

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

**Mémoire présentée en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biochimie Appliquée**

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**Etude phytochimique et evaluation de l'activité antioxydante de  
Romarin (*Rosmarinus officinalis*)**

---

Présenté et soutenu par : **Boumadjen Roufeida**

**Le 01/07/2018**

**Kimouche Sara**

**Jury d'évaluation :**

**Président : Kitouni Rachid** Maitre-assistant classe A- Université des Frères Mentouri, Constantine 1

**Encadreur : Nour Bouanimba** Maitre de conférences A - Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

**Examineur : Harouni Sofiene** Maitre- assistant classe A- Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

**Année universitaire  
2017 - 2018**

# *Remerciement*

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

*Nous tenons à exprimer toute nos connaissances à **Mr Nour Bouanímba** maître de conférence A l'université Mentouri Constantine pour sa générosité, sa gentillesse, son encouragement, son soutien et de nous avoir fait confiance tout au long de la préparation de ce travail, qu'il trouve ici toute nos gratitude et nos sympathie.*

*Un grand merci à **Mr Kitouni Rachid**, Maître-assistant classe A à l'université de Constantine pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider ce Jury.*

*Nous sommes également reconnaissantes à **Mr Harouni Soufiene** maître de conférences à l'université pour avoir accepté d'être membres de ce jury.*

*Nos reconnaissances vont également, à **Mr Kendouli Chouaib** pour tout son aide, pour le temps qui nous a consacré pendant toute la durée de ce travail, nous garderons en mémoire vos grandes qualités, tant humaines, qu'intellectuelles, votre gentillesse et votre souci pour le travail bien.*

*Nos derniers remerciements et ce ne sont pas les moindres, vont à toute l'équipe de Laboratoire de Biochimie de l'université Mentouri, et tous ce qui ont contribués de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A la mémoire de mon père et sœur Sihem*

*A ma source de bonheur, la prunelle de mes yeux  
d'être la plus chère dans le monde,*

*La femme la plus patiente aucun mot ne peut  
exprimer mon respect et mon amour ma chère mère  
avec sa grande tendresse.*

*A mes chers sœurs Keltoum, Meriem, Amira et son  
fils Adem*

*A mes chers frères : Mohammed, Ilyes, Abdelkrim*

*Je dédie aussi ce modeste travail :*

*A mes très chers sœurs cousines et mes chers tantes,  
tous les membres de la famille et à toute personne  
qui m'ont encouragé ou aidée au long de mes études.*

*A mon binôme SARA*

*A tous mes collègues de la promotion de Master 2  
Biochimie Appliquée de la faculté des sciences de la  
vie et de la nature de l'université des frères  
Mentouri, et je leurs souhaite beaucoup de réussite,  
A tout ce que j'aime sans lesquels tout ceci n'aurait  
aucun sens...*

*Rofeida*

## Dédicace

*Je dédie ce travail aux deux êtres les plus chers au monde qui ont donné sens à mon existence :*

*Mes chers parents, ma mère Zeineb, et mon père Mbarek,*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération  
pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien.*

*J'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve  
d'être votre fille, et qu'il sera le fruit de vos innombrables sacrifices.*

*Puisse DIEU, le très haut, vous accorde santé, bonheur et longue vie.*

*A mes très chères sœurs, Rym, Nadia, Amel, Khadidja, Saida et leurs petits poussins pour leur  
soutien moral et leur amour.*

*A mes chers amis Jouvou, Heithem, Ryma, Mimi, Nada, Meriem....*

*A mon binôme Bibia pour tout son soutien durant les moments les plus difficiles ;*

*A toute ma famille ;*

*A tous mes collègues de la promotion de Biochimie Appliquée ;*

*A toutes les personnes qui ont contribué à mon éducation, mon enseignement et ma  
formation.*

**Sara**



---

<b>Sommaire</b>	
<b>Remerciement</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>

---

*Synthèse bibliographique*

---

*Partie 01 Plantes médicinales et principe actif*

---

<b>1. Définition de la phytothérapie</b>	<b>3</b>
<b>1.1. La phytothérapie en Algérie</b>	<b>4</b>
<b>2. Définition des plantes médicinales</b>	<b>4</b>
<b>3. Définition du principe actif</b>	<b>5</b>
<b>4. Métabolites secondaires</b>	<b>5</b>
<b>4.1. Les composés phénoliques</b>	<b>6</b>
<b>4.1.1. Classification</b>	<b>6</b>
<b>A. Les acides phénoliques</b>	<b>7</b>
<b>a. Les acides hydroxybenzoïques</b>	<b>7</b>
<b>b. Les acides hydroxycinnamiques</b>	<b>7</b>
<b>B. Les flavonoïdes</b>	<b>8</b>
<b>C. Les coumarines</b>	<b>8</b>
<b>D. Les tanins</b>	<b>9</b>
<b>a. Les tanins hydrolysables</b>	<b>9</b>
<b>b. Les tanins condensés</b>	<b>9</b>
<b>E. La lignine</b>	<b>10</b>
<b>4.2. Les alcaloïdes</b>	<b>10</b>
<b>4.3. Terpènes et stéroïdes</b>	<b>11</b>

---

*Partie 02 Stress oxydatif*

---

<b>1. Le stress oxydatif</b>	<b>13</b>
------------------------------	-----------

---

<b>1.1. Origine du stress oxydatif</b>	<b>14</b>
<b>2. Les radicaux libres</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Origine des radicaux libres</b>	<b>14</b>
<b>2.1.1. Sources exogènes</b>	<b>14</b>
<b>2.1.2. Sources endogènes</b>	<b>15</b>
<b>3. les types des espèces réactives d'oxygène ERO</b>	<b>16</b>
<b>3.1. l'anion superoxyde O<sub>2</sub></b>	<b>16</b>
<b>3.2. Peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>16</b>
<b>3.3. Radical hydroxyle OH</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Autres espèces réactives de l'oxygène</b>	<b>17</b>
<b>4. Origine cellulaires des espèces réactives de l'oxygène</b>	<b>17</b>
<b>5. Conséquences du stress oxydatif</b>	<b>18</b>
<b>6. antioxydant et système de défense</b>	<b>19</b>
<b>6.1. Système endogène</b>	<b>20</b>
<b>A. Antioxydant enzymatique</b>	<b>20</b>
<b>a. Superoxyde dimutase (SOD)</b>	<b>20</b>
<b>b. La catalase (CAT)</b>	<b>20</b>
<b>c. La glutathion peroxydase (GPX)</b>	<b>20</b>
<b>B. Antioxydant non enzymatique</b>	<b>21</b>
<b>6.2. Système exogène</b>	<b>21</b>
<b>A. Les oligo-éléments</b>	<b>21</b>
<b>B. Les vitamines</b>	<b>22</b>
<b>a. La vitamine E (alpha tocophérol)</b>	<b>22</b>
<b>b. LA vitamine C (acide ascorbique)</b>	<b>22</b>
<b>c. Les caroténoïdes</b>	<b>23</b>
<b>d. Les composés phénoliques</b>	<b>23</b>

*Partie 03 ztude botanique de Rosmarinus Officinalis*

<b>1. présentation botanique et géographique de la famille des Lamiacées</b>	<b>24</b>
<b>2. Historique</b>	<b>24</b>
<b>3. Etymologie</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Nom vernaculaire</b>	<b>25</b>

<b>4. Classification botanique</b>	<b>25</b>
<b>5. Description botanique</b>	<b>26</b>
<b>6. Habitat</b>	<b>27</b>
<b>7. Récolte</b>	<b>27</b>
<b>8. Composition chimique</b>	<b>28</b>
<b>9. Usage</b>	<b>29</b>
<b>9.1. Usage interne</b>	<b>29</b>
<b>9.2. Usage externe</b>	<b>29</b>
<b>10. précaution</b>	<b>30</b>

---

## *Chapitre 02 Partie expérimentale*

---

### *Matériels et méthodes*

<b>1. Matériels</b>	<b>31</b>
<b>2. Méthodes</b>	<b>33</b>
<b>2.1. Méthodes d'extraction</b>	<b>32</b>
<b>A. Broyage</b>	<b>33</b>
<b>B. Macération</b>	<b>33</b>
<b>2.2. Criblage phytochimique</b>	<b>35</b>
<b>2.2.1. Saponines</b>	<b>35</b>
<b>2.2.2. Alcaloïdes</b>	<b>35</b>
<b>2.2.3. Composés réducteurs</b>	<b>35</b>
<b>2.2.4. Tanins</b>	<b>35</b>
<b>2.2.5. Tanins vrais</b>	<b>36</b>
<b>2.2.6. Quinones</b>	<b>36</b>
<b>2.2.7. Stérols et triterpènes</b>	<b>36</b>
<b>2.2.8. Flavonoïdes</b>	<b>36</b>
<b>2.2.9. Flavonoïdes glycosides</b>	<b>36</b>
<b>2.2.10. Phénols</b>	<b>36</b>
<b>2.3. Dosage colorimétrique</b>	<b>37</b>
<b>2.3.1. Dosage des polyphénols totaux</b>	<b>37</b>
<b>2.3.2. Dosage des flavonoïdes</b>	<b>37</b>

<b>2.4. Les activités biologiques in vitro</b>	<b>38</b>
<b>2.4.1. Evaluation de l'activité antioxydante par le DPPH</b>	<b>38</b>
<b>2.4.2. Pouvoir réducteur par la méthode de FRAP</b>	<b>39</b>

### *Résultats et discussions*

<b>1. Screening phytochimique</b>	<b>41</b>
<b>2. Dosage des polyphénols totaux</b>	<b>43</b>
<b>3. Dosage des flavonoïdes totaux</b>	<b>44</b>
<b>4. Evaluation de l'activité antioxydante par le DPPH</b>	<b>46</b>
<b>5. Pouvoir de réduction par la méthode de FRAP</b>	<b>48</b>
<b>Conclusion générale et perspective</b>	<b>51</b>
<b>Références bibliographique</b>	
<b>Résumé</b>	

## Liste des abréviations

AG : acide gallique

AlCl<sub>3</sub> : Trichlorure d'aluminium

CAT : Catalase

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DO : densité optique

ERO: Espèce Réactive de l'oxygène

Etho : Ethanol

Fe<sup>2+</sup> : Ions ferreux

Fe<sup>3+</sup> : Ions ferriques

FeCl<sub>3</sub> : Chlorure de fer

GPx : Glutathion peroxydase.

GSH : Glutathion réduit

GSHPx : glutathions peroxydases

H : Hydrogène.

H<sub>2</sub>O : Eau

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Le peroxyde d'hydrogène

HCl : Acide chlorhydrique

IC<sub>50</sub> : Concentration nécessaire pour inhiber 50% du radical DPPH

K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> : Ferricyanure de Potassium.

LOO• : Radical peroxide

MeOH: methanol

MS : matière sèche

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NaOH : Sodium hydroxyde

NH<sub>4</sub>OH : Hydroxyde d'ammoniaque

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

R•: Radical d'acide gras

R<sup>2</sup> : coefficient de corrélation

SOD : Superoxyde dimustase

UV : Ultra-violet

Que : Quercétine.

Mg EAG/g d'extrait : milligramme d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait.

## **Unités**

°C : Degré Celsius

g : Gramme

L: Litre

ml : millilitre

Mg : Milligramme

Min : Minute

H : heure

mm : Millimètre

Mol : Mole

µl : Microlitre

nm : Nanomètre

## Liste des figures

<b>Figure I.1</b>	Structure de base des composés phénoliques	<b>6</b>
<b>Figure I.2</b>	Structure des acides phénoliques	<b>7</b>
<b>Figure I.3</b>	Structure de base des flavonoïdes	<b>8</b>
<b>Figure I.4</b>	Structure de coumarines	<b>9</b>
<b>Figure I.5</b>	Structure des tanins hydrolysables	<b>9</b>
<b>Figure I.6</b>	Structure des tanins condensés.	<b>10</b>
<b>Figure I.7</b>	Structure de la lignine.	<b>10</b>
<b>Figure I.8</b>	Structure de base des alcaloïdes.	<b>11</b>
<b>Figure I.9</b>	Structure de base d'une unité isoprène.	<b>11</b>
<b>Figure I.10</b>	Structure de base de stérol	<b>12</b>
<b>Figure I.11</b>	Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydant	<b>13</b>
<b>Figure I.12</b>	Origine des radicaux libres	<b>15</b>
<b>Figure I.13</b>	Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale	<b>17</b>
<b>Figure I.14</b>	Principales circonstances pathologiques s'accompagnants d'un stress oxydants	<b>18</b>
<b>Figure I.15</b>	Action des antis oxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène	<b>19</b>
<b>Figure I.16</b>	Structure des tocophérols	<b>22</b>
<b>Figure I.17</b>	Acide ascorbique	<b>23</b>
<b>Figure I.18</b>	Deux exemples des structures des caroténoïdes	<b>23</b>
<b>Figure I.19</b>	Aspects morphologiques du <i>Romarin</i>	<b>26</b>
<b>Figure I.20</b>	Tige principale et rameau Feuillé à fleurs du <i>Romarin</i>	<b>27</b>
<b>Figure II.1</b>	Protocole de l'étude expérimentale	<b>34</b>
<b>Figure II.2</b>	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	<b>38</b>
<b>Figure III.1</b>	Résultat de l'acide gallique	<b>43</b>
<b>Figure III.2</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	<b>44</b>
<b>Figure III.3</b>	Courbe d'étalonnage de la quercétine.	<b>45</b>
<b>Figure III.4</b>	Résultat du DPPH	<b>46</b>

<b>Figure III.5</b>	Pourcentage d'inhibition de la quercetine	<b>47</b>
<b>Figure III.6</b>	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extrait de <i>Rosmarinus Officinalis</i>	<b>47</b>
<b>Figure III.7</b>	Résultat du pouvoir réducteur avant l'apparition de la couleur	<b>49</b>
<b>Figure III.8</b>	Résultat du pouvoir réducteur après l'apparition de la couleur verte	<b>49</b>
<b>Figure III.9</b>	Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique et de la quercetine testée à différentes concentrations.	<b>50</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau I .1</b>	Position systématique du romarin	<b>p 25</b>
<b>Tableau I .2</b>	Composition chimique du Romarin	<b>p 28</b>
<b>Tableau II .1</b>	Réactifs chimique utilisés	<b>p32</b>
<b>Tableau III.1</b>	Résultats du criblage phytochimique de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus Officinalis</i>	<b>p 41</b>
<b>Tableau III.2</b>	Pourcentage d'inhibition de l'extrait de <i>Rosmarinus</i> <i>Officinalis</i> et de la quercetine	<b>p 48</b>

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments [1].

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. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie [2].

Dans le cadre de la valorisation de la médecine traditionnelle, il y a eu un intérêt croissant ces dernières décennies dans l'étude des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles dans différentes régions du monde. Aujourd'hui, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire. Des avantages économiques considérables dans le développement de la médecine traditionnelle et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés [3], d'où la nécessité d'une valorisation de la médecine traditionnelle.

L'Algérie par sa position biogéographique offre une très grande diversité écologique et floristique, estimé à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique [4].

A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, nous nous sommes intéressées à une plante à caractère médicinale, il s'agit de *Rosmarinus Officinalis*, c'est une plante qui pousse spontanément à l'état sauvage dans la région de Constantine, On la reconnaît aisément, toute l'année [5], elle fait l'objet des 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, antioxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, emménagogues et anti-tumorales, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle [6].

De ce fait, le choix de *Rosmarinus Officinalis* comme sujet de travail, vise premièrement à la valorisation de la biodiversité floristique Algérienne, mais il consiste particulièrement à la

volonté de mettre en évidence ses vertus thérapeutiques, très connues en médecine populaire, et à la caractérisation phytochimique de l'extrait issu de cette plante, à travers des analyses quantitatives (dosage des polyphénols et des flavonoïdes).

Notre étude englobe deux aspects dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques.

Le second aspect est consacré à une évaluation de l'activité antioxydante du radical libre DPPH ainsi son pouvoir réducteur.

