

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE
ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEGNEMENT SUPRIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE CONSTANTINE 1



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة قسنطينة 1

N° d'ordre :.....

N° de série :.....

Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie et écologie végétale
Année universitaire 2013/2014

**Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention
Du diplôme de Master**

Filière : Biologie et physiologie végétale

Option : Métabolisme secondaire des plantes

Thème

**Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes
chez *Rosmarinus officinalis* et évaluation de leur
pouvoir antibactérien**

Présenté par :

Soutenu le : 22/06/2014

**BELHI Mustapha
BOURAS Yaakoub**

Devant le jury :

- **Président : Mr CHIBANI Salih** MCB- Université Constantine 1
- **Encadreur : Mme BOUCHOUKH Imane** MAA- Université Constantine 1
- **Examineur : Mme ZEGHAD Nadia** MAA- Université Constantine 1

2013/2014

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, on tient à remercier Dieu le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.

Nous tenons tout d'abord à remercier notre directrice de mémoire, Madame **Bouchoukh Imane**, Maître Assistante « A » à l'université Constantine 1. Recevez ici nos sincères remerciements pour la confiance, les conseils que vous nous avez accordés tout le long de ce travail. Merci également pour votre encadrement, votre disponibilité et votre gentillesse. Nous vous adressons notre profonde reconnaissance pour vos remarques et conseils en vue d'améliorer ce manuscrit.

Nos remerciements vont aussi aux membres de jury : Monsieur **Chibani Salih**, Maître de Conférence « B » à l'université Constantine 1 et Madame **Zeghad Nadia**, Maître Assistante « A » à l'université Constantine 1. Recevez nos plus vifs remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Notre profonde reconnaissance va à Mademoiselle **Abdelaziz Widad**, Maître Assistante « A » à l'université Constantine 1. On n'oublie pas votre soutien qui nous a souvent aidés pour réaliser la partie microbiologique du mémoire.

On tient à remercier chaleureusement Monsieur **Nabil**, ingénieur du laboratoire pédagogique de physiologie végétale à l'université Constantine 1. On vous remercie pour votre soutien moral et pour votre aide technique et scientifique.

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation et au bon déroulement de ce travail.

المخلص

التنوع الجزيئي للنباتات يشكل مصدرا مهما و أساسيا للجزيئات الحيوية النشطة ذات الأصل الطبيعي من بين هذه المكونات الأساسية نجد جزءا كبيرا من المتعضيات الحيوية يستعمل في مجال الإستطباب و العلاج لقد تمحور عملنا على مستخلص من نبتة طبية من منطقة البحر الأبيض المتوسط و هي إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis* L.)

والتي تستعمل محليا للعلاج والطبخ

تقنيات كيميائية كروماتوغرافية و بيولوجية سمحت لنا بالخروج بتقييم كمي و نوعي للفلافونويدات المستخلصة انطلاقا من أوراق أزهار إكليل الجبل عملية الفصل الصبغي (كروماتوغرافيا) باستخدام الطبقة الرقيقة سمحت بالكشف عن عدة عائلات للفلافونويدات في مستخلصنا

إستعملنا دراستنا بإجراء تقييم للقوة المضادة للبكتيريا التي يتمتع بها المستخلص على ثلاثة سلالات بكتيرية النتائج بينت قدرة كبيرة لتنشيط النشاط البكتيري

– فلافونويدات – المتعضيات الثانوية – تقنية الفصل الصبغي – *Rosmarinus officinalis* كلمات مفتاحية نباتات طبية – إكليل الجبل - النشاط المضاد للبكتيريا

Résumé :

La richesse moléculaire des végétaux constitue une source importante de molécules bioactives d'origine naturelle. Parmi ces composés on trouve une grande partie des métabolites secondaires qui sont surtout utilisés en thérapie.

Notre travail a porté sur des extraits d'une plante médicinale de la région méditerranéenne, le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), utilisée en thérapie et cuisine.

Des techniques chimique, chromatographiques et biologiques, nous ont permis de faire une évaluation quantitative et qualitative des flavonoïdes extraits à partir des feuilles et des fleurs du romarin. Une séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) a permis de révéler plusieurs classes d flavonoïdes dans nos extraits.

On a compléter notre étude par une évaluation du pouvoir antibactérien de l'extrait flavonoïque de notre plante contre trois souches. Les résultats montrent une inhibition importante de l'activité des bactéries.

Mots clés : plante médicinale – romarin - *Rosmarinus officinalis*- flavonoides- métabolisme secondaire- CCM- Activité antibactérienne.

Summary :

The wealth Molecular of vegetal is an important source of bioactive molecules of natural origin, among this compounds we find a big part of secondary metabolites, which they are usually used in therapy.

Our work has focused on extracts from a medicinal plant of the Mediterranean area, The Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), used in therapy and cooking.

Chemical, chromatographic, and biological techniques have allowed us to make a quantitative and qualitative evaluation of extracted flavonoids from the leaves and flowers of the Rosemary. A separation with chromatography on thin layer (CTL) has permitted us to reveal many classes of flavonoids in our extracts.

We finished our study with an evaluation of the anti-bacterial power effect of the flavonoid extraction of our plant on three strains. The results show an important inhibition of the bacterial activities.

Liste des figures

Figure 1- <i>Rosmarinus officinalis</i>	5
Figure 2- Classification des polyphénols	8
Figure 3- Structure de base des flavonoïdes	12
Figure 4- Les principales classes de flavonoïdes.....	12
Figure 5- Voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	14
Figure 6- Protocole du screening phytochimique des flavonoïdes réalisée sur les différents organes de la plante.....	19
Figure 7- Préparation de l'extrait éthanolique brut et extraction des flavonoïdes par partition entre solvant.....	21
Figure 8- Préparation de l'extrait méthanolique brut et extraction des flavonoïdes par partition entre solvant.....	22
Figure 9- Résultat des tests du criblage des flavonoïdes dans l'extrait des fleurs de <i>Rosmarinus officinalis</i>	29
Figure 10- Résultat des tests du criblage des flavonoïdes dans l'extrait des feuilles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	30
Figure 11- Chromatogramme des différentes phases de l'extrait éthanolique des feuilles et des fleurs chez <i>Rosmarinus officinalis</i>	31
Figure 12- Chromatogramme des différentes phases de l'extrait méthanolique des feuilles et des fleurs chez <i>Rosmarinus officinalis</i>	31
Figure 13- Résultats de l'activité antibactérienne des différentes fractions de l'extrait des feuilles et des fleurs de <i>Rosmarinus officinalis</i> , par la technique des disques.....	34
Figure 14- Résultats de l'activité antibactérienne des différentes fractions de l'extrait des feuilles et des fleurs de <i>Rosmarinus officinalis</i> , par la technique des puits.....	34
Figure 15- Diamètre des zones d'inhibition des fractions de l'extrait contre différentes bactéries.....	36

Liste des tableaux

Tableau 1- Principales classes des composés phénoliques.....	8
Tableau 2- Activités biologiques de quelques composés phénoliques.....	10
Tableau 3- Le système solvants utilisé pour la CCM.....	23
Tableau 4 : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes.....	25
Tableau 5: Résultats du criblage des flavonoïdes dans les feuilles et fruits chez <i>Rosmarinus officinalis</i>	29
Tableau 6 : Rapports frontaux des différents spots séparés après CCM des différentes fractions des extraits EtOH et MeOH des feuilles de <i>rosmarinus officinalis</i>	32
Tableau 7 : Rapports frontaux des différents spots séparés après CCM des différentes fractions des extraits EtOH et MeOH des fleurs de <i>Rosmarinus officinalis</i>	32
Tableau 8 : Diamètres d'inhibition des différentes fractions de l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i>	35

Table des matières

•	Introduction	
•	1ère partie : Synthèse bibliographique	
•	Chapitre I- Description de la plante	
•	I-1- Présentation de la famille des lamiacées.....	3
•	I-2- Le genre <i>Rosmarinus</i>	4
•	3- Description de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i>	4
•	I-3-1- Taxonomie de l'espèce.....	4
•	Systematique classique.....	4
○	b- Classification contemporaine	5
•	I-3-2- Description botanique.....	5
•	I-3-3- Habitat et culture.....	5
•	I-3-4- Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin.....	6
•	Chapitre II- Le Métabolisme secondaire	
•	Généralités.....	7
•	II-1- Les composés phénoliques	7
•	II-1-1- Définition	7
•	II-1-2- Les principales classes des composés phénoliques.....	7
•	1- 3- Propriétés biologiques	10
•	II.2. Les flavonoïdes	11
•	II2.1. Définition	11
•	II2.2. Structure chimique et classification	11
•	II-2-3- Biosynthèse des flavonoïdes	13
•	II-2-4- Absorption et biodisponibilité	13
•	II-2-5- Propriétés biologiques des flavonoïdes	15
•	II -3- Les tanins.....	15
•	II -4- Les coumarines.....	16
•	II-5- Les terpènes.....	16
•	II-6-Les alcaloïdes.....	16
•	II-6-1-.Propriétés	17
•	II -7- Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.....	17

•	PARTIE II: MATERIEL ET METHODES	
•	I -Etude phytochimique.....	19
•	I-1- Matériel végétal utilisé	19
•	I-2- Criblages des flavonoïdes	19
•	I-3 - Extraction des flavonoïdes.....	20
•	I-3-1- Macération et préparation des extraits éthanoliques et méthanoliques bruts.....	20
•	I-3-2- Fractionnement des extraits bruts par extraction Liquide-Liquide (ELL).....	21
•	I-3-2-1- Fractionnement de l'extrait éthanolique (EtOH)	21
•	I-3-2-2- Fractionnement de l'extrait méthanolique (MeOH)	22
•	I-4- La chromatographie analytique sur couche mince (CCM)	24
•	I-4-1- Principe.....	24
•	I-4-2- Mode opératoire.....	24
•	a / Préparation de la phase stationnaire.....	24
•	b / Préparation de la phase mobile.....	24
•	c / Le dépôt.....	24
•	d / Développement des plaques.....	25
•	e / Révélation.....	25
•	f / Identification des flavonoïdes.....	25
•	II- Etude de l'Activité antibactérienne.....	27
•	II-1- Objectif	27
•	II-2- Principe	27
•	II-3- Préparation des souches bactériennes	27
•	II-4- Extrait testé	27
•	II-5- Milieu de culture	28
•	II-6- Culture des bactéries	28
•	II-7- Dépôt des extraits	28
•	II-7-1- Méthode des disques	28
•	II-7-2-Méthode des puits.....	28

• II-8- Expression des résultats.....	27
• RESULTATS ET DISCUSSION	
• I- Criblage des flavonoïdes.....	29
• I-1- Résultats	29
• I-2- Discussion	30
• II- Séparation des extraits bruts MeOH et EtOH par chromatographie sur couche mince (CCM).....	30
• II-1- Résultats.....	30
• II-2- Discussion	33
• III- Evaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes.....	34
• III-1- Résultats	34
• III-2- Discussion	36
• CONCLUSION ET PERSPECTIVES	39
• Références bibliographiques	

Introduction générale

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (Lhuillier, 2007 in Athamna, 2008)

Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel. Parmi, les 25 composés pharmaceutiques les plus vendus au monde, 12 d'entre eux sont issus de produits naturels. Cela signifie que le nombre de médicaments issus de produits naturels est supérieur à celui issus de la chimie combinatoire où plus de 10 000 molécules doivent être synthétisées puis testées afin de mener au développement d'un seul médicament. Par conséquent, les quelques 250 à 300 000 espèces inventoriées de plantes que l'on trouve sur terre, dont seulement 5 à 15% ont fait l'objet de recherches de molécules bioactives, représentent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels.

Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (Bérubé-Gagnon, 2006 in Athamna, 2008)

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives (Ferrari, 2002 in Athamna, 2008)

Malgré la nature hétérogène d'une biodiversité immense du continent africain en général et de l'Algérie en particulier, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier *Rosmarinus officinalis*, des lamiacées très fréquemment employées dans le pourtour Méditerranéen.

