamare et al., (2007). Des résultats similaires ont été rapportés contre la même souche respectivement en Sardaigne et en Iran (Hayouni et al., 2007; Nikitina, 2009).

La plupart des études portant sur l'action des huiles essentielles contre les organismes responsables de l'altération des aliments et des agents pathogènes d'origine alimentaire conviennent que, généralement, les huiles essentielles sont actives contre les bactéries Gram+ que les bactéries Gram- (Hsouna et al., 2011; Cardile et al., 2009; Wilkinson et al., 2003;

Pintore et al., 2002). La faible sensibilité des microorganismes Gram-négatifs vis-à-vis d'agents antibactériens pourrait être expliquée par la présence de la double membrane chez les bactéries gram négatives contrairement aux bactéries gram positives qui n'en contiennent qu'une seule (Bagamboula et al., 2004). Ce qui rend plus facile l'action de l'huile essentielle.

En effet parmi les raisons avancées pour expliquer l'action des huiles essentielles sur les souches bactériennes, l'atteinte de la perméabilité membranaire par perturbation des structures de la membrane ainsi que la perte du contrôle chimiosmotique sont les plus importantes (Cox et al., 2000). Par ailleurs, par leur caractère lipophile, les huiles essentielles peuvent traverser facilement les parois cellulaires et la membrane cytoplasmique, engendrant des désordres de la structure des polysaccharides, des acides gras et des phospholipides, et aussi sur leur perméabilité (Bakkali et al., 2008).

V. Détermination de la CMI.

La CMI est appréciée par la zone d'inhibition. En fonction du diamètre de cette zone, la CMI est déterminée. Les résultats sont représentés dans le tableau 9.

Les huiles essentielles ont montré un effet inhibiteur contre les micro-organismes étudiés. En effet, presque toutes les souches microbiennes ont été inhibées à la concentration de 1/250 v/v. Le micro-organisme le plus sensible à toutes les huiles essentielles est *M. smegmatis* dont la croissance a été arrêtée à la faible concentration de 1/500 v/v. La souche la plus résistante est *E. coli* avec une valeur de CMI inférieur ou égale à 1/250.

Ceci montre que ces huiles essentielles présentent des caractéristiques antibactériennes intéressantes sur les micro-organismes testés. Ces résultats sont en accord avec ceux de la méthode de disque.

Plusieurs auteurs ont montré la relation entre l'activité antibactérienne des huiles essentielles et leur composition chimique. En effet la variation en nature des constituants et leurs teneurs induit une variation de l'activité microbiologique. La présence d'un certain nombre de constituants dans la composition chimique favorise cette activité.

Tableau 9: CMI des huiles essentielles du Romarin de différentes régions

		CMI v/v						
Souches		$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{125}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$
Romarin d'Agadir	<i>M. smegmatis</i>	-	-	-	-	-	+	+
	<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	+	+
	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	+	+	+
Romarin d'Oued Laou	<i>M. smegmatis</i>	-	-	-	-	-	+	+
	<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	+	+
	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	+	+
Romarin de l'Ayoune	<i>M. smegmatis</i>	-	-	-	-	+	+	+
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	+	+	+
	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	+	+
Romarin de Sefrou	<i>M. smegmatis</i>	-	-	-	-	-	+	+
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	+	+
	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	+	+

+ Présence de croissance ; - Absence de croissance

En effet, il a été démontré que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est souvent due à ses composés terpéniques (Cowan, 1999). En général l'activité des huiles essentielles est principalement due à la présence de composés phénoliques, aldéhydiques et alcooliques (Sacchetti et al., 2005; Bruni et al., 2003). De plus, les terpénols sont connus pour être de très bons agents antimicrobiens (Kelen et Tepe, 2008; Satrani et al., 2006).

Nombreuses études ont montré les propriétés antibactériennes de certaines composés tels que: l' α -pinène (Aligiannis et al., 2000; Martin et al., 2000), le 1,8-cinéole (Prudent et al., 1993), le Camphre et ses dérivés (Felice et al., 2004; Tantaoui-Elaraki, 1993), Oxyde de Caryophyllène (Ulubelen et al., 1994), Bornéol (Felice et al., 2004). En plus Magiatis et al., (2000) ont

constaté que l'Oxyde de Caryophyllène est le plus efficace, suivi par le Camphre et 1,8-Cinéole.

Ceci peut donc expliquer l'activité enregistrée des huiles essentielles extraites des quatre régions étudiées.

VI. Conclusion

Au cours de cette partie, nous avons d'abord déterminé et comparé les rendements, les compositions chimiques et les propriétés antibactériennes des huiles essentielles du Romarin provenant de quatre régions différentes du Maroc (Jardin de Jacky d'Agadir, l'Ayoune Charquia, Oued Laou et Sefrou). Ces huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation et analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Nous avons trouvé que les rendements moyens obtenus, varient en fonction des quatre provenances. En effet, les échantillons du Romarin de la provenance de Sefrou ont donné un meilleur rendement en huile essentielle (2.4%) par rapport à ceux de l'Ayoune Charquia, de Oued Laou et de Jardin de Jacky d'Agadir, avec respectivement des teneurs de 1,8%, 1,9% et 1,45%.

L'analyse chromatographique de ces huiles essentielles a montré que les compositions chimiques sont différentes d'une région à une autre. Les composés majoritaires sont :

- α -Pinène (36,15%), 1,8-Cinéole (33,93%), Camphène (6,1%), Camphre (5,08%) et Sabinène (3,4%) pour le Romarin du Jardin de Jacky d'Agadir.
- Bornyle Acétate (31,21%), α -Pinène (15,79%), Camphène (13,06%), Sabinène (7,11%), δ ,3-Carène (4,54%), Oxyde de Caryophyllène (4,71%), β -Caryophyllène (4,09%), Bornéol (3,59%), Acétate de l' α -Terpinenyl (2,88%) pour le Romarin de la région de Oued Laou.
- Le Camphre (22,1%), 1,8-Cinéole (18,35%), α -Pinène (12,19%), Camphène (6,81%), Oxyde de Caryophyllène (6.3%), β -Myrcène (5,1%) pour le Romarin de la région de Sefrou.
- 1,8-Cinéole (35,91%), l' α -Pinène (16,61%), Camphène (13,67%), Camphre (6,4%), Sabinène (6,04%), Bornéol (4,84%), Oxyde de Caryophyllène (3,8%), β -caryophyllène (2%) pour le Romarin de l'Ayoune Charquia.

L'étude statistique descriptive et comparative de la composition chimique du Romarin des différentes régions par la méthode d'analyse en composante principale a montré une bonne classification des huiles essentielles du Romarin des différentes régions selon la composition chimique. De ce fait, ces huiles peuvent être classées en fonction de leur chémotype :

- Dans la région l'Ayoune Chaquia, on trouve le Romarin à 1,8-Cinéole.
- Dans la région Sefrou, on trouve le Romarin à Camphre.
- Dans la région d'Agadir, on trouve le Romarin à α -Pinène.
- Dans la région d'Oued Laou, on trouve le Romarin à Acétate de Bornyle.

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de Romarin des quatre régions a révélé que ces dernières ont un pouvoir inhibiteur sur toutes les souches étudiées. Cette activité diffère statistiquement d'une région à une autre. En effet, l'activité antibactérienne la plus élevée a été observée chez le Romarin de la région de Sefrou ($30,33 \pm 2.08$ mm chez *B. subtilis* et de 37 ± 1 mm chez *M. smegmatis*) et l'activité la plus faible a été observée chez le Romarin de la région d'Agadir avec des zones d'inhibition de 12 ± 1 mm; $13,33 \pm 1.15$ mm et $16,66 \pm 1.52$ respectivement pour *E. coli*, *B. subtilis* et *M. smegmatis*.

Ceci est confirmé par le test de CMI, les valeurs les plus faibles ont également été trouvées pour l'huile essentielle de Sefrou (1/500 v/v)

Dans le chapitre suivant, on va étudier tout particulièrement le Romarin d'Oued Laou car c'est une variété rare au Maroc et qui n'a jamais été étudiée auparavant.

Chapitre IV

Effet de l'individualité sur la teneur, la composition chimique et l'activité antibactérienne des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* cultivé dans le jardin expérimental de Taounate

INTRODUCTION

Le Maroc est un pays qui est réputé par sa richesse en plantes aromatiques et médicinales à vertus thérapeutiques. Cependant, l'exploitation des PAM au Maroc est loin d'être rationnelle. Des cueillettes massives et répétées dans les habitats naturels épuiseront très rapidement les PAM spontanées ce qui pourrait hypothéquer la survie et la pérennité des peuplements et compromettre le capital génétique. La domestication et la culture des PAM s'avèrent une solution pertinente pour éviter ce phénomène préjudiciable.

Il est reconnu que les PAM spontanées sont plus performantes que celles cultivées, en terme de rendement de substances naturelles. Néanmoins, l'amélioration des techniques culturales est une voie prometteuse pour hausser la performance et les rendements des PAM cultivées. L'expression en termes de quantité et/ou de qualité d'une substance naturelle chez une plante demeure sous le contrôle de trois principaux facteurs : le génotype, l'environnement et l'interaction entre ces deux facteurs.

R. officinalis est parmi les plantes les plus utilisées et les plus étudiées sauf que *Rosmarinus officinalis var. Prostratus* est l'une des variétés rares au Maroc qui n'a jamais été étudiée auparavant d'où l'intérêt de faire cette étude afin de valoriser cette variété sur le plan aromatique et médicinale et compléter les études déjà réalisées sur le Romarin. Pour ce faire, on a jugé utile de réaliser la transplantation de cette variété suivie par une sélection des meilleurs individus.

C'est dans cette optique que s'inscrit le présent travail, dont le but est d'étudier l'effet de l'individualité sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles du Romarin espèce "*Prostratus*" cultivé.

Notre travail cerne plusieurs volets, à savoir une étude qualitative incluant l'évaluation de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de sept individus du *Rosmarin Prostratus*, une étude quantitative qui a permis la détermination de la CMI de ces individus et une identification de la composition chimique des différents individus en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse.

I. Rendement en huile essentielle

Le rendement moyen en huile essentielle a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante et présenté dans le tableau 10.

Tableau 10 : Rendements en HE obtenus par hydro-distillation des différents individus étudiés

Individus	Rendement (%)
I 1	1,36 ± 0,02
I 2	1,66 ± 0,02
I 3	1,76 ± 0,03
I 4	1,82 ± 0,02
I 5	1,79 ± 0,03
I 6	1,72 ± 0,01
I 7	1,93 ± 0,01

Les sept individus de *R. officinalis var. Prostratus* ont fourni des rendements en huile essentielle variant entre 1,36% et 1,93%. Avec 1,93%, l'individu N°7 présente la teneur la plus élevée. En général, les résultats obtenus, montrent que le rendement varie en fonction des individus. D'où l'effet de l'individualité sur le rendement. Il est à signaler qu'aucune étude de ce genre n'a été réalisée.

Par ailleurs, ces rendements sont supérieurs à ceux cités dans de nombreuses études. En effet, des chercheurs tunisiens (Ayadi et al., 2011) ont obtenu des rendements variables selon la provenance: 1,35% dans la région de Sidi Bouzid et 1,25% à Bizerte. Par contre le rendement obtenu pour le Romarin de la région de Zaghouan est de 1,27% (Ayadi et al., 2011). Alors que d'autres études ont enregistré un rendement inférieur par rapport à celui obtenu dans notre étude avec une teneur en huile essentielle de 0,52 % (Zoran et al., 2009). De même, un rendement de 0,8% pour le Romarin de la station Honaine et 0,6% pour le Romarin de la station Tlemcen (Tomi et al., 1995). Par contre, nos rendements sont inférieurs à ceux obtenues par Jashmidi et al., (2009) qui sont de 2,1 et 2,6% respectivement pour les régions de Kerman et de Lalehzar d'Iran (Jashmidi et al., 2009)

II. Composition chimique

La composition chimique des différentes huiles essentielles a été déterminée en se basant sur les résultats des analyses obtenues avec GC et GC/MS. Les résultats sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11: Composition chimique des huiles essentielles de sept individus de *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus*

RI	Composés	I 1	I 2	I 3	I 4	I 5	I 6	I 7
Monoterpènes hydrocarbonés								
931	α -Thujène	0,48	0,51	0,21	0,21	0,22	0,21	0,11
939	α - Pinène	12,76	18,82	28,04	30,14	39	37,31	16,31
953	Camphène	12,47	14,59	6,46	7,12	7,48	7,27	3,48
976	Sabinène	7,17	7,05	13,86	12,7	18,66	18,03	8,64
1011	δ -3-Carène	4,54		1,8	-	--	1,95	-
Total		37,42%	40,97%	50,37%	50,17%	65,36%	64,77%	28,54%
Monoterpènes oxygénés								
1033	1,8- Cinéole	-	1,48	-	1,03	1,82	-	38,24
1068	Trans-Sabinene- hydrate	0,36	--	0,49	0,36	0,42	0,86	0,57
1097	Cis-Sabinene-hydrate	-	-	-	0,18	-	-	-
1125	α -Campholène	-	2,81	-	-	-	-	-
1143	Camphre	4,66	1,97	4,62	3,02	5,54	5,53	14,81
1165	Bornéol	5,46	-	1,3	3,47	1,06	1,13	2,84
1204	Verbenone	0,55	-	-	0,23	-	0,29	-
1227	Trans-2-Caren-4-ol	-	-	-	1,36	0,29	0,79	-
1185	α -Terpineol	0,63	3,75	1,7	1,78	-	-	0,61
1194	Myrtenol	1,23	1,08	1,95	10,54	6,18	9	5,01
1235	Acétate de Myrtenyl	0,22	-	-	0,95	-	-	-
1285	Acétate de Bornyle	29,88	32,55	2,71	8,8	0,63	0,52	0,13
Total		42,99%	43,64%	12,77%	31,72%	15,94%	18,12%	62,21%
Sesquiterpènes hydrocarbonés								
1351	α -Cubebène	0,15	-	0,36	-	-	-	-
1376	α -Copaène	0,10	0,10	0,18	-	-	-	-
1384	β -Bourbonène	0,16	0,16	-	-	-	-	-
1418	β -Caryophyllène	3,8	4,18	11,3	8,39	7,23	7,39	1,45
1473	γ -Gurjunène	0,2	-	1,80	0,4	0,37	0,39	-
1480	Germacrène-D	0,42	-	1,69	-	-	-	-
1493	Ledène	3,92	3,80	1,64	-	0,37	-	-
1499	α -Murolène	0,32	0,3	0,75	-	-	-	0,15
1513	γ -Cadinène	0,8	0,79	1,88	-	-	-	0,64
Total		9,87%	9,33%	19,6%	8,79%	7,97%	7,78%	2,24%
Sesquiterpènes oxygénés								
1581	Oxide de Caryophyllène	5,75	4,01	14,21	7,56	9,16	6,81	4,22
1584	copaen-4- α -ol	1,43	-	0,45	1,01	-	-	-
1590	Viridiflorol	-	-	0,14	-	-	-	-
1611	Tetradecanal	0,21	0,21	0,43	-	-	-	-
1653	τ -Cadinol	0,19	-	-	-	-	-	-
Total		7,58%	4,22%	15,23%	8,57%	9,16%	6,81%	4,22%
TOTAL		97,86	98,16	97,97	99,25	98,43	97,48	97,21

RI : Rétention index

II.1. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 1) de *R. officinalis* var. *Prostratus*

Les résultats relatifs à la composition chimique d'huile essentielle de l'individu I 1 présentés dans la figure 38 et le tableau 11 montrent que l'huile essentielle de cet individu comprend 26 composés qui représentent un total de 97,86%. On remarque que cette huile essentielle est riche en monoterpènes oxygénés qui représentent 42,99% de la composition totale de l'huile suivi par les monoterpènes hydrocarbonés représentant 37,42% de la composition totale.

Tandis que les sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés ne représentent que 9,87% et 7,58% respectivement. Le composé majoritaire est l'Acétate de Bornyle avec un taux de 29,88% environ, accompagné d'autres constituants à des teneurs relativement importantes: α -Pinène (12,76%), Camphène (12,47%), le Sabinène (7,17%), Oxyde de Caryophyllène (5,75%), Bornéol (5,46), Camphre (4,66%) et d'autres composés avec des petits pourcentages.

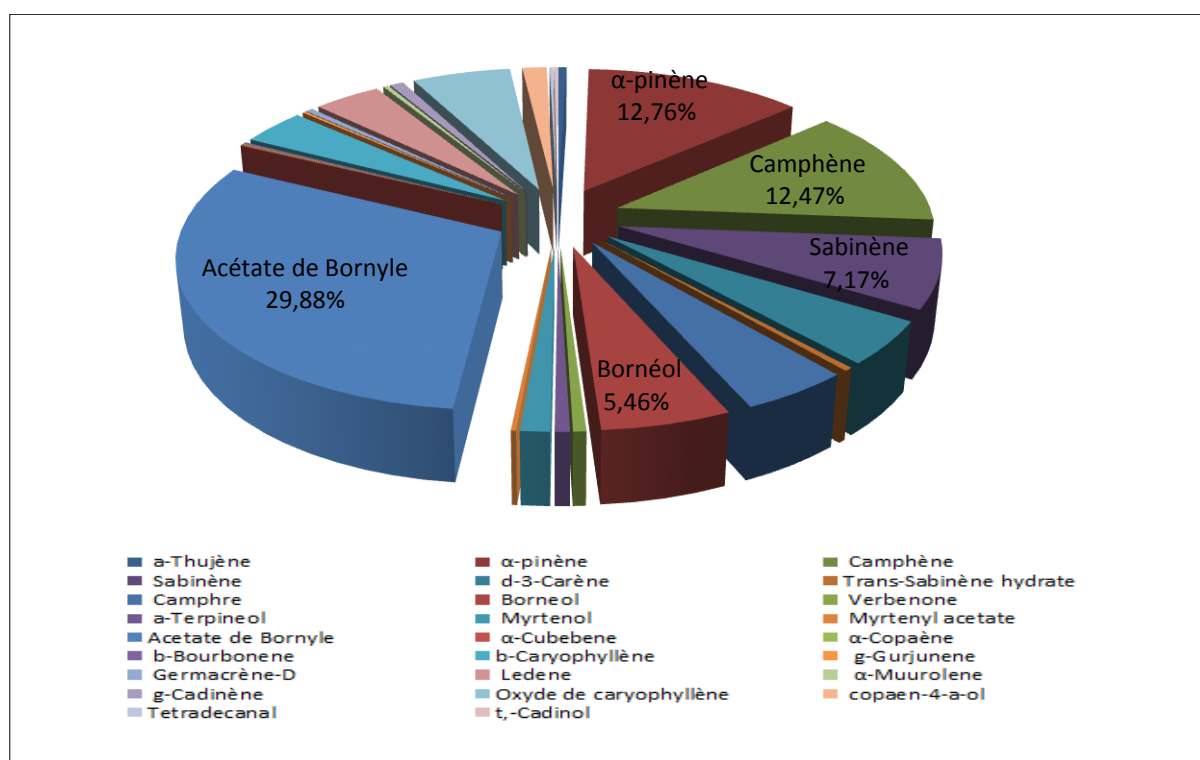


Figure 38 : Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 1)

II.2. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 2) de *R. officinalis* var. *Prostratus*

Les résultats présentés dans le tableau n°11 et illustrés par la figure n°39 ont montré que l'huile essentielle de l'individu I°2 comprend 18 composés qui représentent un total de 98,16 %.