Ce travail est développé en deux chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique qui regroupe trois parties :

La première partie représente des généralités sur les plantes médicinales et les métabolites secondaires et leurs classifications.

La deuxième partie englobe le stress oxydant.

La troisième partie est basée principalement sur une étude botanique sur *Rosmarinus Officinalis*.

Le deuxième chapitre est une étude expérimentale, elle-même est présentée sur deux volets :

Le premier comporte une description brève de la méthode d'extraction de l'extrait méthanolique de la plante étudiée.

Le deuxième dont lequel sont présentés les tests suivants : criblage phytochimique, dosage des polyphénols et des flavonoïdes, l'évaluation de l'activité antioxydante par le radical DPPH, test du pouvoir réducteur.

Enfin, une conclusion générale qui résume notre travail.



## **Partie I : Plantes médicinales et principes actifs**

Depuis les temps les plus reculés l'homme a cherché un moyen d'assouvir sa faim. Il a trouvé chez les végétaux des aliments nourrissants, mais aussi des remèdes à ses maux [7]. Ils fournissent à l'heure actuelle une grande partie des substances actives des médicaments. Nous verrons que leur utilisation à des fins thérapeutiques remonte à l'aube de l'humanité [8].

Cependant La plupart des espèces végétales qui pousse dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme ; elles sont donc médicinales utilisées aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie [9].

### **1. Définition de la phytothérapie**

Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : phuton et therapeia qui signifient respectivement "plante" et "traitement".

La phytothérapie peut donc se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes [10].

On distingue deux types de phytothérapies : tout d'abord se place :

**La phytothérapie traditionnelle** : C'est une thérapie de substitution qui a pour but de traiter les symptômes d'une affection. Ses origines peuvent parfois être très anciennes et elle se base sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement [11].

**La phytothérapie classique** : Cette approche de l'utilisation des plantes médicinales repense la prise en charge thérapeutique de façon originale :

- elle tient compte de l'état général du patient et d'un examen clinique approfondi et non pas uniquement de la symptomatologie du patient,
- elle conçoit la plante médicinale selon les données de la tradition et un usage validé par les connaissances scientifiques actuelles,
- elle utilise l'outil phytothérapeutique en exploitant l'ensemble de ses potentialités connues (synergie, utilisation de doses pondérées) afin de rétablir l'équilibre physiologique du patient [12].

### **1.1. La phytothérapie en Algérie**

En Algérie, les plantes occupent une place importante dans la médecine traditionnelle, qui elle-même est largement employée dans divers domaines de la santé. Dans les dernières années, la phytothérapie est très répandue, des herboristes sont partout et sans aucune formation spécialisée ou connaissance scientifique sur la phytothérapie, ils prescrivent des plante et des mélanges pour toutes les maladies : diabète, rhumatisme, minceur et même les maladies incurables [13].

Des chiffres recueillis auprès du Centre national du registre de commerce, montrent qu'à la fin 2009, l'Algérie comptait 1926 vendeurs spécialisés dans la vente d'herbes médicinales, dont 1393 sédentaires et 533 ambulants. La capitale en abritait, à elle seule, le plus grand nombre avec 199 magasins, suivie de la wilaya de Sétif (107), Bechar (100) et El Oued avec 60 magasins.

## **2. Définition des plantes médicinales**

Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses, elles sont utilisées pour prévenir, soigner ou soulager divers maux, [14] elles sont employées comme source de principe actif très précieux et largement utilisés.

En Afrique, l'art de guérir par les plantes est connu et pratiqué depuis bien longtemps, car il exploite des savoirs transmis oralement de génération en génération à certaines catégories d'individus initiés que sont les tradipraticiens de santé et les herboristes [15].

En 1986, environ 119 substances chimiques obtenues à partir de 91 espèces végétales étaient utilisées comme des médicaments important dans 62 classes thérapeutiques.

En 1995, sur les 25 produits pharmaceutiques les mieux vendus dans le monde, 12 étaient d'origine naturelle [14]. Actuellement, c'est environ 35000 espèces des plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains [16].

C'est grâce ou progrès scientifique considérables enregistrés depuis la fin du XIXème siècle (technique d'analyse et extraction... etc.) les plantes médicinales constituent des ressources

Inestimables qui ont été utilisées pour trouver de nouvelles molécules nécessaire à la mise au point de futurs médicaments [17].

### **3. Définition du principe actif**

C'est une molécule présentant un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animal. Le principe actif est contenu dans une drogue végétale ou une préparation à base de drogue végétale. Une drogue végétale en l'état ou sous forme de préparation est considérée comme un principe actif dans sa totalité, que ses composants ayant un effet thérapeutique soient connus ou non [18].

La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels.

Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes [19].

Les plantes possèdent des métabolites dits «secondaires» par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires [20].

### **4. Métabolites secondaires**

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides) ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisable par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [21].

On distingue trois principales classes des métabolites secondaires : les Composés Phénoliques, les alcaloïdes et les terpénoïdes et stéroïdes [22].

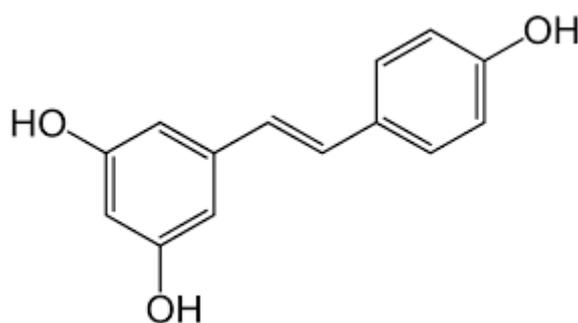
#### **4.1. Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont présents chez tous les végétaux supérieurs, ils correspondent à une très large gamme de structures chimiques et sont caractérisés par une répartition qualitative et quantitative très inégale selon les espèces considérées, mais aussi les organes, les tissus et les stades physiologiques [23].

Comme ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes, elles ont un rôle principale à la vie de plante, à la défense contre les pathogènes ; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes et la protection contre les rayonnements UV [24].

Elles sont caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc.

En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus [25].



**Figure I.1 :** Structure de base des composés phénoliques

##### **4.1.1. Classification**

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyle, en plus d'autres constituants [26].

## A- Les acides phénoliques

Les acides phénols, ou acides phénoliques, sont rares dans la nature. Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes : antiinflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires, hépatoprotecteurs, immunostimulants [27].

Ils se divisent en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque (les acides hydroxycinnamiques) et les dérivés de l'acide cinnamique (les acides hydroxybenzoïques) [28].

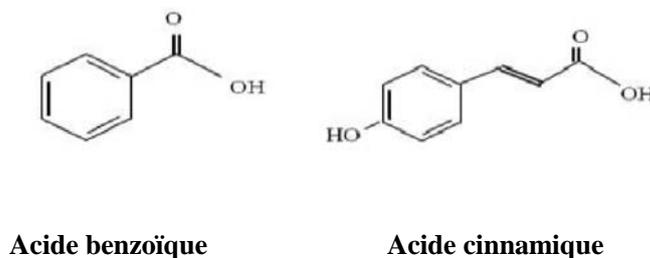
### a- Les acides hydroxybenzoïques

La teneur en acides hydroxybenzoïques dans les plantes est très faible, sauf exception de certains fruits rouges, radis noirs et oignons qui peuvent contenir jusqu'à plusieurs dizaines de milligrammes par kilogrammes de poids frais [29], les acides hydroxybenzoïques sont souvent des composants de structures complexe comme les tanins.

Cette catégorie est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais [30].

### b- Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques sont plus communs que les acides hydroxybenzoïques et sont constitués principalement des acides p-coumarique, caféïque, férulique et sinapique. L'acide férulique est l'acide phénolique le plus abondant dans les céréales, notamment dans l'orge ou il est présent sous forme Trans et liée [31].



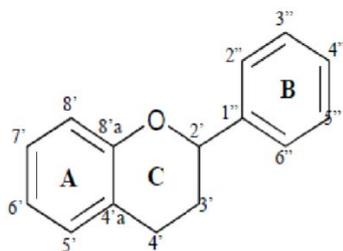
**Figure I.2 :** Structure des acides phénoliques

## B- Les flavonoïdes

L'expression flavonoïde a été introduite en 1952 par Geissman et Hinreiner pour désigner les pigments ayant un squelette ( $C_6-C_3-C_6$ ), provenant du mot latin flavus qui signifie jaune [32]. Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits, sont présents en concentrations élevées dans l'épiderme des feuilles et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation [33].

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison  $C_2-C_3$ , du groupe 3-O et la fonction 4-oxo [34].

**Structure :** Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base ( $C_6-C_3-C_6$ ), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base : deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones (**figure I.3**) liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C [35].



**Figure I.3 :** Structure de base des flavonoïdes.

## C- Les coumarines

Les coumarines sont des composés phénoliques végétaux, portant un noyau benzopyrone dans leur structure, elles sont présentes en quantités plus faibles dans plusieurs plantes comme le mélilot, la sauge sclérée et lavande. On la trouve aussi dans le miel, le thé vert, etc... [36].

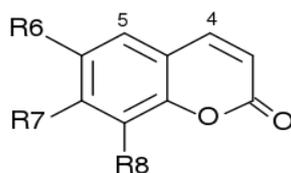


Figure I.4 : Structure de coumarine.

## D- les Tanins

Les tannins sont des substances polyphénoliques de structure variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant.

Très répandus dans le règne végétal, ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles quelquefois combinés aux protéines et aux alcaloïdes [37].

**Structure :** Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés [38].

- a- **Tanins hydrolysables :** Sont des hétéro polymères (**figure I.5**) possédant un noyau central constitué d'un polyol, il s'agit souvent d'un D-glucose ; comme leur nom l'indique, ces substances s'hydrolysent facilement en milieux acides et alcalins ou sous l'action d'enzymes (telle que la tannase), pour donner des glucides et des acides phénoliques [39].

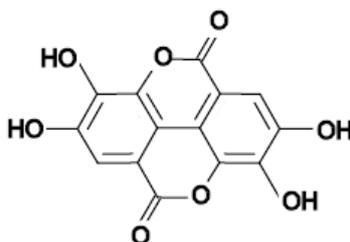
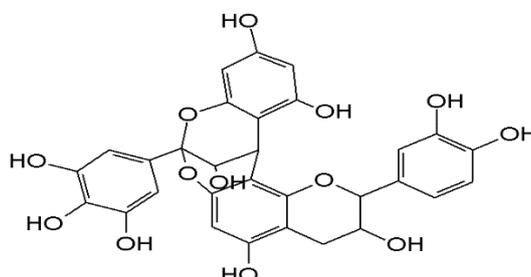


Figure I.5 : Structure des tanins hydrolysables.

- b- **Tanins condensés :** les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des polymères d'unités flavanniques, le plus souvent liées entre elles par des liaisons C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>.

Les précurseurs sont des flavan-3ols (catéchine et épicatechine) et flavan-3,4 diols. Cette classe de tanins est la plus représentée dans le monde végétal, aussi bien chez les Angiospermes que les Gymnospermes [40].

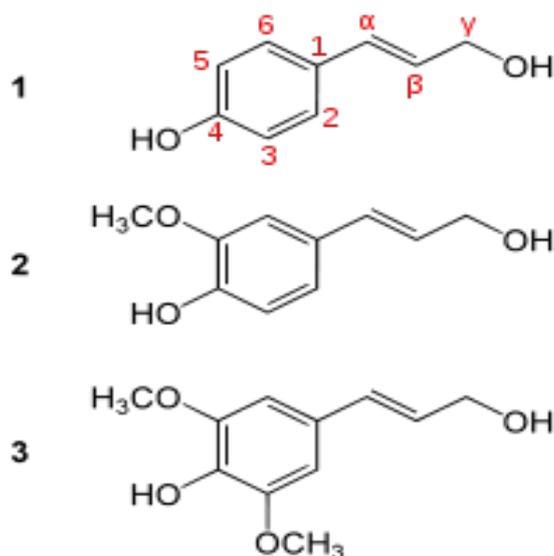


**Figure I.6 :** Structure des tanins condensés

### E- Les lignines

D'un point de vue chimique on peut définir la lignine comme un polymère tridimensionnel formés à partir de trois unités monomères phénoliques qui sont : l'alcool coniférylique, l'alcool sinapylique et l'alcool p-coumarylique.

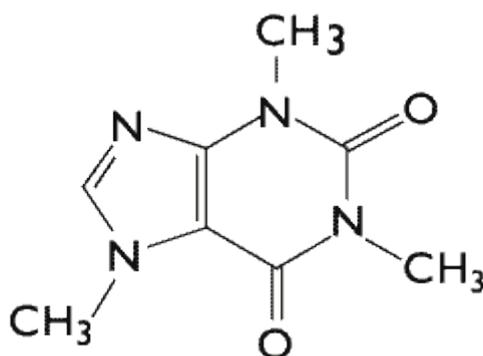
**Structure :** Une des structures admises actuellement est celle proposée par Adler en 1977 (**figure I.7**) [41].



**Figure I.7 :** Structure de la lignine.

## 4.2. Les alcaloïdes

Ce sont des substances organiques azotées d'origine végétale, de caractère alcalin et de structure complexe (noyau hétérocyclique), on les trouve dans plusieurs familles des plantes, la plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool et ont un gout amer et certains sont fortement toxiques [42].

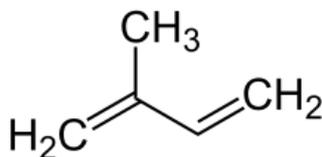


**Figure I.8 :** Structure de base des alcaloïdes.

## 4.3. Terpènes et stéroïdes

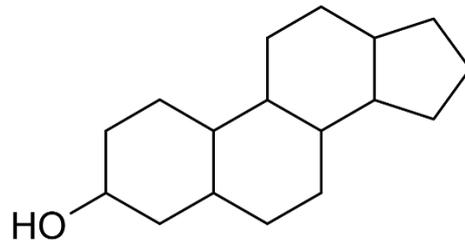
Elaborées à partir des mêmes précurseurs, les terpénoïdes et les stéroïdes constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux [43].

La structure carbonée de base des terpénoïdes est constituée d'un assemblage d'un nombre variable d'unités 2-méthylbutane (aussi appelées unités isoprène - C<sub>5</sub>). Ces assemblages peuvent être modifiés par ajout/soustraction de groupes méthyles ou ajout d'atomes d'oxygène. La diversité chimique des terpénoïdes végétaux provient alors de la complexité de leurs voies biosynthétiques [44].



**Figure I.9 :** Structure de base d'une unité isoprène.

Les stéroïdes sont des triterpènes tétracycliques. Ils sont synthétisés à partir d'un triterpène acyclique, le squalène, bien qu'ils soient généralement modifiés et qu'ils possèdent moins de 30 atomes de carbone [45].



**Figure I.10** : Structure de base de stérol.

## Partie II : Le stress oxydatif

Le stress oxydant et les antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers, il faut rappeler en milieu des années 50, on évoquait déjà le vieillissement. En 1969, les Américains Mc Cord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant la super oxyde dismutase (SOD), démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bien des espèces réactives oxygénés (ERO) dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants [46].

### 1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif, dénommé également stress oxydant, résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants / antioxydants » en faveur des oxydants, ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec altérations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation [47].

Un stress oxydatif pourra être induit lors de la surproduction des ERO et/ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés, soit directement soit par défaut de synthèse [48].

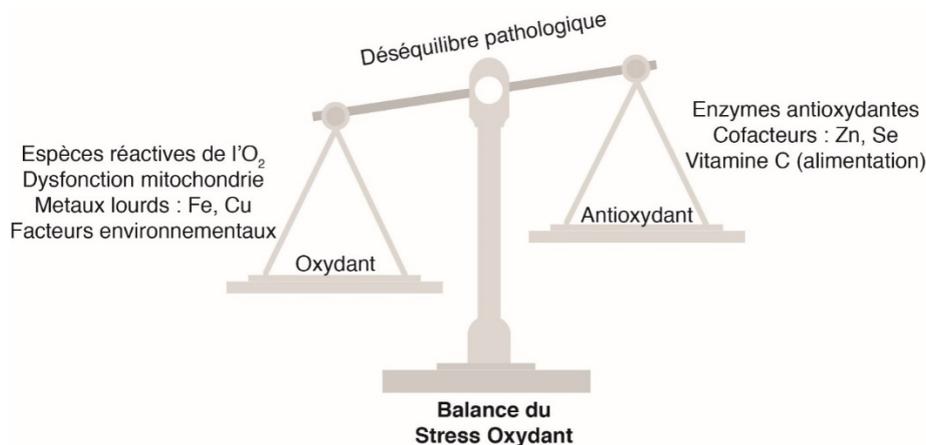


Figure I.11 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydant [49].