Le romarin (*Rosmarinus Officinalis* L.) fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires. C'est une herbe aromatique de la famille des Lamiacées, appréciée pour ses propriétés aromatiques, anti-oxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, emménagogues et anti-tumorales, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle.

Introduction

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (Yano *et al.* 2006 in Zaghad,2008).

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de l'espèce (*Rosmarinus Officinalis* L.) en flavonoïdes et à déterminer leurs propriétés biologiques.

Dans la première partie, nous aborderons les différentes connaissances bibliographiques sur la plante, les flavonoïdes et sur les souches microbiennes testées.

Dans la partie expérimentale, nous développerons dans le premier chapitre le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour l'extraction, des polyphénols et des flavonoïdes, l'analyse par CCM des flavonoïdes et finalement l'activité antimicrobienne. Le deuxième chapitre sera consacré aux résultats obtenus dans notre étude et à leur discussion.

- **Chapitre I**

Description de la plante**I-1- Présentation de la famille des lamiacées :**

La famille des Lamiacées (Lamiaceae) ou Labiées (Labiatae) est une importante famille de plantes dicotylédones, qui comprend environ 4000 espèces et près de 210 genres (Naghibi *et al.*, 2005 in Bougandoura, 2010)

Cette famille comporte de nombreuses plantes exploitées pour les essences ou cultivées pour l'ornementation et la plupart de ces espèces sont aussi bien utilisées dans la médecine traditionnelle que dans la médecine moderne (Judd *et al.*, 2002).

La famille des lamiacées contient une très large gamme de composés comme les terpénoïdes, les iridoïdes, les composés phénoliques, et les flavonoïdes. Les huiles essentielles et plus précisément les courtes chaînes des terpénoïdes sont responsables de l'odeur et la saveur caractéristique des plantes (Naghibi *et al.*, 2005 in Bougandoura, 2010).

C'est une famille très importante dans la flore d'Algérie, ces espèces sont souvent des plantes herbacées, ou sous-arbrisseaux à poils glanduleux, en général aromatiques. Leur tige est carrée, certaines espèces sont dressées, d'autres couchées portent des feuilles opposées ou verticillées. Les fleurs bisexuées, irrégulières, groupées à l'aisselle des feuilles en inflorescences plus ou moins allongées ou en inflorescences terminales plus ou moins denses, à calice tubuleux ou en cloche persistant, à corolle à tube très développé, ordinairement caduque et à 2 lèvres (rarement). Le fruit sec se séparant en quatre articles contenant chacun une graine (Guignard, 1998 in Bougandoura, 2010).

Les lamiacées sont des plantes herbacées ou arbustives, très rarement des arbres. Elle caractérisent par la présence de glande épidermique aromatique. Les feuilles sont opposées exstipulé, simple rarement composé, les jeunes tiges sont à section quadrangulaire. Les fleurs sont ordinairement hermaphrodite, souvent groupées en cymes compactes ou plus rarement solitaire en position axillaire. Le calice est souvent persistant, il est pentamère, possède cinq dents et peut être bilabié, la corolle normalement pentamère et souvent bilabiée ou actinomorphe avec quatre lobes

Les étamines sont au nombre de quatre ou, parfois, de deux ; dans ce dernier cas, elles sont accompagnées de deux staminodes. Le connectif tend à séparer les deux sacs polliniques. Il y a souvent un disque nectarifère à la base du pistil ou parfois sur le gynophore. Le nectar est riche en saccharose.

Le pistil est composé de deux carpelles biovulés, chacun se divisant en deux loges uniovulées.

Les ovules sont unitéguminés, d'anatropes à hémitropes. Le fruit est ordinairement constitué de quatre nucules à tégument dur ; ce peut être une drupe. Les semences sont à embryon droit et un albumen réduit ou absent

I-2- Le genre *Rosmarinus* :

Rosmarinus en Latin signifie la rosée marine, ce qui fait référence à la fois à la présence du romarin sur les côtes et les îles de la méditerranée et à diverses légendes liées à cette plante (Boudy, 1948, Favre *et al.*, 1981, Grégory, 1988 in Eloutassi, 2004)

Le genre *Rosmarinus*, qui fait partie de la famille des Lamiacées, regroupe trois espèces qui sont toutes originaires du bassin méditerranéen : *R. officinalis*, *R. tomentosus* et *R. eriocal*. Le romarin est un arbrisseau dont la tige pouvant atteindre deux mètres, est couverte d'une écorce grisâtre. Le fruit, ovoïde, est entouré par un calice persistant, sec est constitué de quatre akènes (tetrakène). Il attire les insectes (entomophile) pour assurer la pollinisation (Boudy, 1948 ; Grégory, 1988 in Eloutassi, 2004)

La floraison commence dès le mois de février (parfois en janvier) et se poursuit jusqu'à avril-mai. La couleur des fleurs, qui se présentent en grappes assez semblables à des épis, varie du bleu pâle au violet, en passant par le rose (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches : *R. officinalis albiflorus*). Certaines variétés peuvent être remontantes en automne.

I- 3- Description de l'espèce *Rosmarinus officinalis*

I-3-1- Taxonomie de l'espèce :

a- Systématique classique :

Règne : Plantes

Embranchement : Spermaphytes

Sous- embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Lamiales

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *Rosmarinus officinalis*

b- Classification contemporaine :

Règne : Plantes

Embranchement : Magnoliophyte

Sous- embranchement : Euangiospermes

Classe : Eudicots

Ordre : Lamiales

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *Rosmarinus officinalis*

I-3-2- Description botanique :

Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées, il peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur, il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous.

La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril – mai. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches *Rosmarinus officinalis albiflorus*). Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base .Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tétrakène (de couleur brune) (Zeghad, 2008)



Figure 1- *Rosmarinus officinalis* (Wikipédia 2014)

I-3-3- Habitat et culture :

Le romarin est cultivé en méditerranée ; dans des sols drainés, au soleil (Bremness, 2002). On le cultive du début du printemps, jusqu'à l'été (Poletti, 1988 in Athamna, 2008).

Le romarin se développe sous climat méditerranéen de préférence dans les milieux secs et arides.

I-3-4- Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin :

En médecine traditionnelle, le romarin aide à la digestion, traite les céphalées et les migraines, les blanchêtes, les coliques, améliore les fonctions hépatiques et biliaires en cas de troubles digestifs. Il est utilisé en usage externe pour soigner les rhumatismes et les troubles circulatoires (Teuscher, 2005 in Makhloufi, 2010). C'est un hypoglycémique, il soigne les affections oculaires (Bnouham *et al.*, 2002 in Makhloufi, 2010) et est utilisé comme antiseptique, cholagogue, antispasmodique, vulnéraire et diurétique (Koubissi, 2002 in Makhloufi, 2010).

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

- Anti spasmodiques, diurétiques, hépato protectrices, soulagement des désordres respiratoires
- Antibactériennes, antimutagéniques, antioxydantes, chémopréventives.
- Anti-inflammatoires, antimétastatiques.
- Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires et de la prolifération des tumeurs cutanées.
- D'autres études montrent que les composants du romarin inhibent les phases d'initiation et de promotion de cancérogénèse (Offord et al, 1995 in Zeghad, 2008)
- Le Carnosol du romarin possède une activité antivirale contre le virus du SIDA (HIV) alors que l'acide carnosique a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1 (Paris et al, 1993 in Zeghad, 2008).

- **Chapitre II**

Le Métabolisme secondaire**Généralités :**

La majorité des molécules synthétisées par les plantes d'intérêt pharmaceutiques sont extraites directement de la plante entière. Ces molécules, appelées métabolites secondaires, ne constituent pas des espèces chimiques impliquées dans la croissance, aucun rôle spécifique pour la plante ne leur a été assigné (Braz-Filho, 1999 in Eloutassi, 2004). Le métabolisme secondaire des plantes est lié au métabolisme primaire par cinq voies métaboliques principales: la voie de l'acide shikimique, de l'acide malonique, de l'acide mevalonique, des acides aminés (Taiz et Zeiger, 1998 in Eloutassi, 2004) et du glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) via la voie des pentoses phosphates (Contin *et al.*, 1998 in Eloutassi, 2004).

Les interactions entre métabolismes primaire et secondaire. Les précurseurs principaux de la plupart des métabolites secondaires sont l'acétyl-Coenzyme A, l'erythrose-4-phosphate, le phosphoénolpyruvate, les acides aminés, le pyruvate et le 3- phosphoglycérate. A l'inverse des métabolites primaires, les métabolites secondaires ne sont pas synthétisés de manière uniforme dans le règne végétal. Un métabolite secondaire particulier est souvent spécifique à quelques espèces. Ces métabolites secondaires sont classés selon leur structure chimique; on les résume en trois grandes catégories : les composés phénoliques, les isoprénoides et les composés azotés.

II-1- Les composés phénoliques :**II-1-1- Définition :**

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 8000 structures connues différentes (Bahorun, 1997 in Athamna, 2008), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (Martin et Andriantsitohaina, 2002 in Athamna, 2008).

II-1-2- Les principales classes des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base, ces structures peuvent être sous forme libres ou liées à l'ester ou hétérosides (Bruneton, 1999).

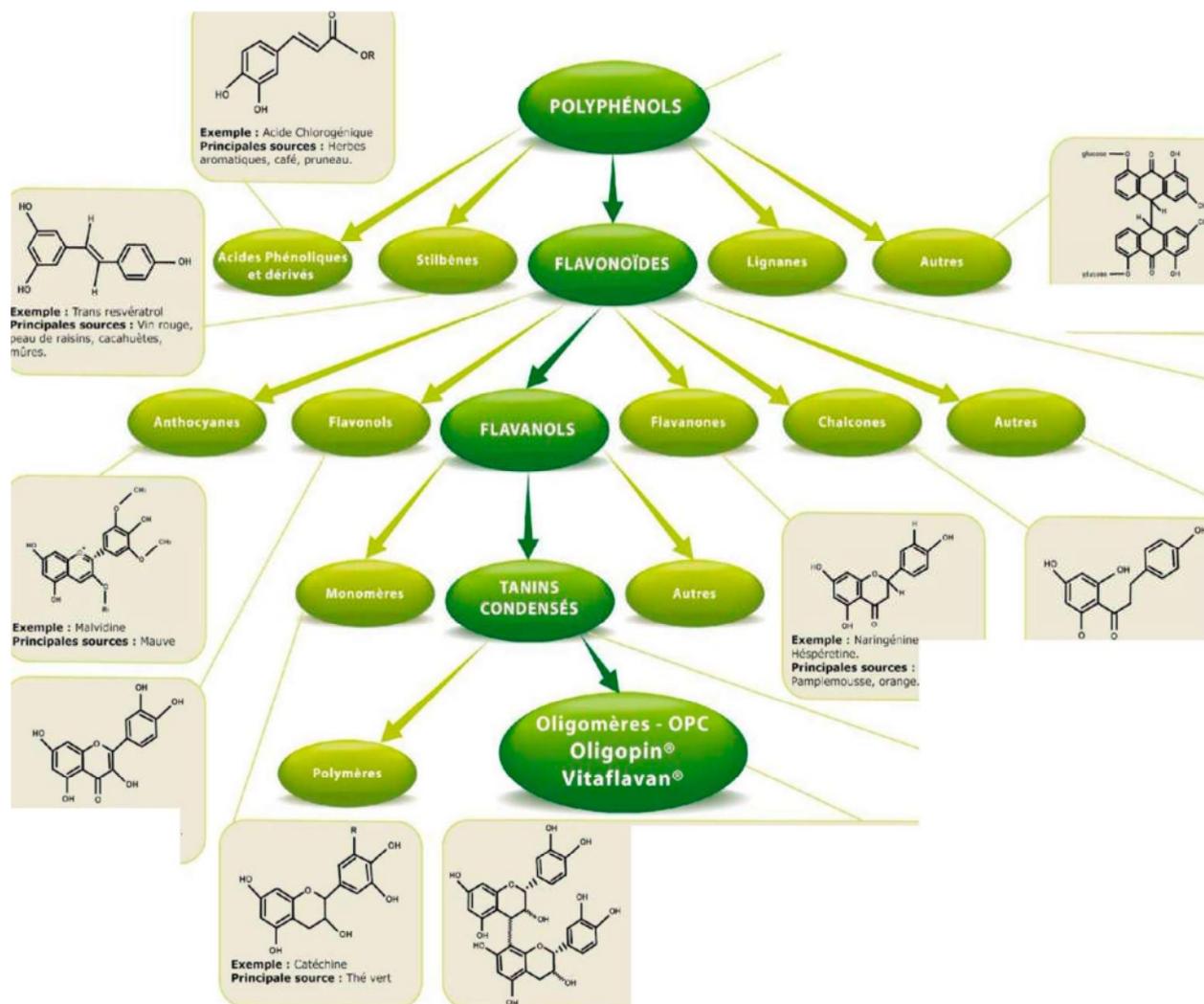


Figure 2- Classification des polyphénols

Tableau 1- Principales classes des composés phénoliques.