Le composé majoritaire est l'Acétate de Bornyle avec un taux de 32,55 % suivi par: l' α -pinène (18,82%), le Camphène (14,59%), Sabinène (7,05%), ainsi β -caryophyllène, ledène, Oxyde de Caryophyllène chacun représente presque 4%. En effet ce sont les monoterpènes oxygénés qui représentent environ 44% de la composition totale de l'huile suivis par les monoterpènes hydrocarbonés représentant 41% de la composition totale. Tandis que les sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés ne représentent que 9,33% et 12,2% respectivement.

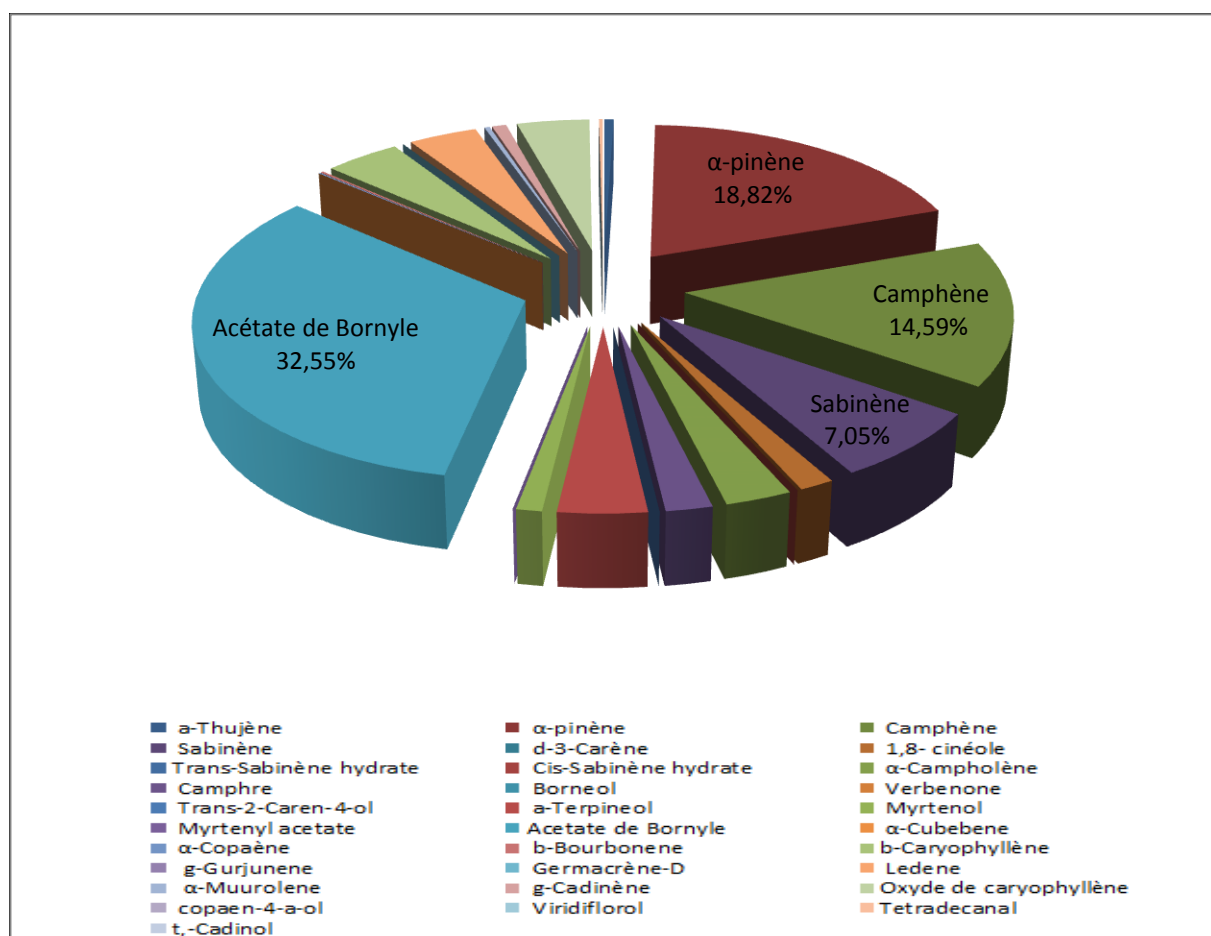


Figure 39 : Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 2)

II.3. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 3) de *R. officinalis* var. *Prostratus*

Vingt-trois composés représentant 97,97% ont été identifiés dans l'huile essentielle de Romarin var. *Prostratus* de l'individu I3 (Tableau 11 et figure 40). Cet échantillon est caractérisé par la présence importante de l' α -Pinène (28,04%), composé majoritaire, suivie par le Sabinène (13,86%), l'Oxyde de Caryophyllène (14,21%), β -Caryophyllène (11,3%), le Camphène (6,46%). Il est à noter que la classe des monoterpènes hydrocarbonés représente le pourcentage le plus élevé ($\approx 51\%$) suivie des monoterpènes oxygénés ($\approx 13\%$), de sesquiterpènes hydrocarbonés ($\approx 20\%$) et sesquiterpènes oxygénés (15%).

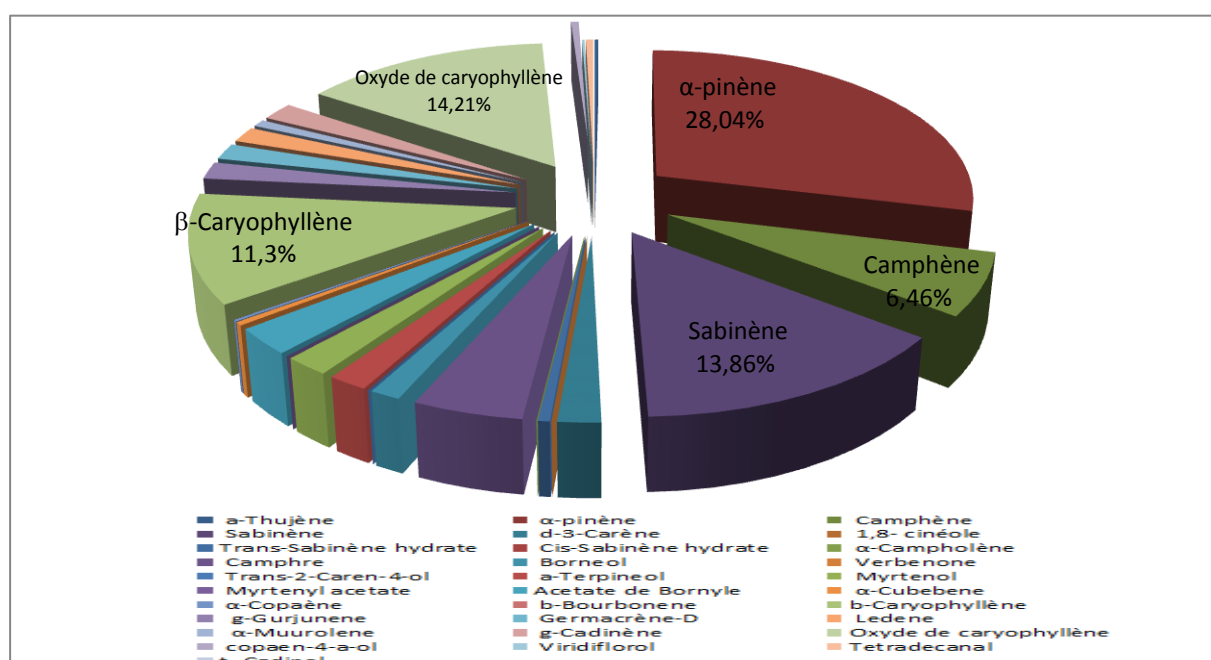


Figure 40: Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 3)

II.4. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 4) de *R. officinalis* var. *Prostratus*

Les résultats relatifs à la composition chimique des huiles essentielles de l'individu I 4 (Tableau 11, figure 41) montrent que les huiles essentielles de cet individu comprennent 19 composés qui représentent un total de 99,25 %. On remarque que cette huile est riche en monoterpènes hydrocarbonés qui représentent environ 50% de sa composition totale suivie par les monoterpènes oxygénés représentant environ 32%. Tandis que les sesquiterpènes oxygénés et hydrocarbonés ne représentent que 9% chacun environ.

Les composés majoritaires sont l' α -pinène (30,14%), le Sabinène (12,7%), le Myrtenol (10,54%), l'Acétate de Bornyle (8,8%), β Caryophyllène 8,39%, l'Oxyde de Caryophyllène (7,56%) et le Camphène (7,12%). On note aussi la présence d'autres composés avec des pourcentages plus faible tels que le Borneol (3,47%), le Camphre (3,02%), et l' α -Terpinéol (1,78%).

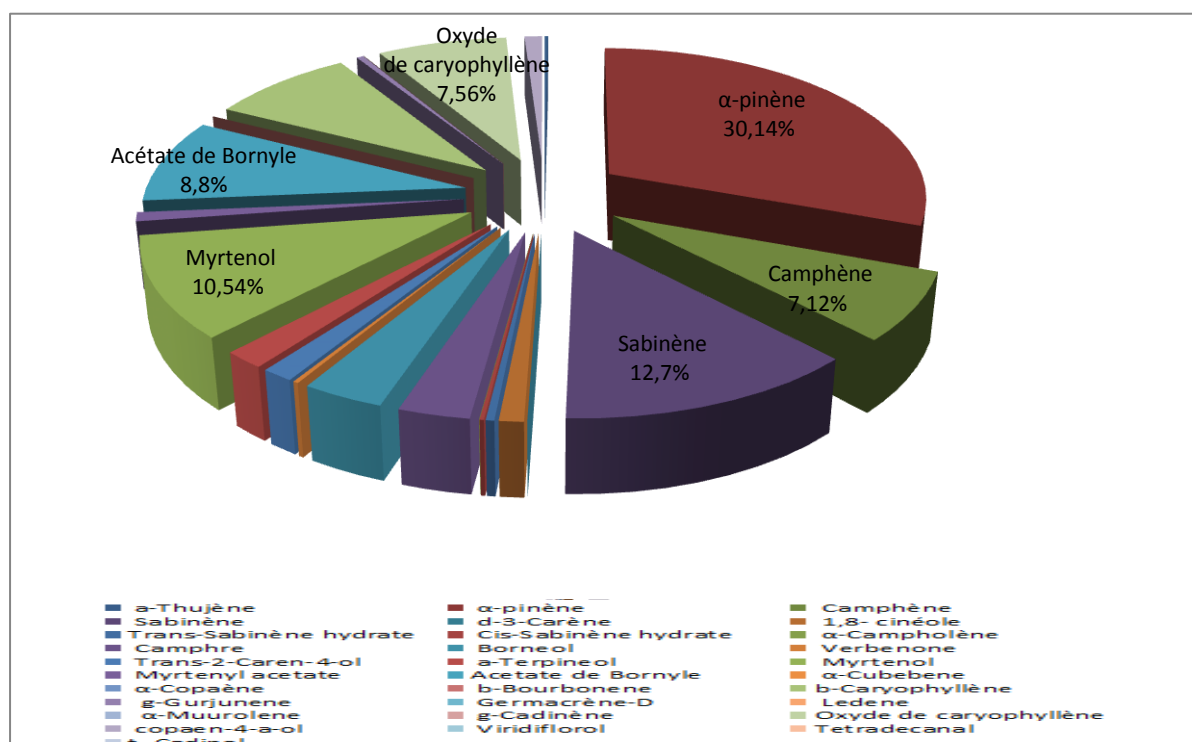


Figure 41 : Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 4)

II.5. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 5) de *R. officinalis* var. *Prostratus*

L'analyse de l'huile essentielle de l'individu I 5 montre la présence de 15 produits avec un taux de 98,43% (Tableau 11, figure 42). On remarque que cette huile est riche en monoterpènes hydrocarbonés qui représentent environ 65% de la composition totale de l'huile suivis par les monoterpènes oxygénés représentant 16% environ de la composition totale.

Tandis que les sesquiterpènes oxygénés et hydrocarbonés ne représentent que 8% et 9% environ respectivement. L' α -Pinène, produit majoritaire, représente 39%, le Sabinène représente 18,66%, l'Oxyde de Caryophyllène représente 9,16%, le Camphène représente 7,48%, le β -Caryophyllène représente 7,23%, le Myrtenol et le Camphre représentent environ 6% chacun.

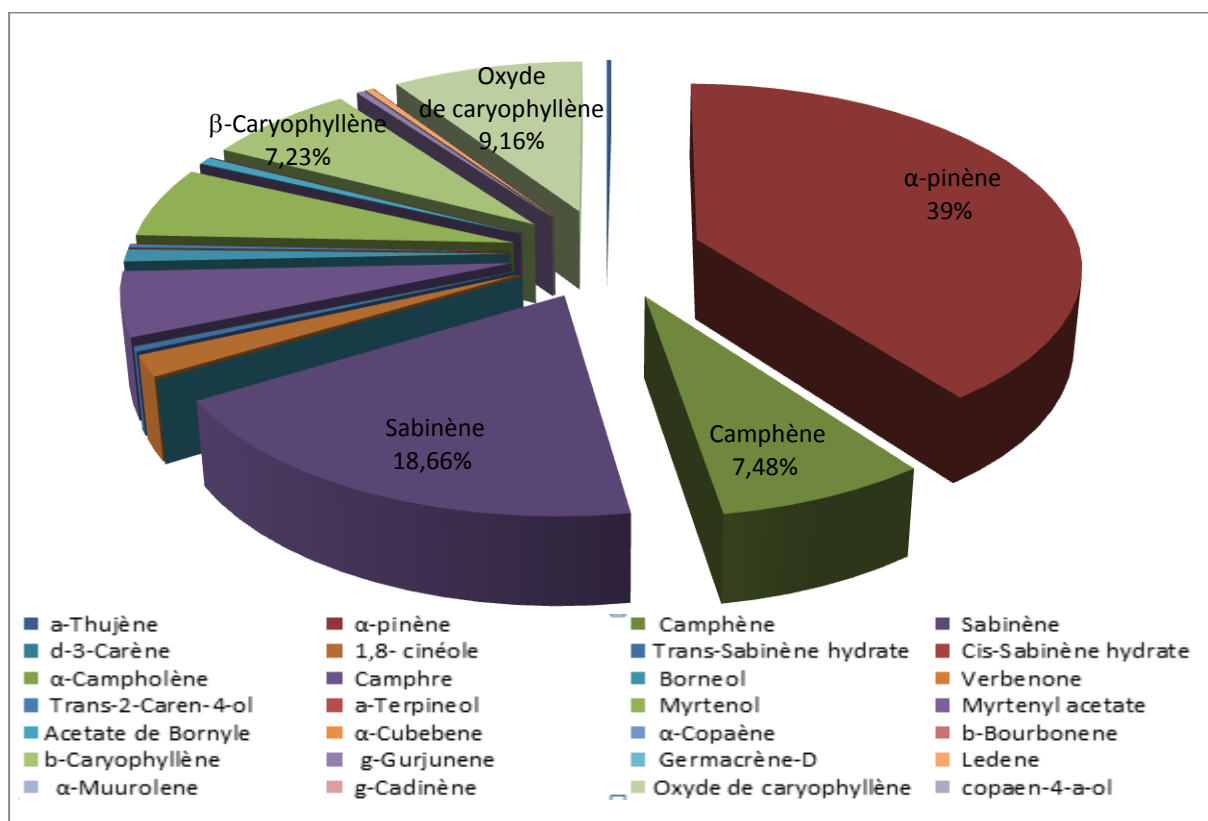


Figure 42 : Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 5)

II.6. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 6) de *R. officinalis* var. *Prostratus*

Les 97,48% de l'huile essentielle totale du Romarin de l'individu I6 sont réparties comme suit: 37,31% de l'α-Pinène comme produit majoritaire, suivi de Sabinène (18,03%), Myrtenol (9%), Camphène (7,27%), β-Caryophyllène (7,39%) et Oxyde de Caryophyllène (6,81%) (Tableau 11, Figure 43).

On remarque que cette huile est prédominée par les monoterpènes hydrocarbonés (64,77%) suivis par les monoterpènes oxygénés (18,12%). Les sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés, quant à eux, ne représentent que 7,78% et 6,81% respectivement.

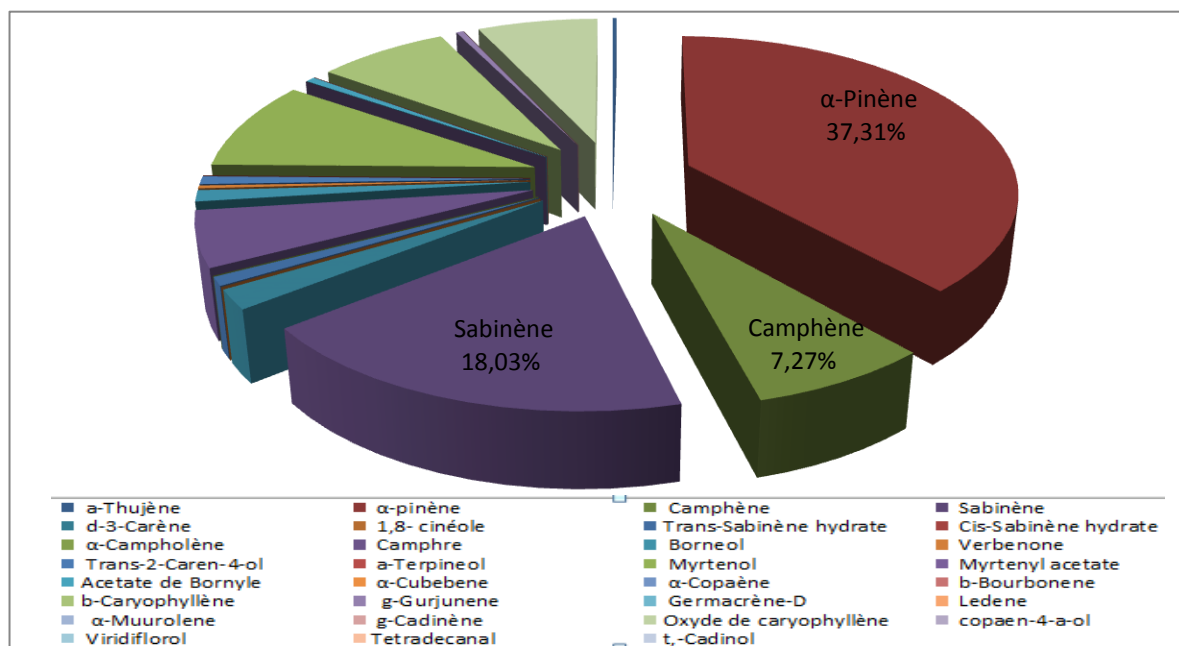


Figure 43 : Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 6)

II.7. Composition de l'huile essentielle de l'individu (I 7) de *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus*

L'analyse de l'huile essentielle de l'individu I 7 fait apparaître 15 produits avec un taux de 97,21% (Tableau 11, figure 44). Les monoterpènes oxygénés représentent 62,21% de la composition totale de l'huile suivis par les monoterpènes hydrocarbonés représentant 28,54% de la composition totale. Tandis que les sesquiterpènes oxygénés et hydrocarbonés ne représentent que 2,24% et 4,22% respectivement.