## **1.1 Origine du stress oxydatif**

Le stress oxydatif peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (Tabac, alcool, médicaments, rayons ultraviolets, pesticides, ozone, amiante, métaux toxiques) [50].

## **2. Les radicaux libres**

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux. La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité, et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices. Cette instabilité, rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques [51].

### **2.1 Origine des radicaux libres**

Les radicaux libres sont produits continuellement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule eucaryote par divers mécanismes. On parle donc de deux sources exogènes et endogènes :

#### **2.1.1 Sources exogènes**

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents extérieurs capables de donner naissance à des espèces oxygénées réactives. Les rayonnements UV (par l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants) et les radiations ionisantes induisent la synthèse de radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que :  $O_2^{\bullet-}$ ,  $HO^{\bullet}$ ,  $^1O_2$  et de molécules génératrices de radicaux libres.

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), des toxiques présents dans notre environnement (suie, goudron, tabac, polluants industriels), sont également responsables des alvéoles pulmonaires [46].

### 2.1.2. Les sources endogènes

Les enzymes pro-oxydantes, incluant la NADPH-oxydase, la NO-synthèse ou la chaîne du cytochrome P450, peuvent générer des RLO, lors du transport des électrons dans la chaîne respiratoire des cellules aérobies, une réduction incomplète de l'O<sub>2</sub> peut apparaître pour 1 à 2% de l'oxygène moléculaire conduisant à la formation de RLO, surtout l'anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> [52].

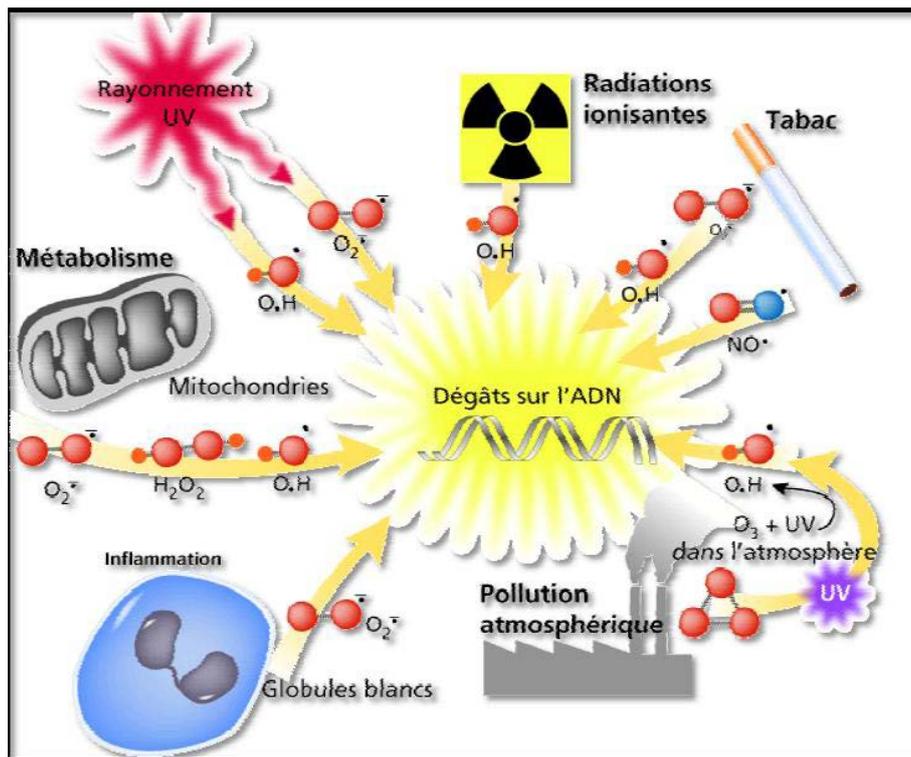


Figure I.12 : Origine des radicaux libres [53].

### 3. Les types des espèces réactives d'oxygène ERO

#### 3.1. L'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$

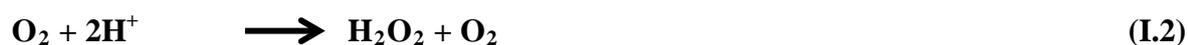
C'est la forme réduite de l'oxygène moléculaire par la réception d'un électron, c'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire.



Il est produit en grande quantité dans les macrophages pendant la destruction bactérienne (phagocytose) [54]. Dans la chaîne respiratoire mitochondriale (phosphorylation oxydative) et dans d'autres types cellulaires comme les lymphocytes[55], les cellules endothéliales et les fibroblastes [56], L'anion super oxyde  $O_2^{\bullet-}$  joue un rôle très important dans la génération d'autres radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , le radical hydroxyle  $OH^\bullet$ , et l'oxygène singlet  $^1O_2$  [57].

#### 3.2. Peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$

Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  qui n'est pas un radical libre, peut être formé secondairement à la dismutation de ( $O_2^{\bullet-}$ ) par la superoxyde-dimutase ou produit par la réduction bivalente de l'oxygène grâce à un grand nombre de déshydrogénases, notamment l'acyl CoA déshydrogénase, la NADH déshydrogénase la xanthine oxydase, l'uricase la monoamine-oxydase [58].



Le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) est également un agent oxydant très réactif ; c'est pour cela qu'on l'utilise souvent comme désinfectant et comme agent de blanchiment. S'il n'est pas rapidement détruit, il peut se décomposer [59].

#### 3.3. Radical hydroxyle $OH^\bullet$

Le radical hydroxyle est produit durant l'inflammation en grande quantité lors des interactions entre l'anion superoxyde et l'acide hypochloreux, entre l'acide hypochloreux et les ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ) ou entre le peroxyde d'hydrogène et le monoxyde d'azote [60].

Le radical hydroxyle est formé à partir du peroxyde d'hydrogène au cours de la réaction de Fenton ou à partir de l'anion superoxyde dans la réaction d'Haber-Weiss :



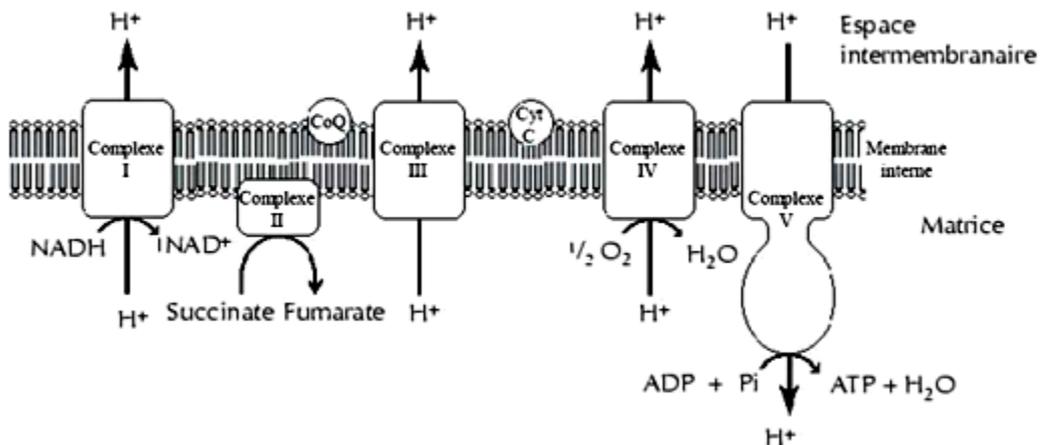
$\bullet\text{OH}$  est considéré comme l'ERO la plus réactive, inactivant la pyruvate-déshydrogénase de la mitochondrie, dépolymérisant le mucus du tractus gastro-intestinal ou induisant directement des atteintes oxydatives de l'ADN [61].

### 3.4. Autres espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène comprennent non seulement les radicaux libres oxygénés, mais aussi les radicaux libres dérivant d'autres espèces que l'oxygène par exemple : L'acide hypochloreux (HClO), le monoxyde d'azote qui se combine aisément avec le  $\text{O}_2^-$  pour former le peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) [62].

## 4. Origines cellulaire des espèces réactives de l'oxygène

Les mitochondries (**figure I.13**) sont des organites présents dans le cytoplasme de toutes les cellules eucaryotes. Elles constituent un système de transport énergétique au cours duquel l'énergie chimique contenue dans les aliments est transformée, par phosphorylation oxydative, en liaisons phosphate à haute énergie (ATP) [63].



**Figure I.13** : Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale [64].

Durant la respiration, quatre électrons sont ajoutés à l'oxygène par le complexe IV de la chaîne respiratoire, cependant l'oxygène peut être réduit en formant des espèces réactives de l'oxygène telles que  $O_2^{\bullet-}$  et  $HO^{\bullet}$ . La production de ces espèces réactives est nettement accélérée lors de la réduction du flux respiratoires notamment au cours de maladies génétiques [65].

## 5. Conséquence du stress oxydatif

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN [66], les lipides (peroxydation), les protéines [67]. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète...) [68], et la dégradation des cellules et des tissus [69].

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides [70].

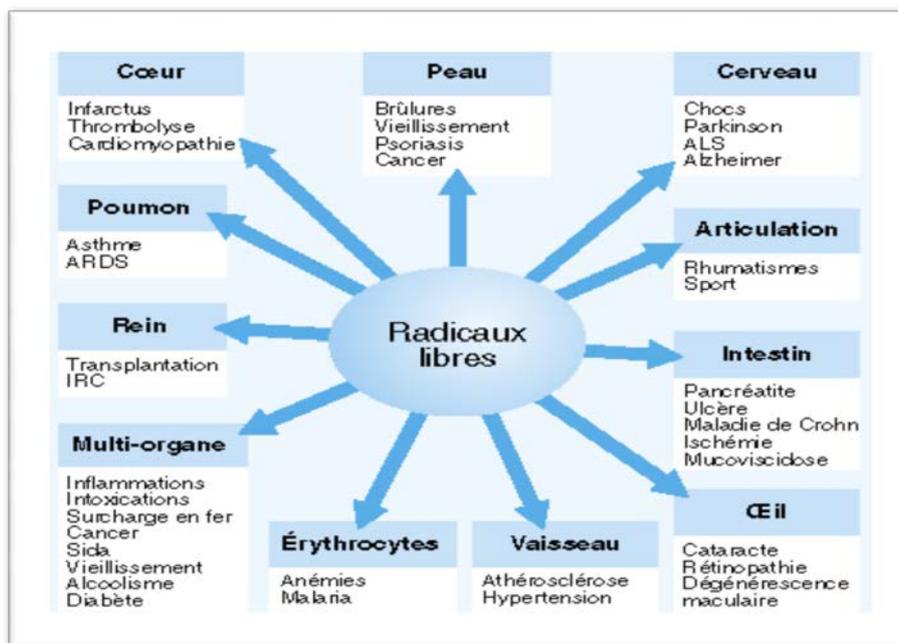


Figure I.14 : Principales circonstances pathologiques s'accompagnant d'un stress oxydatif [71].

## 6. Antioxydants et systèmes de défense

Un moyen de défense contre les radicaux libres : systèmes de défense sont des systèmes qui permettent de prévenir la formation radicalaire ou de limiter les lésions d'oxydation. Ces systèmes peuvent être endogènes ou exogènes, d'origine nutritionnelle. Un antioxydant est une substance qui peut être ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive [72].

D'après Helliwell [73], un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules. Les systèmes de lutte contre les ERO sont classés dans trois catégories : la prévention à temps plein (la prévention passive), la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive [74].

Certains antioxydants sont fabriqués par le corps comme les enzymes, d'autres proviennent de l'alimentation qui a une plus grande hétérogénéité comme les vitamines, les minéraux et les métabolites secondaires (les composés phénoliques). D'autres sont à la fois synthétisés en faible quantité par l'organisme et apportés par l'alimentation. C'est le cas de la cystéine et la coenzyme Q10 [75].

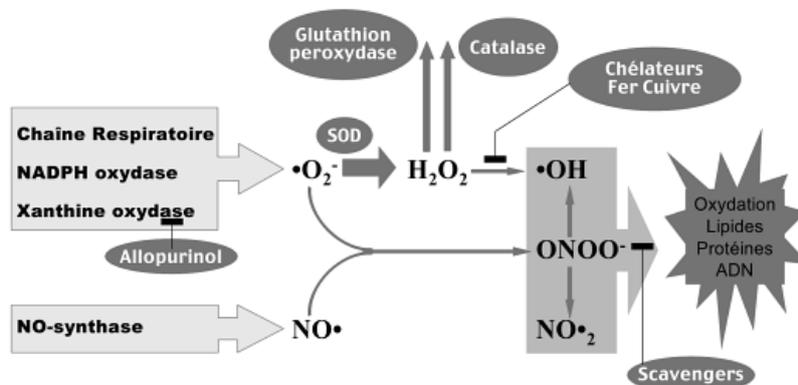


Figure I.15 : Action des antis oxydants au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène [76].

## 6.1. Système endogène

### A. Antioxydants enzymatiques

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes élaborés par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge [77].

#### a. Superoxyde dimutase (SOD)

Il catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en hydrogène en hydrogène peroxyde ( $H_2O_2$ ) et en oxygène.



Chez l'être humain, il y a 3 iso formes des SOD à cofacteurs métallique ((Cu, Zn SOD, Mn-SOD) et sont localisés dans le cytoplasme et la mitochondrie [78].

#### b. La catalase (CAT)

Cette enzyme est localisée essentiellement dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire [79].



#### c. La glutathion peroxydase (GPX)

Les glutathions peroxydases et réductases sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPX) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure(GSSG) [80].



## **B. Antioxydants non enzymatiques**

Ce sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs. Ils peuvent se comporter comme des piègeurs des radicaux libres par les interventions directes sur les molécules peroxydantes ou indirectement, en chélatant les métaux de transition, empêchant ainsi la réaction de Fenton. Ce type d'antioxydants possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Du fait de leur petite taille, ils peuvent en effet pénétrer facilement au cœur des cellules, et se localiser à proximité des cibles biologiques. Ce type d'antioxydants regroupe un grand nombre de substances hydrophiles ou lipophiles, et ils sont en partie produits par l'organisme au cours de processus biosynthétiques. Néanmoins le nombre d'antioxydants produits *in vivo* est très limité, on peut citer parmi les plus actifs : le glutathion [81], les dipeptides [82], l'acide urique [83], l'acide lipoïque [84] ou la bilirubine [85].

Le taux de ce système de défense dans l'organisme est essentiellement assuré par un apport alimentaire. Parmi les antioxydants naturels de faible poids moléculaire, les plus connus et les plus importants :

### **6.2. Système exogène**

Ils sont apportés par l'alimentation où se trouvent les oligo-éléments et les vitamines.

#### **A. Les oligo-éléments**

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Ces oligoéléments jouent le rôle de cofacteur pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydantes [86]. Ainsi le sélénium (Se), joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases sélénodépendantes, et à l'activité biologique anti radicalaire des scléroprotéines [87].

