

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologique

Département : Biologie

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

**L'EVALUATION DE L'ACTIVITE PRO-OXYDANTE D'UNE PLANTE MEDICINALE
DE LA REGION DE GUELMA**

Présenté par : AKOTO Dickson

TOUMINTA Kadidia

IDRISSA Sadou Boubacar

Devant le jury composé de :

Président : M. Hemici AHMED	MCB	Université 8 Mai 1945 Guelma
Examinatrice : Mme. Asma BRAIK SERIDI	MCB	Université 8 Mai 1945 Guelma
Encadrante : Mme. Nadia H. BOUSSENANE	MCB	Université 8 Mai 1945 Guelma

Juin 2022

Remerciements

Nos vifs remerciements vont à nos honorable membres du jury :

*Monsieur **Hemici Ahmed** : Président du Jury*

*Madame **Asma Braik S.** : Examinatrice*

Pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant de procéder à l'examination de notre travail et de l'enrichir par leurs valeureuses observations et suggestions.

*Nous remercions Monsieur **Mehdi** et Madame **Ratiba** qui nous ont aidés et guidés dans la réalisation de notre travail.*

*Nous adressons nos sincères remerciement à notre encadrante Madame **Nadia H. Bousenane** pour sa patience, ses judicieux conseils et surtout l'orientation qu'elle nous a donné durant toute la période de ce travail.*

Dédicace

Je dédie ce travail à

Mon père, M. Malamine Touminta

Ma mère, Mme Assitan Dramé

Mon grand frère, M. Boubacar Makan Diakité

Kadidia.

Nous dédions ce travail à nos familles et amis respectives.

Dickson et Boubacar.

Résumé

Dans la présente étude, nous avons évalué l'effet pro-oxydant de la plante *Rosmarinus officinalis* de la région de Guelma en Algérie chez le rat wistar, *in vitro*. Tout d'abord cette plante a été soumise à un screening phytochimique pour mettre en évidence la composition qualitative de la plante en métabolites secondaires. Cette analyse montre la présence des alcaloïdes, flavonoïdes, saponosides, tanins, mucilages, composés réducteurs oses et holosides.

La préparation de l'extrait brute a été faite par macération hydro-éthanolique (7 :3), Le rendement est de l'ordre de 7,84 %. Par la suite, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince (CCM) avec deux systèmes de solvants différents. Le premier système est constitué des solvants (hexane/ acétate d'éthyle/ éthanol/ n-butanol/ chloroforme) 2 :8 :1.5 :3 :20 par volume et le deuxième système constitué des solvants (éthanol / H₂O) 7 :3 par volume. Grâce à cette CCM, nous avons pu observer plusieurs couleurs distinctes représentant des métabolites secondaires.

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-ciocalteu a montré que l'extrait hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis* est très riche en composés phénoliques. Le dosage des flavonoïdes totaux par la méthode de trichlorure d'aluminium a montré aussi l'extrait hydro-éthanolique du romarin est très riche en composés flavonoïdes.

La détermination de l'activité antiradicalaire (radical DPPH) en utilisant l'acide ascorbique comme standard montre que l'extrait hydro-éthanolique du Romarin présente un pouvoir antioxydant important. Les valeurs des concentrations inhibitrices à 50 % ont été déterminé graphiquement, elles sont égales à 223 µg/ml et 75µg/ml pour l'extrait hydro-éthanolique et l'acide ascorbique respectivement.

L'évaluation *in vitro* de l'activité pro-oxydante a été réalisé par la mesure des variations du marqueur de la peroxydation lipidique le Malon dialdéhyde cytosolique (MDA), du glutathion réduit (GSH) et de la catalase vis-à- vis des différentes concentrations de l'extrait hydro-éthanolique du romarin.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis* – Rat wistar- effet prooxydant- MDA- GSH – catalase

Summary

In the present study, we evaluated the pro-oxidant effect of the *Rosmarinus officinalis* plant from the Guelma region in Algeria in wistar rats, *in vitro*. First of all, this plant was subjected to a phytochemical screening to highlight the qualitative composition of the plant in secondary metabolites. This analysis shows the presence of alkaloids, flavonoids, saponosides, tannins, mucilages, ose and holoside reducing compounds.

The preparation of the crude extract was made by hydro-ethanolic maceration (7:3), the yield is around 7.84%. Subsequently, we performed thin layer chromatography (TLC) with two different solvent systems. The first system consists of solvents (hexane / ethyl acetate / ethanol / n-butanol / chloroform) 2:8:1.5:3:20 by volume and the second system consists of solvents (ethanol / H₂O) 7:3 by volume. Thanks to this TLC, we were able to observe several distinct colors representing secondary metabolites.

The dosage of total polyphenols by the Folin-ciocalteu method showed that the hydro-ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* is very rich in phenolic compounds.