Le 1,8-Cinéole, produit majoritaire, représente 38,24% environ, l'α-Pinène représente 16,31% environ, le Camphre représente 14,81%, le Sabinène représente 8,64%. On note aussi la présence d'autres composés avec des pourcentages plus faibles tels que le Myrtenol (5,01%), l'Oxyde de Caryophyllène (4,22%) et le bornéol (2,84%).

Cet individu présente un profil chromatographique similaire à celui de l'huile essentielle de *R. officinalis* du Maroc. La présence de 1,8-Cinéole comme principal composé est un signe qui indique le profil phylogénétique de notre variété « *Prostratus* ». L'apport de l'espèce Officinal dans ce cas est très marqué.

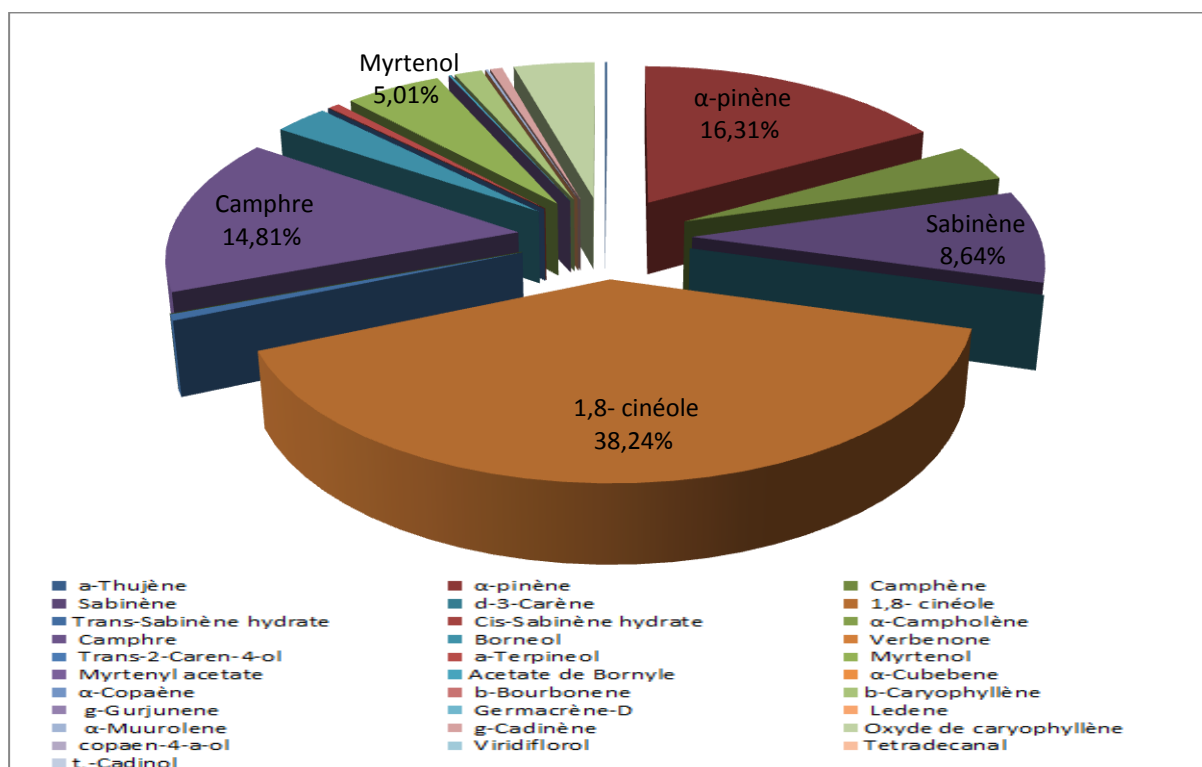


Figure 44 : Répartition en % des principaux composés de l'huile essentielle de l'individu (I 7)

III. Analyse en Composantes Principales (ACP)

Afin de comparer les profils de la composition chimique des huiles essentielles de sept individus choisis, de mettre en évidence la variabilité et de chercher les corrélations existantes entre les variables, nous avons utilisé la méthode d'analyse de données multidimensionnelles: l'Analyse en Composantes Principales (ACP). C'est une méthode descriptive qui permet d'extraire les composantes principales donnant le maximum d'informations. Elle décrit et classe les échantillons étudiés dans des espaces de dimensions plus réduites afin d'observer l'homogénéité ou l'hétérogénéité des individus et d'en connaître la cause. La représentation des données dans des espaces de faible dimension (deux dimensions dans notre cas) facilite considérablement l'analyse. Nous avons considéré chaque composé comme une variable quantitative à expliquer (Tableau 12).

Tableau 12: Composés de l'huile essentielle utilisée dans les analyses statistiques

var 1	α -Thujène	Var 16	Acétate de Myrtenol
Var 2	α -Pinène	Var 17	Acétate Bornyle
Var 3	Camphène	Var 18	α -Cubebène
Var 4	Sabinène	Var 19	α -Copaène
Var 5	δ -3-Carène	Var 20	β -Bourbonène
Var 6	1,8- Cinéole	Var 21	β -Caryophyllène
Var 7	Trans-Sabinène hydrate	Var 22	γ -Gurjunène
Var 8	Cis-Sabinène hydrate	Var 23	Germacrène-D
Var 9	α -Campholène	Var 24	Ledène
Var 10	Camphre	Var 25	α -Murolène
Var 11	Bornéol	Var 26	γ -Cadinène
Var 12	Verbenone	Var 27	Oxyde de Caryophyllène
Var 13	Trans-2-Carèn-4-ol	Var 28	copaén-4-a-ol
Var 14	α -Terpinéol	Var 29	Viridiflorol
Var 15	Myrtenol	Var 30	Tetradecanal
		Var 31	τ -Cadinol

III.1. Variabilité expliquée

Le Tableau 13 présente les pourcentages de la variabilité expliquée par chaque composante et les pourcentages cumulés. La représentation graphique de ces pourcentages est illustrée dans la figure 45.

Tableau 13: Pourcentage de la variabilité expliquée des données

Numéro de la composante	Pourcentage de variance expliquée	Pourcentage cumulé
1	51,31%	51,31%
2	42,28%	93,59%
3	3,68%	97,27%
4	1,59%	98,86%
5	0,98%	99,85%

Sur le graphe de la variance expliquée en fonction du nombre de composantes retenues (figure 45), nous notons que la première composante explique 51,31% de la variabilité des données ; alors que la deuxième explique 42,28%. Nous pouvons donc nous contenter de retenir ces deux composantes expliquant 93,59% de la totalité de la variabilité.

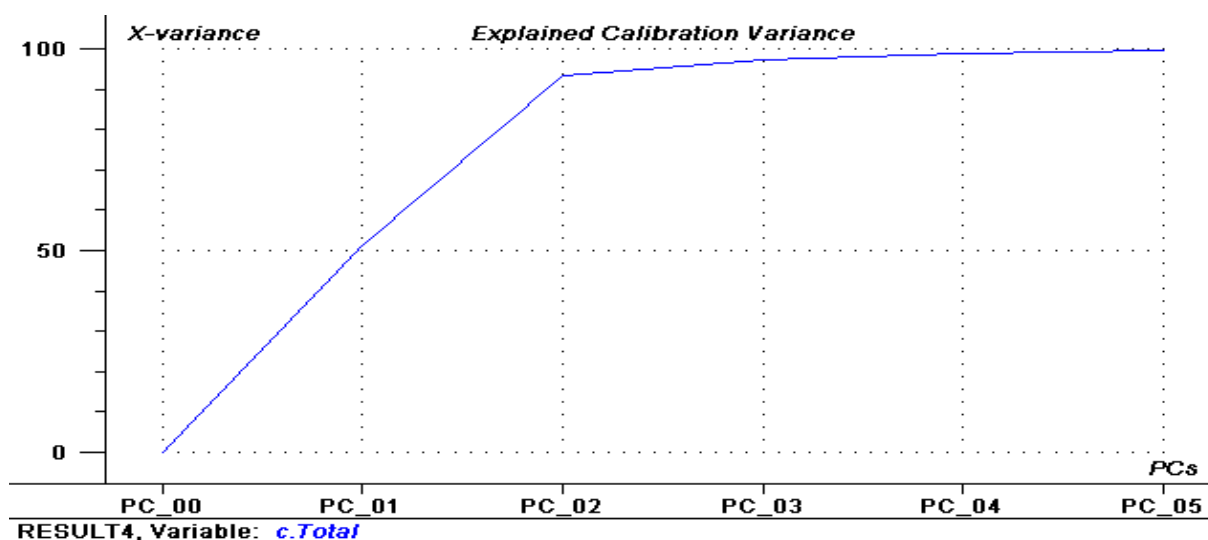


Figure 45 : Graphe de la variance expliquée en fonction du nombre de composantes retenues

III.2. Etude des variables

❖ Moyenne et écart type

L'examen statistique (moyenne et écart type) nous a permis de déterminer les variables ayant la plus grande variance (Figure 50).

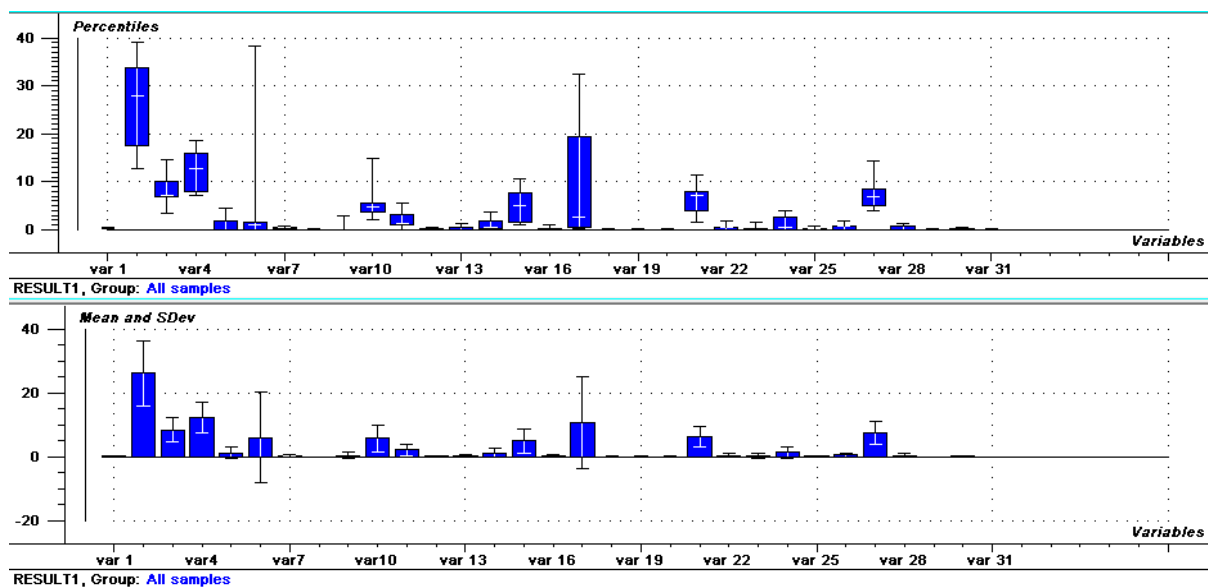


Figure 46: Graphe de la moyenne et écart type

La composition de l'huile essentielle des différents individus du *R. officinalis* var. *Prostratus* présente une différence notable, ainsi les composants identifiés montrent une grande

variabilité interspécifique (Figure 46). Le 1,8-Cinéole (Var 6) est le composant qui présente le plus de variation au sein des espèces, suivi d'Acétate de Bornyle (Var 17), d' α Pinène (Var 2), de Sabinène (Var 4), de Camphre (Var 10), de Myrtenol (Var 15), et de Camphène (Var 3). Les autres composants présentent peu de variabilité.

❖ Cercle des corrélations

Dans notre étude, nous pourrions déduire, de la Figure (47) représentant le cercle des corrélations des variables des huiles essentielles, que les axes PC1 et PC2 véhiculent respectivement 51% et 42% de l'information totale. Le cercle des corrélations est aussi utile pour interpréter la signification des axes. Cette représentation révèle l'existence de corrélation entre certaines variables étudiées telles que la corrélation entre le 1,8-Cinéole (var 6) et le Camphre (Var 10) ; entre l'Acétate de Bornyle (Var 17) et le β -Caryophyllène (Var 20); entre le Ledène (Var 24) et l' α -Thujène (Var 1), le Camphène (Var 3) et entre α -Pinène (Var 2) et Sabinène (Var 4).

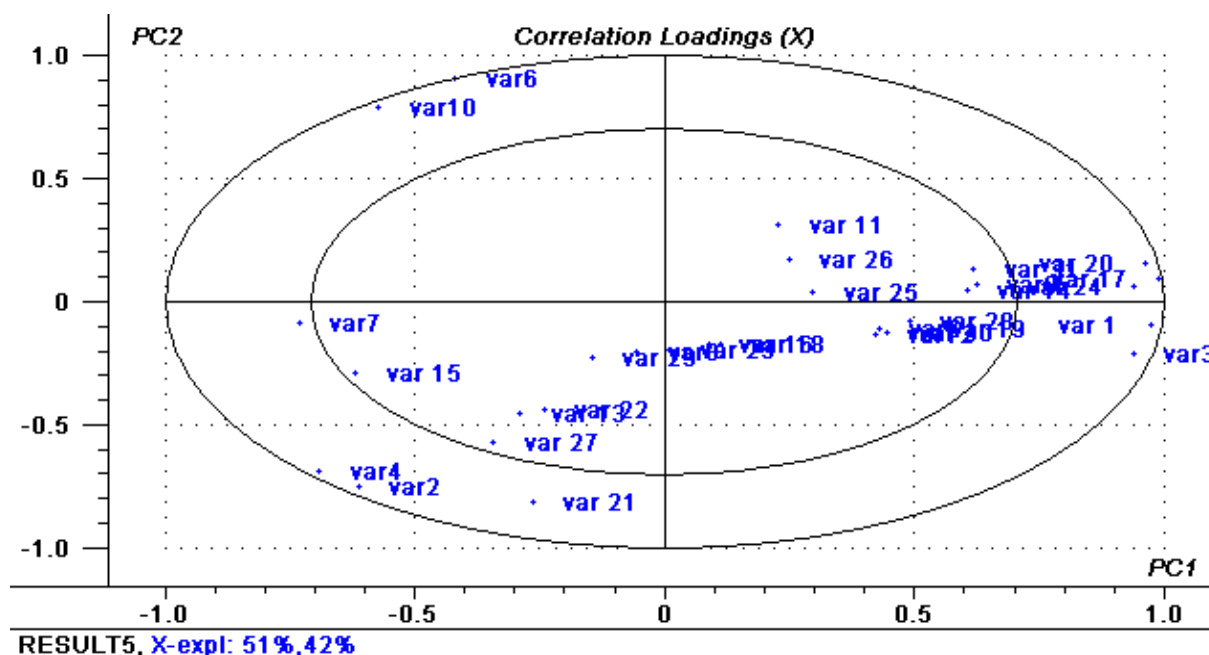


Figure 47 : Cercle des corrélations des variables des huiles essentielles

La partie positive de l'axe 1 est expliquée par la variable Acétate de Bornyle (Var 17); par contre la partie négative de l'axe est expliquée par les composés, α -Pinène (Var 2) et 1,8-Cinéole (Var 6). L' α -pinène (var 2) explique la partie négative de l'axe 2 aussi, alors que sa partie positive est expliquée par 1,8-Cinéole (Var 6).

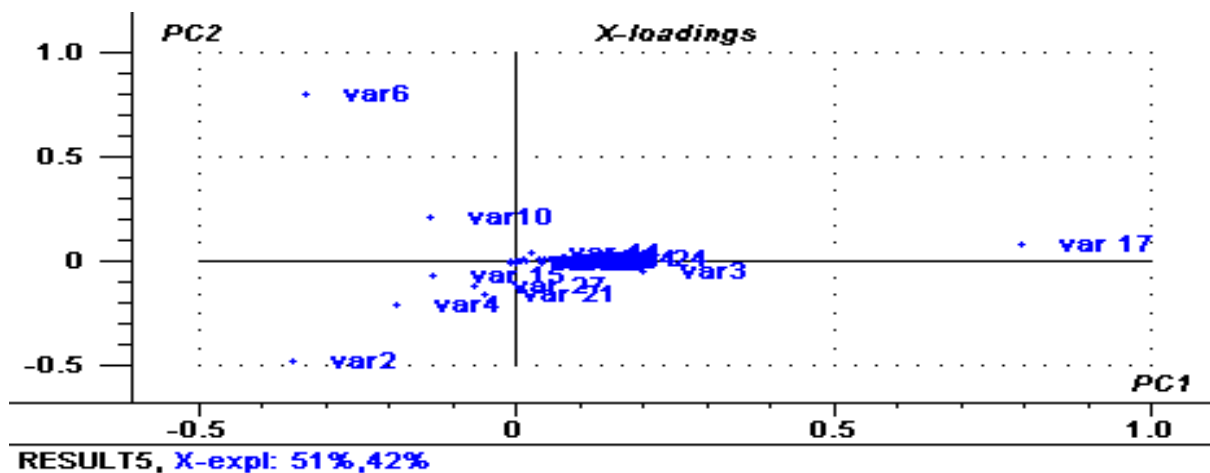


Figure 48: Graphe des variables

III.3. Etude des huiles essentielles des différents individus

Le graphe d'ellipse de hotelling montre bien qu'il n'y a pas d'individus atypiques.