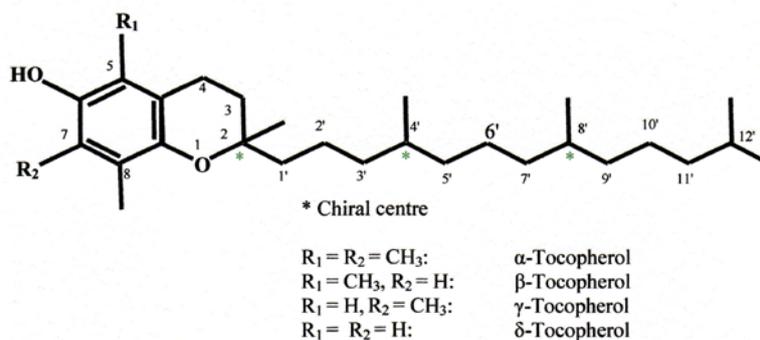
Le zinc (Zn) et le Cu, jouent un rôle dans le fonctionnement de SOD. Le zinc protège les groupements thiols (SH) des protéines contre l'oxydation induite par le fer, en empêchant la formation de ponts disulfure intramoléculaires [88].

## B. Les vitamines

### a. la vitamine E (l'alpha tocophérol)

Les tocophérols (**figure I.16**) sont des composés liposolubles, ils regroupent quatre substances, dont l'alpha-tocophérol aussi appelé Vitamine E est l'antioxydant majeur, la plus active Biologiquement [89].

L' $\alpha$ -tocophérol a été largement étudiée comme complément alimentaire, potentiellement préventive dans les maladies cardiovasculaires. Il joue un rôle dans l'atténuation du stress oxydatif [90], il est présent dans les membranes des cellules et les organites cellulaires, où il joue un rôle important dans la suppression de la peroxydation des lipides et il s'accumule sur ces sites au sein des cellules dans lesquelles la production des radicaux d'oxygène est plus grande [91]. Il neutralise les radicaux pyroxyles [92], alkyles et alcoxyles [93].



**Figure I.16** : Structure des tocophérols.

### b. Acide ascorbique (vitamine C)

La vitamine C ou acide ascorbique n'est pas synthétisée par l'organisme, sa concentration plasmatique dépend fortement de l'alimentation et des modifications du flux hépatique. C'est un excellent piègeur des EOA qui peut protéger divers substrats biologiques (protéines, acides Gras, ADN) de l'oxydation. Aux concentrations physiologiques, la vitamine C est capable d'empêcher l'oxydation des LDL produite par divers systèmes générateurs d'EOA [94].

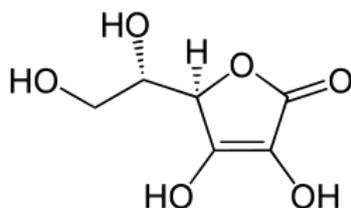


Figure I.17 : Acide ascorbique.

### c. Les caroténoïdes

La plupart des caroténoïdes et vitamine A interagissent avec l'oxygène singulet, et peuvent ainsi empêcher l'oxydation de plusieurs substrats biologiques dont les acides gras polyinsaturés (AGPI). Parmi d'autres caroténoïdes intéressants pour leurs propriétés antioxydantes [95], il existe plusieurs membres dans le groupe des caroténoïdes, mais le caroténoïde le plus connu et étudié est le  $\beta$ -carotène, qui est un puissant antioxydant capable d'éteindre rapidement l'oxygène singulet [96].

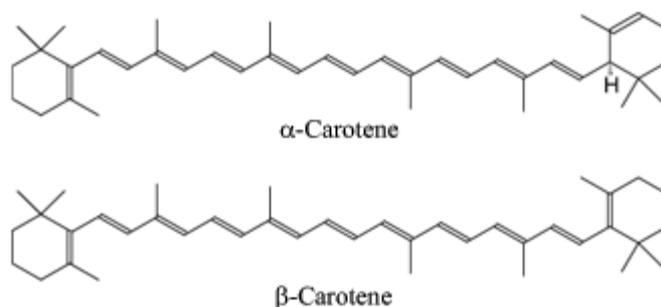


Figure I.18 : Deux exemples des structures des caroténoïdes.

### d. Les composés phénoliques

La propriété antioxydante des flavonoïdes la mieux décrite est leur capacité à piéger le radical libres : radical hydroxyle, l'anion superoxyde et les radicaux peroxydes. Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres, grâce à leur groupement hydroxyle ( $C_3OH$ ) fortement réactif [97]. Ils peuvent également protéger les membranes cellulaires par leur action à différents niveaux sur la peroxydation lipidique.

**Partie III : La plante de *Rosmarinus officinalis***

**1. Présentation botanique et géographique de la famille des Lamiacées**

La famille des Lamiacées ou Labiées est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 6000 espèces, et près de 210 genres répartis dans le monde entier, mais surtout dans la région méditerranéenne. Elles sont réparties en sept sous-familles (Ajugoïdeae, Chloanthoïdeae, Lamioïdeae, Nepetoïdeae, Scutellarioïdeae, Teucroïdeae, Viticoïdeae, Pogostemoïdeae).

Ce sont le plus souvent des plantes herbacées, des arbustes et rarement des arbres ou des lianes, producteurs d'huiles essentielles, largement répartis autour du monde et dans tout type de milieux. La forme de lèvre de la fleur et la présence d'huiles essentielles signent cette famille. Pour la plupart des genres, la section carrée de la tige et les feuilles opposées sont aussi des caractéristiques. De nombreuses espèces de cette famille sont des plantes mellifères, fréquentées par les abeilles [98].

Les plantes de cette famille sont rarement ligneuses, souvent velues, à tige généralement quadrangulaire. Les feuilles sont opposées et décussées (disposées en paire se croisant d'un nœud à l'autre), dépourvues de stipules, à limbe généralement denté. Les fleurs généralement sont hermaphrodites, à symétrie bilatérale ou parfois presque radiaire. Les sépales (calice) et les pétales (corolle) sont soudés en tubes comportant habituellement quatre ou cinq lobes, ou lèvres, de forme irrégulière (symétrie bilatérale). Les deux, quatre ou cinq étamines sont attachées à l'intérieur du tube corollaire. L'ovaire est supère, libre et possède deux carpelles.

Les Lamiacées possèdent souvent des poils glanduleux et des glandes sous-épidermiques à huiles essentielles les rendant très odorantes [99].

**2. Historique**

Le Romarin, chargé de symboles chez les anciens pour les cérémonies religieuses qui en faisaient des couronnes a servi à l'élaboration d'un remède longtemps réputé, « l'Eau de la reine de Hongrie » qui en fait est un alcoolat : à l'aide de ce remède, la souveraine, âgée de 72 ans, guérit des rhumatismes et de la podagre [100]. Les médecins arabes utilisaient beaucoup le romarin et ce sont eux qui réussirent les premiers à en extraire l'huile essentielle [101].

### 3. Etymologie

Le nom « romarin » vient du latin « *ros marinus* » (rosée de mer) [102], ou bien du grec « *rhaps myrinos* » (buisson aromatique) [103], ou encore du latin « *rhus marinus* » (Sumac de mer) [104]. On l'appelle également « herbe-aux-couronnes », et en provençal, « encensier » [105].

#### 3.1 Noms vernaculaire

Iklil al jabal, Klil, Hatssa louban, Hassalban, Lazir, Azîir, Ouzbir, Aklel, Touzala [106].

Appellations régionales en Algérie : En plus souvent

Région de l'Est : Eklil

Région de l'Ouest : Helhal

Région du Centre : Yazir

### 4. Classification botanique

**Tableau I .1:** Position systématique du romarin

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Ordre</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Famille</b>	<i>Lamiaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Rosmarinus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. 1753
<b>Période de floraison</b>	Février à Avril
<b>Couleur des fleurs</b>	Bleu / Mauve

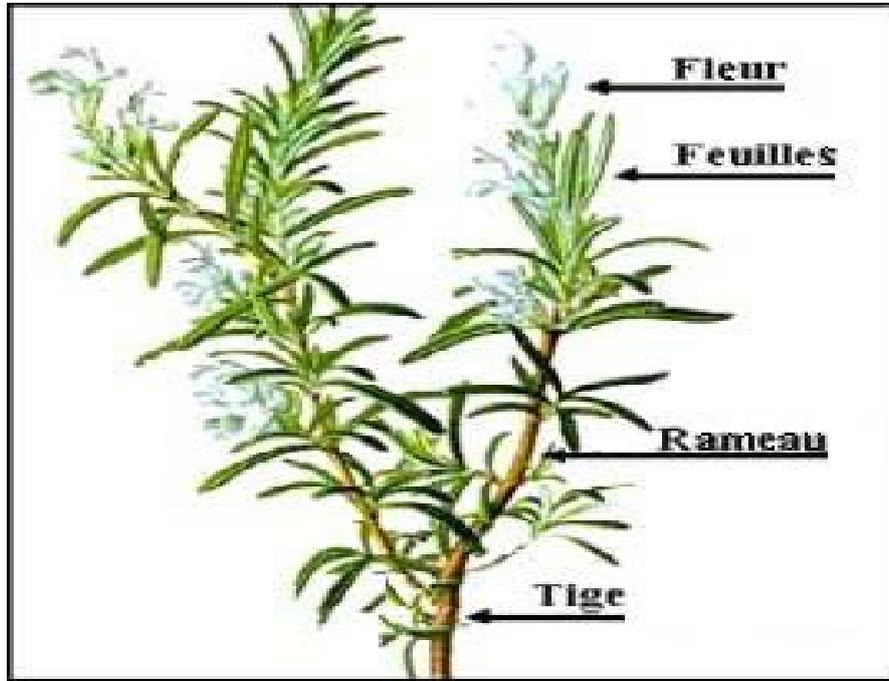


Figure I.19 : Aspects morphologiques du *Rosmarinus officinalis* [107].

## 6. Description botanique

Le Romarin, plante commune à l'état sauvage, est l'une des plantes les plus populaires en Algérie, trouvée dans tous les jardins et les parcs en bordure odorante [108]. Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées [109], de 50 cm à 1 mètre et plus, toujours vert, très aromatique, très rameux, très feuillé [110]. Les feuilles sont coriaces, persistantes, sessiles, linéaires, entières, enroulées sur les bords, vertes et ponctuées dessus, blanches tomenteuses à la face inférieure [111]. Son écorce s'écaille sur les branches les plus âgées, et son odeur est extrêmement odorante et tenace [110]. La floraison commence dès les mois de Janvier / Février et se poursuit jusqu'en Avril / Mai [109]. Les fleurs sont réunies au sommet des rameaux, bleues pâles à blanchâtre, pratiquement sessiles, disposées en petites grappes axillaires et terminales, bractées tomenteuses lancéolées [111].

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 [109]. Le fruit, ovoïde, est entouré par un calice persistant, sec est constitué de quatre akènes (Tétrakène). Il attire les insectes (Entomophiles) pour assurer la pollinisation (Entomogame) [112].



**Figure I.20** : Tige principale et rameau Feuillé à fleurs du *Romarin* [113].

## **5. Habitat**

Les régions de la méditerranée représentent une zone principale d'existence des différents types de romarin ; cette plante occupe de vastes superficies du nord de l'Afrique, et du sud de l'Europe. Il apprécie les climats chauds ou modérément secs [114].

En Algérie, onze recouvrent plus de 70000 ha du territoire national [115].

## **6. Récolte**

Le romarin fleurit de Janvier jusqu'à l'automne, c'est presque toute l'année que l'on peut en faire la cueillette, toutefois la meilleure époque en vue de la distillation s'étend de Mai à Juillet et même jusqu'à Septembre.

La parfumerie demande toute la plante fleurie, coupée par un temps chaud et sec [116].

## 7. Composition chimique

Tableau I .2 Composition chimique du Romarin

<b>Huiles essentiels</b>	1,8 cinéole, alpha-pinène camphre de romarin [117] camphène [118].
<b>Flavonoïdes</b>	lutéoline, quercétine [119], genkwanine, cirsimaritrine [120], ériocitrine, hespéridine, diosmine, lutéoline [121], apigénine [122].
<b>Diterpènes</b>	Acide carnosolique, rosmadial [117].
<b>Triterpènes et Stéroïdes</b>	acide aléanolique [117], acide ursotique [122].
<b>Tanins</b>	[123]
<b>Lipides</b>	n-alkanes, isolalkanes, alkènes [117].
<b>Acides phénoliques</b>	Acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique [110]. Acide rosmarinique, Rosmaricine [123].

## **9. Usage**

Le romarin fut longtemps utilisé empiriquement en phytothérapie. Le miel de romarin, aussi appelé « Miel de Narbonne » était un des multiples constituants de la thériaque de la pharmacopée maritime occidentale au XVIII<sup>e</sup> siècle [124].

Des études modernes montrent les effets du romarin sur différentes parties de l'organisme.

### **9.1. Usage interne**

Le romarin est un stimulant antispasmodique et cholagogue. On l'indique pour ses qualités stimulantes dans les dyspepsies atoniques, les fermentations intestinales, les asthénies, le surmenage, les états adynamiques des fièvres typhoïdes ou muqueuses, de la grippe. En sa qualité d'antispasmodique, il est bénéfique dans le catarrhe chronique des bronches, la coqueluche, 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), un anti-VIH et anti-cancer [125].

### **9.2 Usage externe**

Pour les traitements externes (entorses, foulures, contusions, torticolis), on emploie les sommités infusées dans de l'alcool. L'extrait alcoolique lui-même agit sur les ulcères, les plaies, les dermatoses parasitaires. La décoction aqueuse s'utilise en gargarismes (angines) et en bains de bouche (aphtes) ou elle est ajoutée à des bains stimulants, 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 [125].

#### **9.2.1. Parfumerie et cosmétique**

Au 19<sup>ème</sup> siècle, l'essence de romarin est utilisée dans la fabrication de très célèbre eau de Cologne de la reine de Hongrie. Aujourd'hui, elle entre dans la composition des savonneries, détergent, crème, l'eau de toilette, des poudres, le taux d'utilisation maximum rapporté à 1% [126].

### **9.2.2 Industrie agro-alimentaire**

Les extraits végétaux de romarin présentent un pouvoir antioxydant important, et peuvent être appliqués à la conservation des aliments et des huiles lipidiques, ces propriétés sont dues aux acides polyphénoliques (rosmarinique, caféique) [127].

### **9.2.3 Alimentation**

L'épice et l'huile de romarin sont largement utilisés en alimentation, l'épice est utilisée dans les aliments cuits, viande, les aliments industriels, avec le niveau maximum utilisé d'environ 0,41% dans les aliments cuits. L'huile est utilisée dans les desserts glacés, confiseries, gélatines.

Le romarin est utilisé en infusions, sous forme de poudres, extraits sec ou autres préparations galéniques pour usage interne et externe, principalement contre les douleurs d'estomac [127].

## **10. Précautions**

L'huile de romarin augmente la pression sanguine dans le cas d'une pression artérielle élevée, il peut être irritant pour la peau sensible. L'huile de romarin peut déclencher des crises d'épilepsie chez les personnes sensibles [128].

## **Matériels et méthodes**

Notre travail a été réalisé au laboratoire de Biochimie, Université des Frères Mentouri, Constantine, Algérie.

### **1. Matériels**

#### **1.1 Matériel végétal**

Notre étude est portée sur une espèce de plante de la famille des lamiacées (labiées) qui est *Rosmarinus officinalis*.

La partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* a été récoltée au mois de février 2018 dans la forêt de Djebel ELwahch de la wilaya de Constantine, loin de tout impact de pollution. Après la récolte, la partie aérienne de la plante a été lavée à l'eau courante afin de les débarrasser des poussières et autres particules. Puis la plante a été séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant 7 jours. La partie aérienne a été d'abord coupée en petits morceaux dans le but d'accélérer leur séchage.