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Exemples	Plantes
6	C6	Phénols simples	Cathécol, hydroquinone	Busserole
7	C6-C1	Acides phénols benzoïque	Ac. gallique, Ac. salysalique, vanilline	Artichaut Saule
8	C6-C2	Acétophénones	3-acétyl6-méthoxybenzaldehy	Saule

9	C6-C3	Acides phénols cinnamiques	Ac. coumarique, Ac.caféique	Romarin Marronnier d'inde
10	C6-C4	Naphtoquinones	Shikonine	Drosera spp.
13	C6-C1-C6	Xanthonnes	Bellidifoline, mangoctine	Racine de gentiane Centaurée
14	C6-C2-C6	Stiblènes	Hydrangénol, Pinosylvine	Raisin, pin
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine Roténoïde	Ginkgo Thym Camomille
18	(C6-C3) ₂	Lignanes	Matairésinol	Chardon
30	(C6-C3-C6) ₂	Bi flavonoïdes	Amentoflavone Hinokiflavone	Carcinia Hyperic
n	(C6-C3-C6) _n	Tanins condensés (proanthocyanidols)	Aesculitanins	Marronnier d'inde, vigne

II- 1- 3- Propriétés biologiques :

Les polyphénols ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leur structure chimique.

Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes puisqu'elles comprennent plus de 6000 molécules. Contrairement aux antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT). Les polyphénols n'ont aucun effet nuisible sur la santé humaine (Bounatirou *et al.*, 2007 in Bougandoura, 2010).

Les polyphénols ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries (Makoi et Ndakidemi, 2007 in Bougandoura, 2010).

Les pigments non azotés sont impliqués dans le processus de pollinisation : ils attirent l'attention des insectes pollinisateurs, ou servent au contraire à dessiner les formes pour éloigner les prédateurs. D'autre sont des inhibiteurs d'enzymes et interviennent dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies (Bruneton, 1999).

Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (Bruneton, 1999).

Tableau 2- Activités biologiques de quelques composés phénoliques (Bruneton 1999 ;Hennebelle, 2006 in Bougandoura, 2010).

Composés phénoliques		Activité biologique
Ac. Phénols	Ac. cafeique Ac. salicylique	Antibactérienne Antifongique, antioxydante
Tanins	Tanin gallique Proanthocyanidine	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, antidiarrheique , effet antiseptique , effet vasoconstricter

Flavonoïdes	Lutéoléine Catéchine Hespéridine Quercétine Naringénine	Antitumorale, anticarcinogène, anti-inflammatoire, antioxydante, antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypotenseur diurétique.
Coumarines	Dicoumarol	Anticoagulant, antioxydant, protectrice vasculaire et antioedémateuse

II.2. Les flavonoïdes :

II.2.1. Définition :

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On attribue à ces flavonoïdes des propriétés variées : veinotonique, antitumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice, oestrogénique et/ou anti-oestrogénique, anti-virale etc... Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires.

Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On distingue différents types de noyaux : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, aurones, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, 3-arylcoumarines, coumestanes, roténoïdes, etc...

II.2.2. Structure chimique et classification :

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules (Harbone, 1988) dont les plus importantes sont : les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanidines (Figureure 4)

Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous la forme libre (génine) ou sous la forme de glycoside (C ou O glycosylés). On les retrouve dans toutes les plantes vasculaires où elles peuvent être localisées dans divers organes : racines, tiges, feuilles et fruits (Bruneton, 1999).

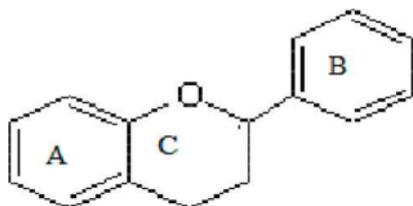
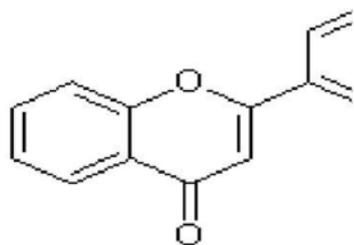
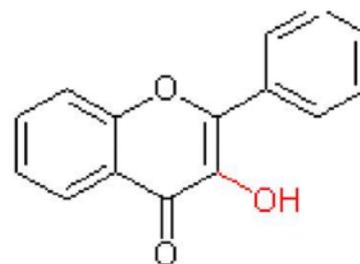


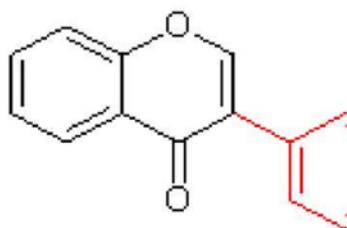
Figure 3- Structure de base des flavonoïdes(Moufouk,2008)



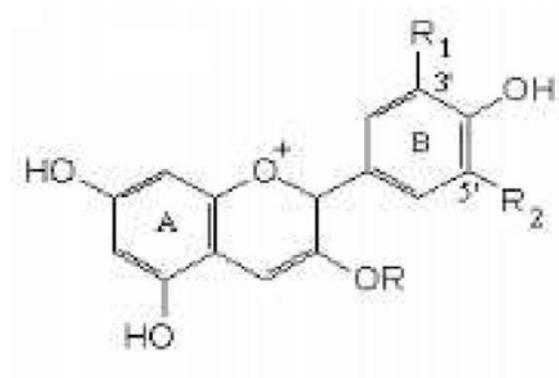
Flavone



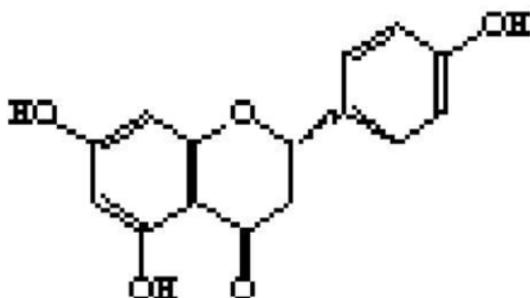
Flavonol



Isoflavone



Anthocyanidines



Flavanone

Figure 4- Les principales classes de flavonoïdes

II-2-3- Biosynthèse des flavonoïdes :

La biosynthèse des flavonoïdes se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone. Par l'action d'enzymes, cette chalcone, est métabolisée en différentes classes de flavonoïdes (Figureure4). Des étapes ultérieures, surtout de glycosylation et d'acylation, amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle ils se trouvent in vivo. A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées (Bruneton, 1999).

II-2-4- Absorption et biodisponibilité :

Le métabolisme et la pharmacocinétique des polyphénols, et plus particulièrement les flavonoïdes ont fait l'objet d'intenses recherches. Ces dernières ont montré que les flavonoïdes sont rapidement absorbés dans le tractus intestinal et détectés dans le plasma, ce qui suggère qu'ils sont disponibles pour exercer leurs effets biologiques (Spencer *et al.*, 2004 in Bougandoura, 2010).

En effet, il a été démontré que les flavonoïdes peuvent traverser la barrière intestinale et atteindre la circulation plasmatique à des concentrations de l'ordre du micromolaire, concentrations auxquelles ils possèdent des effets bénéfiques observés in vitro (Manach *el al.*, 2005 in Bougandoura, 2010).

Scalbert *et al.* (2002) rapportent que l'absorption de la lutéoline dans le petit intestin peut atteindre jusqu'à 60 % de la quantité consommée et que la demie-vie varie de 2 à 28 heures. D'une manière générale, les flavonoïdes sont excrétés dans la bile et dans le duodénum, puis ils sont réabsorbés dans le cycle entérohépatique ce qui explique la longueur de leur demie-vie (Bougandoura,2010)

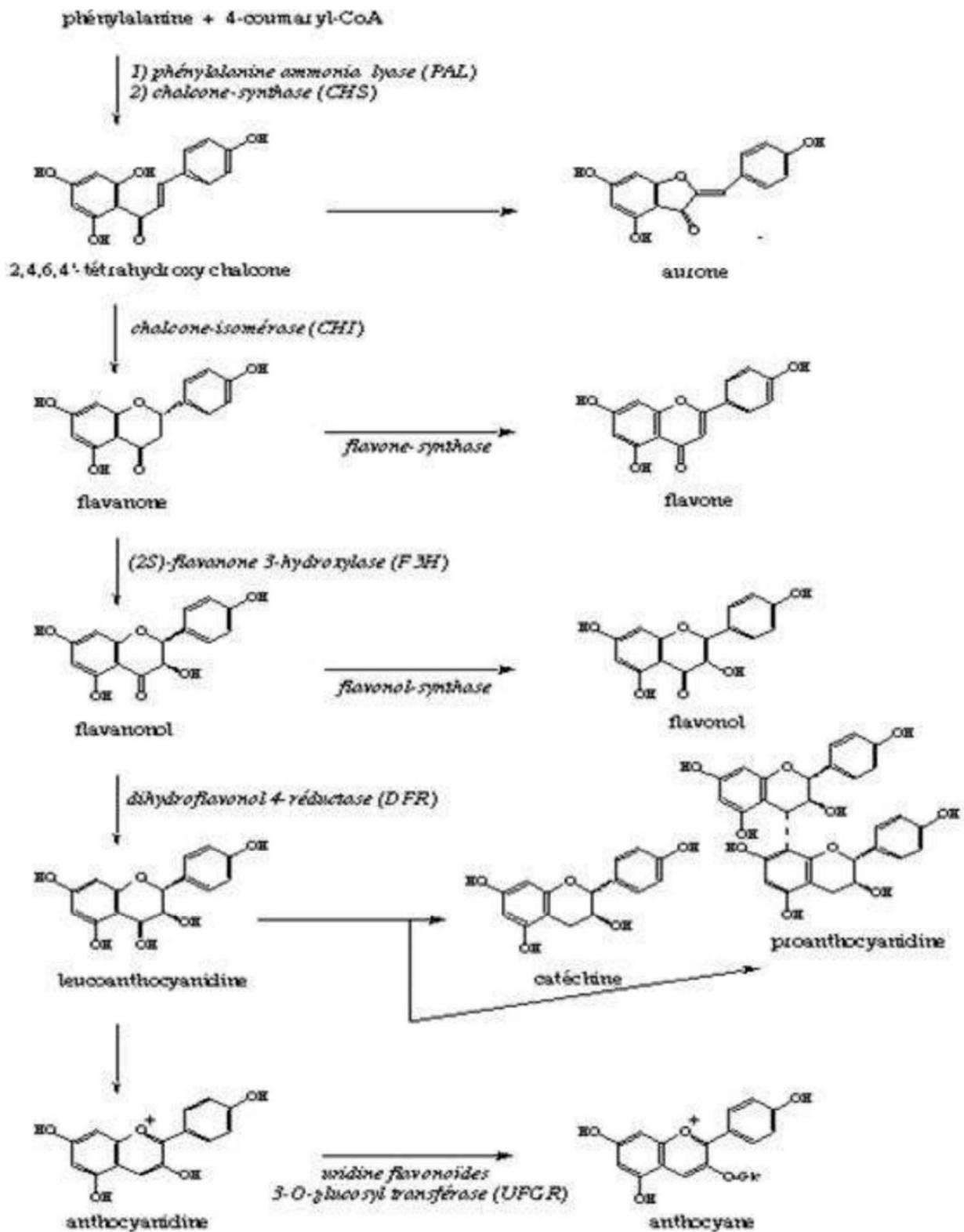


Figure 5- Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999)

II-2-5- Propriétés biologiques des flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont suscité l'intérêt scientifique depuis plusieurs décennies. D'abord à cause de leur importance dans la physiologie des plantes et de leurs rôles dans la pigmentation, mais aussi parce qu'ils sont impliqués dans la croissance et la reproduction des plantes. Ils ont également pour fonction de protéger ces dernières contre les pathogènes d'origine virale ou bactérienne, les prédateurs comme les insectes (Bravo, 1998, Manach *et al.*, 2004 in Bougandoura, 2010).