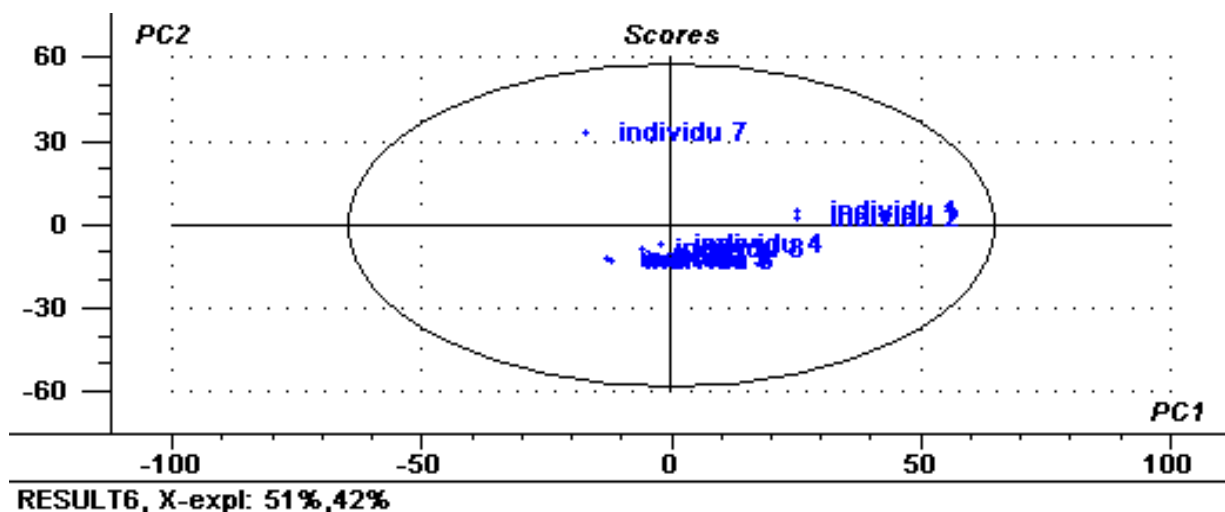


Figure 49: Graphe d'ellipse de hotelling

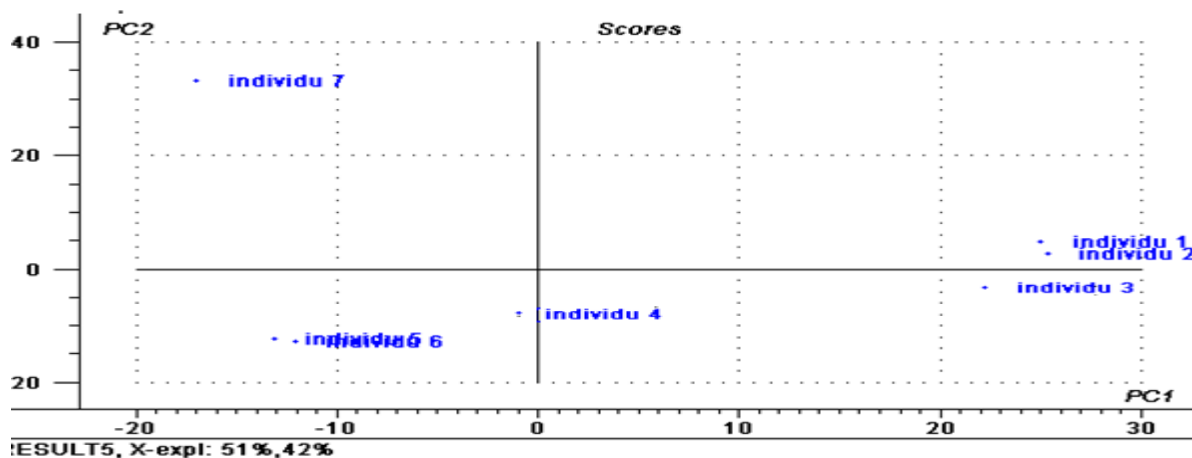


Figure 50: Graphe des individus

Les individus 1, 2 et 3 du Romarin sont localisés sur la partie positive de l'axe 1, ils sont caractérisés par l'Acétate de Bornyle (Var 17). Contrairement, les individus 5,6 et 7 sont localisés sur la partie négative de l'axe 1. Les individus 5 et 6 sont caractérisés par la présence de l' α -Pinène (Var 2) or l'individu 7 est caractérisé par le 1,8-Cineole (Var 6). L'axe 2 oppose l'individu 7 et les individus 5 et 6, sur sa partie positive on retrouve l'individu 7, alors que sur la partie négative on trouve les deux individus 5 et 6 qui sont caractérisés par la présence d' α -pinène (Var 2).

L'analyse en composantes principales a montré que la composition chimique varie en fonction des individus. La composition chimique des individus 1, 2 et 3 est presque similaire. Elle est caractérisée par la présence de l'Acétate de Bornyle (Var 17), les individus 5 et 6 ont aussi le même profil chimique et sont différents des autres individus. Ils sont caractérisés par la présence du myrténol avec des teneurs respectives de 10,54 et 6,8% et par la présence α -Pinène (Var 2). Les individus 4 et 7 ont des compositions différentes des autres individus, le dernier est caractérisé par la présence abondante de 1.8-Cinéole (Var 6) et contient une très faible concentration d'Acétate de Bornyle.

En général, la composition chimique varie en fonction des individus. D'où l'effet de l'individualité sur le profil chimique.

D'après ces résultats, les individus transplantés n'ont pas conservé tous, les qualités chimiques des huiles essentielles des populations naturelles sauf pour le cas de l'individu 1,2 et 3 qui ont conservé leur qualité chimique. Contrairement aux résultats de Fechtal et al., (2001) qui ont trouvé que les populations transplantées conservent la qualité chimique des huiles essentielles des population naturelles avec une légère diminution de la concentration de l' α et β -pinène et du camphre.

Par ailleurs aucune étude similaire, n'a été réalisée auparavant sur cette variété de romarin et sur l'effet de l'individualité.

IV. Etude de l'activité antibactérienne par la méthode de disque

Les résultats obtenus avec la méthode de disque sont représentés dans le tableau 14 qui décrivent la moyenne de diamètre de la zone d'inhibition (mm) en fonction des individus et des souches.

Tableau 14 : Effet antibactérien des huiles essentielles des 7 individus du *R. officinalis* var. *Prostratus* par la méthode de disque

Individu	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)*		
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. smegmatis</i>
1	6 ± 0	10,46 ± 0,5	7,16 ± 0,28
2	12,23 ± 0,41	19,5 ± 0,5	15,56 ± 0,3
3	13,16 ± 0,28	22,5 ± 0,5	19,1 ± 0,36
4	8,53 ± 0,05	14,33 ± 0,28	25,1 ± 0,85
5	17,1 ± 0,26	31,23 ± 0,92	46,5 ± 1,5
6	15 ± 0,2	24,6 ± 0,52	40,33 ± 0,35
7	17,1 ± 0,26	28,2 ± 0,19	49,46 ± 0,61

*Les résultats correspondent à la moyenne de trois répétitions

Dans le but de vérifier s'il y a des différences significatives entre les moyennes de diamètre d'inhibition pour les 7 niveaux différents des individus du *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* testés sur trois souches (*E. coli*, *B. subtilis* et *M. smegmatis*), on a utilisé l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur. Les résultats de ce test sont représentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Tableau d'Analyse de la Variance à un facteur

souche	Analyse de variance					
	Source	somme des carrées	Ddl	Carré moyen	F	probabilité
<i>E. coli</i>	Inter-groupes	190,91	6	31,81	321,25	0
	Intra-groupes	1,38	14	0,092		
<i>B. subtilis</i>	Inter-groupes	1330,22	6	221,704	809,7	0
	Intra-groupes	3,833	14	0,279		
<i>M. smegmatis</i>	Inter-groupes	4871,82	6	811,97	1502,32	0
	Intra-groupes	7,566	14	0,540476		

Ce tableau d'ANOVA décompose la variance en deux composants: un composant inter-groupes et un composant intra-groupes. Comme la valeur de la probabilité pour le test F est inférieure à 0,05, il y a une différence statistiquement significative entre les moyennes des diamètres d'inhibition d'un niveau d'un individu à un autre au niveau de confiance de 95,0% et ceci pour les trois souches utilisées.

Les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des sept individus de *R. officinalis var. Prostratus* ont révélé un pouvoir inhibiteur sur toutes les souches étudiées. Cette activité diffère d'un individu à l'autre. En effet, l'activité antibactérienne la plus élevée a été observée pour les individus 5 et 7 de *R. officinalis var. Prostratus* et l'activité la plus faible a été observée pour l'individu (I 1) (Tableau 14) et ceci pour les trois souches utilisées.

Pour les individus I 5 et I 7 la plus grande activité a été observée contre *M. smegmatis* avec des diamètres d'inhibition de 46,5 et 49,46 mm respectivement alors que l'activité la plus faible a été observée contre *E. coli* avec des diamètres d'inhibition de 17,1.

Les mêmes résultats ont été observés pour l'individu I 1. En effet, les diamètres des zones d'inhibition obtenus pour *M. smegmatis* sont plus élevés que ceux obtenus pour *B. subtilis* et *E. coli*. Ces diamètres sont 6; 10,46 et 7,16 mm pour *E. coli*, *B. subtilis* et *M. smegmatis*, respectivement.

Par la méthode de disque, on a montré que les individus I 5 et I 7 présentent un effet antibactérien plus élevé que les autres individus, ceci pourrait s'expliquer par la composition de l'huile essentielle de ces deux individus.

V. Détermination de la CMI

La CMI est mesurée par la zone d'inhibition. En fonction du diamètre de cette zone, la CMI est déterminée. Les résultats sont représentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : CMI des huiles essentielles du Romarin

Souches	CMI v/v						
	I 1	I 2	I 3	I 4	I 5	I 6	I 7
<i>E. coli</i>	0,5	0,25	0,25	0,25	0,2	0,25	0,2
<i>B. subtilis</i>	0,25	0,2	0,2	0,2	0,125	0,2	0,125
<i>M. smegmatis</i>	0,25	0,2	0,2	0,125	0,125	0,125	0,125

Les huiles essentielles ont montré un effet inhibiteur contre les micro-organismes étudiés. En effet, toutes les souches microbiennes ont été inhibées à la concentration de 1/4 v/v à l'exception l'individu 1 pour lequel les souches ne sont inhibées qu'à partir de 1/2 v/v.

Le micro-organisme le plus sensible à toutes les huiles essentielles est *M. smegmatis* dont la croissance a été arrêtée à la faible concentration de 1/8 v/v.

Les résultats ont aussi montré que les CMI des individus 5 et 7 sont les plus faibles par rapport aux autres individus et ceci pour *M. smegmatis*, *E. coli* et *B. subtilis*; alors que l'individu I 1 a présenté la plus grande CMI. Ceci montre que les huiles essentielles des individus 5 et 7 présentent des caractéristiques antibactériennes intéressantes sur les micro-organismes testés. Ces résultats sont en accord avec ceux de la méthode de disque.

La variation de la nature des constituants et leurs teneurs induit une variation de l'activité microbiologique. La présence d'un certain nombre de constituants dans la composition chimique favorise cette activité. En effet plusieurs études ont montré les propriétés antibactériennes de certains composés tels que : l' α -Pinène (Aligiannis et al., 2000 ; Martin et al., 2000), le 1,8-Cinéole (Prudent et al., 1993), le Camphre et ses dérivés (Felice et al., 2004; Tantaoui-Elaraki, 1993), Caryophyllène oxyde (Ulubelen et al., 1994), Bornéol (Felice et al., 2004). En plus, Magiatisa et al., (2002) ont constaté que l'Oxyde de Caryophyllène est le plus efficace, suivi du camphre et du 1,8-Cinéole.

L'huile des deux individus I 7 et I 5 atteste d'une activité antibactérienne importante surtout contre *M. smegmatis*. Cette activité pourrait principalement être due aux composés majoritaires.

La grande activité antibactérienne de l'individu I 7 peut être reliée à la présence de 1,8-Cinéole, de l' α -Pinène et du Camphre qui sont majoritaires. Dans le cas de l'individu I 5 cette inhibition est probablement due à la présence des constituants dominants dont le Sabinène, l'Oxyde de Caryophyllène et l' α -Pinène font partie. Ces composés sont en effet connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. Cependant, en général, l'effet de la synergie n'est pas à écarter.

VI. Conclusion

Cette partie du travail a été consacrée à la détermination et à la comparaison du rendement, de la composition chimique et des propriétés antibactériennes de l'huile essentielle extraite de sept individus du Romarin *var. Prostratus*. Cette étude a permis de faire une comparaison quantitative et qualitative entre les différents individus.

Les individus n°7 et n°5 sont les individus qui ont les meilleurs rendements 1,93% et 1,79% respectivement.

Les analyses chimiques, par CG et CG/SM, ont permis d'identifier plus de 97,21% des produits volatiles totaux de l'essence pour l'individu n° 7 et 98,43% pour l'individu n°5.

L'analyse en composante principale a montré que la composition chimique varie en fonction des individus.

L'étude de l'activité antibactérienne a montré que les huiles essentielles étudiées possèdent, in vitro, une activité inhibitrice importante sur les trois souches testées. Cette activité diffère d'un individu à l'autre. En effet, l'activité antibactérienne la plus élevée a été observée pour les individus 5 et 7 (La plus grande activité a été observée contre *M. smegmatis* avec des diamètres d'inhibition de 46.5 et 49.46 mm respectivement alors que l'activité la plus faible a été observée contre *E. coli* avec des diamètres d'inhibition de 7 et 8 mm respectivement).

Les composants majeurs comme, l' α -Pinène, le Camphre et le 1,8-Cinéole peuvent être responsables de la différenciation de l'activité antimicrobienne.

Les deux individus (5 et 7) peuvent être choisis pour une future multiplication végétative afin d'avoir des clones capables d'assurer une production standard. Cette production va assurer une huile essentielle source de cette activité très importante vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis*.

Chapitre V

Effet de l'individualité sur l'activité antibactérienne des extraits de *R. officinalis* *var. Prostratus* obtenus par les ultrasons

INTRODUCTION

L'émergence de nouvelles pathologies qui affectent et affaiblissent notre système immunitaire de manière excessive, ainsi que l'apparition de souches microbiennes de plus en plus résistantes et virulentes rendent la recherche de nouveaux agents antibactériens, plus qu'indispensable. Ces agents doivent être à la fois disponibles et moins toxiques comparés aux antibiotiques obtenus via la voie chimique.

Comme cité dans le chapitre précédent, le Maroc est reconnu par une diversification en plantes aromatiques et médicinales ayant une efficacité thérapeutique. Le *R. officinalis var. Prostratus* est parmi ces PAM qui sont menacées d'épuisement du fait de leur exploitation massive. C'est pour cette raison que la domestication et la culture de cette plante s'avèrent une solution nécessaire pour sa pérennité.

C'est dans cette optique que s'inscrit le présent travail qui concerne l'étude de l'effet de l'individualité sur les extraits de cette plante transplantée afin de sélectionner les meilleurs individus.

Notre travail cerne trois volets, à savoir :

- Une étude qualitative incluant l'évaluation de l'effet antibactérien des extraits de sept individus du *R.officinalis var. Prostratus*.
- Une étude quantitative permettant la détermination de la CMI de ces individus.
- Une étude phytochimique.

I. Rendement en extraits par sonication

Les extraits de l'hexane, d'acétate d'éthyle, de dichlorométhane et de méthanol obtenus par sonication ont été concentrés sous vide au évaporateur rotatif. Après filtration et évaporation du solvant sous vide, les extraits totaux ainsi obtenus sont pesés en vue d'évaluer leur rendement. Les valeurs obtenues sont regroupées dans le tableau n°17.

Tableau 17 : Rendement des extraits de *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* obtenus par les ultrasons

	Rendement en extraits			
	Hexane	Acétate d'éthyle	Dichlorométhane	Méthanol
Individu 1	8,8%	8,8%	4,1%	6,6%
Individu 2	7,5%	8,7%	4,8%	5,8%
Individu 3	7,8%	7,9%	6,8%	6,4%
Individu 4	9,3%	11,6%	4,4%	6,8%
Individu 5	6,7%	10,8%	3,5%	7,2%
Individu 6	9,2%	11,4%	4,5%	6,4%
Individu 7	9,8%	11,35%	5,2%	7,8%

Les sept individus du *Romarin Prostratus* ont fourni des rendements variant entre 6,7% et 9,8% pour l'extrait hexanique, entre 7,9 % et 11,6% pour l'extrait d'acétate d'éthyle, entre 3,5% et 6,8% pour l'extrait de dichlorométhane et entre 5,8% et 7,8% pour l'extrait méthanolique.

Ces résultats obtenus montrent que le meilleur rendement est obtenu avec l'extrait d'Acétate d'éthyle, avec un pourcentage variant de 7,9% jusqu'à 11,6%. Ceci peut être attribué au fait que la grande majorité des composés de cette plante sont solubles dans l'acétate d'éthyle.

Avec un pourcentage de 9,8%; 11,35 %; 5,2% et 7,8% pour l'extrait hexanique, d'acétate d'éthyle, de dichlorométhane et de méthanol respectivement, l'individu N°7 présente la teneur la plus élevée.

En général, les résultats obtenus, montrent que le rendement varie en fonction des individus et en fonction des extraits. D'où l'effet de l'individualité et de la nature du solvant sur le rendement.

Ces rendements sont proches de ceux cités dans la littérature. En effet, Balouiri et al., (2014) ont obtenu un rendement de 8,7% pour l'extrait du Romarin en utilisant les ultrasons.

En effet une étude menée par Fadil et al., (2015) a montré qu'il ya un effet de l'individualité sur le rendement.

II. Etude de l'activité antibactérienne par la méthode de disque

Les résultats de la méthode de disque pour les extraits obtenus par les ultras-sons sont présentés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Effet antibactérien des extraits de 7 individus du Romarin par la méthode de disque

Solvant		Souche		Individu 1	Individu 2	Individu 3	Individu 4	Individu 5	Individu 6	Individu 7
Diamètre (mm)*	Hexane	<i>E. coli</i>	Test	6,5±0,5	7,66±0,57	7,66±0,57	8,5±0,5	8,33±0,57	7,33±0,57	8,66±0,5
			Témoin	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0
		<i>B. subtilis</i>	Test	7,66 ±0,57	8,33 ±0,57	6,66 ±1,13	10,66 ±0,57	7,16 ±0,28	9,66 ±0,57	9,83 ±1,04
			Témoin	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0
		<i>M. smegmatis</i>	Test	7 ± 0,57	14,33 ± 0,57	15,33 ± 0,57	29,66±0,57	15,3 ± 0,57	16 ± 1	24,66 ± 1,15
			Témoin	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0	6,00 ± 0
	Acétate d'éthyle	<i>E. coli</i>	Test	9±1,0	11,33±0,57	15,66 ±0,57	18,66±0,57	16±1	14,33 ±0,57	17,33 ±0,57
			Témoin	6,33 ± 0,33	6,33 ± 0,33	6,33 ± 0,33	6,33 ± 0,33	6,33 ± 0,33	6,33 ± 0,33	6,33 ± 0,33
		<i>B. subtilis</i>	Test	10,66±0,57	17,33 ±0,57	15,66 ±1,15	24,33 ±1,52	15,66±0,57	18,33 ±1,15	28 ±1
			Témoin	7,2 ± 0,22	7,2 ± 0,22	7,2 ± 0,22	7,2 ± 0,22	7,2 ± 0,22	7,2 ± 0,22	7,2 ± 0,22
		<i>M. smegmatis</i>	Test	9,66 ± 0,66	14,33 ± 0,33	15,33 ± 0,33	29,66 ± 0,33	15,33 ± 0,33	16 ± 0,9	24,66±1,33
			Témoin	6,33± 0,22	6,33± 0,22	6,33± 0,22	6,33± 0,22	6,33± 0,22	6,33± 0,22	6,33± 0,22
	Dichlorométhane	<i>E. coli</i>	Test	9,33±0,33	8,33±0,57	11,33 ±0,57	12,33±0,57	9,33±0,57	9,66 ±0,57	14,33 ± 0,57
			Témoin	7,5±0,00	7,5±0,00	7,5±0,00	7,5±0,00	7,5±0,00	7,5±0,00	7,5±0,00
		<i>B. subtilis</i>	Test	11,33±0,57	10,66 ±0,33	12,33 ±0,33	16±0,57	11 ±0,8	14,33±0,33	19,33 ±0,33
			Témoin	8,33 ± 0,57	8,33 ± 0,57	8,33 ± 0,57	8,33 ± 0,57	8,33 ± 0,57	8,33 ± 0,57	8,33 ± 0,57
		<i>M. smegmatis</i>	Test	12,66±0,57	11,66±0,57	14,66 ±0,33	17,66±0,54	14±0	13,33±1,57	17,66 ±0,57
			Témoin	8,5±0,33	8,5±0,33	8,5±0,33	8,5±0,33	8,5±0,33	8,5±0,33	8,5±0,33
	Méthanol	<i>E. coli</i>	Test	6,66±0,57	8,33±0,57	9,33 ±0,57	9,83±0,25	7,12±0,28	8,33±0,57	10,33 ±0,57
			Témoin	7,3 ± 0,33	7,3 ± 0,33	7,3 ± 0,33	7,3 ± 0,33	7,3 ± 0,33	7,3 ± 0,33	7,3 ± 0,33
		<i>B. subtilis</i>	Test	9,46 ±0,56	11,33 ±0,22	9,35 ±0,54	16,35 ±0,33	12,43 ±0,22	12,6 ±0,54	18,2 ±0,33
			Témoin	8,3 ± 0,33	8,3 ± 0,33	8,3 ± 0,33	8,3 ± 0,33	8,3 ± 0,33	8,3 ± 0,33	8,3 ± 0,33
		<i>M. smegmatis</i>	Test	9,16 ± 0,28	12,33 ± 0,57	13,66 ± 0,57	13,66 ± 1,15	12,33 ± 0,57	10,33 ± 0,57	13,66±0,57
			Témoin	8,33± 0,22	8,33± 0,22	8,33± 0,22	8,33± 0,22	8,33± 0,22	8,33± 0,22	8,33± 0,22

Dans le but de vérifier s'il y a des différences significatives entre les moyennes de diamètre d'inhibition pour les 7 individus testés sur trois souches (*E. coli*, *B. subtilis* et *M. smegmatis*), on a utilisé l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur. Les résultats de ce test sont représentés dans le tableau 19.