The determination of total flavonoids by the aluminum trichloride method also showed the hydro-ethanolic extract of rosemary is very rich in flavonoid compounds.

The determination of the antiradical activity (radical DPPH) using ascorbic acid as a standard show that the hydro-ethanolic extract of Rosemary has significant antioxidant power. The values of the 50% inhibitory concentrations were determined graphically, they are equal to 223 µg/ml and 75 µg/ml for the hydro-ethanolic extract and the ascorbic acid respectively.

The *in vitro* evaluation of the pro-oxidant activity was carried out by measuring the variations of the lipid peroxidation marker cytosolic Malon dialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) and catalase with respect to different concentrations of the hydro-ethanolic extract of rosemary.

Key words: *Rosmarinus officinalis* – Wistar rat- pro-oxidant effect- MDA- GSH – catalase

ملخص

في هذه الدراسة ، قمنا بتقييم التأثير المؤيد للأوكسدة لنبات *Rosmarinus officinalis* من منطقة قالمة في الجزائر في جرد ويستار ، في المختبر. بادئ ذي بدء ، تم إخضاع هذا النبات لفحص كيميائي نباتي لإبراز التركيب النوعي للنبات في المستقلبات الثانوية. يوضح هذا التحليل وجود قلويدات ، مركبات الفلافونويد ، سابونوسيدات ، التانينات ، الصمغ ، الأوز والهولوسيد المختزل. تحضير المستخلص الخام تم بواسطة النقع المائي الإيثانولي (7:3) ، المحصول حوالي 7.84٪. بعد ذلك ، أجرينا كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) بنظامين مختلفين من المذيبات. يتكون النظام الأول من المذيبات (الهكسان / أسيتات الإيثيل / الإيثانول / n-بيوتانول / الكلوروفورم) 2:8:1.5:3:20 بالحجم ويتكون النظام الثاني من المذيبات (الإيثانول / H₂O) 7:3 بالحجم. بفضل TLC ، تمكنا من ملاحظة عدة ألوان مميزة تمثل نواتج الأيض الثانوية. أظهرت جرعة البوليفينول الكلي بطريقة Folin-ciocalteu أن المستخلص المائي الإيثانولي لـ *Rosmarinus officinalis* غني جدًا بالمركبات الفينولية. كما أظهر تحديد إجمالي مركبات الفلافونويد بطريقة ثلاثي كلوريد الألومنيوم أن المستخلص الإيثانولي المائي لإكليل الجبل غني جدًا بمركبات الفلافونويد. يوضح تحديد النشاط المضاد للجراثيم (DPPH) باستخدام حمض الأسكوربيك كمعيار أن المستخلص المائي الإيثانولي من إكليل الجبل له قوة كبيرة كمضاد للأوكسدة. تم تحديد قيم التراكيز المثبطة بنسبة 50٪ بيانياً ؛ وهي تساوي 223 ميكروغرام / مل و 75 ميكروغرام / مل للمستخلص المائي الإيثانولي وحمض الأسكوربيك على التوالي. تم إجراء التقييم في المختبر للنشاط المؤيد للأوكسدة عن طريق قياس الاختلافات في مؤشر بيروكسيد الدهون مالون ديالدهيد (MDA) ، والجلوتاثيون المخفض (GSH) والكتلاز فيما يتعلق بتركيزات مختلفة من مستخلص إكليل الجبل المائي الإيثانولي.

Listes des figures

FIGURE 1: <i>Rosmarinus officinalis</i> (variété cultivée).....	4
FIGURE 2: fleurs et feuilles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	4
FIGURE 3 : aspects morphologiques du romarin	5
FIGURE 4 : Acide rosmarinique.....	8
FIGURE 5: Acide carnosique	9
FIGURE 6: Carnnosol	9
FIGURE 7: α - pinène.....	10
FIGURE 8: 1,8- cinéole.....	10
FIGURE 9: Camphre.....	10
FIGURE 10: Le stress oxydatif	13
FIGURE 11: formation des radicaux libres	14
FIGURE 12: sources des radicaux libres	15
FIGURE 13: espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote.	17
FIGURE 14: représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	19
FIGURE 15: système de défense des antioxydants au niveau de la cellule	20
FIGURE 16: la génération et disposition de l'anion peroxyde et du peroxyde d'hydrogène	21
FIGURE 17: système en chaîne des réactions antioxydants	22
FIGURE 18: récapitulatif des défenses antioxydantes	25
FIGURE 19: les principales modifications biochimiques et métaboliques cellulaires conséquence d'un stress oxydant, selon.....	26
FIGURE 20: peroxydation lipidique.	27
FIGURE 21: les réactions d'oxydations des protéines	28
FIGURE 22: lésion de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	29
FIGURE 23: rôle pathologique des radicaux libres.....	30
FIGURE 24: Induction de la cancérogenèse via l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B induite par le stress oxydatif	31
FIGURE 25: relation entre hyperglycémie et stress oxydant	32
FIGURE 26: la poudre des feuilles du romarin après broyage	34
FIGURE 27: la macération du romarin dans des bocaux opaques	35
FIGURE 28: la filtration de l'extrait du romarin après macération.....	35
FIGURE 29: l'évaporation du solvant à l'aide de rotavapeur	36
FIGURE 30: lyophilisateur	36
FIGURE 31: réaction d'antioxydant avec un radical de DPPH	41
FIGURE 32: un rat Wistar	42
FIGURE 33: extraction du foie de souris	43
FIGURE 34: l'extrait hydro-éthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	47
FIGURE 35: les résultats de Chromatogramme photographié CCM sous lampe UV à 365 nm dans les 2 systèmes.....	52
FIGURE 36: courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour les polyphénols totaux.....	53
FIGURE 37: courbe d'étalonnage de la quercétine	54
FIGURE 38: pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i> et de l'acide ascorbique	56