Plus particulièrement, les flavonoïdes sont impliqués, chez les plantes, dans le transport d'électrons lors de la photosynthèse et ils jouent un rôle de protection contre les effets néfastes des rayons ultraviolets en agissant comme antioxydant.

Les flavonoïdes parviennent à capturer les espèces réactives de l'oxygène associées au stress oxydatif, les empêchant ainsi de créer des dommages cellulaires. En effet, ils sont capables d'inactiver et de stabiliser les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. Ils inhibent aussi l'oxydation des LDL et, de ce fait, peuvent prévenir l'athérosclérose et diminuer les risques de maladies cardiovasculaires.

Les flavonoïdes sont capables d'exercer en plus des propriétés antioxydantes, des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et antiulcérogènes. Certains flavonoïdes ont également démontré un potentiel d'agent vasodilatateur. Ils ont été surnommés les « modificateurs naturels des réponses biologiques » (Di Carlo *et al.*, 1999, Middleton *et al.*, 2000, Woodman et Chan, 2004, in Bougandoura, 2010).

Une panoplie d'études *in vitro* ont ensuite montré que les flavonoïdes peuvent moduler l'activité d'une grande variété d'enzymes impliquées dans des voies importantes qui régulent la division et la prolifération cellulaire, l'agrégation des plaquettes, la détoxification, l'inflammation et la réponse immunitaire (Middleton *et al.*, 2000 in Bougandoura, 2010). Ils sont donc capables de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires.

Récemment, plusieurs études épidémiologiques ainsi que des études réalisées dans différentes lignées cellulaires ont démontré le potentiel antitumoral et anticancéreux des flavonoïdes (Birt *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 2001 ; Ramos, 2007 in Bougandoura, 2010) notamment les molécules appartenant à la sous-classe des flavones efficaces contre le colon et les poumons. De plus les anthocyanidines ont montré des effets d'inhibition de la migration de cellules provenant de tumeurs hautement invasives et prolifératives, les glioblastomes (Lamy *et al.*, 2007 in Bougandoura, 2010)

II -3- Les tanins :

Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé. Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation

pour les insectes ou le bétail (Eberhard et al., 2005 in Makhloufi, 2010). Les tanins ont la propriété de tanner la peau. Cette propriété de tannage provient de la Création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène (Schauenberg et Paris ,2006 in Makhloufi, 2010).Les tanins représentent généralement la principale partie de l'extrait polyphénolique. Peu de choses sont connues concernant leur rôle biologique sur la plante mais leur présence confère à cette dernière des propriétés astringente, antiseptique, antioxydante et antidiarrhéique.

II -4- Les coumarines :

Pour la première fois, la coumarine fut isolée de la fève tonka (*Coumarouna odorata*) à laquelle elle confère son odeur caractéristique de foin coupé (Garnero, 2000 in Makhloufi, 2010). Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Igor, 2002 in Makhloufi, 2010)

II -5- Les terpènes :

La très grande majorité des terpènes sont spécifiques du règne végétal mais on peut en rencontrer chez les animaux. Tous les terpènes et les stéroïdes peuvent être considérés comme formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonées ramifiées dérivées du IPP.

Selon le nombre d'entités isoprène qui sont incorporées dans leurs structures, les terpènes sont subdivisés en : monoterpènes ($C_{10}H_{16}$), sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$), diterpènes ($C_{20}H_{32}$), triterpènes ($C_{30}H_{48}$), tetraterpènes ($C_{40}H_{64}$) et polyterpènes ($(C_5H_8)_n$) (Belguidoum,2011)

II -6- Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés et faiblement basiques issus Principalement des végétaux. Ils présentent des réactions communes de Précipitation . Après extraction, ils sont détectés par des réactions générales de précipitation fondées sur leur capacité de se combiner avec des métaux. La caractérisation de la présence d'alcaloïde peut se faire par précipitation à l'aide de : Réactif silicotungstique : réactif de Bertrand, Réactif Tétraiodomercure de potassium : réactif de Valser-Mayer, Iodobismuthate de potassium : réactif de Dragendorff (Kansole, 2009 in Kanoun,2010).

II -6-1-Propriétés

Les propriétés toxiques ou médicamenteuses des alcaloïdes font de ce groupe de métabolites secondaires un intérêt particulier. Au niveau du système nerveux central ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine,...). Au niveau du système nerveux autonome comme sympathomimétiques (éphédrine), anticholinergiques (atropine). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antipaludiques (quinine) (Kansole, 2009 in Kanoun,2010).

II -7- Caractéristiques des souches bactériennes utilisées :

Staphylococcus sp :

Les *staphylocoques* sont des cocci à gram positif qui tendent à se grouper en amas (Nauciel, 2000,in athamna) irrégulier à la façon d'une grappe de raisin (Avril, 2000,in athamna).

Staphylococcus aureus est un germe aérobic - anaérobic facultatif (Avril, 2000,in athamna), doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales, possède une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de *staphylocoques*.

La bactérie est très répandue chez l'homme et dans de nombreuses espèces animales.

Chez l'homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses et des zones cutanées humides.

Il développe rapidement des résistances aux antibiotiques et les souches hospitalières ne sont souvent sensibles qu'aux glycopeptides (Nauciel, 2000).

Escherichia coli :

C'est l'espèce dominante de la flore aérobic du tube digestif. *Escherichia coli* est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers (Nauciel, 2000,in athamna).

Le groupe *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, dit K.E.S, sont rassemblés des *enterobacteriaceae* qui ont en commun les caractères suivants :

- La réaction de Voges-Proskauer (VP) est généralement positive
- Ce sont des bactéries pathogènes
- Ces espèces sont souvent multi-résistantes aux antibiotiques (Avril, 2000,in Athamna).

Bacillus ;

Les *Bacillus* forment un genre de bactéries à gram positif, appartenant à la famille des bacillacées (*Bacillaceae*), l'ordre des bacillales (*Bacillales*), la classe des bacilles (*Bacillis*), le phylum des firmicutes (*Firmicutes*).

De forme bacilles, les dimensions de ces bactéries sont variables ; elles peuvent aller de ($0.5 \times 1.2 \mu\text{m}$) à ($2.5 \times 10 \mu\text{m}$). Elles sont aérobies ou aéro-anaérobies facultatives, et tirent leur énergie par respiration ou fermentation. Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables. Celles-ci donneront naissance à de nouvelles bactéries en cas de conditions favorables

I- Etude phytochimique

I-1- Matériel végétal utilisé :

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de *Rosmarinus officinalis*. Les feuilles et les sommités fleuries du romarin ont été récoltées en mars 2014 de la région de Tébessa et de l'université de Constantine. Après séchage à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, le matériel végétal est broyé grossièrement dans un moulin électrique.

I-2- Criblages des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des pigments quasi-universels des végétaux, se répartissent en plusieurs classes des molécules, plusieurs tests de caractérisation permettent de mettre en évidence différents types de flavonoïdes.

La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par des tests simples et rapides (les réactions à la cyanidine) (Nikiama, 2005 in Kechkar 2008).

La préparation de l'extrait hydro alcoolique de chaque partie de la plante (feuille fleurs)

A partir de 10g de matériel végétal coupé et broyé, on rajoute 10ml d'un mélange méthanol /eau (7/3) le rapport solvant / matériel végétal utilisé est 10/1 (ml/g) après 24 h on filtre le broyat sur papier filtre, seulement les extraits des feuilles sont dépigmentés par 10ml de cyclohexane pendant 24 h, les fleurs ne contiennent pas de la chlorophylle. Chaque extrait est reparti dans quatre tubes (Figure 6)

Le tube 1 sert de témoin.

Dans le deuxième tube on ajoute quelques gouttes de HCl concentré à 50 % et quelques tournures de Mg (5 environ 0.5 g), on laisse agir 5 minutes. La coloration rouge implique la présence des flavones, la coloration rouge pourpre implique la présence des flavonols et la coloration rouge violacé implique la présence des flavanones et flavonols.

Le même protocole expérimental dans le troisième tube mais on ajoute aussi 1 ml d'eau distillée et 1 ml d'alcool isoamylique. C'est la coloration de la phase supérieure qui est prise en considération.

Ensuite, on additionne dans le quatrième tube 0.5 ml de HCl concentré et met au bain marie 30 minutes. La coloration rouge dénote la présence de leucoanthocyanes.

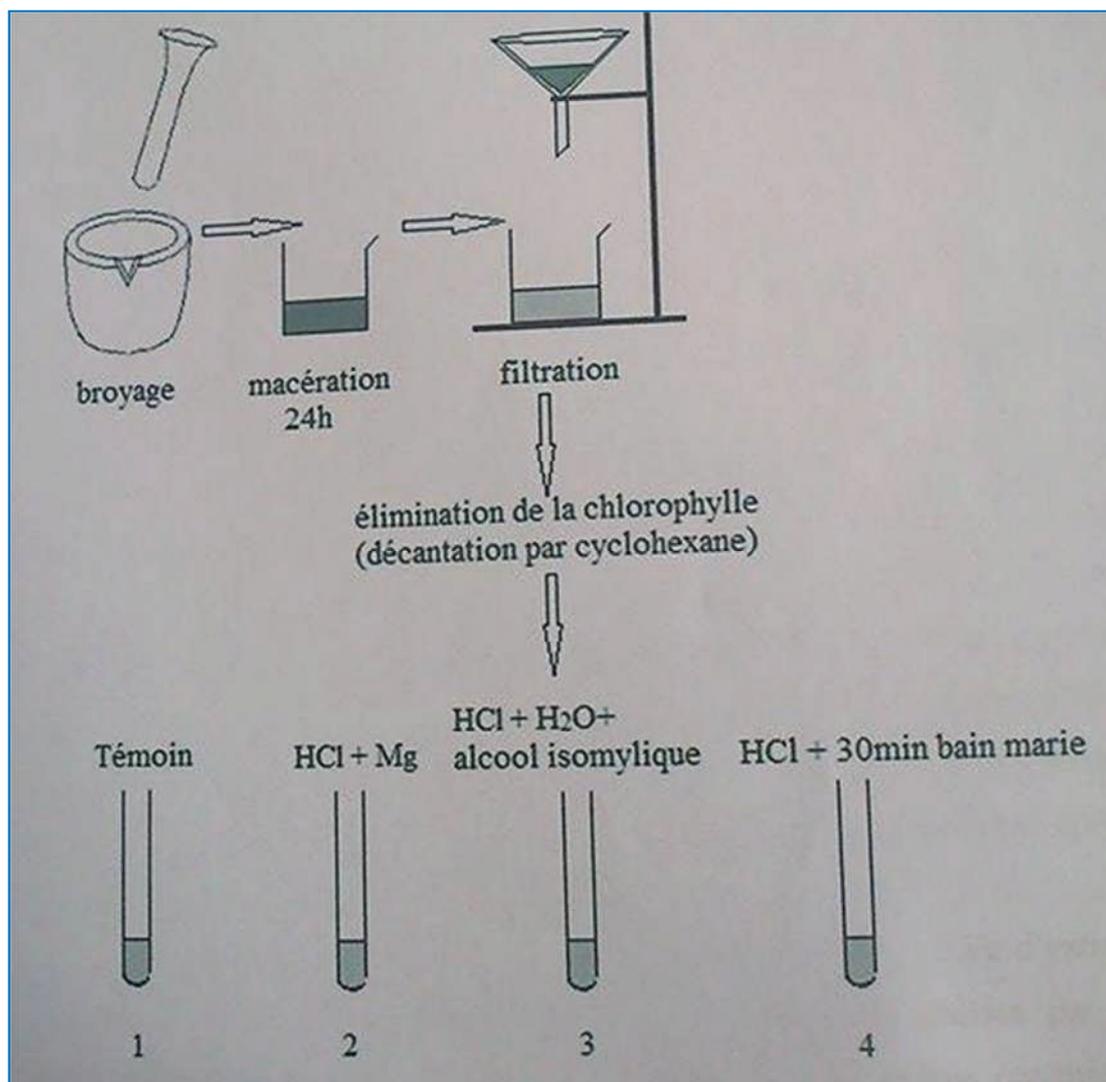


Figure 6- Protocole du screening phytochimique des flavonoïdes réalisée sur les différents organes de la plante (Amirèche, 2013)