Tableau 19: Tableau d'Analyse de la Variance à un facteur

Souche		Analyses de la Variance					
		Source de Variation	Somme des carrées	Ddl	Carré moyen	F	Probabilité
Extrait d'hexane	<i>E. coli</i>	Inter- groupes	10,9762	6	1,82937	5,91	0
		Intra-groupes	4,33333	14	0,309524		
	<i>B. subtilis</i>	Inter- groupes	40,9762	6	6,82937	12,47	0,0001
		Intra-groupes	7,66667	14	0,547619		
	<i>M. smegmatis</i>	Inter- groupes	873,905	6	145,651	219,62	0
		Intra-groupes	9,3333	14	0,666671		
Extrait d'Acétate d'éthyle	<i>E. coli</i>	Inter- groupes	207,619	6	34,6032	66,06	0
		Intra-groupes	7,33333	14	0,5238		
	<i>B. subtilis</i>	Inter- groupes	609,143	6	101,524	101,52	0
		Intra-groupes	14	14	1		
	<i>M. smegmatis</i>	Inter- groupes	57,5	6	9,583	197,071	0
		Intra-groupes	6,16667	14	0,44		
Extrait de Dichlorométhane	<i>E. coli</i>	Inter- groupes	32,9762	6	5,49603	11,54	0,0001
		Intra-groupes	6,66667	14	0,47619		
	<i>B. subtilis</i>	Inter- groupes	187,452	6	31,2421	72,90	0
		Intra-groupes	6,0	14	0,428571		
	<i>M. smegmatis</i>	Inter- groupes	57,5	6	9,583	21,76	0
		Intra-groupes	6,16667	14	0,444571		
Extrait de Méthanol	<i>E. coli</i>	Inter- groupes	65,9048	6	10,9841	23,07	0
		Intra-groupes	6,66667	14	0,47619		
	<i>B. subtilis</i>	Inter- groupes	183,81	6	30,6349	58,48	0
		Intra-groupes	3,833	14	0,279		
	<i>M. smegmatis</i>	Inter- groupes	99,2381	6	16,5397	23,16	0
		Intra-groupes	10,0 14	14	0,714286		

Ce tableau d'ANOVA décompose la variance en deux composants: un composant inter-groupes et un composant intra-groupes. Comme la valeur de la probabilité pour le test F est inférieure à 0,05, il y a une différence statistiquement significative entre les moyennes des diamètres d'inhibition d'un individu à l'autre, au niveau de confiance de 95,0% et ceci pour les trois souches utilisées. D'où l'effet de l'individualité sur l'activité antibactérienne.

Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré qu'à l'exception de l'extrait hexanique, les extraits des sept individus de *R. officinalis* var. *Prostratus* ont révélé un pouvoir inhibiteur sur toutes les souches étudiées. Cette activité diffère d'un individu à l'autre et d'un extrait à un autre .

En effet, l'extrait d'hexane ne permet pas l'extraction des composés bioactifs (diamètre de l'auréole d'inhibition significativement semblable à celui du témoin) alors que les trois autres solvants (dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol) ont permis l'extraction de substances à effet antibactérien qui se traduit par la formation d'auréoles d'inhibition autour des disques.

L'activité antibactérienne la plus élevée a été observée pour les extraits d'acétate d'éthyle du *R.officinalis* var.*Prostratus* suivi par les extraits de dichlorométhane et l'extrait méthanolique (Tableau 18; Figure 58) et ceci pour les trois souches utilisées.

En effet, Barros et al., (2007) et Hafsé et al., (2015) ont testé l'effet de différents extraits (hexane, acétate d'éthyle et méthanol) et ont montré que l'extrait de l'acétate d'éthyle possède l'effet inhibiteur le plus élevé par rapport aux autres extraits.

Ceci montre que les molécules responsables de l'activité de cette plante sont plus extractibles par l'acétate d'éthyle que par les autres solvants et qu'elles sont de polarité moyenne, étant donné que ce solvant permet l'extraction de composés moyennement polaires (Derbel et al., 2010).

Plusieurs travaux antérieurs ont montré que les extraits obtenus par l'acétate d'éthyle de plusieurs plantes y compris le Romarin possèdent un effet contre des bactéries pathogènes et aussi contre *M. smegmatis*, (Hafsé et al., 2015; Balouiri et al., 2014; Barros et al., 2007).

L'analyse statistique des résultats a montré que les extraits d'acétate d'éthyle de l'individu 4 et 7 ont donné le meilleur résultat avec une zone d'inhibition moyenne de 29,66 et de 24,66 pour *M. smegmatis*, de 24,33 et 28 pour *B. subtilis*, de 18,66 et 17,33 pour *E. coli*.

III. Détermination de la CMI

Les résultats de la concentration minimale d'Inhibition sont représentés dans le tableau 20 .

Tableau 20: Concentration Minimale d'Inhibition (CMI), des extraits d'acétate d'éthyle des différents individus du *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus*.

	<i>E. coli</i> (mg/mL)	<i>B. subtilis</i> (mg/mL)	<i>M. smegmatis</i> (mg/mL)
Individu 1	8,01	6,6	5,18
Individu 2	6,6	5,18	5,18
Individu 3	5,18	5,18	5,18
Individu 4	3,77	3,77	2,35
Individu 5	5,18	6,6	5,18
Individu 6	5,18	6,6	5,18
Individu 7	3,77	2,35	3,77

Les extraits d'acétate d'éthyle des différents individus du romarin, se sont révélés actifs envers toutes les souches bactériennes testées par la méthode de disque mais avec des degrés différents, ce qui s'est traduit par la différence des CMI.

Ces extraits inhibent la croissance des bactéries avec des valeurs de la CMI qui varient entre (3,77 et 8,01 mg de résidus/mL) pour *E. coli*, entre (2,35 et 6,6 mg/mL) pour *B. subtilis* et entre (2,35 et 5,18 mg/mL) pour *M. smegmatis*.

En effet, toutes les souches microbiennes ont été inhibées à la concentration de 5,18 mg/mL à l'exception de l'individu 1 où les souches *E. coli* et *B. subtilis* ne sont inhibées qu'à partir de 6,6 mg/mL.

Le micro-organisme le plus sensible à tous les extraits est *M. smegmatis* dont la croissance a été arrêtée à la faible concentration de 5,18 mg/mL.

Les résultats ont aussi montré que les CMI des individus 4 et 7 sont les plus faibles par rapport aux autres individus et ceci pour *M. smegmatis*, *E. coli* et *B. subtilis*; alors que

l'individu 1 a présenté la plus grande CMI. Ceci montre que les extraits des individus 4 et 7 présentent des caractéristiques antibactériennes intéressantes sur les micro-organismes testés. Ces résultats concordent avec ceux de la méthode de disque.

IV. Screening Phytochimique

Les tests de révélation des polyphénols, des flavonoïdes, des tannins et des alcaloïdes ont été réalisés sur les sept individus sélectionnés. Le mode opératoire a été décrit au chapitre matériel et méthodes. Les résultats de ce screening phytochimique sont regroupés dans le tableau 21.

Les résultats se sont révélés négatifs pour ce qui est des alcaloïdes et par contre positifs pour ce qui est des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins (Tableau 21). Selon Gonzalez-Trujano et al., (2007), le criblage phytochimique de l'extrait des parties aériennes du Romarin indique la présence des flavonoïdes et des tannins.

L'étude phytochimique effectuée sur les différents individus montre une légère différence de la composition chimique de ces derniers. On peut céder cette différence aux facteurs influençant la composition des plantes comme les facteurs génétiques (Bekkara et al., 2007), la croissance de ses organes (al-Ramamneh., 2009), le stade de développement des organes de la plante (ontogénèse des feuilles, fleurs et fruits) (Ozguven et Tansi., 1998) et les conditions climatiques et édaphiques de chaque région (Khia et al., 2014).

Tableau 21 : Caractérisation phytochimique des extraits de *R. officinalis* var. *Prostratus*

individus	extraits	Groupes chimiques			
		Polyphénols	Flavonoïdes	Tannins	Alcaloïdes
Individu 1	Hexane	-	-	-	-
	Acétate d'éthyle	++	+++	++	-
	Dichlorométhane	++	++	+	-
	Méthanol	++	++	+	-
Individu 2	Hexane	-	-	-	-
	Acétate d'éthyle	++	+++	++	-
	Dichlorométhane	++	++	+	-
	Méthanol	++	++	+	-
Individu 3	Hexane	-	-	-	-
	Acétate d'éthyle	++	+++	++	-
	Dichlorométhane	++	++	+	-
	Méthanol	++	++	+	-
Individu 4	Hexane	-	-	-	-
	Acétate d'éthyle	+++	+++	+++	-
	Dichlorométhane	++	++	+	-
	Méthanol	++	++	+	-
Individu 5	Hexane	-	-	-	-
	Acétate d'éthyle	+++	+++	++	-
	Dichlorométhane	++	++	+	-
	Méthanol	++	++	+	-
Individu 6	Hexane	-	-	-	-
	Acétate d'éthyle	+++	+++	++	-
	Dichlorométhane	++	++	+	-
	Méthanol	++	++	+	-
Individu 7	Hexane	-	-	-	-
	Acétate d'éthyle	+++	+++	+++	-
	Dichlorométhane	++	++	+	-
	Méthanol	++	++	+	-

Présence des composés: (+++) = important; (++) = moyen ;(+) = faible ; (-) = absent

On remarque que les flavonoïdes et les tannins sont présents en grande quantité dans l'extrait d'acétate d'éthyle des individus 4 et 7. On a déjà constaté que l'extrait d'acétate d'éthyle présente le meilleur effet antibactérien. Cette activité pourrait donc être due à la présence des flavonoïdes et des tanins dans ces extraits. En effet, selon Elâgoun, (2003) l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes .

Les flavonoïdes jouent des rôles très importants dans la survie des plantes. Ils les protègent contre le stress hydrique et génèrent une tolérance des plantes aux métaux lourds présents

dans les sols. En plus, les flavonoïdes possèdent plusieurs effets pharmacologiques (El-Sakka et al., 2010); ils augmentent la solidité des capillaires (vierling, 2003) et protègent les aliments d'origine végétale de l'oxydation (Jennan et al., 2014). Ce sont des antioxydants réputés pour leur action anti radriculaire (Sim et al., 2007). Ils possèdent aussi des activités antivirales, spasmodiques, anti-inflammatoires et cytotoxiques (Bernard et al., 1997).

Plusieurs études ont été menées concernant l'activité biologique des flavonoïdes d'autres plantes, et ont montré que ces molécules sont dotées d'un effet antibactérien (Hernandez et al., 2000; Schinor et al., 2007), et d'un effet antimycobactérien (Kuete et al., 2010; Koysomboon et al., 2006; Kuete et al., 2008; Okunade et al., 2004; Newton et al., 2000). D'où l'importance de relier la présence de tels métabolites à l'activité antibactérienne du *Romarin*.

On note aussi la présence des tanins. Ces molécules sont dotées d'activités antibactériennes comme le montrent plusieurs travaux tels que ceux de Mahamat (1999) et Bassene (1995). Selon Iserin (2001), les tanins permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections.

V. Conclusion

La partie de ce travail a été consacrée à la détermination et à la comparaison du rendement, des activités antibactériennes des extraits hexaniques, d'acétate d'éthyle, de dichlorométhane et de méthanol ainsi qu'à l'étude phytochimique de sept individus du *R. officinalis* var. *Prostratus*.

L'étude statistique montre qu'il y'a un effet de l'individualité sur le rendement et sur l'activité antibactérienne des extraits de *R.Officinalis* var. *Prostratus* obtenus par les ultrasons au niveau de confiance de 95,0%.

L'étude phytochimique montre que les flavonoïdes et les tannins sont présents en grande quantité dans l'extrait d'acétate d'éthyle et surtout dans les individus 4 et 7.

Les résultats de l'activité antibactérienne montrent qu'à l'exception de l'extrait hexanique, les extraits présentent, in vitro, une activité inhibitrice importante sur les trois souches testées. Cette activité diffère d'un individu à l'autre et d'un extrait à l'autre (Les extraits d'acétate d'éthyle de l'individu 4 et 7 ont donné le meilleur résultat avec une zone d'inhibition

moyenne de 28,5mm et de 23,7 mm pour *M. smegmatis*, de 24,33 et 18,33 pour *B. subtilis* ainsi de 18,66 et 17,33 pour *E. coli*. Les flavonoïdes et les tannins peuvent être responsables de la différenciation de l'activité antimicrobienne.

L'étude quantitative (CMI) a confirmé les résultats de l'étude qualitative et a montré que les extraits d'acétate d'éthyle de l'individu 4 et 7 sont dotés des effets antibactériens les plus élevés.

Tous les résultats ont montré que les extraits d'acétate d'éthyle de l'individu 4 et 7 ont donné le meilleur rendement et la meilleure activité contre les souches testées surtout *M. smegmatis*. Aussi l'analyse phytochimique a montré que les flavonoides et les tannins sont présents en grande quantité dans ces extraits de *R. officinalis* var. *Prostratus*.

Ces deux individus (4 et 7) peuvent être choisis pour une future multiplication végétative afin d'avoir des clones capables d'assurer une production standard. Cette production va assurer des extraits source de cette activité très importante vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis* et vis-à-vis des autres souches testées.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les plantes aromatiques et médicinales constituent une richesse naturelle de première importance au Maroc. Elles représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs qui seront dans plusieurs domaines les solutions de demain. Ces plantes sont des sources de revenus non négligeables pour la population rurale d'où la nécessité de les préserver et de les valoriser.

Cependant, la gestion et la conservation de ce patrimoine se trouvent confrontées à des contraintes diverses qui contribuent à la dégradation de ces ressources comme les conditions climatiques, l'exploitation irrationnelle, le niveau et la fréquence des coupes inadéquats ainsi que la méconnaissance des potentialités réelles de production.

C'est dans ce contexte que cette étude a été réalisée tout en insistant sur la valorisation du patrimoine naturel marocain, principalement les plantes aromatiques et médicinales et plus précisément le Romarin.

Dans le premier chapitre de ce travail, nous nous sommes intéressés à déterminer et comparer les rendements en huile essentielle, la qualité chimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne de ces essences du *Rosmarinus officinalis* de quatre provenances (Jardin de Jacky d'Agadir, Sefrou, Oued Laou et l'Ayoune Charquia).

Nous avons trouvé que les rendements moyens obtenus, varient en fonction des quatre provenances. En effet, les échantillons du Romarin de la provenance de Sefrou ont donné un meilleur rendement en huile essentielle (2,4%) par rapport à ceux de l'Ayoune Charquia, de Oued Laou et de Jardin de Jacky d'Agadir, avec respectivement des teneurs de 1,8%; 1,9% et 1,45%.

Nous avons également déterminé la composition chimique des HE étudiées en nous basant sur les résultats du couplage GC-MS. Ces résultats ont montré une variabilité chimique très intéressante au sein des huiles essentielles étudiées associée à leurs origines. Les composés majoritaires sont:

- α -Pinène (36,15%), 1,8-Cinéole (33,93%), Camphène (6,1%), Camphre (5,08%) et Sabinène (3,4%) pour le Romarin du Jardin de Jacky d'Agadir.
- Bornyle Acétate (31,21%), α -pinène (15,79%), camphène (13,06%), Sabinène (7,11%), δ , 3-Carène (4,54%), Oxyde de Caryophyllène (4,71%), β -Caryophyllène (4,09%),

Conclusion générale

Bornéol (3,59%), Acétate de l' α -Terpinenyl (2,88%) pour le Romarin de la région de Oued Laou.

- Le Camphre (22,1%), 1,8-Cinéole (18,35%), α -Pinène (12,19%), Camphène (6,81%), Oxyde Caryophyllène (6.3%), β -Myrcène (5,1%) pour le Romarin de la région de Sefrou.
- 1,8-Cinéole (35,91%), l' α -Pinène (16,61%), Camphène (13,67%), Camphre (6,4%), Sabinène (6,04%), Bornéol (4,84%), Oxyde de Caryophyllène (3,8%), β -caryophyllène (2%) pour le Romarin de l'Ayoune Charquia.

L'étude statistique descriptive et comparative de la composition chimique du Romarin des différentes régions par la méthode d'analyse en composantes principales a montré une bonne classification des huiles essentielles du Romarin des différentes régions selon la composition chimique. De ce fait, ces huiles peuvent être classées en fonction de leur chémotype. On trouve le Romarin à 1,8-Cinéole dans la région l'Ayoune Chaquia, le Romarin à camphre dans la région Sefrou, le Romarin à α -Pinène dans la région d'Agadir et le Romarin à Acétate de Bornyle dans la région Oued Laou.

Les différentes huiles étudiées ont fait l'objet d'une évaluation de l'activité antibactérienne. Les résultats obtenus montrent que ces essences possèdent des pouvoirs antibactériens intéressants sur toutes les souches étudiées. Cette activité diffère d'une région à l'autre statistiquement. En effet, l'activité antibactérienne la plus élevée a été observée pour le Romarin de la région de Sefrou (des halos de $15,66 \pm 0,57$ et $30,33 \pm 2,08$ pour la bactérie *E. coli* et *B. subtilis* respectivement et de 37 ± 1 mm pour *M. smegmatis*) et l'activité la plus faible a été observée pour le Romarin de la région d'Agadir et ceci pour les trois souches utilisées.

Le deuxième chapitre de ce travail a été consacré à l'étude de l'effet de l'individualité sur la teneur, la composition chimique et l'activité antibactérienne des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* provenant d'Oued Laou, qu'on a cultivé dans le jardin expérimental de l'INPMA.

Cette étude a permis de faire une comparaison quantitative et qualitative entre sept individus.

L'analyse en composante principale a montré que la composition chimique varie en fonction des individus.

Conclusion générale

L'individu I 7 et I 5 sont les individus qui ont le meilleur rendement 1,93% et 1,79% respectivement.

Les analyses chimiques, par CG-SM, ont permis d'identifier plus de 97,21% des produits volatiles totaux de l'essence pour l'individu I 7 et 98,43% pour l'individu I 5.