#### **1.2 Appareils et réactifs chimique**

##### **Appareillage**

- Spectrophotomètre UV-Visible
- Rotavapeur
- Bain Marie
- Agitateur magnétique
- Micro pipette
- Etuve
- Balance de précision
- Broyeur électrique
- Vortex
- Réfrigérateur

## Réactifs chimiques

Tableau II .1 Réactifs chimique utilisés

<b>Produit</b>	<b>Formule brute</b>	<b>Fournisseur</b>
L'acide gallique	$C_7H_6O_5$	<b>Sigma-Aldrich</b>
Réactif de Folin-Ciocalteu	/	<b>Sigma-Aldrich</b>
Carbonate de sodium	$Na_2CO_3$	<b>Sigma-Aldrich</b>
Chlorure d'aluminium	$AlCl_3$	<b>Sigma-Aldrich</b>
L'eau distillée	/	/
DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	/	<b>Sigma-Aldrich</b>
Quercetine	$C_{15}H_{10}O_7$	<b>Sigma-Aldrich</b>
Méthanol	$CH_3OH$	<b>Sigma-Aldrich</b>
Ethanol	$C_2H_6O$	<b>Sigma-Aldrich</b>
Acétone	$C_3H_6O$	<b>Sigma-Aldrich</b>
Acide chlorhydrique	$HCl$	<b>Sigma-Aldrich</b>
Acide acétique	$CH_3COOH$	<b>Sigma-Aldrich</b>
Acide ascorbique	$C_6H_8O_6$	<b>Sigma-Aldrich</b>
Ferricyanure de potassium	$K_3 [Fe(CN)_6]$	<b>Sigma-Aldrich</b>
Trichloracétique	TCA	<b>Sigma-Aldrich</b>
Chlorure ferrique	$FeCl_3$	<b>Sigma-Aldrich</b>
Hydroxyde de sodium	$NaOH$	<b>Sigma-Aldrich</b>
Phosphate disodique	$Na_2HPO_4$	<b>Sigma-Aldrich</b>
Phosphate monosodique	$NaH_2PO_4$	<b>Sigma-Aldrich</b>

## **2. Méthodes**

### **2.1. Méthodes d'extraction**

Avant toute extraction, le séchage des feuilles du matériel végétal est effectué dans l'étuve durant 72h à 40°C dans le but de compléter le séchage.

#### **2.1.1 Extraction des composés phénoliques**

##### **2.1.1.1. Préparation des extraits méthanoliques**

###### **A. Broyage**

Après séchage les feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine qui a servi pour la préparation des extraits.

Après broyage, la poudre de plante a été conservée dans des flacons en verre afin de garder leur couleur et principalement leur effet thérapeutique, elle a été stockée soigneusement dans un endroit sec jusqu'à leur analyse.

###### **B. Macération**

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact avec un solvant pour en extraire les principes actifs, elle se fait à température ambiante [129].

Des extraits méthanoliques sont préparés par macération de 20 g de la poudre végétale dans 100 ml de méthanol à 70% pendant 24 heures. Les extraits sont récupérés dans un premier temps après filtration du mélange à travers le papier filtre Wattman.

Les résidus obtenus sont repris pour une deuxième et troisième fois d'extraction pendant trois jours successifs, avec changement du solvant chaque 24h avec le même volume du mélange méthanolique. Les trois filtrats sont réunis et concentrés sous pression réduite dans un rotavapeur à 40°C. Les extraits secs obtenus ont été ensuite conservés au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à leurs utilisations.

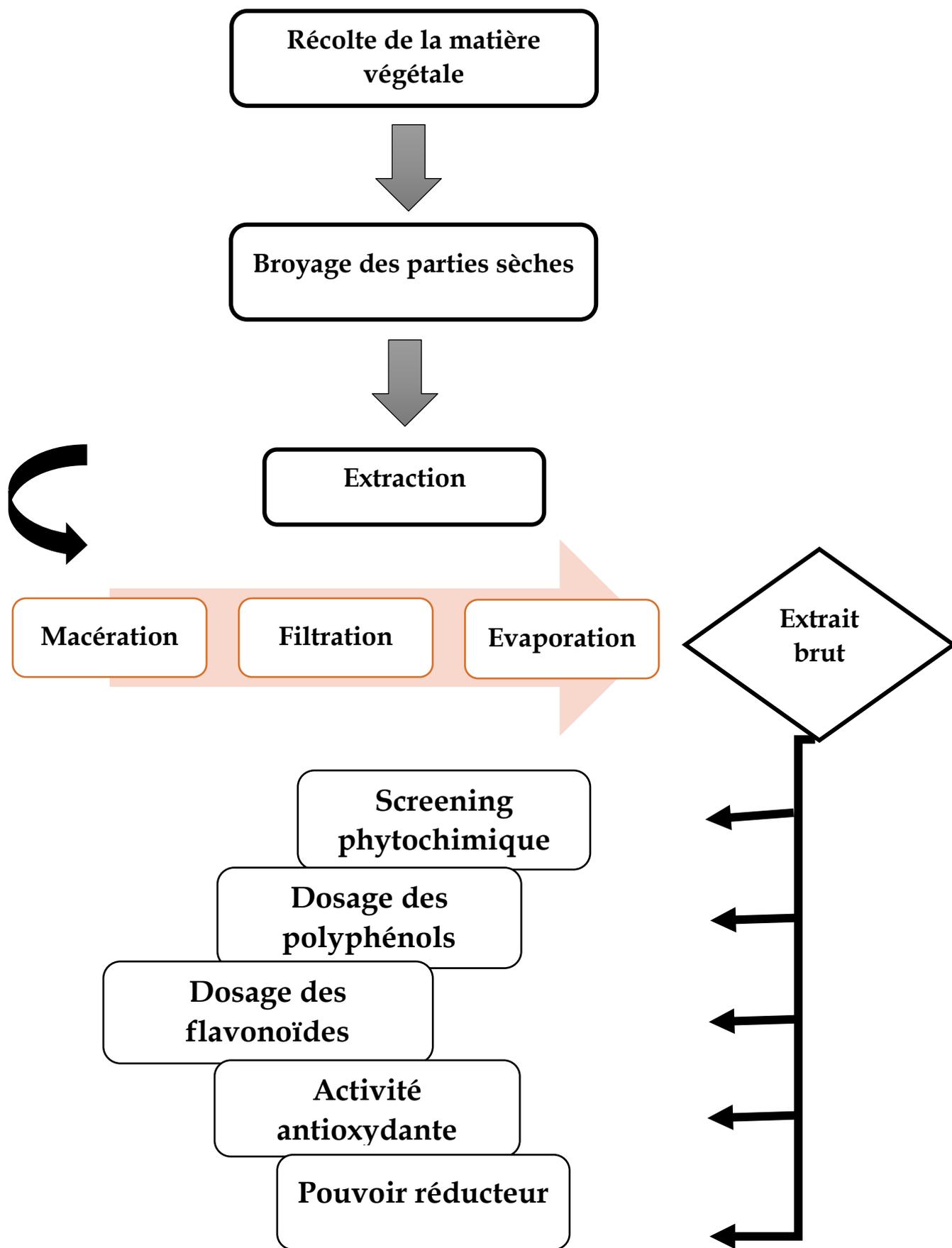


Figure II.1 : Protocole de l'étude expérimentale.

## **2.2 Criblage phytochimique**

Le criblage phytochimique est un ensemble des méthodes et techniques de préparation et d'analyses des substances organiques naturelles de la plante. Ces techniques permettent de détecter la présence des produits appartenant à des classes de composés ordinairement physiologiquement actifs qui sont les composés phénoliques [130].

### **2.2.1 Test des saponines**

Leur présence est déterminée quantitativement par le test de la mousse, dans un tube à essai 2 mg de l'extrait méthanolique est mis en contact avec 2 mL d'eau distillé, sous agitation vigoureuse, la formation d'une mousse stable persistant pendant 15 min, indique la présence des saponines [131].

### **2.2.2 Test des Alcaloïdes**

Test fondé sur la capacité qu'ont les alcaloïdes à se combiner avec les métaux lourds.

**Test de Mayer :** 2 mg de l'extrait méthanolique est dissous dans 2 ml de HCL 50%. La formation d'un précipité jaune après l'ajout de quelques gouttes de réactif de Mayer, témoigne la présence des alcaloïdes [132].

### **2.2.3 Test des composés réducteurs**

1 mg de l'extrait méthanolique est traité avec 2 mL d'eau distillé, avec l'ajout de 20 gouttes de la liqueur de Fehling suivi de 2 min de chauffage au bain marie à 70°C. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique [131].

### **2.2.4 Test des tanins**

Une quantité de 1 mg de l'extrait méthanolique est placée dans 2 mL d'eau distillé. L'ajout de FeCl<sub>3</sub> à 1% permet de détecter la présence ou l'absence des tanins, la couleur vire au bleu noir en présence de tanins gallique, et au brun verdâtre en présence des tanins catéchique [133].

### **2.2.5 Test des tanins vrais**

2 mg de l'extrait méthanolique est mis en contact avec 2 mL d'eau distillé, suivi de l'ajout de quelques gouttes d'HCl concentré et un chauffage au bain marie bouillant. La formation d'un précipité rouge indique un test positif [134].

### **2.2.6 Test des quinones**

2 mg de l'extrait méthanolique est placé dans 2 mL d'eau distillé. Le virage de la couleur de la phase aqueuse au jaune, rouge ou violet après ajout de quelques gouttes de NaOH (1/10), témoigne de la présence des quinones [135].

### **2.2.7 Test des stérols et les triterpènes**

Selon les réactions de Liebermann, Un aliquote de résidu est dissoute dans 1 mL d'anhydride acétique dans un tube à essai dans lequel sont coulés 0,5 mL d'acide sulfurique concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive [134].

### **2.2.8 Test des flavonoïdes**

Un mélange de quelques copeaux de  $Mg^{2+}$  et de gouttes de HCl concentré, placé dans un tube et ajouté à 2 ml d'extrait, l'apparition d'une coloration allant de l'orange au rouge pourpre indique une réaction positive [136].

### **2.2.9 Test des flavonoïdes glycosides**

1 ml d'hydroxyde de potassium KOH à 1% est ajouté à 2 ml de l'extrait dilué dans le MeOH. L'apparition d'une coloration jaune, indique la présence des flavonoïdes glycosides [137].

### **2.2.10 Test des phénols**

2 ml de l'éthanol est ajouté à 2 mL de l'extrait, l'ajout de quelques gouttes de  $FeCl_3$  permet l'apparition d'une coloration verdâtre qui indique la présence des phénols [137].

## **2.3 Dosage colorimétrique (Spectrophotométrique)**

### **2.3.1 Dosage des polyphénols totaux**

**Principe :** Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène [138]. La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

**La mise en œuvre du dosage :** Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de différentes concentrations comprise entre 0 et 1 mg/mL à partir d'une solution mère 400 µl. 200 µl de chaque solution a été introduit à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau distillée). Après agitation et 5 min d'incubation 800 µl de carbonates de sodium à 7,5% ont été ajoutées, les solutions ainsi obtenues sont maintenues à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS. Le blanc de la réaction ne contenant pas de polyphénols est réalisé comme le point 0 µg/mL de la gamme. Les lectures de la densité optique à 760 nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

L'analyse quantitative des phénols totaux des extraits phénoliques a été réalisée par l'ajout de 2 mg de l'extrait méthanolique dans 10 mL eau distillé suivi par la même procédure. Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

### **2.3.2 Dosage des flavonoïdes totaux**

La détermination de la teneur en flavonoïdes de l'extrait a été effectuée par la méthode de trichlorure d'aluminium  $AlCl_3$  avec des modifications : le chlorure d'aluminium forme des complexe jaunâtre avec les atomes d'oxygène présentent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes [139].

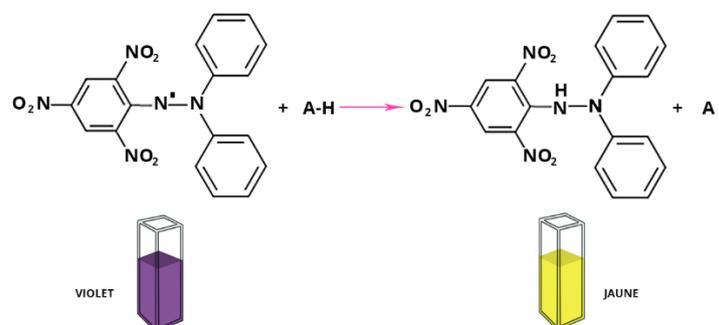
Brièvement, 1 mL de l'extrait est ajouté à 1 mL d' $\text{AlCl}_3$  (solution méthanolique à 2%). Après 10 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est lue à 420 nm par un spectrophotomètre UV-Visible.

La teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g MS).

## 2.4 Les activités biologiques in vitro

### 2.4.1 Evaluation de l'activité antioxydante par diphenyl-picryl- hydrazyl DPPH

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), fut l'un des premier radicaux utilisés pour étudier structure / activité antioxydante des composés phénoliques. Depuis certaines modifications ont été apportés et un paramètre important a été induit : la détermination de la  $\text{IC}_{50}$ , définit comme étant la concentration en substrat entrainant une diminution de 50% de l'absorption. A cette concentration, 50% du DPPH est sous forme réduite [140].



**Figure II.2** : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

L'activité antioxydante de la solution mère est mesurée par la méthode décrite par BRAND-WILLIAM et ses collaborateurs (1995) avec quelques modifications. Un volume de 2 mL de la solution de DPPH est mélangé avec 2 mL de la solution mère de l'antioxydant standard (la quercétine), subira des dilutions pour en avoir des différentes concentrations de l'ordre de mg/ml. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm.

Le pourcentage de réduction de DPPH est donné par la formule décrite par Yen et Dut, (1994).

$$\text{PR du DPPH (\%)} = [(A \text{ contrôle (c)} - A \text{ échantillon (t)} / A \text{ contrôle (c)} \times 100 \quad (\text{II.1})$$

% PR du DPPH : pourcentage de réduction ou d'inhibition du DPPH ;

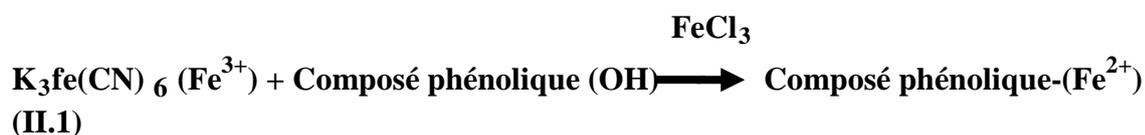
A (c) : Absorbance du contrôle ;

A (t) : Absorbance d'extrait ou standard.

#### **2.4.2 Test du pouvoir réducteur par la méthode de FRAP (Ferric Reducing-Antioxydant Power)**

**Principe :** le pouvoir réducteur du fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans l'extrait a été déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu en 1986.

La méthode de réduction du fer est basée sur la réduction du fer ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  en sels de fer ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  par les antioxydants qui donnent la couleur bleu [141].



**Complexe jaune**

**Complexe bleu**

**Expérimentation :** Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 0 à 0,1 mg/mL) est mélangé avec 2,5mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2,5 mL d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction.

Après un repos de 10min, un aliquote (2,5 mL) de surnageant est combinée avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de  $\text{FeCl}_3$  à 0,1%.

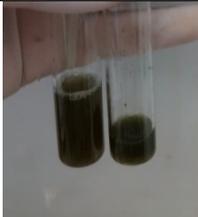
La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-Visible spectrophotomètre).

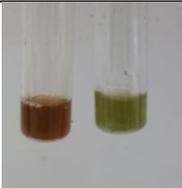
Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; la quercetine dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé [142].

## 1-Screening phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la plante par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions, sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques. Les résultats de ce criblage phytochimique sont reportés dans le (tableau III.1), Il révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolites secondaires.

**Tableau III.1** : Résultats du criblage phytochimique de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis*.

Métabolites secondaires	Observation	Résultats
Saponines		-
Alcaloïdes		-
Composés réducteurs		+++
Tanins galliques		+++
Tanins vrais		++

Quinones		+++
Stérols et triterpènes		++
Flavonoïdes		+++
Flavonoïdes glycosides		++
Phénol		+++

- ❖ (+++) : Réaction fortement positive
- ❖ (++) : Réaction moyennement positive
- ❖ (-) : Réaction négative

D'après le tableau ci-dessus, la présence des composés réducteurs est révélée par l'apparition d'une coloration rouge brique intense, ce qui signifie une présence importante de ces composés, ce qui infirme les travaux de **Fadili K. Et al. (2015) [143]**.

Pour les tests des tanins, la couleur vire au bleu noir, ce qui indique la présence des tanins galliques par une réaction fortement positive, ainsi que pour les quinones et les flavonoïdes, par l'apparition d'une coloration rouge qui révèle leur présence. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Fadili K et al. (2015) [143]**.