I-3 - Extraction des flavonoïdes :

I-3-1- Macération et préparation des extraits éthanoliques et méthanoliques bruts :

Suivant le protocole d'extraction décrit par (Marston et Hostettmann ,2006 ; in Akroum , 2011). Le matériel végétal broyé (100 g) est soumis à une extraction par macération dans le mélange solvant / eau pendant 24 heures avec renouvellement de solvant toutes les 24 heures et agitation de temps en temps.

Le rapport matériel végétal /solvant utilisé était de (1 /10 g/ml)

Le mélange éthanol/eau 8/2 : (v/v)

Le mélange méthanol/eau 7/3 :(v/v)

Pour 8g de fleurs on a utilisé :

Le mélange éthanol/eau : 64 /16 (v/v)

Le mélange méthanol/eau 56/24 (v/v)

Pour 30g de feuilles on a utilisé :

Le mélange éthanol/eau : 240/60 (v/v)

Le mélange méthanol/eau : 210/90 (v/v)

La chlorophylle est éliminée par cyclohexane. Les macéras sont réunis puis ils sont filtrés sur un papier filtre. Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris dans 100 ml d'eau distillée bouillante (l'intérêt de l'utilisation de l'eau distillée bouillante c'est pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation). Après une décantation de toute une nuit on récupère la phase limpide qui va subir des affrontements par des solvants de polarité croissante.

I-3-2- Fractionnement des extraits bruts par extraction Liquide-Liquide (ELL) :

Cette étape permet de séparer les flavonoïdes selon leur structure et leur degré de polymérisation en les affrontant avec plusieurs solvants allant du moins polaire au plus polaire.

I-3-2-1- Fractionnement de l'extrait éthanolique (EtOH) :

- Affrontement par éther de pétrole : pour enlever les composés non phénoliques (les acides gras, chlorophylle, huiles, résine, cires...)
- Affrontement par éther di éthylique : pour soutirer les aglycones.
- Affrontement par acétate d'éthyle : pour soutirer les flavonoïdes mono-glycolisés.

Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter, la phase aqueuse et le solvant sont agités énergiquement puis laissés au repos pendant 24 heures , la phase aqueuse (qui est au fond de l'ampoule) et la phase chargée de molécules spécifiques sont récupérées séparément. Les différentes phases récupérées (acétate d'éthyle, phase eau résiduelle) sont évaporées à sec puis reprises par 10 ml du méthanol, les extraits obtenus sont ensuite stockés à une température ambiante jusqu'à leur utilisation.

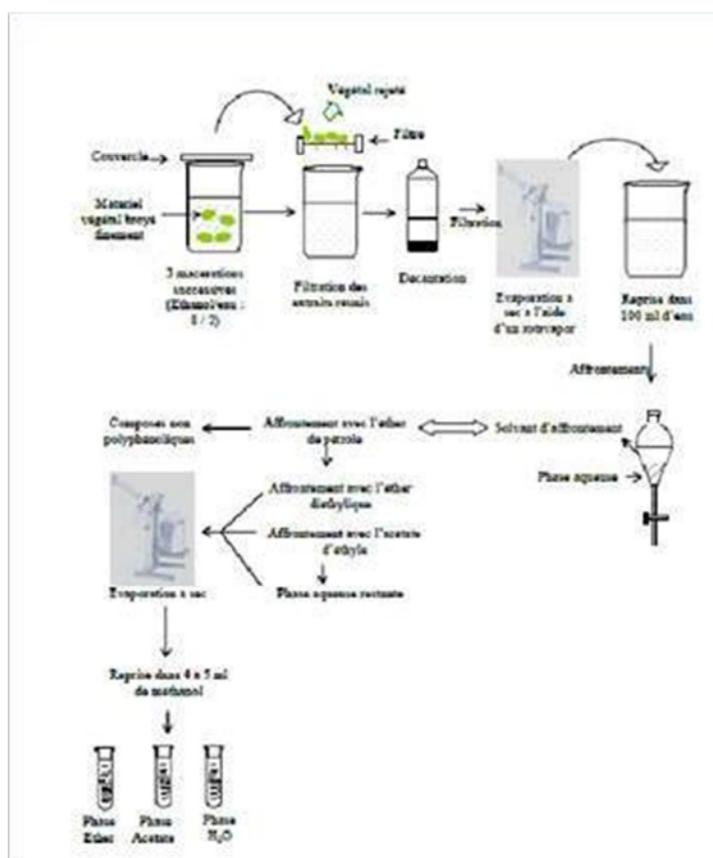


Figure 7- Préparation de l'extrait éthanolique brut et extraction des flavonoïdes par partition entre solvants

I-3-2-2- Fractionnement de l'extrait méthanolique (MeOH) :

La phase aqueuse est affrontée successivement par les solvants suivant :

- L'éther de pétrole.
- Le chloroforme.
- Le Butanol.
- L'acétate d'éthyle.

Ces affrontements se font dans les ampoules à décanter, la phase aqueuse et les solvants sont mélangés énergiquement en laissant s'échapper à chaque fois les gazes.

Après un repos de 24h en récupère séparément d'une part, et la phase aqueuse d'autre part, le solvant utilisé se charge des composés spécifiques.

La phase d'éther de pétrole ne referme pas des composés phénoliques et elle est rejetée, quant aux autres phases, elles sont évaporées à sec avec le rota vapo à 50°C puis récupérées à 10 ml du méthanol.

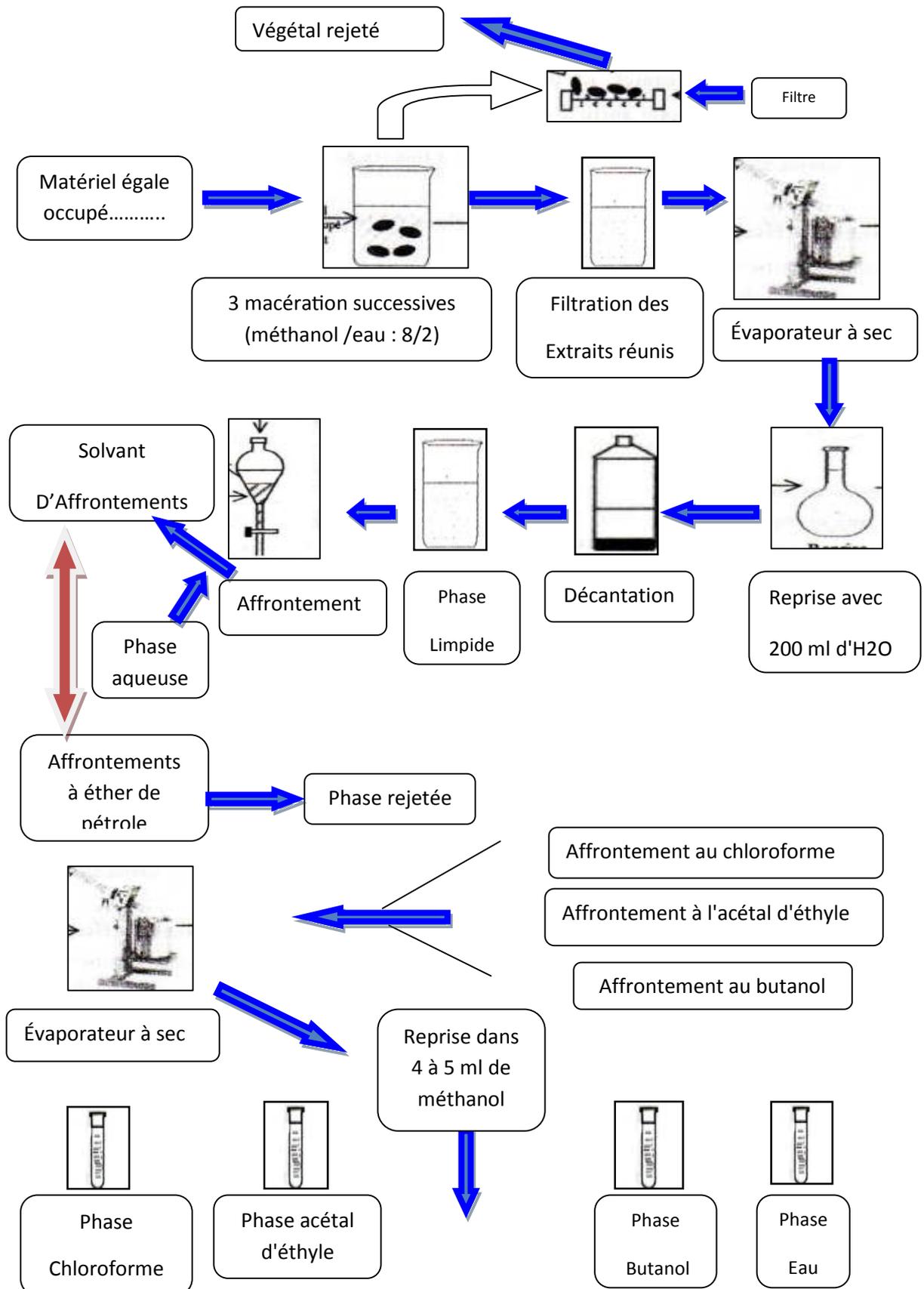


Figure 8- Préparation de l'extrait méthanolique brut et extraction des flavonoïdes par partition entre solvants

I-4- La chromatographie analytique sur couche mince (CCM) :

La chromatographie est un outil analytique utilisé pour la séparation, l'identification, et la quantification de composés chimiques dans des mélanges complexes comme des extraits de plantes.

I-4-1- Principe :

Le principe de la chromatographie repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire (Wikipédia, 2008 in Zeghad, 2009) .

I-4-2- Mode opératoire :

a / Préparation de la phase stationnaire : La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques pré-étalées de gel de silice.

b / Préparation de la phase mobile : La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques.

Tableau 3: Le système solvants utilisé pour la CCM.