FIGURE 39: concentration d'inhibition de 50 % de l'acide ascorbique et l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i> par le DPPH	56
FIGURE 40: le milieu réactionnel pour la mesure du taux de MDA avant l'ajout de différentes concentrations de l'extrait de romarin	58
FIGURE 41: variation du taux de MDA moyenne dans le cytosol après l'ajout de différente concentration de l'extrait du romarin et ceux des blancs sans l'extrait du romarin.....	58
FIGURE 42: variation du taux de GSH moyenne dans le cytosol après l'ajout de différente concentration de l'extrait du romarin et ceux des blancs sans l'extrait du romarin.....	59
FIGURE 43: variation de l'activité de la catalase moyenne dans le cytosol après l'ajout des différentes concentrations de l'extrait.....	60
FIGURE 44: dosage des protéines totaux dans les fractions cytosolique des foies.....	60
FIGURE 45: courbe d'étalonnage de BSA pour le dosage des protéines totaux.	61

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition chimique de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> L de différents pays du bassin méditerranéen.....	10
Tableau 2: Les systèmes des solvants utilisés	39
Tableau 3: Résultats du screening phytochimique de l'extrait méthanolique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	49
Tableau 4: Les classes des composés phénoliques identifiés dans <i>Rosmarinus officinalis</i> selon	51

Listes des abréviations

° C :	Degré Celsius
µg :	Microgramme
µl :	Microlitre
¹O₂ :	Oxygène singulet
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
AGPI :	Acide gras polyinsaturé
ALAT :	Alanine aminotransférase
AlCl₃ :	Trichlorure d'aluminium
ANSM : des produits de santé	Agence Nationale de sécurité et du médicament et
ATP :	Adénosine triphosphate
AVC :	Accident vasculaire cérébrale
BSA :	Bovin sérum albumine
Cat :	Catalase
CCL₄ :	Tétrachlorure de carbone
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CI₅₀ :	Concentration d'inhibition à 50 %
Cl⁻ :	Ion chlorure
ClO⁻ :	Ion hypochlorite
Cu :	Cuivre
DO :	Densité optique
DPPH :	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl
DTNB :	5,5- dithiobis-2-acide nitrobenzoïque
EAG :	Equivalent d'acide gallique
EC :	Equivalent de catéchine
EQ :	Equivalent de quercétine

ERA :	Espèces réactives d'azote
ERO :	Espèces réactives d'oxygène
FADH₂ :	Flavine adénine dinucléotide
Fe²⁺ :	Ion de fer
FeCl₃ :	Trichlorure de fer
FMNH₂ :	Flavine mononucléotide réduit
GPx :	Glutathion peroxydase
GR :	Glutathion réductase
GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion oxydé
H⁺ :	Ion hydrogène
H₂O :	Eau
H₂O₂ :	Péroxyde d'hydrogène
H₂SO₄ :	Acide sulfurique
HCl :	Acide hydrochlorique
HE :	Huile essentielle
HOCl :	Acide hypochloreux
KCl :	Chlorure de potassium
LDL :	Lipoprotéine de basse densité
LOOH :	Hydropéroxyyl lipidique
M :	Molarité
MDA :	Malon dialdéhyde mitochondrial
mg :	Milligramme
Mn :	Manganèse
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NH₄OH :	Hydroxyde d'ammonium
nm :	Nanomètre
NO :	Monoxyde d'azote