L'étude de l'activité antibactérienne a montré que les huiles essentielles étudiées possèdent, *in vitro*, une activité inhibitrice importante sur les trois souches testées. Cette activité diffère d'un individu à l'autre. En effet, l'activité antibactérienne la plus élevée a été observée pour les individus 5 et 7 (La plus grande activité a été observée contre *M. smegmatis* avec des diamètres d'inhibition de 46.5 et 49.46 mm respectivement alors que l'activité la plus faible a été observée contre *E. coli* avec des diamètres d'inhibition de 7 et 8 mm respectivement).

Les composants majeurs comme, l' α -Pinène, le Camphre et le 1,8-Cinéole peuvent être responsables de la différenciation de l'activité antimicrobienne.

Les deux individus (5 et 7) peuvent être choisis pour une future multiplication végétative afin d'avoir des clones capables d'assurer une production standard. Cette production va assurer une huile essentielle source de cette activité très importante vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis*.

Le troisième chapitre avait pour ambition scientifique, l'étude de l'effet de l'individualité sur le rendement et l'activité antibactérienne réalisée cette fois-ci pour les extraits fixes de *R. officinalis var. Prostratus* obtenus par les ultrasons ainsi que l'étude phytochimique.

L'étude statistique montre qu'il y a un effet de l'individualité sur le rendement et l'activité antibactérienne des extraits de *R. officinalis var. Prostratus* obtenus par les ultrasons au niveau de confiance de 95,0%.

L'étude phytochimique montre que les flavonoïdes et les tannins sont présents en grande quantité dans l'extrait d'acétate d'éthyle et surtout dans les individus 4 et 7.

Les résultats de l'activité antibactérienne montrent qu'à l'exception de l'extrait hexanique, les extraits présentent, *in vitro*, une activité inhibitrice importante sur les trois souches testées. Cette activité diffère d'un individu à l'autre et d'un extrait à l'autre (Les extraits d'acétate d'éthyle de l'individu 4 et 7 ont donné le meilleur résultat avec une zone d'inhibition moyenne de 28.5 et de 23.7 pour *M. smegmatis*, de 24.33 et 18.33 pour *B. subtilis* ainsi de

Conclusion générale

18.66 et 17.33 pour *E. coli*. Les flavonoïdes et les tannins peuvent être responsables de la différenciation de l'activité antimicrobienne.

L'étude quantitative (CMI) a confirmé les résultats de l'étude qualitative et a montré que les extraits d'acétate d'éthyle des individus 4 et 7 sont dotés des effets antibactériens les plus élevés.

Tous les résultats ont montré que les extraits d'acétate d'éthyle de l'individu 4 et 7 ont donné le meilleur rendement et les meilleures activités contre les souches testées surtout *M. smegmatis*. Aussi l'analyse phytochimique a montré que les flavonoïdes et les tannins sont présents en grande quantité dans ces extraits de *R. officinalis var. Prostratus*.

Ces deux individus (4 et 7) peuvent être choisis pour une future multiplication végétative afin d'avoir des clones capables d'assurer une production standard. Cette production va assurer des extraits source de cette activité très importante vis-à-vis de *Mycobacterium tuberculosis* et vis-à-vis des autres souches testées.

Les études effectuées dans le cadre de cette thèse ont abordé plusieurs domaines : culture, domestication, l'extraction des huiles essentielles, extraction des extraits fixes par sonication, la détermination des rendements et des profils chimiques des huiles essentielles ainsi que la mise en évidence de l'activité antibactérienne des huiles et des extraits de plantes. Ces résultats ouvrent plusieurs perspectives pour compléter ce travail, dont certaines seraient comme suit :

- La multiplication et le clonage de cette espèce par objectif, selon la demande des utilisateurs.
- La réalisation d'autres activités biologiques telles que les pouvoirs antioxydant et anti-inflammatoire.
- La réalisation des formulations à partir des extraits obtenus par l'acétate d'éthyle, doté d'une activité antimycobactérienne.

Références

Références

A

Abdoulhousen. (1990). Romarin officinal, *Rosmarinus officinalis* L.(Lamiaceae). Thèse de doctorat. IRAN.

Abuzeid, Kalsum, Koshy, Larsson, Glader, Andersson, Raffetseder, Pienaar, Eklund, Alhassan, AlGadir, Koko, Schön, Mesaik A., Abdalla, Khalid, Lerm. (2014). Antimycobacterial activity of selected medicinal plants traditionally used in Sudan to treat infectious diseases. *J. Ethnopharmacol.* 157: 134-9.

Adams, R. P.(1995). Identification of essential oil components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy. Allured Stream, IL.

Adams R. P. (2001). Identification of essential oils components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Co, Carol Stream, IL, USA, Allured Stream, IL. 456.

Alcaraz L. E., Blanco S. E., Puig O. N., Tomas F., Ferretti F. H. (2000). Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Theor. Biol.*, 205: 231-240.

Aliyiannis N., Kalpoutzakis E., Chinou I. B., Mitakou S., Gikas E., Tsaibopoulos A. (2000). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. *J. Agric. Food Chem*, 49: 811-815.

Al-Ramamneh M., Al-Dein E. (2009). Plant growth strategies of *Thymus vulgaris* L. in response to population density. *Ind Crop Prod.* 30: 389–394.

Al-Sereiti M. R., Abu-Amer K. M., Sen P. (1999). Pharmacology of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J. Exp Biol*, 37(2): 124-130.

Amponsah K., O.R., Crensil G. T., Odamten W., Ofusohene-Djan. (2002). Manual for the propagation of medicinal plants of Ghana. Darwin initiative 32.

Références

Angenot M., Caprasse M., Coune C., Tits M. (1981). *Se soigner par les plantes*. Ed. De l'association des consommateurs. Bruxelles.

AQEL M. B. (1991). Relaxant effect of the volatile oil of *Rosmarinus officinalis* on tracheal smooth muscle. *J. Ethnopharm.* 33: 57- 62.

Arima H. et Danno G. (2002). Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava L.*) and their structural elucidation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 : 1727–30.

Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P. (1995). *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, Masson, Paris.

Aruoma O. I., Halliwell B., Aeschbach R., Lööggers J. (1992). Antioxidant and prooxidant properties of active Rosemary constituents: Carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, 22: 257 – 268.

Aruoma O. I., Spencer J. P., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A., Butler J., Halliwell B. (1996). An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of Rosmary and provençal herb. *Food Chem. Toxicol.* 34 (5): 449-456.

Ayadi S., Jerribi C., Abderrebba M. (2011). Extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* cueillie dans trois régions différentes de la Tunisie. *J Soc Alger Chim* 21(1): 25–33.

B

Bagamboula C. F., Uyttendaele M., Debevere J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *Food Microbiol.* 21: 33– 42.

Bakirel T., Bakirel U., Ustuner Keles O., Gunes Ulgen S., Yardibi, H. (2008). In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 116: 64-73.

Références

- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Zhiri A., Idaomar M. (2005). Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, 585: 1–13.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils- A review. *Food chem. Toxicol.* 46: 446-475.
- Baldwin I. T., Halitschke R., Paschold A., Von Dahl C. C., Preston C. A. (2006). Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: Talking Trees in the Genomics Era. *Science*, 311(5762): 812-815.
- Balouiri M., Sadiki M., Ouedrhiri W., Farah A., Abed S., Ibsouda S. (2014). Antibacterial activity of extracts from *Salvia officinalis* and *Rosmarinus officinalis* obtained by sonication and maceration method. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6(2): 0975-1491.
- Barros L., Oliveira S., Carvalho A. M., I.C.F.R. Ferreira. (2010). In vitro antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Ind. Crop. Prod.* 32: 572-579.
- Bassene E., Mahamat B., Lom C., Boye S., Faye B. (1995). Comparaison de l'activité antibactérienne de trois Combretaceae: *C. micranthum*, *Guiera senegalensis* et *Terminalia avicennioides*. *Fitoterapia.* 66(1): 86-87.
- Basile A., Sorbo S., Giordano S., Ricciardi L., Ferrara S., Montesano D., Cobianchi R. C., Vuotto M. L., Ferraro L. (2000). Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. *Fitoterapia, Milano*, 71: 110-116.
- Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45(4): 493-496.
- Bayoub K., Baibai T., Mountassif D., Retmane A., Soukri A. (2010). Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *Afr. J. Biotechnol.*, 9 (27): 4251-4258.
- Bedrossian, (1999). Le romarin: analyse chromatographique de l'huile essentielle. Thèse de doctorat.

Références

- Békro Y. A., Békro J. A. M., Boua B. B., Tra B. F. H., Ehilé E. E. (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend et Zarucchi (Caesalpiniaceae). Rev. Sci. Nat. 4 (2) :217-225.
- Bekkara F., Bousmaha L., Taleb Bendiab S. A., 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. Biologie & Santé. 7 : 1.
- Bellakhdar, J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Saint-Etienne.
- Bellakhdar J. (2006). Plantes médicinales au Maghreb et soins de base précis de phytothérapie moderne. In: Le Fennec (ed). Tela Botanica, Casablanca. 386.
- Belyagoubi L., (2006). Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid. 110.
- Benabid A. (2000). Flore et écosystèmes du Maroc, Evaluation et préservation de la biodiversité. Edition Ibis press, Paris, France : 159-61.
- Benchaâbane A., abbad A. (1997). Les plantes médicinales commercialisées à Marrakech. Ed. Info, Marrakech, 74.
- Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J. M., Bernardini J.F., Costa J. (2007). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. Food Chem. 106: 132-139.
- Benhabiles N. E. H. H., Aït-Amar. (2001). Comparative study of Algeria's *Rosmarinus eriocalys* and *R. officinalis*. Perfumer & Flavorist. 26 (5): 40-48.
- Benjilali B. (2005). Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Huiles essentielles : de la plantes à la commercialisation-manuel pratique. Corporation Laselve : 17- 59.

Références

- Benjlali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaili-Alaoui M., Ayadi A. (1986). Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes Méd Phytother* 20: 155–167.
- Bernath B., Danos E., Hethelyi, Herba Hung (1991). Variation in essential oil spectrum of *Salvia species* affected by environment. *Herba Hung.*30: 35-46.
- Bernard F. X., Sable S., Cameron B. (1997). Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 992–998.
- Besombes. (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat, Université de la Rochelle.
- Beta T., Nam S., Dexter J.E., Sapirstein H. D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled ulreat and roller-milled fractions. *Cereal Chem.* 60: 390 -393
- Betts T. J. (2001). Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *J. Chromatogr. A.* 936: 33–46.
- Bhat S. V., Nagasampagi B. A., Sivakumar M. (2005). *Chemistry of Natural Products*. Narosa, New Delhi, India. 4: 237.
- Biesaga M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *J. Chromatogr. A.* 1218: 2505–2512
- Bnouham M., Mekhfi H., Legssyer A., Ziyat A. (2002). Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int J Diabetes & Metabolism.* 10 (33): 50 33.
- Bnouham M., Merhfour FZ., Legssyer A., Mekhfi H., Maâllem S., Ziyat A. (2007). Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsuta*. *Pharmazie.* 62(8): 630-632.
- Bonjar G. H. S. (2004). Inhibition of Clotrimazole-resistant *Candida albicans* by plants used in Iranian folkloric. *Fitoterapia.* 75(1): 74-76.

Références

Bouchnnet S., Libong D. (2002). Le couplage chromatographique en phase gazeuse-spectrométrie de masse ; Département de Chimie, laboratoire des Mécanismes Réactionnels. Ecole Polytechnique, PALAISEAU Cedex.

Bowles J. E., Griffiths D. M., Quirk L., Brownrigg A., Croot K. (2002). Effects of essential oils and touch on resistance to nursing care procedures and other dementia-related behaviours in a residential care facility. *Int. J. Aromat.*, 12: 22-29.

Boyle W. (1955). Spices and essential oils as preservatives. *Am. Perfurmer Essent. Oil Rev.* 66: 25-28.

Bruneton J. (1987). *Éléments de phytochimie et de Pharmacognosie*, Tec. et Doc. Lavoisier, Paris. 230.

Bruneton J. (1993). *Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales*. Paris, France: Lavoisier. 278-279.

Bruneton J. (1999). *Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales*, 3.Ed. Tec & Doc, Paris.

Bruni R., Medici A., Andreotti E., Fantin C., Muzzoli M., Dehesa M. (2003). Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chem.* 85: 415–421.

Burt S. (2004). Essential oils their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223–253.

C

Calabrese V., Scapagnini G., Catalano C., Dinotta F., Geraci D. et Morganti P., (2000). Biochemical studies of a natural antioxidant isolated from Rosemary and its application in cosmetic dermatology. *Int. J. Tissue React.* 22: 5–13.

Cao G., Sofic E., Prior R. L. (1996). Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3426-3431.

Références

- Cardile V., Russo A., Formisano C., Rigano D., Senatore F., Arnold N. A., Piozzi F. (2009). Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. *Ethnopharmacol.* 126(2): 265-72.
- Celiktas O. Y., Kocabasa E. E. Hames, Bedirb E., Sukanb F., Vardar, Ozekc T., Baserc K. H. C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 100(2): 553-559.
- Chacha M, Bojase-Moleta G, Majinda R.R. (2005). Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*. *Phytochem.* 66:99–104.
- Chalchat J. C., Garry R. P., Michet A., Benjilali B., Chabat J. L. (1993) Essential oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). The chemical composition of oils of various origins (Morocco, Spain and France). *J. Essent. Oil Res.* 5: 613–618.
- Chan E. D., Iseman M. D. (2008). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review. *Curr Opin Infect Dis.* 21: 587–595.
- Chang F. R., Chao Y. C., Teng C. M., Wu Y. C. (1998). Chemical Constituents from *Cassitha filiformis* II. *J. Nat. Prod.* 61: 863–866.
- Chang S.S., Ostric-Manjasevic B., Hsieh O.L. et Huang C.L., (1977). Natural antioxidants from Rosemary and Sage. *J. Food Sci.* 42: 1102 – 1106.
- Chaturvedi V., Dwivedi N., Tripathi R. P., Sinha S. (2007). Evaluation of *Mycobacterium smegmatis* as a possible surrogate screen for selecting molecules active against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53(6): 333-7.
- Chemat F., Lucchesi M. E., Smadja J., Favretto L., Colnaghi G., Visinoni F. (2006). Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Anal. Chim. Acta.* 555: 157-160.
- Chemonics Internaional Inc. (2006). Projet Filière Des Plantes Aromatiques Et médicinales, Mission de l'USAID au Maroc, Agriculture & Agrobusiness Intégrés, Rabat : Agence américaine pour le développement international.

Références

Chemonics Internaional Inc. (2008). Stratégie nationale de développement du secteur des plantes aromatiques et médicinales Mission de l'USAID au Maroc, Agriculture et Agrobusiness Intégrés, Rabat : Agence américaine pour le développement international.

Cheung S. et Tai J. (2007). Anti-proliferative and antioxidant properties of Rosmary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology reports*. 17 (6) : 1525-1531.

Clevenger J. F. (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.* 17: 341-6.

Connolly J. D., Hill R. A. (1991). *Dictionary of Terpenoids*. Chapman and Hall, London.

Cook N. C., Samman S. (1996). Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7: 66-76.

Cottiglia F., Loy G., Garau D., Floris C., Casu M., Pompei R., Bonsignore L. (2001). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium L.* *Phytomed.* 8: 302-305.

Cowan M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re.* 12 (4): 564- 582.

Cox S. D., Mann C. M., Markham J. L., Bell H. C., Gustafson J. E., Warmington J. R., Wyllie S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88: 170–175.

Crouteau R. (1988). *Catabolism of monoterpenes in essentials oil plants, Flavour and Fragrance, A world perspective*, Amsterdam (Netherland). 65- 83.

Crouteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Am.Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD. 1250–1268.

CTA, (2007). *Les plantes médicinales*. Radio rurale 07/3. Wageningen. 33.

Cunningham, A., B., (1993). *African Medicinal Plants: Setting priorities at the interface between conservation & primary health care*. People and Plants Working Paper.

Références

Cushnie T. P. T, Hamilton V. E. S, Lamb A. J. (2003). Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.* 158: 281–289.

Cushnie T. P. T. et Lamb A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 26: 343-356.

D

Dall Agnol R., Ferraz A., Bernardi A. P., Albring D., Nör C., Sarmiento L., Lamb L., Hass M., von Poser G., Schapoval E. E. S. (2003). Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomed.* 10: 511-516.

Dastidar S. G., Manna A., Kumar K. A., Mazumdar K., Dutta N. K., Chakrabarty A. N., Motohashi N., Shirataki Y. (2004). Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 23: 99–102.

Delamare A. P. L., Moschen-Pistorello I. T., Artico L., Atti-Serafini L., Echeverrigaray S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis L.* and *Salvia triloba L.* cultivated in South Brazil. *Food Chem.* 100: 603–608.

Delcampo J., Amiot M. J., Nguyen C. (2000). The Antimicrobial effect of Rosemary extracts. *J. of Food Protect.* 10:1359–1368.

Derbel, S., Bouaziz M. Dhouib A. Sayadi S., Chaieb M. (2010). Chemical composition and biological potential of seed oil and leaf extracts of *Henophyton deserti* Coss. & Durieu. *C. R. Chimie.* 13: 473-480.

Derwich E., Benziane Z., Chabir R. (2011). Aromatic And Medicinal Plants Of Morocco: Chemical Composition of Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* And *Juniperus phoenicea*. *IJABPT.* 2(1): 145-153.

De Sousa A. C., Alviano D. S., Blank A. F., Alves P. B., Alviano C. S., Gattass C. R. (2004). *Melissa officinalis L.* essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J. Pharm. Pharmacol.* 56: 677-681.

Références

- Dewick, P. M. (2001). *Medicinal Natural Products*. Wiley. 6: 291.
- Diab Y., Auezova L., Chebib H., Chalchat J. C., Figueredo G., (2002). Chemical composition of Lebanese Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) essential oil as a function of the geographical region and the harvest time. *J. Ess. Oil Res.* 14: 449 - 452.
- Dias P. C., Foglio M. A., Possenti A., D. E., Carvalho J. E. (2000). Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis L.*, *J. Ethnopharmacol.* 69: 57 – 62
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A., Capasso F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.*, 65(4): 337-353.
- Di Pasqua R., Hoskins N., Betts G., Mauriello G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2745– 2749.
- Djenane D., Sanchez-Escalante A., Beltran J. A., Roncales P. (2002). Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chem.* 76: 407–415.
- Donald R., Berdahl, Jill McKeague. (2015). Rosemary and sage extracts as antioxidants for food preservation. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 177–217.
- Dordevic S., Petrovic S., Dobric S., Milenkovic M., Vucicevic D., Zizic S., Kukic J. (2007). Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 109: 458-463.
- Dorman H. J. D., Peltoketo A., Hiltunen R., Tikkanen M. J. (2003). Characterisation of the El Amrani A., Zrira S., Berrada M., Benjlali B. (2000). A study of Moroccan Rosemary oils. *J. Essent.Oil. Res.* 12: 487-495.