	Systèmes solvants	Proportions (v/v/v)	Référence
Système choisi	Acétate d'éthyle/MeOH/H ₂ O	(100/13.5/10)	Maleš <i>et al.</i> , 1998 in Zaghad ,2009

Le système solvants choisi est utilisé comme un éluant, sa vapeur doit saturer l'atmosphère de la cuve ceci impose d'utiliser une cuve bien fermée.

c / Le dépôt : le dépôt se fait avec des pipettes de pasteur en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire et linéairement. Chaque phase doit être déposée en solution diluée dans le méthanol, on peut effectuer plusieurs dépôts successifs du même échantillon en même endroit, cette pratique permet de concentrer la tâche déposée (Sine, 2003, in Zaghad, 2009).

d / Développement des plaques : chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque (Sine, 2003 ,in zaghad ,2009) .

e / Révélation : si les constituants sont colorés, ils seront directement visible sur la plaque, sinon la révélation peut se faire soit aux UV ou bien par des méthodes chimiques.

Révélation aux UV : qui permet de mettre en évidence sous forme des tâches des substances qui absorbent les UV entre 254 nm et 365 nm.

f / Identification des flavonoïdes : le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par sa fluorescence sous UV et par son Rf (le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile c'est à dire le front du solvant) qui est compris entre 0 et 1 .

Relation : Structure - Rf

La distance de migration des substances dépend essentiellement de leur polarité :

- Les polyhydroxyflavones ont des faibles valeurs de Rf (0,00-0,25).
- Les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones ont des valeurs de Rf comprises entre (0,3-0,5).
- Les flavanones, les flavonols, méthoxyflavones ont les valeurs les plus élevées de Rf (0,5-0,75) (Bandyukova et Shinkarenko, 1973,in Zeghad .2009).

Relation : Structure-fluorescence :

L'examen en lumière ultraviolette est la méthode la plus utilisée pour la détermination de la structure des flavonoïdes, le tableau 4 résume la relation qui peut exister entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV.

Tableau 4 : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes
(Lahouel, 2005,in Zeghad,2009)

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5, 6, 7, tri OH libres Flavonols 5, 7, 8, tri OH libres
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4' OH Flavones 3-OR et 5 OH ,4'-OH Flavones 6 ou 8 OH Chalcones Dihydroflavonols Isoflavones Flavanones
Bleu claire (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué
Jaune terne Jaune Fluorescence orangée	Flavonols 3- OH libre avec ou sans 5-OH libre
Jaune vert brillant	5 OH libre ou 5 OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone flavanones
Jaune pâle	dihydroflavonols

II- Etude de l'Activité antibactérienne :

II-1- Objectif :

Pour évaluer l'activité antibactérienne des composés flavonoïques, la méthode de contact direct en milieu solide a été utilisée.

Les tests ont été réalisés sur 3 souches bactériennes, afin de déterminer parmi les extraits préparés ceux qui avaient la plus grande activité inhibitrice des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif.

II-2- Principe :

L'activité antibactérienne des extraits est testée *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose. Cette méthode a le même principe de celui de la réalisation d'antibiogrammes. Le but est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique (Burnichon et Texier, 2003 in Amireche, 2013). C'est-à-dire, l'application de patchs imprégnés de principes actifs ou des puits remplis par le produit à tester sur des milieux de culturesensemencés de microorganismes.

L'activité inhibitrice du produit se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du puits ou du disque.

II-3- Préparation des souches bactériennes :

Les souches bactériennes proviennent du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Constantine 1. Il s'agit des espèces suivantes :

Les bactéries utilisées	Classe
<i>Escherichia coli</i>	Gram -
<i>Staphylococcus</i> sp.	Gram -
<i>Bacillus</i> sp.	Gram+

Les bactéries sont préalablement ensemencées dans le milieu nutritive liquide est incubées à 37°C.

II-4- Extrait testé :

On s'est intéressé à l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique obtenu à partir des fleurs et des feuilles. On a testé :

- La Phase acétate d'éthyle.
- La Phase chloroforme.

- La Phase butanol.
- La Phase aqueuse.

Ces phases ont été obtenues suivant la méthode d'extraction décrite précédemment (figure 8)

II-5- Milieu de culture :

Nous avons utilisé comme milieu de culture le milieu Mueller Hinton.

Le milieu de culture solide mis en bain marie pour une heure pour devenir liquide, coulé dans des boîtes de pétri, puis laissé à température ambiante du laboratoire près du bec benzène jusqu'à qu'il devient complètement solide.

II-6- Culture des bactéries :

On a trempé un écouvillon dans la suspension bactérienne et on a étalé sur la surface entière de la gélose (Gélose Mueller Hinton) à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution égale des bactéries. Enfin, on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose.

II-7- Dépôt des extraits :

II-7-1- Méthode des disques :

On a préparé des disques de papier filtre de 5mm de diamètres puis on les a stérilisés à 120°C pendant 20 min dans une autoclave. À l'aide d'une seringue stérile on a injecté 0.1 ml de l'extrait sur les disques puis on les a laissés sécher pendant 15min, ensuite on les a déposés sur la surface de la gélose préalablement inoculée avec la souche bactérienne.

II-7-2-Méthode des puits :

Pour cette technique on a créé des puits dans la gélose à l'aide d'une pipette pasteur, et dans chacun on a déposé 1ml d'extrait.(figure)

II-8- Expression des résultats :

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition (mm) autour des disques et des puits.

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I- Criblage des flavonoïdes :

I-1- Résultats :

Les résultats de criblage phytochimique des flavonoïdes sont classés en fonction des différents critères d'observations. Entre autres :

Tableau 5: Résultats du criblage des flavonoïdes dans les feuilles et fruits chez *Rosmarinus officinalis*

Organe \ Test	Fleur	Feuille
Témoin	-	-
Test 1 (flavonoïdes libres)	++	++
Test 2 (anthocyanes)	-	-
Test 3 (leucoanthocyanes)	++	+

- Réaction positive : ++
- Réaction douteuse : +
- Réaction négatif : -

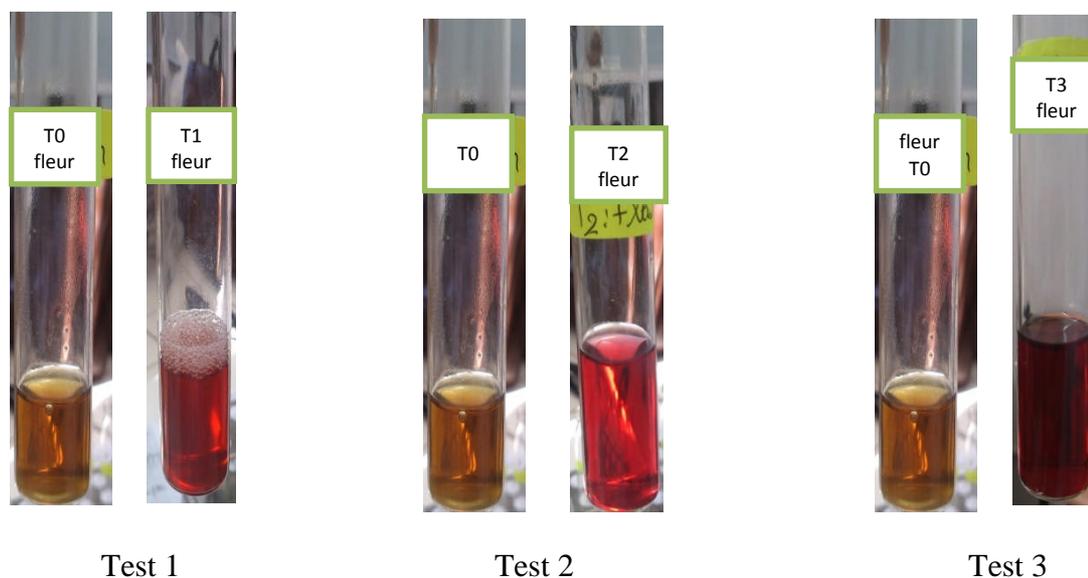


Figure 9- Résultat des tests du criblage des flavonoïdes dans l'extrait des fleurs de *Rosmarinus officinalis*

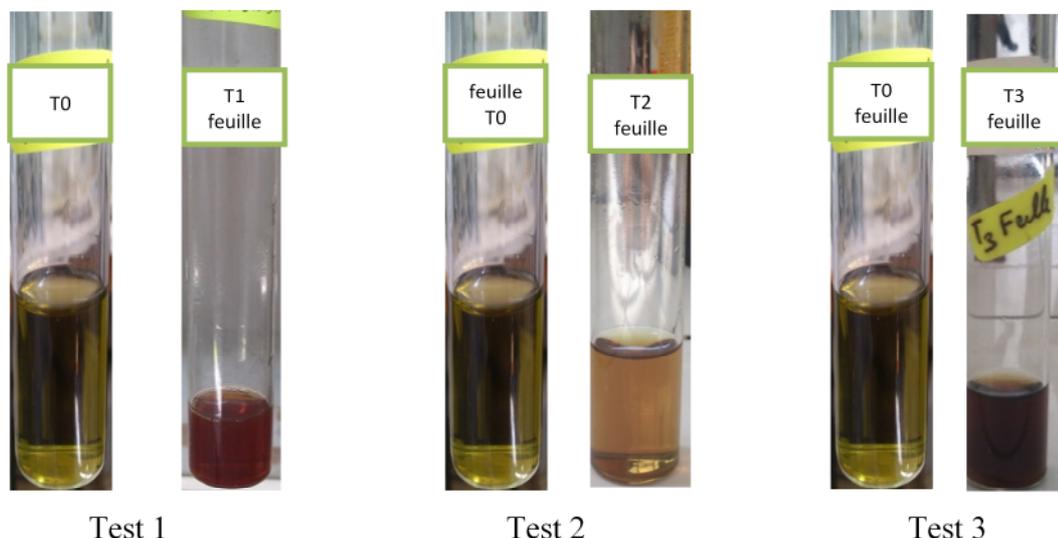


Figure 10- Résultat des tests du criblage des flavonoïdes dans l'extrait des feuilles de *Rosmarinus officinalis*

I-2- Discussion

Pour la détermination des flavonoïdes, nous avons réalisé le criblage photochimique au niveau des différents organes de la plante, feuilles et fleurs, ces tests révèlent la présence des flavonoïdes dans la plante *Rosmarinus officinalis*.

Les flavonoïdes par traitement acide HCL, sont réduits en anthocyanes qui sont responsables de la couleur rouge par élimination d'une molécule d' H_2O , Selon les travaux de Lock *et al.* (2006) et Boumaza (2011), le romarin contient les différents composants des métabolismes secondaires, les flavonoïdes, leucoanthocyanes. Cette présence est très marquée au niveau des fleurs et des feuilles. (Yakhlef, 2010)

Nos résultats montrent également l'absence des anthocyanes aux niveaux des feuilles et des fleurs. Alors, chez notre espèce *Rosmarinus officinalis*, les flavonoïdes sont présents dans les fleurs et les feuilles sous deux formes :

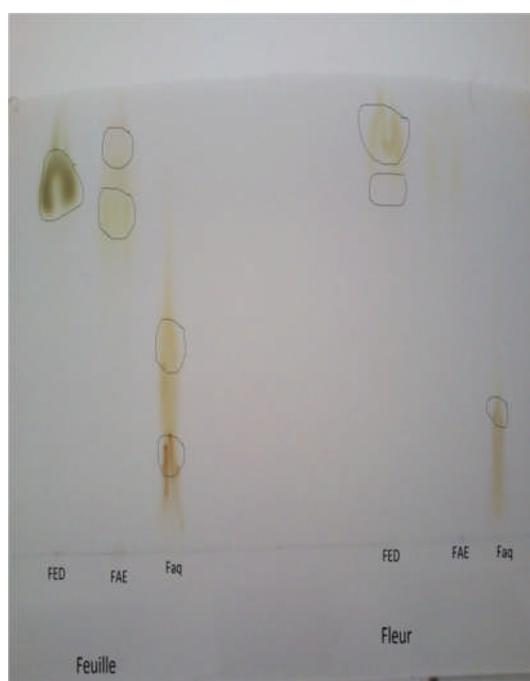
- Les flavonoïdes libres (flavonols=apparition de la couleur rouge pourpre)
- Les leucoanthocyanes.