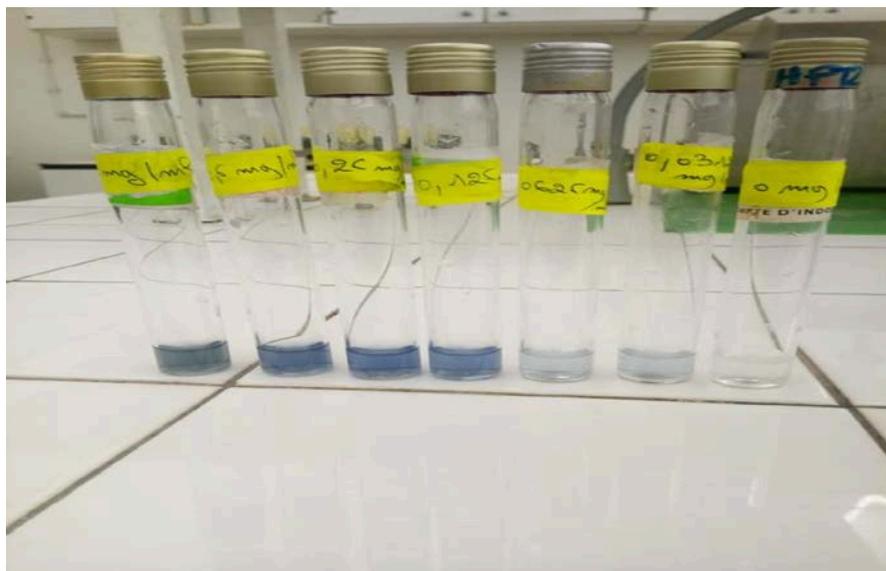
Les tanins vrais, les stérols et les triterpènes ainsi que les flavonoïdes glycosides sont faiblement présents.

En revanche, une absence totale des saponines et des alcaloïdes est observée, ce qui confirme les résultats de **Fadili K et al. (2015) [143]**.

La richesse de cet extrait en composés chimiques actifs pourrait expliquer son utilisation traditionnelle.

## 2-Dosage des polyphénols totaux

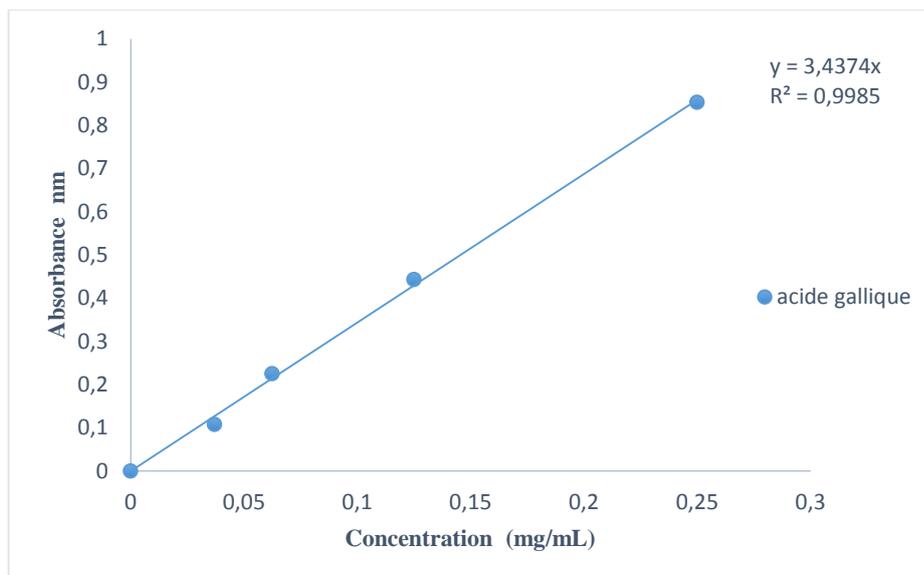
La teneur en polyphénols totaux a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, des plantes médicinales et les nourritures.



**Figure III.1** : Résultat de l'acide gallique.

L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans cette méthode. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage (**figure III.1**) ayant l'équation :

$$y = 3,4374 x \quad (\text{III.1})$$



**Figure III.2 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les teneurs ont été rapportées en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/ g MS). Les résultats indiquent que la teneur moyenne en phénols totaux de l'extrait méthanolique est de  $248,55 \pm 26,71$  mg EAG/g.

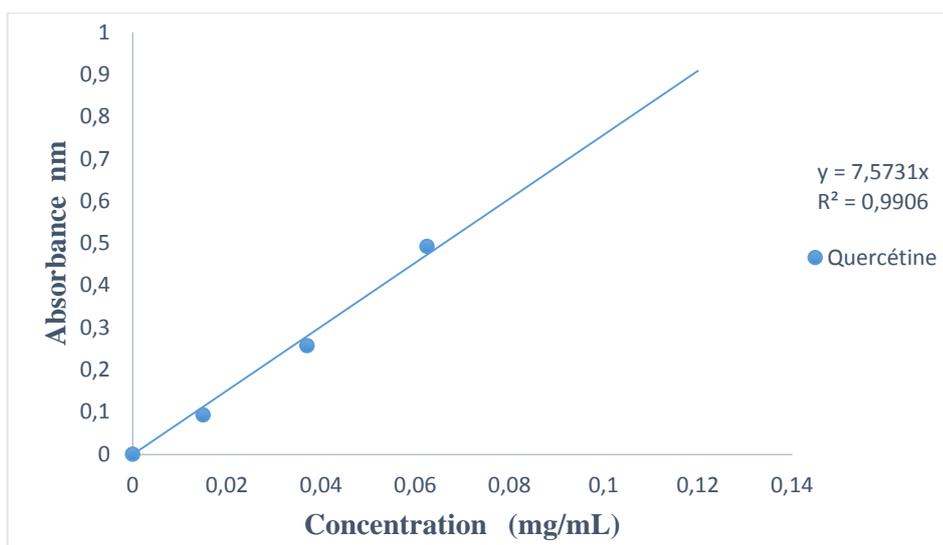
Cette valeur est beaucoup plus élevée que celle trouvée par : **Stephanovits B Et al. (2003) [144]**, qui est de l'ordre de  $128,976 \pm 9,257$  mg EAG/g MS.

Les teneurs reportés par **Yesil-Celiktas O et al. (2007b) [145]**, qui ont mené des études sur les teneurs en composés phénoliques totaux issus de trois régions différentes de Turquie, variaient entre 70,3 et 147,3 mg EAG/g, sont très faibles par rapport à nos résultats.

### 3. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes déterminée par la méthode au trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis*, a été rapportée en mg équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/ g MS).

La courbe d'étalonnage du standard est établie avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,9906$ . (**Figure III.2**).



**Figure III.3 :** Courbe d'étalonnage de la quercétine.

La teneur en flavonoïdes est de  $372,52 \pm 10,27$  mg EQ/g MS, cette valeur est largement supérieure à celle de **Tsai P et al. (2007) [146]**, qui est de l'ordre de  $60,7 \pm 1,1$  mg EQ/g, ainsi que celle de **Stephanovits B et al. (2007) [144]**, qui est de l'ordre de  $38,018 \pm 0,884$  mg QE/g de MS.

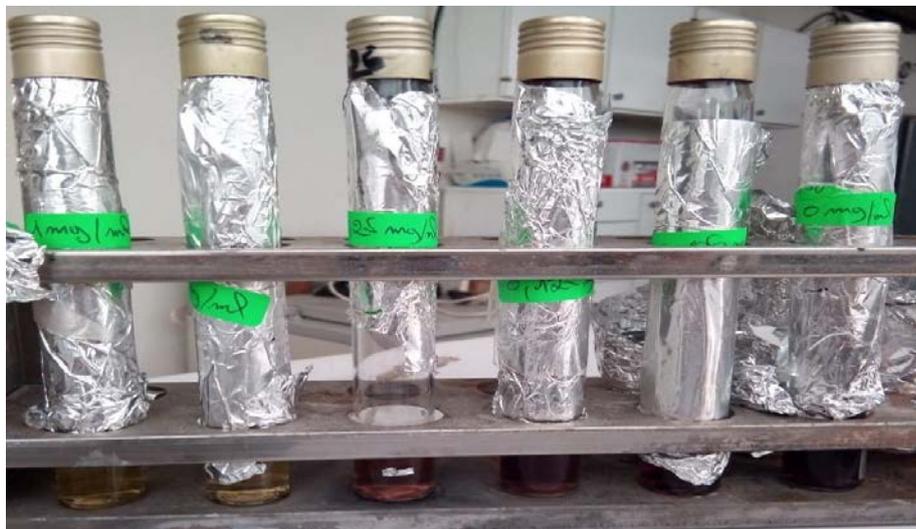
D'après les résultats obtenus, il est clair que *Rosmarinus officinalis* est très riche en flavonoïdes qui représentent la classe majoritaire avec un taux plus élevé que des polyphénols. Ces résultats sont en désaccord avec ceux trouvés par **Stephanovits B et al. (2007) [144]**.

Cette différences de résultats se trouve probablement due à la distribution des métabolites secondaires pendant la croissance de la plante, ceci peut être lié aux facteurs extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité, au moment de récolte, les conditions de stockage ainsi que le solvant d'extraction) et intrinsèques (génétiques) [147].

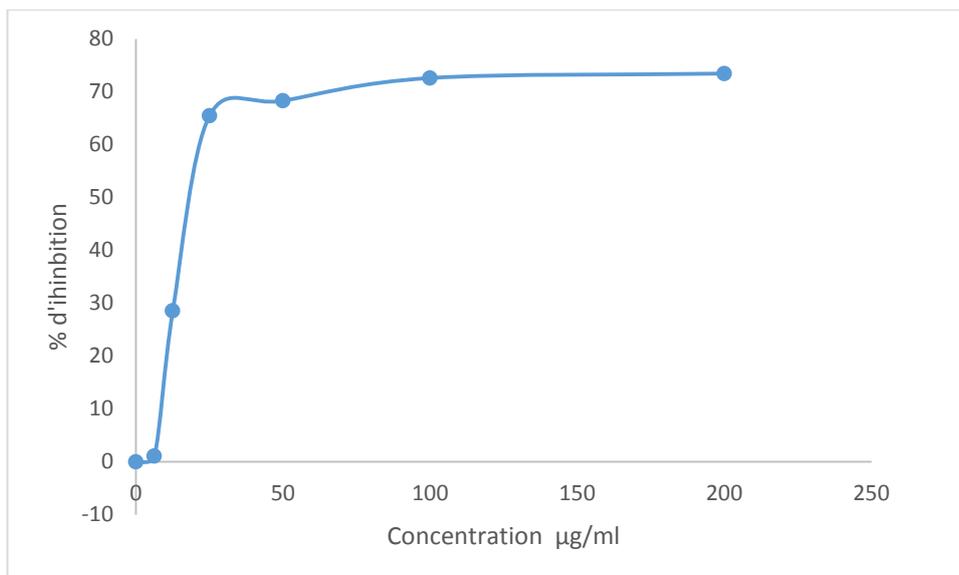
Néanmoins, le dosage des polyphénols totaux par le test Folin-Ciocalteu implique que toutes les molécules réductrices comme les sucres réducteurs ou la vitamine C, sont dosées, ce qui par conséquent rend ce dosage non sélectif vis-à-vis des polyphénols en surestimant les valeurs obtenue [148].

#### **4. Evaluation de l'activité antioxydante par le DPPH**

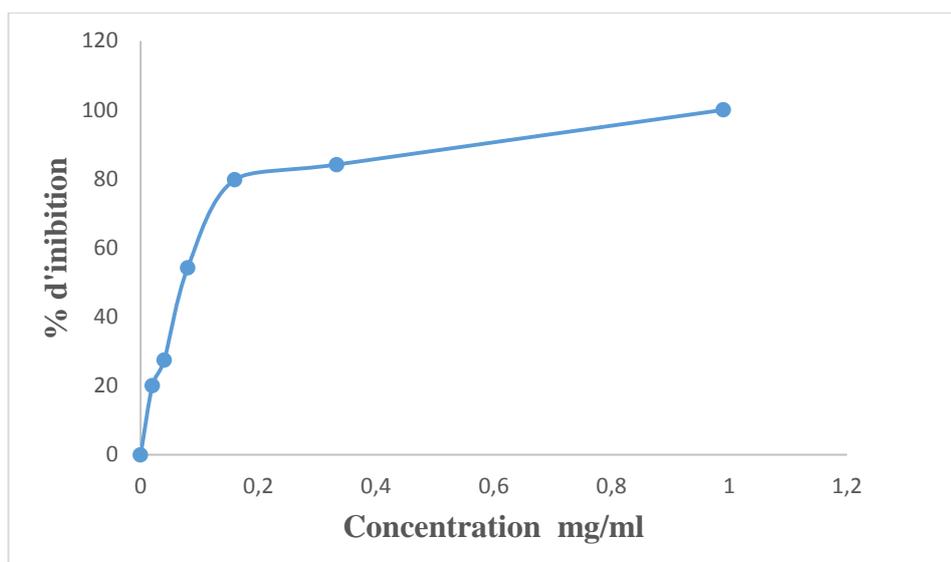
L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* et de l'antioxydant standard (quercetine) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre, en suivant la réduction de ce radical, qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH<sup>•</sup>) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à longueur d'onde de 515nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition du radical libre de DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extrait de *Rosmarinus officinalis*, ce qui a permis l'obtention des courbes logarithmiques (**figure III.6**), dont les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration du standard (**Figure III.5**) [149].



**Figure III.4 : Résultat du DPPH.**



**Figure III.5 :** Pourcentage d'inhibition de la quercétine.



**Figure III.6 :** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extrait de *Rosmarinus officinalis*.

Les valeurs  $IC_{50}$  déterminées en mg/mL exprimant la concentration efficace de l'extrait antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de moles de DPPH en dissolution dans du méthanol (**tableau III.2**).

**Tableau III.2 :** Pourcentage d'inhibition de l'extrait de *Rosmarinus Officinalis* et de la quercetine.

	IC <sub>50</sub> (mg / mL)
<b>Extrait</b>	0,08
<b>Quercetine</b>	0,02

Selon les résultats enregistrés, l'extrait méthanolique est doté d'un pouvoir antioxydant important, IC<sub>50</sub> est de 0,08 mg/mL mais relativement faible que celle de la quercetine dont la valeur est de l'ordre de 0,02 mg/mL.

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène [150].

Il est clair que même à de faibles concentrations, l'extrait montre un pourcentage d'inhibition important, ce qui permet de déduire que les composés phénoliques contenus dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *R. officinalis* sont très efficaces comme antioxydants.

Nos résultats sont inférieurs par rapport à ceux rapporté par **Fadili K et al. (2015)** [143], dont IC<sub>50</sub> est de 0,001 mg/mL et 0,05 mg/mL respectivement pour l'extrait méthanolique et le standard l'acide ascorbique.

Ceci indique qu'une valeur faible d'IC<sub>50</sub> indique une activité antioxydante forte, d'un autre coté il existe une corrélation entre la concentration des polyphénols et l'activité antioxydante, ce qui confirme que les polyphénols sont des antioxydants puissants, capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules [151]. En effet l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la concentration des polyphénols, mais également de la nature et la structure des antioxydants dans l'extrait [152].

## 5. Pouvoir de réduction par la méthode de FRAP

L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique en utilisant la méthode de FRAP est un essai simple, rapide et reproductible [153], cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols

à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$ , par conséquent le  $Fe^{2+}$  peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnelle à 700 nm [154].