Références

E

- Edenharder R., Grünhage D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* 540: 1–18.
- Edris A. E., Shalaby A., Fadel H. (2003). Evaluation of a chemotype of Spearmint (*Mentha spicata* L) growing in Siwa Oasis, Egypt. *Eur. Food Technol.* 218: 74-78.
- El Ajjouri M., Satrani B., Ghanmi M., Aafi A., Farah A., Rahouti M., Amarti F., Aberchane M. (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* L. Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnol. Agron. Soc.* 12 (4) : 345-351.
- Elâgoun S., (2003) فصل و تحديد منتج الأيض الثانوي الفلافونيدي لنبته طيبة تنتمي إلى العائلة الشفوية. (LAMIACEAE) و دراسة التأثير المضاد للبكتريا. شهادة ماجستير. قسطنطينة.
- El Amrani A., Zrira S., Berrada M., Benjilali B. (1997). Effet du stade végétatif sur les rendements et la qualité de l'huile essentielle de Romarin du maroc. Congrès International Organisé à l'IAV, Rabat: 161-168.
- Elamrani A., Zsira S., Benjilali B., Berrada M.A. (2000). Study of Moroccan Rosemaryoils. *J. Essent. Oil Res.* 12: 487–495.
- El Haouari M., López J. J., Mekhfi H., Rosado J. A., Salido G. M. (2007). Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *J. Ethnopharmacol.* 113(2): 325-31.
- EL-Sakka, M. (2010). *Phytochemistry Alkaloids. Manuel Third Edition*:1-122.
- Emberger L. (1960). *Les végétaux vasculaires.* Masson, Paris, Tome II, 1540.
- Enrico V., Papini A., Baldo F., Zhan J. M. (2004). Étude expérimentale du renfort de l'immunité par le sirop du père Michel (POE 20). Institut de Sciences Naturopathiques (ISN).
- Eva S. B., Tulok M. H., Hegedus A. (2003). Antioxidant effect of various Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) clones. *Acta. Biologica. Szegediensis* 47: 111–113.

Références

F

Fadi (2011). Le Romarin *Rosmarinus officinalis*. Le bon procédé d'extraction pour un effet thérapeutique optimal. Thèse de doctorat, Université de MOHAMMED V faculté de médecine et de pharmacie.

Fadil M. (2015). Etude chimiométrique pour l'optimisation de l'extraction et la formulation des huiles essentielles par la méthodologie des plans d'expériences et l'analyse de l'individualité par ACP et RLM. Thèse de doctorat. Université sidi Mohammed Ben Abdellah, FST, MAROC. 130-165.

Faixov Z. R. Faix S. (2008). Biological Effects of *Rosemary (Rosmarinas officinalis)* Essential oil. *folia veterinaria*, 52, 3-4: 135-139.

Favela-Hernández J. M., García A., Garza-González E., Rivas-Galindo V. M., Camacho-Corona M. R. (2012). Antibacterial and antimycobacterial lignans and flavonoids from *Larrea tridentata*. *Phytother. Res.* 26 (12): 1957-1960.

Fayed S. A. (2009). Antioxidant and Anticancer Activities of *Citrus reticulata* (Petitgrain Mandarin) and *Pelargonium graveolens* (Geranium) Essential Oils. *Res. J. Agr. Biol. Sci.* 5(5): 740-747.

Fechtal M., Ismaili R., Zine el Abidine A. (2001). Effet de la transplantation sur la qualité et le rendement en huiles essentielles du Romarin (*Rosmarinus officinalis L.*). *Annales de la recherche forestière au Maro* 34: 94-102.

Fechtal M., Zine el Abidine A., Hachmi M., Sesbou A., Karkouzi R. (2005). Variabilité infra-spécifique du rendement et de la composition chimique des huiles essentielles du Romarin (*Rosmarinus officinalis L.*). *Annales de la recherche forestière au Maroc* 36: 98-106.

Felice S., Francesco N., Nelly A. A., B. Maurezio et Werner H. (2004). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea falcata*. *L. Flav. And Fragr. J.*, 20 (3): 291-294.

Références

Fellah S., Romdhane M., Abderrabba M. J. (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*. Cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. Soc. Alger. Chim. 16(2) :193-202. 16(2): 193-202.

Fennane M., Ibn Tattou M., Ouyahya A., El Oualidi J. (2007). Flore pratique du Maroc, manuel de détermination des plantes vasculaires. Volume 2, Série Botanique N°.38. ISBN 9954834745. Rabat : 636.

Fisher K., Phillips C. (2009). In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. Br. J. Biomed. Sci. 66: 180-185.

Fiorini C. (2006). Les Plantes Qui Apaisent ISBN: 9782708945289 Editions Privat.

Flamini G., Tebano M., Cioni P. L., Ceccarini L., Ricci A. S., Longo I. (2007). Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. J. Chromatogr. A, 1143: 36-40.

Fouché J. G. et Marquet A. (2000). Les plantes médicinales, de la plante au médicament. Observation du monde des plantes Sart-Tillman.

Franchomme P., Pénéol D. (1990). L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jollois éditeur. Limoges. 445.

Franchomme P., Jollois R., Pénéol D. (2001). L'aromathérapie exactement, Edition Roger Jollois.

G

Garg, S. C., Siddiqui N. (1992). Antifungal activity of some essential oil isolates. Pharmazie. 47 (6) : 467-468.

Garnier M., Delamare V., Delamare J., Delamare T. (2002). Dictionnaire des termes de médecine, 27 Ed. Maloine, Paris.

Références

- Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G., Georgakis S. A. (2007). Effect of Rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*, 75: 256-264.
- Ghanmi M., Satrani B., Aafi A. (2010). Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guerçif (Maroc oriental). *Phytotérapie*. 8: 295–301.
- Ghanmi M., Satrani B., Aberchane M. (2011). Plantes Aromatiques et Médicinales du Maroc : Les milles et une vertu. Collection Maroc Nature, édition du Centre de Recherche Forestière. ISBN 978-9981-824-28-7: 128.
- Ghfir B., Dargent R. (1995). Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Hyssopus officinalis* sur *Aspergillus fumigatus* (Fresenius) : Conséquences cytologiques et biochimiques. Thèse de doctorat. Université de Toulouse 3. Toulouse, France, 213.
- Ghourri M., Zidane L., Douira A. (2014). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiasérénale dans la province de Tan Tan (Maroc saharien). *IJBCS*, 7(4): 1688-1700.
- Gianmario A., Silvio S., Rita P. A., Teresa M., Roberto D., Aurelia T., (2007). *J. Agric. Food Chem.* 55(5): 1718.
- Gonzalez-Trujano M. E., Pena E. I., Martinez A. L., Moreno J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos M., Lopez-Munoz F. J. (2007). Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 111: 476-482.
- Grella G. E., Picci V., (1988). Variazioni stagionali dell olio essenziale di *Salvia officinalis* *Phytoterapia*. 59: 97-102.
- Grigonis D., Venskutonis P. R., Sivik B., Sandahl M., Eskilsson C. S. (2005). Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*). *J. Supercrit. Fluids*. 33 (3): 223-233.
- Guignard J. L. (2000). *Biochimie végétale*. 2^{ème} édition. Edition Dunod, Paris: 198-207.

Références

Guinochet. (1973). Flore de France par les éditions du C.N.R.S. 5.

Gustafson J. E., Liew Y. C., Chew S., Markham J. L., Bell H. C., Wyllie S. G., Warmington J. R. (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol., 26: 194–198.

H

Hafsi M. (2015). Valorisation de deux plantes médicinales et aromatiques du Nord du Maroc: *Pistacia lentiscus* et *Coriaria mytifolia*. Thèse, Faculté des Sciences et techniques (Fés) Maroc.

Haloui M., Louedec L., Michel J. B., Lyoussi B. (2000). Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaureum erythraea*. J. Ethnopharmacol. 71: 465 – 472.

Hammer K. (1984). Das Domestications syndrome. Kulturpflanze 32: 11-34.

Haraguchi H., Saito T., Okamura N., Yagi A. (1995). Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. Planta Med., 61: 333–336.

Harborne, J. B. et Herbert B. (1995). Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. Bristol: Taylor & Francis.

Haslam E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. J. Nat Pro, 59: 205 -215.

Haslam E. (1998). Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. Cambridge University Press, Cambridge (UK).

Hatano T., Kusuda M., Inada K., Ogawa T-o., Shiota S., Tsuchiya T., Yoshida T. (2005). Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Phytochem. 66: 2047-2055.

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol. Therapeut. 96: 67– 202

Références

- 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.
- Heil M. et Silva Bueno J. C. (2007). Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. Proc. Nat. Ac. Sci., 104(13): 5467-5472.
- Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothér. 1:3-6.
- Hernandez, J. A., Jimenez A., Mullineaux P., Sevilla F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum L.*) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. Plant Cell Environ. 23: 853-862.
- Herzi N. (2013). Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse pour l'obtention du doctorat de l'université de Toulouse.
- Hesse M. (2002). Alkaloids – Nature's Curse or Blessing, VHCA, Zürich.
- Hirt H. M., M. Bindanda I. K., Balagizi, (2003). La Médecine naturelle tropicale. Marianum Press, Kisubi 128.
- Hmamouchi M. et Agoumi A. (1993). Place des plantes médicinales dans le système de santé au Maroc. Premier congrès international des plantes médicinales et phytothérapie. Tunis. 17.
- Houlihan C. M. H. O C. T., Chang S. S. (1985). The structure of Rosmariquinone. A new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis L.* J. Amer. Oil Chem. Soc., 62: 96 – 98.
- Hromadkova Z., Kovacikova J., Ebringerov'a A., (1999). Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corncobxylan, Ind. Crops Prod. 9: 101–109
- Hsouna A. B., Trigui M., Mansour R. B., Jarraya R. M., Damak M., Jaoua S. (2011). Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. Int. J. Food Microbiol. 148: 66–72.

Références

Huang M. T., Ho C. T., Wang Z. Y., Ferraro T., Lou Y. R., Stanber K., Ma W., Hoffman L., Besseau S., Geoffroy P., Rizenthaler C., Meyer D., Lepierre C., Pollet B. et Legrand M. (1994). Silencing of Hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell*. 16 (4): 1446-1465.

I

Ibañez E., Cifuentes A., Crego A. L., Señoráns F. J., Cavero S., Reglero G. (2000). Combined use of supercritical fluid extraction, Micellar electrokinetic chromatography and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L). *J. Agric. Food Chem.* 48 (9): 4060-4065.

Idowu T. O., Ogundaini A. O., Salau A. O., Obuotor E. M., Bezabih M., Abegaz B. M. (2010). Doubly linked, A-type proanthocyanidin trimer and other constituents of *Ixora coccinea* leaves and their antioxidant and antibacterial properties. *Phytochemistry*. 71 (17-18): 2092-2098.

Inatani R., Nakatani N., Fuwa H., (1983). Antioxidant effect of the constituents of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.* 47: 521 – 528.

AMPB, (2008). Andian medicinal Plants Board.

Iserin P. (1997). Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, 2^{ème} édition, Paris, France, 10-11.

Iserin P., Masson M., Restellini J. P. (2007). Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins .Ed Larousse, 14.

Ivanovic, Dusan Mistic, Irena Zizovic, Mihailo Ristic. (2012). In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, Rosemary and sage isolates. *Food Control*. 25: 110-116.

Références

J

Jafri M. A., Farah A., Javed K., Singh S. (2001). Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb). *J. Ethnopharmacol.* 75: 89-94.

Jaganmohan R. L., Meenakshi S., Raghavan D., Abraham K. O., (1997). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): impact of drying on its flavor quality. *J. Food Qual.*, 21: 107 – 115.

Jahier J., Chalhoub B., Charcosset A. (2006). La domestication des plantes : de la cueillette à la post-génomique. *Biofutur.* 266 : 28-33.

Jashmidi, R., Afzali Z., Afzali D. (2009). Chemical composition of hydrodistillation essential oil of Rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries. *American-Eurasian. J. Agr. Environ Sc.* 5 (1): 78–81.

Janz J. A. M., Morel P. C. H., Wilkinson b. H. P., et Purchas R. H. (2007). Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. *Meat Sci.* 75 : 360–365.

Jennan S., Farah A., Bousta D., Chahmi N., Mansouri L., Mahjoubi F. (2014). Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activities of *Salvia Mouretii* Extracts from Morocco. *International Journal of Indigenous Medicinal Plants.* ISSN. 47 (1): 2051-4263.

Jordan M. J., Lax V., Rota M. C., Loran S., Sotomayor J. A. (2013). Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Control:* 30463-30468.

Jouad H., Haloui M., Rhiouani H., El Hilaly J., Eddouks M. (2001). Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J. of Ethnopharmacol.* 77(2): 175-182.

Julien Paolini. (2005). Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM (IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux Asteraceae endémiques de Corse :

Références

Eupatorium cannabinum subsp. *corsicum* et *Doronicum corsicum*. Thèse de doctorat de l'Université de Corse.

K

Kahouadji M. S. (1995). Contribution a une étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Maroc Oriental. Thèse de 3ème cycle, Université Mohamed 1^{er}, Fac. Sc., Oujda. 207.

Kalemba D., Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10: 813-829.

Karou D., Savadogo A., Canini A., Yameogo S., Montesano C., Simporé J., Colizzi V., Traore A.S. (2005). Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *A. J. B.* 4: 1452-1457.

Karumi Y., Onyeyili P. A., Ougbuaja V. O. (2004). Identification of active principals of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J. Med. Sci.* 4(3):179-182.

Karioti A., Vrahimi-Hadjilouca T., Droushiotis D., Rancic A., Hadjipavlou Litina D. S. (2006). Analysis of the Essential Oil of *Origanum dubium* Growing Wild in Cyprus. Investigation of its Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. *Planta. Med.* 72(14):1330-1334

Kelen M., Tepe B. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bio resour. Technol.* 99 (10): 4096–4104.

Khababae K., Van Ree T. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.*, 18: 641–649.

Kharroubi. (2008). DNCR à Oujda. Aujourd'hui le Maroc: Le 21-03-2008.

Khia A., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Aberchane M., Quaboul B., Chaouch A., Amusant N., Charrouf Z. (2014). Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L.* du Maroc. *Phytothérapie.* 12 (6): 341-347.

Koysomboon S., Van Altena I., Kato S., Chantrapromma K. (2006). Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. *Phytochemistry.* 67: 1034-1040.

Références

Kuete V., Ngameni B., Fotso Simo C. C., Kengap Tankeu R., Tchaleu Ngadjui B., Meyer JJM Lall N., Kuate J. R. (2008). Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *J. Ethnopharmacol.* 120: 17-24.

Kuete V., Poumale Poumale H. M., Guedem A. N., Shino Y., Randrianasolo R., Ngadjui B. T. (2010). Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae). *S. Afr. J. Bot.* 76: 536–542.

L

Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M., Hseini S. (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (maroc occidental). *Lejeunia, revue de botanique, Nouvelle série* N° 186, BE ISSN 0457-4184.

Lamendin H. (2006). Soixante-douze plantes médicinales bucco-dentaires. *Plantes et Nature* (H.S.2), 82.

Lardy J., Haberkorne V. (2007). *Kinesither Rev*, 61: 14-7.

Larran S., Ringuélet J.A., Carranza M.R., Henning C.P., RE M.S., Cerimele E.L. et Urrutia M.I., (2001). In vitro fungistatic effect of essential oils against *Ascosphaera apis*. *J. Ess. Oil Res.* 13: 122 – 124.

Legssyer A., Ziyat A., Mekh H., Bnouham M., Herrenknecht C., Roumy V., Fourneau C., Laurens A., Hoerter J., Fischmeister R. (2004). Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta. *Phytother Res.* 18(11): 889-94.

Lemonica I. P., Damasceno D. C., Di-Stasi L. C. (1996). Study of the embryo toxic effects of an extract of Rosmary (*Rosmarinus officinalis*). *BJMBR.* 29 (2): 223-227.

Leung, A. Y. et Foster S. (1996). *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs, and Cosmetics*, second ed. Wiley, New York. 446–448.

Lucchesi, M. E., Chemat F., Smadja J. (2004). Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A* 1043: 323-327.

Références

Lucchesi M. E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F. (2007). Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L. A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food Engineer.* 79: 1079-1086.

M

Mahamat M, Haggar A. (1999). Etat des statistiques concernant les produits forestiers non ligneux (pfnl) au tchad. Programme de partenariat CE-FAO (1998-2001) Ligne budgétaire forêt tropicale B7-6201/97-15/VIII/FOR PROJET GCP/INT/679/EC.

Magiatisa P., Alexios L., S., Ioanna C., Serkos A. H. (2002). Chemical Composition and in-vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Three Greek *Achillea* Species. *Z. Naturforsch.* 57: 287-290.

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 Res.* 49: 241-256.

Marfak A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de dépsides. Thèse de doctorat de l'université de limoges.

MAROC-PAM, Lettre Bimensuelle d'Information sur les Plantes Aromatiques et Médicinales. N° 7 Novembre- Décembre 2006.

Martin R., Salgueiro L. R., Goncalves M. J., Vila R., F., Tomi , Adzet J., Casanova. (2000). Activity and chemical composition of the bark oil of *Croton stellulifer*. *Planta Medica*, 66(7), 647-650.

Masatoshi H., et Hiroaki K. (1997). Repellency of Rosemary oil and its components againts the Onion aphid, *Neotoxoptera formosana*. *Appl. Entomol. Zoot.* 32 : 3303 - 3310.

Maugein J. J., Fourche M. C., Bezian, F. Boineau. (2003). Epidemiology and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in Aquitaine in. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 33(5), 247-253.

Références

- May J., Chan . H., King A., Williams L., French G. L. (2000). Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. J., Antimicrob. Chemother. 45: 639-643.
- Mbarek L. A., Mouse H. A., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A., Ziad A. (2007). Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa L.*) extracts. Anti-tumor effect of blackseed (*Nigella sativa L.*) extracts. Braz. J. Med. Biol. Res. 40: 839-847.
- Mc Sweeney C. S., Palmer B., McNeill D. M., Krause D. O. (2001). Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants. Anim. Feed Sci. Technol., 91:83-93.
- Mehdioui R., Kahouadji A. (2007). Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène : cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira) – Bulletin de l'Institut Scientifique, Section Sciences de la Vie, 29, Rabat: 11-20.
- Mekhfi H., El Haouari M., Bnouham M., Aziz M., Ziyat A., Legssyer A. (2006). Effects of extracts and tannins from *Arbutus unedo* leaves on rat platelet aggregation. Phytoter. Res. 20(2):135-9.
- Mengel P., Beh D., Be lido G. M., Monpon B. (1993). VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-ondes. Parfums Cosmétiques Arômes. 114: 66-67.
- Michel T. (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse de doctorat, Université D'Orléans École Doctorale Sciences Et Technologies, Institut de Chimie Organique et Analytique.
- Mockute D., Bernotiene G., Judzentiene A. (2001). The essential oil of *Origanum vulgare L.* vulgare growing wild in Vilnius district (Lithuania). Phytochemistry 57: 65-69.
- Mohammedi Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentiels et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magistère de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.
- Moghtader M. et Afzali D. (2009). Study of the antimicrobial properties of the essential oil of Rosemary. Am Eurasian J Agric Environ Sci. 5 (3): 393-397.

Références

Moino M. I., Martinez C., Sotomayor J. A., Lafuente A., et Jordan M. J. (2008). Polyphenolic transmission to segure lamb meat from ewes dietary supplemented with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *J. Agri. Food Chem.*, 56: 3363–3367.

Molina-Salinas G. M., Ramos-Guerra M. C., Vargas-Villarreal J., Mata-Cardenas B. D., Becerril-Montes P., Said-Fernandez S. (2006). Bactericidal activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Med Res.* 37:45–49.

Monti D., Chetoni P., Burgalassi S., Najarro M., Saetton M. F., Boldrini E. (2002). Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.* 237: 209-214.

Mukohata Y., Nakabayashi S., Higashida, M. (1978). Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett*, 85: 215– 218.

N

Newton S. M, Lau C., Wright C. W. (2000). A Review of antimycobacterial natural products. *Phytother. Res.* 14: 302–322.