II- Séparation des extraits bruts MeOH et EtOH par chromatographie sur couche mince (CCM)

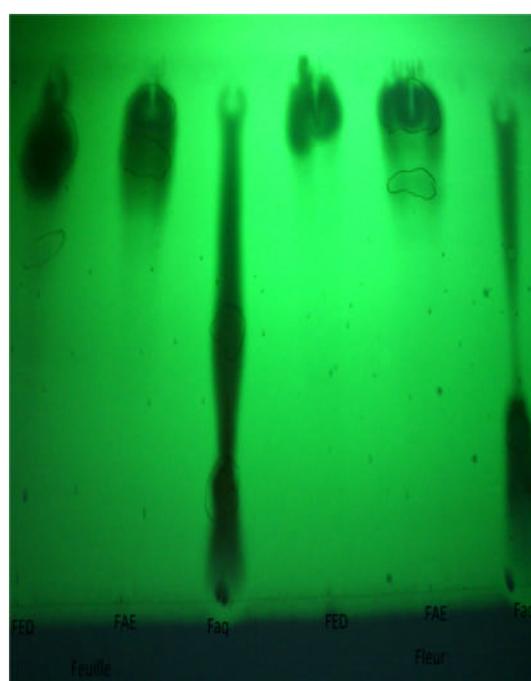
II-1- Résultats :

Le développement de la technique de la chromatographie sur couche mince commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire.

Pour avoir les empreintes flavoniques de nos extraits, et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant le système solvant (Acétate d'éthyle/MeOH/H₂O). Sous lumière UV à 254 nm, les différentes tâches qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées au crayon. (figures 11 et 12)



Détection visible

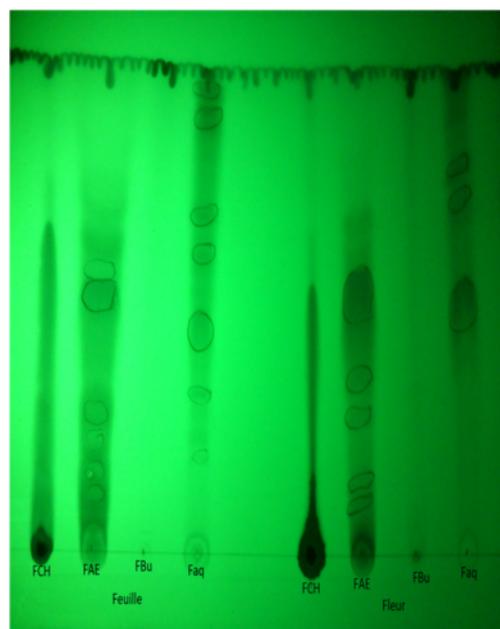


Révélation par UV (254)

Figure 11- Chromatogramme des différentes phases de l'extrait éthanolique des feuilles et des fleurs chez *Rosmarinus officinalis*



Détection visible



Révélation par UV (254)

Figure 12- Chromatogramme des différentes phases de l'extract méthanolique des feuilles et des fleurs chez *Rosmarinus officinalis*

FED : Fraction Ether Diéthylique , **FAE** : Fraction Acétate d'Ethyle , **Faq** : Fraction aqueuse

FCH : Fraction chloroforme, **FBu** : Fraction butanol

Les tableaux 6 et 7 comportent les rapports frontaux (Rf) des différents spots apparus dans le chromatogramme.

Tableau 6 : Rapports frontaux des différents spots séparés après CCM des différentes fractions des extraits EtOH et MeOH des feuilles de *rosmarinus officinalis*

Spot révélés	Rapports frontaux (Rf)						
	Extraits EtOH			Extraits MeOH			
	FED	FAE	Faq	FCH	FAE	FBu	Faq
Spot 1	0.748	0.696	0.244		0.184	0.112	
Spot 2		0.792	0.422		0.304	0.152	
Spot 3					0.432	0.216	
Spot 4					0.584	0.272	
Spot 5					0.664	0.504	
Spot 6					0.872	0.552	
Spot 7					0.944		

Tableau 7 : Rapports frontaux des différents spots séparés après CCM des différentes fractions des extraits EtOH et MeOH des fleurs de *Rosmarinus officinalis*

Spot révélés	Rapports frontales (Rf)						
	Extraits EtOH			Extraits MeOH			
	FED	FAE	Faq	FCH	FAE	FBu	Faq
Spot 1	0.725		0.311		0.496	0.096	
Spot 2	0.881				0.712	0.144	
Spot 3					0.792	0.294	
Spot 4						0.344	
Spot 5						0.512	

FED : Fraction Ether Diéthylique , **FAE** : Fraction Acétate d'Ethyle , **Faq** : Fraction aqueuse

FCH : Fraction chloroforme, **FBu** : Fraction butanol

II-2- Discussion :

La chromatographie obtenue dans notre travail montre des diminutions et augmentations des valeurs des RF, Fraction Ether Diéthylique, Fraction Acétate d'Ethyle, Fraction butanol montre des valeurs RF élevées comprises entre 0,4 et 0,94 ces composés sont probablement des flavonones et flavonols et Anthocyanidine selon (bandycova et shinkarenko, 1973 in Amireche, 2013), cette augmentation est due à une méthylation des groupements (OH) et l'acétylation, par contre, la diminution du RF 0,09, 0,29, 0,34, 0,5, est expliquée selon les mêmes auteurs selon l'augmentation de (OH) due principalement à l'introduction de nouveaux groupements de ces derniers (glycosylation), ces composés sont contenus dans la fraction acétate d'éthyle butanol des deux extraits (feuilles, fleurs)

En comparant nos RF avec ceux des étalons appliqués dans les mêmes conditions expérimentales (Mohammedi, 2005), on peut constater que les RF obtenus conviennent tout à fait à ce qui a été rapporté dans d'autres travaux (0.311, 0.512, 0.344, 0.216, 0.422....).

Dans un travail réalisé par Zeghad (2008) sur deux plantes médicinales *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* pour étudier les flavonoïdes naturels, les RF détectés pour la phase acétate d'éthyle (FAE) sont très proches à ceux trouvés dans notre travail.

Selon (Markham, 1982 in Akroum, 2011), et d'après notre résultat, la plante est riche en flavonoïde qui sont présents sous différentes formes, Flavonols, flavones.

III- Evaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes :

III-1- Résultats :

Pour testé le pouvoir antibactérienne des différentes phases issues des affrontements de l'extrait méthanolique brut des feuilles et fleurs de *Rosmarinus Officinalis*, on a utilisé deux techniques, celle des disques et celle des puits.

La technique des puits était celle qui a donné des résultats significative. Celle des disques ne présentait pas des zones d'inhibitions. (figures 13et 14)

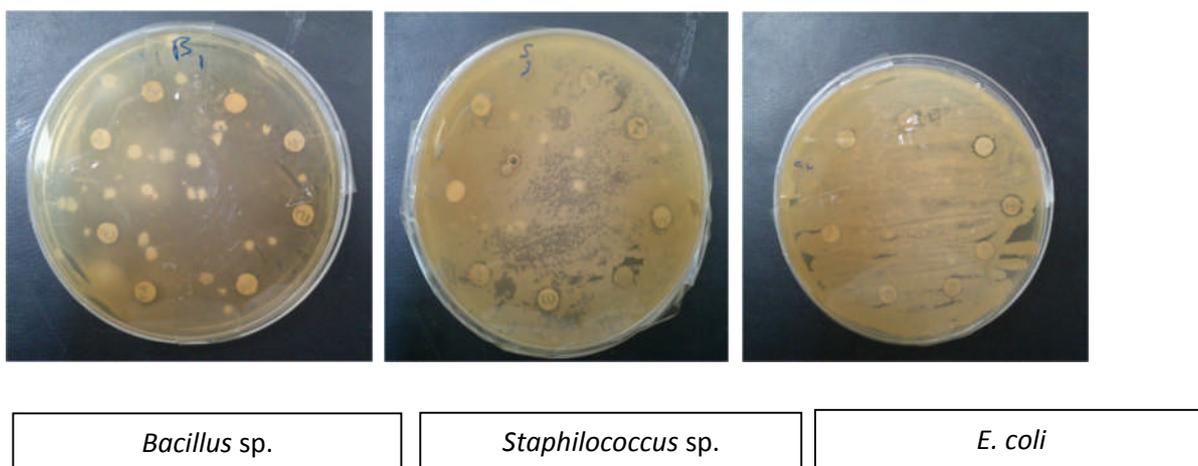


Figure 13- Résultats de l'activité antibactérienne des différentes fractions de l'extrait des feuilles et des fleurs de *Rosmarinus officinalis*, par la technique des disques.



Figure 14- Résultats de l'activité antibactérienne des différentes fractions de l'extrait des feuilles et des fleurs de *Rosmarinus officinalis*, par la technique des puits.

Le tableau ci-dessous montre les résultats de l'activité antibactérienne des fractions obtenues après séparation par solvant. Le test est réalisé en suivant la méthode des puits.

Tableau 8 : Diamètres d'inhibition des différentes fractions de l'extrait de *Rosmarinus officinalis*

Fraction Bactérie	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)							
	Feuilles				Fleurs			
	FCH	FAE	FBu	Faq	FCH	FAE	FBu	Faq
<i>E. coli</i> (-)	22.0	15.5	0	10.5	0	8.0	0	11.0
<i>Staphylococcus</i> (+)	11.5	15.0	19.0	11.5	11.5	12.0	12.0	0
<i>Bacillus sp</i> (-)	20.0	13.0	25.0	20.0	8.0	0	13.0	0

FAE : Fraction Acétate d'Ethyle , **Faq :** Fraction aqueuse **FCH :** Fraction chloroforme,
FBu : Fraction butanol

Pour mieux élucider le pouvoir antibactérien des différentes fractions de l'extrait méthanolique de la plante, les diamètres de la zone d'inhibition sont représentés graphiquement sur des histogrammes (figures 15).