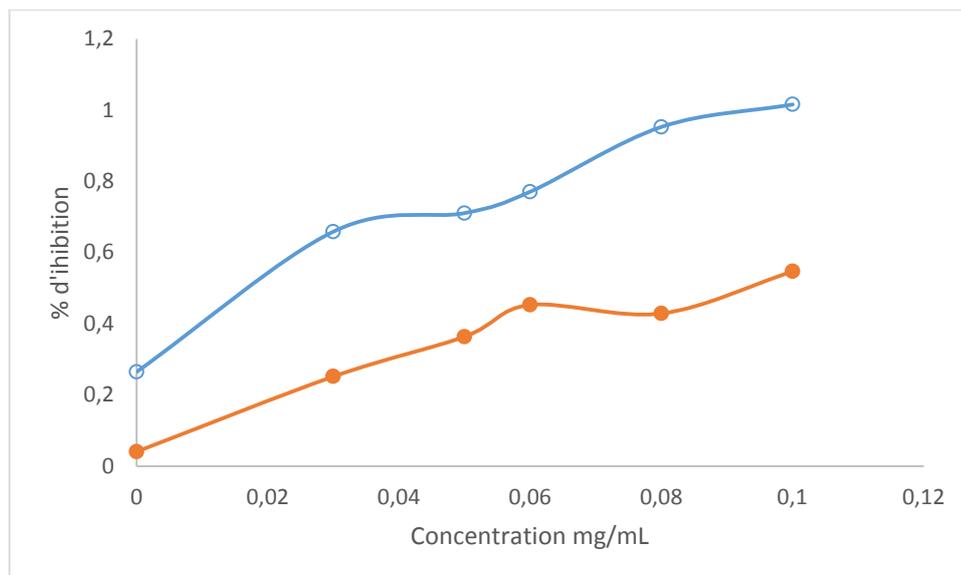
A partir de nos résultats (**figure III.6**), l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées de l'extrait méthanolique, le changement de la couleur du milieu réactionnelle du jaune au bleu vert (**figure III.7**), indique que l'extrait méthanolique du *R.officinalis* présente une capacité antioxydante et exerce une meilleure activité réductrice à 0,1 mg/mL avec une absorbance de 1,01 nm, inférieure à celle du standard (la quercetine) (**figure III.8**).



**Figure III.7** : Résultat du pouvoir réducteur avant l'apparition de la couleur.



**Figure III.8** : Résultat du pouvoir réducteur après l'apparition de la couleur verte.



**Figure III.9 :** Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique et de la quercétine testée à différentes concentrations.

A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futur médicaments.

Dans l'objectif de la valorisation de la flore algérienne, une étude phytochimique et une évaluation de l'activité antioxydante ont été portés sur *Rosmarinus Officinalis*, reconnue par ses vertus thérapeutiques variées.

Les résultats de l'analyse phytochimique qualitative ont mis en évidence la présence de flavonoïdes, composés réducteurs, de tanins et de phénols ainsi que les quinones en quantités importantes. Ils ont montré aussi la présence de tanins vrais, de stérols et triterpènes, de flavonoïdes glycosides. Cependant, les alcaloïdes et les saponines ont été absents dans l'extrait méthanolique.

La quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes de l'extrait obtenus a permis de déduire que la plante testée constitue une source prometteuse des composés phénoliques. Les teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux évaluées par la méthode de Folin-Ciocalteu et par la méthode d' $\text{AlCl}_3$  sont respectivement de l'ordre de  $248,55 \pm 26,71$  mg EAG/g et  $372,55 \pm 10,27$  mg QE/g de MS.

L'extrait méthanolique de *Rosmarinus Officinalis* est plus riche en flavonoïdes que les polyphénols.

L'étude de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique selon la méthode de la réduction du fer et celle du piégeage du radical libre DPPH a montré que l'extrait méthanolique possède une activité antioxydante importante. Cette activité reste néanmoins nettement inférieure à celle de la quercétine. Il est donc très probable qu'il contient des composés qui, une fois purifiés, peuvent présenter une activité comparable à celle des agents antioxydants.

Sur l'ensemble des résultats obtenus, on pourrait conclure que cette plante peut être une source naturelle de composés antioxydants d'importance élevée.

Par la suite, il est souhaitable de mener une étude plus approfondie pour isoler et caractériser les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques, et d'évaluer d'autres activités biologiques in vitro et in vivo de chacun de ces composés pris séparément.

## Résumé

*Rosmarinus Officinalis* est une plante médicinale appartenant à la famille des lamiacées, utilisée en médecine traditionnelle pour ses divers effets thérapeutiques.

La partie aérienne de la plante a été soumise à une macération dans le méthanol afin d'extraire les métabolites secondaires.

Les résultats de criblage phytochimique ont mis en évidence la richesse de *Rosmarinus Officinalis* en métabolites secondaires.

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, (248.55±26.71) mg EAG/g de MS. Les flavonoïdes ont été évalués par la méthode de chlorure d'aluminium AlCl<sub>3</sub>, la teneur est estimée à (372.55 ±10.27) mg QE/g de MS.

Les résultats obtenus pour l'activité antiradicalaire révèlent que l'extrait possède un grand pouvoir de piéger ce radical, avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 0.08 mg/g mais relativement faible à celui de quercétine.

Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur par la méthode de FRAP de l'extrait méthanolique est de l'ordre de 0.1 mg/ml, avec une absorbance de 1.01 nm.

*Rosmarinus officinalis* est une plante riche en composés phénoliques notamment en flavonoïdes, et présente une bonne activité antioxydante.

**Mots clés :** *Rosmarinus Officinalis*, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, FRAP

## Abstract

*Rosmarinus Officinalis* is a medicinal plant belonging to the Lamiaceae family, used in traditional medicine for its various therapeutic effects.

The aerial part of the plant was macerated in methanol to extract the secondary metabolites. The results of phytochemical screening revealed the richness of *Rosmarinus Officinalis* as secondary metabolites.

Total polyphenol content was determined using Folin-Ciocalteu reagent ( $248.55 \pm 26.71$ ) mg EAG / g MS. Flavonoids were evaluated by AlCl<sub>3</sub> aluminum chloride method, the content is estimated at ( $372.55 \pm 10.27$ ) mg QE / g MS.

The results obtained for the antiradicals activity reveal that the extract has a great power to trap this radical, with an IC<sub>50</sub> of the order of 0.08 mg / g but relatively low that of quercetin.

The results of the evaluation of the reducing power by the FRAP method of the methanolic extract is of the order of 0.1 mg / ml, with an absorbance of 1.01 nm.

*Rosmarinus officinalis* is a plant rich in phenolic compounds including flavonoids, and has a good antioxidant activity.

**Key words :** *Rosmarinus Officinalis*, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, FRAP

## ملخص:

إكليل الجبل هو نبات طبي ينتمي إلى العائلة الشفوية، ويستخدم في الطب التقليدي لتأثيراته العلاجية المختلفة. تم تهوية الجزء العلوي من النبات في ميثانول لاستخلاص الأيض الثانوي. كشفت نتائج الفحص الكيميائي النباتي عنى إكليل الجبل بالأبيض الثانوي. تم تحديد محتوى متعدد الفينول الكلي باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu (248.55 ± 26.71) mg EAG/g. تم تقييم الفلافونيدات بواسطة طريقة كلوريد الألمنيوم  $AlCl_3$ ، ويقدر المحتوى بـ (10.27 ± 372.55) mg QE/g MS. النتائج التي تم الحصول عليها لنشاط المضادات الحيوية تكشف أن المستخلص له قدرة كبيرة على هذا النشاط، مع  $IC_{50}$  بترتيب 0.08 mg/g ولكنه منخفض نسبيا من الكيرسيتين.

نتائج تقييم الطاقة المختزلة بواسطة طريقة FRAP لمستخلص الميثانول هي من 0.1 mg/ml، مع امتصاص 1.01 نانومتر.

إكليل الجبل هو نبات غني بالمركبات الفينولية بما في ذلك مركبات الفلافونويد، ولديه نشاط جيد مضاد للأكسدة.

**الكلمات المفتاحية:** إكليل الجبل، متعدد الفينول، الفلافونويد، نشاط مضاد للأكسدة.

## Références bibliographiques

- [1] : Maurice N. (1997). L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI<sup>e</sup> siècle. Ed. Lavoisier, Paris, p. 12-14.
- [2] : Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. and Pinkas M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung.* 46: 1086-1089.
- [3] : Muthu C., Ayyanar M., Raja N., and Ignacimuthu S. (2006). Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2:43 doi : 10.1186/1746-4269-2-43
- [4] : Hanifi N. (1991). Importance des ressources phylogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. Publication d'actes éditions : 47-49.
- [5] : Mouas Y., Benrebiha F-Z., Chaouia C. (2017). Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *Rosmarinus Officinalis L*, *Revue Agrobiologia* 7(1) : 363-370
- [6] : Atik bekkara F., Bousmaha L., Taleb bendiab S-A., Boti J.B., Casanova J. (2007). Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis L* poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé.* 7: 6-11.
- [7] : Paris R.R., Moyse H. (1976). Collection de précis de pharmacie sous la direction de M.-M. Janot : Matière médicale, 2<sup>ème</sup> édition tomes 1, 2 et 3, Ed. Masson, (et 1667, 1971).
- [8] : Sébastien C, LES PLANTES MEDICINALES A TRAVERS L'HISTOIRE, UL 701.
- [9] : Iserin P. Larousse Encyclopédie des plantes médicinales. Ed Larousse, pp10, consulté le 18 Avril 2018.
- [10] : Wichtl M., Anton R.(2003). Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, 2<sup>ème</sup> édition, Ed. TEC & DOC.
- [11] : Prescrire. Bien utiliser les plantes en situations de soins, numéro spécial été.(2007). T. 27, n° 286

- [12] : Jorite S. (2015). La phytothérapie, une discipline entre passé et futur. De l'herboristerie aux pharmacies dédiées au naturel. Sciences pharmaceutiques. <dumas-01188820>
- [13] : Mahmoudi Y. (1992). La thérapeutique par les plantes : Ed Palais du livre .Blida (128p). Roux, D., 2005. Les nouvelles plantes qui soignent : Edition Alpen, Paris (21p)
- [14] : Farnsworth N-R., Akerele O., Bingel A-S., Soejarto D-D., Guo Z. (1986). Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé, 64 (2) : 159-164
- [15] : Sanogo R. (2006). Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Faculté de médecine de pharmacie et d'Odonto-Stomatologie, Université de Bamako.
- [16] : Elqaj M., Ahami A., Belghyti D. (2007). La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques", (Maroc) : 22
- [17] : Gurib-Fakim A. (2006). Medicinal plants : Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine. 27: 1-93.
- [18] : Pelt J-M. (1980). Les drogues. Leur histoire, leurs effets, Ed. Doin
- [19] : Iserin P., Masson M., Restellini J-P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A. (2001). Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.
- [20] : Sabrina K. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Sciences du Vivant [q-bio]. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, Français. <tel-00006170>
- [21] : Macheix J-J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique, pp 3
- [22] : RAMAWAT K-J., MERILLON J-M. (2008). Bioactives molecules and medicinal plant. Edition Springer, Berlin Heidelberg. Verlag, ISBN 978-3-540-74603-4.

- [23] : Jean-Jacques Macheix. (1996). Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XXème siècle?, Acta Botanica Gallica, 143:6, 473-479, DOI : 10.1080/12538078.1996.10515344
- [24] : SARNI-MANCHADO P., VERONIQUE C. (2006). Les polyphénols en agroalimentaires. Collection sciences et techniques agroalimentaires, édition TEC et DOC, Paris (France) : 398
- [25] : Lugasi A., Hovari J., Sagi K-V., Biro L. (2003). The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. Acta. Biol. Szegedientis, 1-4: 119-125.
- [26] : Salunkhe D-K., Chavan J-K., Kadam S-S. (1990). Nutritional consequences of dietary tannins : consequences and remedies. Boca Raton. Florida : CRC press. Pp 113-146
- [27] : Bruneton J. (1999). Pharmacognosie. Phytochimie Plantes médicinales, 3ème Ed Techniques et documentations. Paris. Pp : 227-310-312-313-314.494.
- [28] : PANDEY KB et RIZVI SI. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Vol. 2 (5) : 270 – 278.
- [29] : Shahidi F., Naczki M. Food phenolics : sources, chemistry, effects, applications, 2<sup>nd</sup> Edition. (CRC-press :). A <<http://www.informaworld.com/978-1-58716-138-4>>
- [30] : Popovici C., Saykova I., Tylkowsk B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de génie industriel. 4: 25-39.
- [31] : Nordkvist E., Salomonsson, A-C. & Aman P. (1984). Distribution of insoluble bound phenolic acids in barley grain. Journal of the science of food and agriculture 35, 657-661
- [32] : Bouakaz I. (2006). .Etude phytochimique de la plante Genista Microcephala. Mémoire de magister. Batna.
- [33] : Loto C- A. (2011). Inhibition effect of tea extract on the corrosion of mild steel in dilute sulphuric acid. J.Mater. Environ. Sci. 2 (4) 335-344
- [34] : YAO L-H., JIANG Y-M., SHI J., TOMAS-BARBERAN F-A., DATTA N., SINGANUSONG R., Chen S-S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. Plant. Food Hum. Nutr. Vol (59) : 113-122.

- [35] : Tapas A-R., Sakarkar D-M. & Kakde R-B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals : A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (3), 1089-1099.
- [36] : COLLIN S., CROUZET J. (2011). Polyphénols et procédés. En France par EMP. S.S.A., Paris, p 5.
- [37] : Alignan M. (2006). Thèse de doctorat : Phoma du Tournesol : déterminisme de la tolérance de l'hôte à la maladie, Toulouse.
- [38] : Catier O., Roux D. (2007). Botanique, pharmacognosie, phytothérapie : Cahiers du préparateur en pharmacie. 3eme ed. France : Walters Kluwer
- [39] : Monteiro M., Farah A., Perrone D., Trugo L-C., Donangelo C. (2007). Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *Journal of Nutrition* 137: 2196-2201.
- [40] : LEINMÜLLER E., STEINGASS H., MENKE KH. (1991). Tannins in feeds for ruminants. II Effects on rumen metabolism in vitro. *Übersichten zur Tierernährung*. Vol. (19) :45-70.
- [41] : McLeod M-N. (1974). Plant tannins, Their role in forage quality. *Nutr. Abstr. Rev.*, 44, 803-815.
- [42] : Nagy M., Kosa M., Theliander H., and Ragauskas A-1. (2010). Characterization of CO<sub>2</sub> precipitated Kraft lignin to promote its utilization. *Green Chemistry*, 12(1), 31- 34.)
- [43] : WICHTL M., ANTON R. (2009). Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Édition LAVOISIR, Paris : 38, 41.
- [44] : Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4eme ed. Paris : Tec & Doc Lavoisier
- [45] : Bohlmann, J., and Keeling C-I. (2008). Terpenoid biomaterials. *Plant J.* 54, 656-669.
- [46] Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115
- [47] Sergent O., Griffon B., Cillard P., Cillard J. (2000). Alcool et stress oxydatif. *Pathol. Biol.* 49: 689-695

- [48] Pelletier E., Campbell P., Denizeau F. (2004).Écotoxicologie Moléculaire : Principes Fondamentaux et Perspectives de développement ; Bibliothèque nationale du Québec ; Canada p : 182
- [49] Reuter S. (2010). Free Rad Biol Med, 49, 1603-161
- [50]: Magder S. (2006). Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life? Critical Care Med Journal, Vol 10, pp. 208-216
- [51] : Bennefont R., Therond P., Delattre J. (2003). Radicaux libres et antioxydants.Ed : Flammarion Médecine-Sciences ,59-81
- [52] : Chaabi, M. (2008). Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines, diplôme de doctorat en Pharmacognosie. p168, 169
- [53] : <https://www.la-famille-des-radicauxlibres.html>
- [54]: Babior BM., Woodman RC. (1990). Chronic granulom atous disease. Semin hematol ; 27: 247-59
- [55]: Fridovich I. (1989). Super oxide dismutases an adaptation to a param agnetic gas.J Biol Chem; 264: 7761-4.
- [56]: Maly F-E. (1990). The B lymphocyte: anewly recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential.Free Radic Res Commun; 8: 143-8
- [57]: Stief T-W. (2003). the physiology and pharmacology of singlet oxygen. Med Hypoth .Vol 60:567–572.
- [58] : Jadot G. (1994). Antioxydants et vieillissement, Edition John Libbey Eurotext, p35
- [59] : Karp G. (2010). Biologie cellulaire et moléculaire : Concepts and experiments. Edition De Boeck Supérieur, p 35.
- [60]: Kruidenier L., Verspaget H-W. (2002). Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease -radicals or ridiculous? Alimentatry Pharmacology and Therapeutics, 16, 1997-(2015)