Newton S. M., Lau C., Gurcha S. S., Besra G.S., Wright C. W. (2002). The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis*. *J. Ethnopharmacol.* 79(1): 57-67.

Nigou J. et Besra G. S. (2002). Characterization and regulation of inositol monophosphatase activity in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochem. J.* 361: 385-390.

Nikitina L. E. (2009). Synthesis and antifungal activity of compounds of the pinane series. *Pharm. Chem. J.* 43(5): 20.

Références

O

Offord E. A., Macé K., Ruffieux C., Malnoë A. et Pfeifer A. M. (1995). Rosmary components inhibit benzo [a] pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis*. 16 (9) : 2057-2062.

O'Grady M. N., Maher M., Troy D. J., Moloney A. P., et Kerry J. P., (2006). An assessment of dietary supplementation with tea catechins and Rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Sci*. 73: 132–143.

Okoh O. O., Sadimenko A. P., Afolayan A. J. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis L.* obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chem*. 120: 308-312.

Okunade A. L. et Elvin-Lewis W. H. (2004), Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry*. 65: 1017 – 1032.

Olle M. et Bender I. (2010). The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*. 8 (3): 687-696.

OMS (1993). Research Guidelines for Evaluating the safety and efficacy of herbal medicines, Regional Office for the Western Pacific, Manila.

Oussalah M., Caillet S., Lacroix M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 69: 1046–1055.

Özcan M. M. et Chalchat J. C., (2008). Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) oil from Turkey. *Inter. J. Food sci. nutria*. 59: 691 – 698.

P

Papa F., Rivière M., Fournié J. J., Puzo G., David H. (1987). Specificity of a *Mycobacterium kansasii* phenolic glycolipid (mycoside A) immunoserum. *J. Clin. Microbiol*. 25(12): 2270-2273.

Références

- Paris A., Strukelj B., Renko M., Turk V., Pukl M., Umek A. et Korant B. D. (1993). Inhibition effects of carnosic acid on HIV-I protease in cell free assays. *J. Natural Products*. 56 (8): 1426-1430.
- Pepeljnjak S. et Kosalec I. (2004). Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, Enterococcus spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 240: 111–116.
- Pérez M. B., Calderón N. L., Croci C. A. (2007). Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of Rosmary (*Rosmarinus officinalis* L). *Food chemistry*. 104: 585-592.
- Pichersky E et Gershenzon J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin Plant Biol.*, 5(3): 237-243.
- Pichersky E., Noel J. P., Dudareva N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311: 808-811.
- Pietta P. G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *J. Natural Products*. 63 : 1035-1042.
- Piquemal G. (2008). Les flavonoides (en ligne). les-flavonoides et catid 41. phyto-aromatherapie et Itemid. 215.
- Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri R., Casanova J. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oil from Sardinia and Corsica. *Flav. Fragr. J.* 17: 15-19.
- Plaper A., Golob M., Hafner I., Oblak M., Solmajer T., Jerala R. (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 530–6.
- Ponce A. G., Roura S. I., Del Valle C. E., Moreira M. R., (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. *Postharv. Bio. Techno.* 49: 294–300.
- Porte A., Godoy O., Lopes R. L., Koketsu D., Goncalves M., Torquillo h.S., (2000). Essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary) from Rio de Janeiro, Brazil. *J. Ess. Oil Res.* 12 M: 577 – 580.

Références

Prudent D., Perineau F., Bessiere J. M., Michel G., Bravo R. (1993). Chemical analysis, bacteriostatic and fungistatic properties of the essential oil of the atoumau from Martinique (*Alpinia speciosa*). *J. Ess.Oil. Res.* 5: 255-264.

Purohit S. S., Vyas S. P. (2004). Medicinal plant cultivation. A scientific approach. Agrobios, India.

Q

Quarenghi M. V., Tereschuk M. L., Baigori M. D, Abdala L. R. (2000). Antimicrobial activity of flowers from *Anthemis cotula*. *Fitoterapia*, 71: 710–712.

R

Rabbani M., Shaw R., Van Metter R (1987). Detective quantum efficiency of imaging systems with amplifying and scattering mechanisms. *J. Opt. Soc. Am. A* 4: 895–901.

Rauha J. P., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kähkönen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H., Vuorela P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.*, 56: 3-12.

Rastogi N., Labrousse V., Goh K. S., De Sousa J. P. (1991). Antimycobacterial spectrum of sparfloxacin and its activities alone and in association with other drugs against *Mycobacterium avium* complex growing extra cellularly and intra cellularly in murine and human macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35(12): 2473-2480.

Remmal A., Tantaoui Elaraki A., Bouchikhi T., Rhayour K et Ettayebi M. (1993) Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in Agar medium. *J. Essent. Oil. Res.* 5: 179-184.

Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté des Sciences Dhar Mehraz, Fés.

Références

Richheimer S. L., Bernart M.W., King G. A., Kent M. C., Bailey D. T. (1996). Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from Rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 507–514.

Romano C. S., Abadi K., Repetto V., Vojnov A. A., Moreno S. (2009). Synergistic antioxidant and antibacterial activity of Rosemary plus butylated derivatives. *Food Chem.* 115:456–461.

Roulier G. (1992). Les huiles essentielles pour votre santé. *Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes.* Edt. Dangles France.

Rožman T., Jeršek B. (2009). Antimicrobial activity of Rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis L.*) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica.* 93 (1): 51-58.

S

Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91: 621– 632.

Salah-Fatnassi B. K., Salim-Bannour A., Harzallah-Skhiri F., Mohamed-Ali M., Mighri Z., Chaumont J. P., Aouni M. (2010). Activités antivirale et antioxydante in vitro d'huiles essentielles de *Thymus capitatus L.* Hoffmans. & Link de Tunisie. *Acta Botanica Gallica.* 157 (3): 433-444.

Sarni-Manchado P., Cheynier V. (2006). Les polyphenols en agroalimentaire. Edition sciettechnol.

Sanchez-Escalante A., Djenane D., Torrescano G., Beltran J.A., et Roncales P. (2001). The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and Rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Sci.* 58: 421–429.

Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F., Sangwan R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation.* 34: 3-21.

Références

- Sato H., Goñi B., Matsuda M., Tobar Y.N. (2000). A site specific increase in recombination in *Drosophila ananassae*. *Genes & Genet. Systems* 75(1): 41--47.
- Satrani B., Farah A., Talbi M. (2006). Fractional distillation effect on the chemical composition and antimicrobial activity of Moroccan Myrtle. *Acta botanica Gallica*. 153: 235–242.
- Schinor E. C., Salvador, M. J., Ito, I. Y., Dias, D. A. (2004). Trypanocidal and Antimicrobial Activities of *Moquinia kingie*. *Phytomedicine*. 11: 224-229.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- Scherrer A. M. Motti R., weckerle C. S. (2005). Traditional plantuse in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). *J. Ethnopharmacol.* 97: 129-143.
- Schinor E. C., Salvador M. J., Ito I. Y., Dias D. A. (2007). Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents from *Chrestascapigera*. *Brazilian J. Microbiol.* 38: 145-149.
- Schnitzler P., Koch C., Reichling J. (2007). Susceptibility of Drug-Resistant Clinical Herpes Simplex Virus Type 1 Strains to Essential Oils of Ginger, Thyme, Hyssop, and Sandalwood. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 1859-1862.
- Schwedt G. (1993). *Méthodes d'analyse*. Ed. Flammarion.
- Sebranek J. G., Sewalt V. J. H., Robbins K. L., Houser T. A., (2005). Comparison of a natural Rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Sci.*, 69: 289–296.
- Seenayya G., Prasad M. M. (2000). Effects of spices on growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt. *Food Research Int.* 33: 793-798.
- Serrano E., Palma J., Tinocco T., Venancio F., Martins A. (2002) : Evaluation of the essential oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) from different zones of “Alentejo” (Portugal). *J. Ess. Oil Res.* 14: 87 – 92.

Références

- Shin S., Kim J. H. (2005). In vitro inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens. *Arch. Pharm. Res.* 28: 897-901.
- Shukla H. S., Dubey P., Chaturvedi R.V., (1989). Antiviral properties of essential oils of *Foeniculum vulgare* and *Pimpinella anisum* L. *Plant Pathology. Agronomie.* 9: 277-279.
- Shylaja M., R., Peter K., V. (2004). The functional role of herbal spices. In., Peter, K.V. ed. *Handbook of herbs and spices.* 2. England: Woodhead Publishing Limited.
- Siani A. C., Ramos M. F., Menezes-de-Lima O. Jr., Ribeiro-dos-Santos R., Fernandez-Ferreira E., Soares R. O., Rosas E. C., Susunaga G. S., Guimaraes A. C., Zoghbi M. G., Henriques M. G. (1999). Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J. Ethnopharmacol.* 66: 57-69.
- Sim G. S., Lee B. C., Cho H. S., Lee J. W., Kim J. H., Lee D. H., Kim J. H., Pyo H. B., Moon D. C., Oh K. W., Yun Y. P., Hong J. T. (2007). Structure Activity Relationship of Antioxidative Property of Flavonoids and Inhibitory Effect on Matrix Metalloproteinase Activity in UVA-Irradiated Human Dermal Fibroblast. *Arch Pharm Res.* 30(3): 290-298.
- Simin K., Ali Z., Khaliq-Uz-Zaman S. M., Ahmad V. U. (2002). Structure and biological activity of a new rotenoid from *Pongamia pinnata*. *Nat. Prod. Lett.* 16: 351-7.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.
- Slaughter J. C. (1999). The naturally occurring furanones: formation and function from pheromone to food. *Biol. Rev.*, 74(3): 259-276.
- Smallfield B., (2001). Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research* (45): 1-4.
- Soidrou S. H. (2013). Contribution à la valorisation de quelques plantes issues de la pharmacopée traditionnelle Comorienne par la recherche de substances bioactives. Thèse de doctorat. Faculté Des Sciences Dhar El Mahraz, Fès.

Références

- Soliman F. M., Kashoury E. A., Fathy M. M., Gonaïd M. H. (1994). Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. from Egypt. *Flavour Fragr. J.*9: 29-33.
- Song J. H., Kim S. K., Chang K. W., Han S. K., Yi H. K., Jeon J. G. (2006). In vitro inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Arch. Oral Biol.* 51: 1131-1140.
- Sotelo Felix J. I., Martinez-Fong D., Muriel P., Santillan R. L., Castillo D., Yahuaca P. (2002). Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (*Lamiaceae*) in the alleviation of carbon tetrachloride.
- Souza C., R., F., Schiavetto I. A., Thomazini F. C. F., Olivieira W. P. (2008). Processing of *Rosmarinus officinalis* Linne extract on spray and spotted bed dryers. *BRAZ J CHEM ENG.* 25 (1): 59-69.
- Sqalli H., El Ouarti A., Farah A., Ennabili A., Haggoud A., Ibensouda S., Houari A., Iraqui Houssaini M. (2009). Antibacterial activity of *Thymus pallidus* Batt. and determination of the chemical composition of its essential oil. *Acta Bot Gallica*, 156(2): 303-310.
- Stapleton P. D., Shah S., Hamilton-Miller J. M., Hara Y., Nagaoka Y., Kumagai A., Taylor P.W. (2004). Anti-Staphylococcus aureus activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 24: 374-380.
- Sureram S., Senadeera S. P., Hongmanee P., Mahidol C., Ruchirawat S., Kittakoo P. (2012). Antimycobacterial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Tiliacora triandra* against multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22(8): 2902-2905.
- Svoboda K. P. et Hampson J. B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK. KA6 5H W.

Références

T

Tahiri T., (1994). Estimation de la biomasse et la production en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et de *Lanvandula dentata var Typica* dans le Parc National de Talassemtane, Mémoire de 3^{ème} cycle, ENFI, sale.

Taguri T., Tanaka T., Kouno I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol. Pharm. Bull.*, 27: 1965-1969.

Takenaka M., Watanabe T., Sugahara K., Harada Y., Yoshida S., Sugawara F., (1997). New antimicrobial substances against *Streptomyces scabies* from Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 1440 – 1444.

Takeoka G. (1998). Flavor chemistry of vegetables. In *Flavor chemistry. Thirty years of progress.* Teranishi R. (Ed.). Cluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 287- 304.

Tampieri M. P., Galuppi R., Macchioni F., Carelle M. S., Falcioni L., Cioni P. (2005) . The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia.* 159 (3): 339-45.

Tantaoui-Elaraki A., Ferhout H., Errifi A. (1993). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus Broussonettii*, *Tzygis* and *T.satureioides*. *J. Essent. Oil. Res.* 5: 45-53.

Thompson J. D., Chalchat J. C., Michet A., Linhart Y. B., Ehlers B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J. Chem. Ecol.* 29: 859-880.

Threlfall E. J., Ward L. R., Rowe B. (1997). Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. *Eurosurveillance.* 2: 81–84.

Tkachenko K. G., (2006). Antiviral activity of the essential oils of some *Heracleum L.* species. *Journal of Herbs, Spices. Medicinal plants.* 12 (3):1-12.

Références

Tohidpour A., Sattari M., Omidbaigi R., Yadegar A., Nazemi J. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Phytomedicine*. 17: 142-145.

Tomi F., Bradesi P., Bighelli A., Casanova J. (1995). Computer-aided of individual components of essential oils using carbon -13 NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. Anal.* 1: 25-34.

Tsuchiya H., Iinuma M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomed.* 7:161–5.

Tuberoso C. I. G., Satta M., Cabras P., Garau V. L. (1998). Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* of Sardinia. *J. Ess. Oil Res.* 10: 660 - 664.

Tucker A.O., Maciarello M. J., (1986). The essential oils of Rosemary cultivars. *Flavour Fragrance J.* 1: 137–142.

U

Umezu T. (1999). Anticonflict effects of plant-derived essential oils. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64: 35-40.

Ulubelen A., Topcu G., Eris C., Sonmez U., Kartal M., Kurucu S., Bozok-Johansson C. (1994). Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry* 36: 971-974.

V

Varela F., Navarrete P., Cristobal R., Fanlo M., Melereo R., Sotomayor J. A., Jordan M. J., Cabot P., Sanchez De Ron D., Calvo R., Cases A. (2009). Variability in the chemical composition of wild *Rosmarinus officinalis L.* *Acta Horti.* 826: 167 – 174.

Verschaffelt et Stahl (1915), K. gl. A. k. Amsterdam, Gertz, Jahr, Wis. Bot. 56: 536.

Vickers C. E., Gershenzon J., Lerdau M. T., Loreto F., (2009). A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nat. Chem. Biol.* 5 (5): 283–291.

Références

Vierling W., Brand N., Gaedecke F., Sensch K. H., Schneider E., Scholz M. (2003), Investigation of the pharmaceutical and pharmacological equivalence of different hawthorn extracts. *Phytomedicine* 10 : 8-16

Vinatoru M. (2001). An overview of ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* 8: 303-313.

W

Walker R. D. (2000). Antimicrobial susceptibility testing and interpretation of results. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. University Press, 12-26.

Wan J., Wilcock A., Coventry M. J. (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* 84: 152-158

Wang L., Waller C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Tech.* 17: 300-312.

Wang W., Wu N., Zu Y. G., Fu Y. J. (2008). Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis L.* oil compared to its main compounds. *Food chem.* 108 (3): 1019-1022.

Wannissorn B., Jarikasem S., Siritwangchai T., Thubthimthed S. (2005). Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia.* 76: 233-236.

Weerakkody N. S., Caffin N., Turner M. S., Dykes G. A. (2010). In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control.* 21: 1408-1414.

WHO (2010). *Global Tuberculosis Control: WHO Report.*

Wilkinson J. M., Hipwell M., Trachy R., Cavanagh H. M. A. (2003). Bioactivity of *Backhousia citriodora* antibacterial and antifungal activity. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 76-81.

Wink M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem.*, 64(1): 3-19.

Références

Y

Yesil Celiktas O., Hames Kocabas E. E., Bedir E. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 100: 553–59.

Yuegang Zuo, Kai Zhang, Yuejan Lin, (2007). *J. Chromatography A*, 1148: 211-218.

Z

Zaouali Y, Bouzaine T, Boussaid M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis L.* varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem. Toxicol.* 48(11): 3144-52.

Zhao W. H., Hu Z. Q., Okubo S., Hara Y., Shimamura T. (2001). Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:1737–42.

Zhao R. J., Koo B. S., Kim G. W., Jang E. Y., Lee J. R., Kim M. R., Kim S. C., Kwon Y. K., Kim K. J., Huh T. L., Kim D. H., Shim I., Yang C. H. (2005). The essential oil from *Angelica gigas* NAKAI suppresses nicotine sensitization. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 2323-2326.

Zhiri A., Baudoux D. (2005). *Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies*. Edition Inspir., Development. ISBN: 2-919905-27-9

Zhu M., Phillipson J. D., Greengrass P. M., Bowery N. E., Cai Y. (1997). Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to protein. *Phytochem.* 44: 441-447.

Zivanovic S., Chi S., DRAUGHON A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J. Food Sci.* 70: 45–51.

Zoran P., Zeković, Žika D., Lepojević, Ibrahim O., Mujić. (2009). *Laurel* Extracts Obtained by Steam Distillation, Supercritical Fluid and Solvent Extraction. *J. Natural Products*, 2: 104-109.



Résumé de la thèse

Les plantes aromatiques et médicinales (PAM) constituent une richesse naturelle de première importance au Maroc et représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs. Cependant, la gestion et la conservation de ce patrimoine se trouvent confrontées à des contraintes diverses qui contribuent à la dégradation de ces ressources.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation du patrimoine naturel marocain, principalement les plantes aromatiques et médicinales et plus précisément le Romarin.

Nous nous sommes intéressés premièrement à déterminer et comparer le rendement en huile essentielle, la qualité chimique et l'évaluation de l'activité antibactérienne des essences du *Rosmarinus officinalis* de quatre provenances (Jardin de Jacky d'Agadir, Sefrou, Oued Laou et Ayoun Charquia). Nous avons trouvé que les rendements moyens obtenus, varient en fonction des quatre provenances. La composition chimique des essences a été déterminée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les résultats ont montré une variabilité chimique très intéressante au sein des huiles essentielles étudiées associée à leurs origines. L'étude statistique descriptive et comparative de la composition chimique du Romarin des différentes régions par la méthode d'analyse en composantes principales a montré une bonne classification des huiles essentielles du Romarin des différentes régions selon la composition chimique. De ce fait, ces huiles peuvent être classées en fonction de leur chémotype. Les différentes huiles étudiées ont fait l'objet d'une évaluation de l'activité antibactérienne. Les résultats obtenus montrent que ces essences possèdent des pouvoirs antibactériens intéressants sur toutes les souches étudiées. Cette activité diffère d'une région à une autre statistiquement.

Une étude de l'effet de l'individualité sur la teneur, la composition chimique et l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits fixes du *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* cultivé dans le jardin expérimental de l'Institut National des Plantes Aromatiques et Médicinales de Taounate a été réalisée. Il en résulte que deux individus (5 et 7) peuvent être choisis pour une future multiplication végétative afin d'avoir des clones capables d'assurer une production standard en huile essentielle source d'activité antimycobactérienne très importante. Par contre, les deux individus (4 et 7) peuvent être choisis pour assurer une production des extraits source d'activité antibactérienne très importante vis-à-vis des souches testées y compris *Mycobacterium smegmatis*.

Mots clés : Valorisation PAM, *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus*, Huile essentielle, Composition chimique, Activité antibactérienne, ACP.