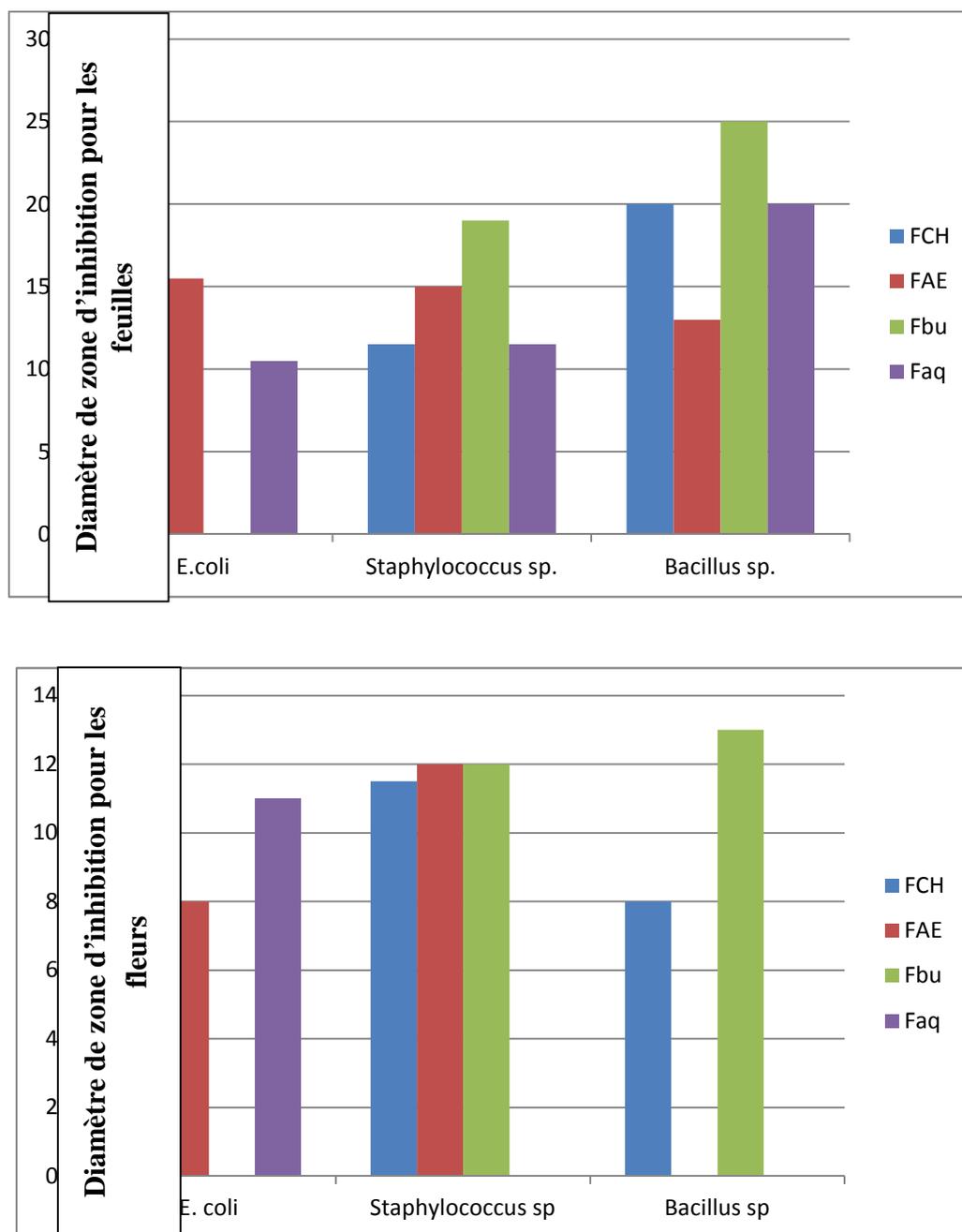


Figure 15- Diamètre des zones d'inhibition des fractions de l'extrait contre différentes bactéries.

FAE : Fraction Acétate d'Ethyle , **Faq** : Fraction aqueuse **FCH** : Fraction chloroforme,
FBu : Fraction butanol

III-2- Discussion :

Nous avons étudié le pouvoir antibactérien des flavonoïdes isolés de *Rosmarinus officinalis* par la méthode de diffusion des disques et des puits sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton).

L'activité antibactérienne de nos produits est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant les produits flavoniques à tester vis-à-vis de trois germes pathogènes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp.).

Pour la méthode des disques il y'a aucun résultat, ce qui peut être expliqué par le fait que l'action des fractions doit être direct avec les bactéries.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'*Escherichia coli* apparaît sensible vis-à-vis des flavonoïdes testés, ces mêmes flavonoïdes développent des zones d'inhibition moyennement importantes vis-à-vis de *Staphylococcus* dont les diamètres des zones d'inhibition varient entre (11-19) mm pour *Escherichia coli*, et de (1-22) mm pour *Bacillus* sp.

Selon Zeghad (2008), la sensibilité d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus* traduit l'action antibactérienne des flavonoïdes. En fait, cette sensibilité est en relation avec le nombre des hydroxyles libres dont on constate que les flavonoïdes les moins hydroxylés sont les plus actifs, à titre d'exemple le flavonoïde de *Rosmarinus officinalis* développe des zones d'inhibition équivalentes à 19mm pour *Staphylococcus* dans la phase Butanol et 22 mm pour *Escherichia coli* dans la phase chloroforme.

La sensibilité des bactéries à gram négatif traduit l'action antibactérienne des flavonoïdes. En fait, cette sensibilité et en relation avec le nombre des hydroxyles libre dont on constaté que les flavonoïdes les moins hydroxylés sont les plus actifs, Cowan (1999) supposait que les flavonoïdes dépourvus des groupements hydroxyles libres ont plus d'activité antimicrobienne par rapport à ceux qui en sont pourvus, ce qui conduit à une augmentation de leur affinité chimique aux lipides membranaires, donc on peut supposer que la cible microbienne de ces flavonoïdes testés est la membrane cytoplasmique.

Notre résultat montre qu'*Escherichia coli* est sensible aux phases butanol et chloroforme pour les fleurs. Par contre, elle résiste aux des autres phases, cela peut se traduire par une inhibition des activités ou concurrence entre les molécules contenues dans l'extrait.

- L'activité antibactérienne des flavonoïdes peut être expliquée par le mécanisme de toxicité

vis-à-vis des microorganismes qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation des ions métalliques, inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (Karou *et al*, 2005).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les plantes aromatiques et médicinales représentent une source inépuisable de composés naturels bioactifs

Notre étude a concerné l'espèce *Rosmarinus officinalis* qui appartient à la famille des Lamiacées. On a utilisé des plantes originaires de la région de Constantine (Algérie) et du Tébessa (Algérie), où l'emploi de cette espèce fait partie des traditions.

L'espèce *Rosmarinus officinalis* qui appartient de la famille des Lamiacées très fréquemment employées en Algérie. Notre recherche a pour but, la détermination de la richesse de *Rosmarinus officinalis* en flavonoïdes qui ont montré un potentiel antibactérien intéressant.

Cette étude a été réalisée à partir des extraits fleuris et des feuilles de *Rosmarinus officinalis* après avoir soumis à des tests de criblage des flavonoïdes et en ayant des résultats positifs pour les flavonoïdes libres chez les extraits de ces organes, et d'après notre résultat les fleurs sont plus riches que les feuilles en leucoanthocyanes, et en ayant des résultats négatives pour les anthocyanes

les résultats de l'analyse effectuée par la chromatographie sur couche mince, montrent que les extraits éthanoliques et méthanolique des deux organes (fleurs et feuilles) renferment une multitude de type de ces composés dont les flavonols, flavones

En raison de la richesse en flavonoïdes, l'étude du pouvoir antibactérien des différentes fractions, obtenues par extraction liquide-liquide, Les extraits du romarin ont témoigné d'une activité antibactérienne intéressante contre les bactéries, *Bacillus* sp, *Staphilococcus* sp, et *E.coli*

On conclue de tous nos résultats obtenus que l'espèce *Rosmarinus officinalis* est très riches en flavonoïdes, particulièrement au niveau des fleurs. Ces flavonoïdes présentent un pouvoir antibactérien important.

Une prolongation de ce travail à l'avenir est souhaitable pour étudier les composants présents dans l'extrait méthanolique du romarin et pour évaluer leur activité antibactérienne.

Il serait donc intéressant de mener une étude plus approfondis sur *Rosmarinus officinalis* afin d' identifier et étudier les flavonoïdes de cette plante utilisant des méthodes

plus précise telles que CCM .en ce qui concerne activité antibactérienne il serait intéressant de définir le mécanisme d action de cette substance végétale sur le microorganisme.

Sachant que Afrique en général et Algérie en particulier possède une immense biodiversité qui ne demande qu'à être étudié, les sujets dans ce domaines ne manquent doc pas ,car chaque plante est un réservoir potentiel de métabolites avec des caractéristiques photochimiques particulières .

Nous pensons montrer à travers ce travail que les plantes constituent un réservoir très intéressent pour la recherche dans le futur.

Références bibliographiques :

- 1- **Akroum, S. (2011)** Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels, 2011, université mentouri Constantine ,101p.
- 2- **Athamna, S. (2008)** Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum cyminum* et des feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. Université Hadj Lakhdar,90p.
- 3- **Attou, A. (2011)** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Université Aboubaker Belkaid, Tlemcen ,93 p.
- 4- **Belguidoum, M. (2011)** Une approche phytochimique pour différencier deux espèces de genre *Zygophyllum*. 45p.
- 5- **Bougandoura, N. (2010)** Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calamintha* ssp. *nepta* (nabta) et *Ajugaiwa* L. (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Université Abou BakrBelkaid-Tlemcen, 83p.
- 6- **Boumaza, D. (2011)** Séparation et caractérisation chimique de quelque biomolécule actives de deux plantes médicinales :*Inula viscosa*, *Rosmarinus officinalis* de la région d'Oran. 62p.
- 7- **Bouzeroune, F. (2007)** Etude photochimique de la plante *Helianthemum Kahiricum*. Université Hadj Lakhdar, Batna, 91 p.
- 8- **Bremness, L. (2002)** Plantes aromatiques et médicinales. Bordas (Ed). Paris, 303 p.
- 9- **Bruneton, J. (1999)** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, 575p.

- 10- **Cowan, M. (1999)** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews.*, 12 (4) : pp 564-570.
- 11- **Eltouassi, N. (2004)** Elaboration de procédés biotechnologiques pour la valorisation du romarin (*Rosmarinus officinalis*). Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, 57p.
- 12- **Harborne, J.B. (1988)** The flavonoids, advances in research since 1980. Ed. Chapman et Hall. London.
- 13- **Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. (2002)** Botanique systématique. Une perspective phylogénétique. 1ère Edition De Boeck Université. Paris. 383p.
- 14- **Kanoun, K. (2010)** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Université Aboubaker Belkaid, Tlemcen, 96 p.
- 15- **Karou D., Dicko M. H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. et Traoré A. S. (2005)** Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Maîtrise des procédés en vue d'améliorer la qualité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire. novembre. Ouagadougou. pp 8-11
- 16- **Kechkar, M. (2007)** Extraction de la silymarine et étude de son activité antibactérienne. Université Mentouri Constantine, 66p.
- 17- **Makhloufi, A. (2010)** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Université Aboubaker Belkaid, Tlemcen, 136 p.
- 18- **Mekhbi, A. et Boudra, H. (2012)** Contribution à l'étude des extraits bruts de la plante *Urtica dioica*. Université Kasdi Marbah, Ouargla, 35p.

- 19- Moufouk, S. (2008)** Etude des métabolite secondaire de *Centaurea Pubescens* ssp. *omphalotricha* , Université Hadj Lakhdar, Batna, 61 p.
- 20- Yakhlef, G. (2010)** Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L. Université Hadj Lakhdar, Batna, 78 p.
- 21- Zeghad, N. (2008)** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne, Université Mentouri Constantine, 96p.

Noms et Prénoms : BELHI Mustapha

BOURAS Yaakoub

Mémoire de fin de cycle

Pour l'obtention du diplôme de Master

Filière : Biologie et physiologie végétale

Option : Métabolisme secondaire et molécules bioactives

**Thème : Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes
chez *Rosmarinus officinalis* et évaluation de leur
pouvoir antibactérien**

Résumé : La richesse moléculaire des végétaux constitue une source importante de molécules bioactives d'origine naturelle. Parmi ces composés on trouve une grande partie des métabolites secondaires qui sont surtout utilisés en thérapie.

Notre travail a porté sur des extraits d'une plante médicinale de la région méditerranéenne, le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), utilisée en thérapie et cuisine.

Des techniques chimique, chromatographiques et biologiques, nous ont permis de faire une évaluation quantitative et qualitative des flavonoïdes extraits à partir des feuilles et des fleurs du romarin. Une séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) a permis de révéler plusieurs classes d flavonoïdes dans nos extraits.

On a compléter notre étude par une évaluation du pouvoir antibactérien de l'extrait flavonoïque de notre plante contre trois souches. Les résultats montrent une inhibition importante de l'activité des bactéries.

Mots clés : plante médicinale – romarin - *Rosmarinus officinalis*- flavonoides- métabolisme secondaire- CCM- Activité antibactérienne.

Soutenu le : 22/06/2014

Devant le jury :

Président : Mr CHIBANI Salih

MCB- Université Constantine 1

Encadreur : Mme BOUCHOUKH Imane

MAA- Université Constantine 1

Examineur : Mme ZEGHAD Nadia

MAA- Université Constantine 1