- [61]: Iubec G. (1996). The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. *Journal of investigative medicine*, 44, 324-346
- [62] : Moussard C. (2006). *Biochimie structurale et métabolique*, Edition De Boeck Supérieur, p 336.
- [63] : De Robertis E-D-P., & De Robertis E-M-F. (1983). *Biologie cellulaire et moléculaire*. Presses Université Laval, p 287.
- [64] : Berg L. (2016). «Déficits de la chaîne respiratoire mitochondriale avec instabilité de l'ADN mitochondrial : Identification de nouveaux gènes et mécanismes.» thèse de doctorat ; faculté de médecine Nice France
- [65] : Lacolley P. (2007). *Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux*. Edition John Libbey Eurotext, p 312
- [66] : Hadj Salem J. (2009). *Extraction, Identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de Nitraria retusa et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique*. Thèse de Doctorat : Université de LORRAINE
- [67] : Jacob L. (2007). *L'insuffisance rénale aiguë* Edition Springer, p 88
- [68] : Pincemail J., Defraigne J-O. (2003). Le Coenzyme Q<sub>10</sub> ou ubiquinone : un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Cœur, Poumons* 18 (2), 55-60.
- [69] : Bonnet C., Alamigeon F., Micheels P. (2010). *Guide complet des soins esthétiques : du côté de ma vie*. Edition Eyrolles, p 14
- [70]: Harris A-L. (2002). Hypoxia a key regulatory factor in tumor growth. *Nature Reviews Cancer*. Vol 2(1), pp. 38-47
- [71] : Favier A. (1997). Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie Médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Annales de Biologie Clinique*.55(1) :9-16.
- [72]: Shimizu H. (2004). Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke*, 35 (9): 2072-2077
- [73]: Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, 52(8) :253-265
- [74] : Viot S. (2004). *Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire. Etude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R120G de l'αβ-cristalline*. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon1

- [75]: Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2001). Antioxidants in food, Practical applications. Woodhead Publishing Linn
- [76]: Cano N., Bamoud D., Schneider S., Vasson M-P., Hasselmann M., Leverve X. (2007) traité de nutrition artificielle de l'adulte. Paris : Springer Verlag, Traité de nutrition artificielle de l'adulte. 1189 pp.
- [77]: Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Lüthje S. (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*, 3, 173-193.
- [78]: Landis G.N., Tower J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.* 126: 365–379.
- [79]: Sorg O. (2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?; *327(7):649-62*
- [80]: Marfac M. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes : Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides thèse de doctorat, Université de Limoges
- [81]: Piquet M., Hébuterne X. (2007). Nutrition en pathologie digestive. *Edition Wolters Kluwer France*, p 93.
- [82]: Boldyrev A. (1993). Does carnosine possess direct antioxidant activity? *Int. J. Biochem.* 25(8), 1101-1107.
- [83]: Ames B., Shigenaga K., Hagen, T. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7915-7922.
- [84]: Packer L., Kraemer K., Rimbach G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 17(10), 888-895.
- [85]: Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A., Glazer A., Ames B. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235 (4792), 1043-1046
- [86]: Garait B. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) Ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin. Thèse de doctorat en biologie cellulaire. Université Joseph Fourier. France.
- [87]: LHUILLIER A. (2007). Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia hook*, *F ex Oliver*. *Agauria polyphylla baker* (ERICACEAE). *Tambourissa trichophylla baker* (monimiaceae) et *embelia concinna baker* (myrsinaceae). Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat. Ecole doctorat de Toulouse.
- [88]: BOULDJADJ R. (2009). Etude de l'effet antidiabétique et antioxydant de l'extrait aqueux lyophilisé d'*Artemisia herba alba* Asso. Université de Constantine p

- [89]: Wang X., Quinn, P. (2006). The structure and phase behaviour of  $\alpha$ -tocopherol-rich domains in 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine. *Biochimie* 88, 1883-1888.
- [90]: Annaházi A., Mracskó E., Süle Z., Karg, E., Penke B., Bari F., Farkas E. (2007). Pre-treatment and post-treatment with  $\alpha$ -tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage in experimental cerebral hypoperfusion. *European Journal of Pharmacology* 571, 120–128.
- [91]: DUTTA-ROY A. (1999). Molecular Mechanism of Cellular Uptake and Intracellular Translocation of  $\alpha$ -Tocopherol: Role of Tocopherol-binding Proteins. *Food and Chemical Toxicology* 37, 967-971.
- [92]: Lecerf J-M., Luc G. & Fruchart J-C. (1994). Vitamine E, antioxydants et athérosclérose, *Rev. Mid. Interne* 15, 641-649.
- [93]: Herrera E., Barbas C. (2001). Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J. Physiol. Biochem.* 57, 43-56.
- [94]: Will J-C., Byers T. (1996). Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin A, C and E? *New Rev.* 54:193-202.
- [95]: Center S., Randolph J. (2004). Influence of SAME on erythrocytes and liver tissue in healthy cats (abstract). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Vol 14, p 357
- [96]: Fusco D., Colloca G, Lo Monaco M., Cesari M. (2007). Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clinical Interventions in Aging journal*, Vol 2(3), pp. 377-87
- [97]: Ghedira K. (2005). Flavonoids: structure, biological activities, prophylactic function and Therapeutic uses. *Phytothérapie*, 3(4), therapeutic uses. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169
- [98] : Guignard J. (2001). *Botanique systématique moléculaire*, Masson, Paris, 221-225.
- [99] : Bonniere G., Douin R.(1992). *Labiataea*, 5, 396
- [100] : Botineau M. (2010). « *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs* » ; Edition Lavoisier ; pp1025-1026,1028.
- [101] : Fuinel G. (2002). « *Plantes de vie. Du corps et de l'esprit* ; Edition Fernand Lanore » ; pp32-34.
- [102] : Auguste S. (1862). *Dictionnaire d'étymologie française d'après les résultats de la science moderne*.
- [103]: Helmut G. (1996). *Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen*.

- [104] : Rameau J., Mansion D., Dumé G. (2008). Flore forestière française : Région méditerranéenne.
- [105] : Huguette M. (2008). La route des épices.
- [106] : O.P.U.NT.WS.Benston, Fleurs algériennes.P54
- [107] : QUEZEL P., SANTA S. (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, CNRS, Paris : pp 600.
- [108] : Zermane A. (2010). « Etude de l'extraction supercritique Application aux systèmes Agroalimentaires » ; thèse de doctorat, université de Mentouri ; Constantine
- .
- [109] : Zeghad N ; « Etude du contenu polyphénoliques de deux plantes médicinales D'intérêt économique (Thymus vulgarise, Rosmarinus officinalis) et évaluation de leur Activité antibactérienne » ; thèse de magistère thèse de magistère, université de Mentouri ; Constantine
- [110] : Makhloof A., « Etude des activités antimicrobienne et antioxydants de deux Plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (matri caria : Pubescents (des.) Et Rosmarinus officinalis l) et leur impact sur la conservation des Dattes et du beurre cru » ; thèse de doctorat ; université d'Boubaker belkaid.
- [111] : Rameau J-C., Dumé G. (2008). « Flore forestière française : Région méditerranéenne » Edition Forêt privée française ; pp 897.
- [112] : Eloutassi N. (2004). « Elaboration de procédés Biotechnologiques pour la valorisation Du romarin (Rosmarinus officinalis) marocain » ; thèse de doctorat, université de Sidi Mohamed Ben Abdellah ; Fès.
- [114] : Iserin P. (2001). Larousse Encyclopédie des plantes médicinales. Ed Larousse, pp10, 335.
- [115] : BOUKHELFA T. (1991). .Apport du couplage CPG/SM ET CPG/TR.Techniques des analyses des mélanges naturels complexe exemple de l'huile essentielle de romarin.U.S.T.B.H.Alger.126p
- [116] : Perrot E., Paris R. (1971). Les plantes médicinales. Presses universitaires de France. Paris, p245
- [117] : Akroum S. (2006). Étude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de Rosmarinus officinalis et Vicia faba L

- [118]: Rao L., Meenakshi S., Raghavan B., Abraham K.O. (1998). Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.): Impact of drying on its flavor quality. *Journal of Food quality* v(21), issue 2 : 107-115p
- [119]: Akroum S. (2008). Inhibition de quelques bactéries pathogènes par les extraits éthanoliques de *Rosmarinus Officinalis*
- [120]: Ibañez E., Kubátová A., Señoráns F. J., Cavero S., Reglero G. et Hawthorne S. B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary Plants. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, 51 (2): 375-382
- [121]: Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto K., Yaghi A. (1994). Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*, 37 (5): 1463-1466.
- [122]: Yang R., Lin S., Kuo G. (2008). Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species. *Asia of pacific journal of clinical nutrition*. 17 (S1): 275-279
- [123]. Hui Y (2010), *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors*.
- [124]: Pixabay. [En ligne] disponible sur : « <http://pixabay.com/en/rosemary-flowerprovence-violet-283098/>> Consulté le (22 Juin 2018)
- [125]: Bousbia N. (2011). « Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires » ; thèse de doctorat ; université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique.
- [126]: Albert Y-L., Foste S. (1996). *Encyclopedia of common Naturel Ingredients used In Foods, Drugs, and cosmetics*, 2ème édition, Awreley-interscience publication, P445.
- [127]: Zoubeydi C. (2004). *Etude des antioxydants dans le Rosmarinus officinalis .Labiatea* » ; thèse de magistère ; université de Ouargla
- [128]: Wilson R. (2002). « *Aromatherapy: Essential Oils for Vibrant Health and Beauty*»; Edition Penguin; pp 116
- [129]: Lagnika. (2005). *Etude phytochimique et activité antipaludique de substances naturelles issues de plantes Béninoises*. Thèse de Doctorat Université de Louis Pasteur de Strasbourg/Université d'Abomey-calavi, Bénin

- [130] : Etude Rwandaises. (1977). Médecine traditionnelle et pharmacopée rwandaise, Butare, UNR, 19 pages.
- [131] : Bruneton J. (1993). « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ». 2eme ed ; université de paris-sud, France, 389-617.
- [132] : Dohou N., Yamni K., Gmira N., Idrissi Hassani L.M. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine. Thymelealythroïdes, Bull. Soc. Bordeaux. P142, 61-78.
- [133] : Rizk A-M. (1982). Constituents of plant growing in Qatar, Fitoterapia, 52 (2), 35-42.
- [134] : Yves-Alain B., Janat A., Mamyrbekova B., Boua B., Fézan H. Trabi., Ehouan E. (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Bail). Herend. And Zaruchi (Caesalpinaceae). Sciences and nature Vol. 4 N°2 : 217-225
- [135] : Ribéreau-Gayon J et Peynaud E. (1968). Les composés phénoliques des végétaux, Traité d'œnologie, Paris : Édition Dunod, 254 p.
- [136] : Ciulel I. (1982). Methodology for analysis of vegetable drugs. ED I. P.A.C. Romania.
- [137] : Hussain I ; Ur Rehman Khattak M ; Ullah R ; Muhammad Z ; Khan N ; Khan F-A ; Ullah Z and Haider S. (2011). Phytochemicals screening and antimicrobial activities of selected medicinal plants of Khyberpakhtunkhwa Pakistan African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 5(6), pp. 746-750.
- [138] : Mahmoudil S., Khali M., Mahmoudi N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Sinara Scolymus* L). p36
- [139] : Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. (1999). The determination of Flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, food chemistry, 64 (4) : 555-559
- [140] : Brand-Williams W., Cuvilier M. E., Bersaet C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft and technologie, Vol. 28, pp .25-30
- [141] : Amarowicz R., Estrella I., Hernandez T., Robredo S., Troszynska A., Kosinska A., Pegg R. (2010). Free radicals-scavenging capacity : antioxidant activity and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*) ; Food Chemistry 121 ; Ed : ELSEVIER.705-711

[142]: Singleton V-L et Rossi J-A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. American Journal of Technology and Viticulture. 16, 144-153.

[143]: Fadili K., Amalich S., Soro KN., Bouachrine M., Mahjoubi M., El hilali F., Zair T. (2015). Polyphenols content and antioxidant of two species from Moroccan high Atlas : *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides*. Journal of innovation and scientific research, Vol.17, pp.24-33

[144]: Stephanovits Banyai E., Tulok M-H., Hegedus A., Renner C., Szololosi Varga L. (2003). Antioxydant effect of various Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) clones, Vol 47 (1-4) : 111-113.

[145]: Yesil-Celiktas O., Girgin G., Orhan H., Wichers H-J., Bedir E. and Vardar-Sukan F. (2007b). Screening of free radical scavenging capacity and antioxydant activities of *Rosmarinus Officinalis* extract with Focus on location and harvesting times. European food research and technology 224 : 443-51

[146]: Tsai P., Tsai T., Ho S. (2007). In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. Food Chem 105, 311-316

[147]: Podsedek, A. (2007). Natural antioxydants and antioxydant capacity of Brassica vegetables : A review. LWT. 40 :1-11.

[148]: Fukushima Y., T- Ohie Y., Yonekawa K., Yonemoto H., Aizawa Y., Mori M., Watanabe M., Takeuchi M., Hasegawa C., Taguchi Kondo K. (2009). "Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population." Journal of Agricultural and Food Chemistry 57(4) : 1253-1259.

[149]: Majhenic L., kergel M-S., et Knez Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chemistry. 104, 1258–1268.

[150]: De Pooter H-L. et Schamp N. (1986). Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In : Progress in essential oil research. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin. 139-150p.

[151]: Hua L., Xiaoyu W., Peihong L., Hua W. (2008). Comparative study of antioxidant activity of grape (*Vitis Vinifera*), seed powder assessed by different methods. Journal of food drug analysis, 16(6), 67-73

- [152] : Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karay- Bouaroui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara Cardunculus* L. Organs, and their biological activities. *C. R. biologies.* 331 : 372-379
- [153] Benzie I.F.F., Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a mesure of « antioxidant power » the FRAP essay. *Analytical biochemistry.* 239, 70-76
- [154] : Chung Y-C., Chang C-T., Chao W-W., Lin C-F., et Chou S-T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50, 2454–2458.



## ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DE ROMARIN (ROSMARINUS OFFICINALIS)

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée.

### Résumé

*Rosmarinus officinalis* plante médicinale appartenant à la famille des *lamiacée*, utilisée en médecine traditionnelle pour ses divers effets thérapeutiques.

La partie aérienne de la plante a été soumise à une macération dans le méthanol afin d'extraire les métabolites secondaires.

Les résultats de criblages phytochimique ont mis en évidence la richesse de *Rosmarinus officinalis* en métabolites secondaires.

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de folin ciocalteu, ( $248.55 \pm 26.71$ ) mg EAG/g de MS. Les flavonoïdes ont été évalués par la méthode de chlorure d'aluminium  $AlCl_3$ , la teneur est estimée à ( $372.55 \pm 10.27$ ) mg QE/g de MS.

Les résultats obtenus pour l'activité antiradicalaire révèlent que l'extrait possède un grand pouvoir de piéger ce radical avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de 0.08 mg/g mais relativement faible à celui de quercétine.

Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur par la méthode de FRAP de l'extrait méthanolique est de l'ordre de 0.1 mg/ml avec une absorbance de 1.01 nm.

*Rosmarinus officinalis* est une plante riche en composés phénoliques notamment en flavonoïdes et présente une bonne activité antioxydante.

**Mots clefs :** *Rosmarinus officinalis*, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante , FRAP.

**Laboratoire de recherche :** laboratoire de biochimie RDC

Jury d'évaluation :

**Président :** Kitouni Rachid Maitre-assistant classe A - Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

**Encadreur :** Nour Bouanimmba Maitre-assistant classe A - Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

**Examineur :** Harouni Soufiene Maitre-assistant classe A - Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

**Date de soutenance :** 01/07/2018