O₂ :	Dioxygène
O₂^{•-} :	Anion superoxyde
O₂²⁻ :	Ion peroxyde
O₃ :	Ozone
OH[•] :	Radical hydroxyle
OH₂[•] :	Radical hydroperoxyl
ONOO⁻ :	Anion peroxydinitrite
pH :	Potentiel d'hydrogène
R_f :	Rapport frontale
RO⁻₂ :	Radical peroxyde
RO :	<i>Rosmarinus officinalis</i>
RO[•] :	Radical alcoxyde
Se :	Sélénium
SOD :	Superoxyde dismutase
t/mn :	Tour par minute
TBA :	Acide thiobarbiturique
TCA :	Acide trichloroacétique
TNB :	Acide thionitrobenzoïque
UI :	Unité internationale
UV :	Ultraviolet
V :	Volume
Zn :	Zinc

Sommaires

i

Remerciements.....	
Dédicace.....	
Résumé	
Listes de figures.....	
Liste des tableaux	
Listes des abréviations.....	
Sommaires	
Introduction	1
Chapitre 1: <i>Rosmarinus officinalis</i>	
1. <i>Rosmarinus officinalis</i>	3
1.1. Description de la plante.....	3
1.2. Classification de la plante	5
1.3. Utilisation de la plante.....	5
1.1.1. Usage thérapeutique	6
1.1.2. Usage culinaire	6
1.1.3. Usage phytosanitaire	6
1.1.4. Usage agroalimentaire.....	7
1.1.5. Usage cosmétique et parfum	7
1.2. Composition chimique (principaux phytoconstitués).....	7
1.3. Propriétés pharmacologiques.....	11
1.3.1. Activité antibactérienne.....	11
1.3.2. Activité antioxydantes	11
1.3.3. Activité anti-inflammatoire	11
1.3.4. Activité antiproliférative	12
1.3.5. Activité hépato-protectrice	12
Chapitre II: Le stress oxydatif	
1. Rappel sur le stress oxydatif.....	13
2. Les radicaux libres	14
2.1. Définition	14

2.2. Sources des radicaux libres.....	15
3.Espèce réactives d'oxygène (ERO).....	15
3.1. Les espèces radicalaires.....	16
3.1.1. Anion superoxyde (O ₂ • ⁻).....	16
3.1.2. Radical hydroxyle (HO•).....	16
3.1.3. Radical hydroperoxyde (HO ₂ •).....	16
3.2. Les espèces non radicalaires.....	16
3.2.1. Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	16
3.2.2. Peroxynitrite (ONOO ⁻).....	17
3.2.3. Oxygène singulet (1O ₂).....	17
3.3. Mécanisme de production des ERO dans l'organisme.....	18
3.4. Rôle physiologique des espèces réactives d'oxygène.....	19
4.Système de défense antioxydants.....	19
4.1. Système antioxydant enzymatique.....	20
4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD):.....	20
4.1.2. Catalase (CAT):.....	21
4.1.3. Glutathion peroxydase (GPX):.....	22
4.1.4. Glutathion réductase (GR).....	23
4.2. Système antioxydant non enzymatique.....	23
4.2.1. Glutathion réduit (GSH):.....	23
4.2.2. Vitamine C (acide ascorbique):.....	23
4.2.3. Vitamine E (tocophérol):.....	24
4.2.4. Oligoéléments.....	24
4.2.5. Polyphénols flavonoids.....	24
4.2.6. Ubiquinones et Cytochrome C.....	25
5.Stress oxydant et conséquences cellulaires.....	26
5.1. Peroxydation lipidique.....	26
5.2. Oxydation des protéines.....	28
5.3. Alteration de l'ADN.....	28
6. Stress Oxydatif et pathologies.....	29
6.1. Stress oxydatif et maladies cardiovasculaires : cas de l'arthrosclérose.....	30
6.2. Stress oxydatif et cancer.....	30
6.3. Stress oxydant et diabète.....	31

6.4. Stress oxydatif et inflammation	32
6.5. Stress oxydatif et maladies hépatiques	32
7.Élimination des ERO de l'organisme	33
Partie expérimentale	
Chapitre III : Matériels et Méthodes	
1.Matériels	34
1.1. Matériel végétal	34
2.Méthodes	34
2.1. Préparation des extraits hydro-éthanoliques	34
2.1.1. Broyage	34
2.1.2. Macération	35
2.1.3. Filtration.....	35
2.1.4. Evaporation	36
2.1.5. Lyophilisation	36
2.1.6. Détermination du rendement	37
3.Screening phytochimique	37
3.1. Alcaloïdes.....	37
3.2. Tanin	37
3.3. Flavonoïdes	37
3.4. Saponosides	38
3.5. Composés réducteurs.....	38
3.6. Oses et holosides	38
3.7. Mucilages.....	38
4.La chromatographie sur couche mince de l'extrait hydro-éthanolique	38
4.1. Principe	39
4.2. Mode opératoire	39
4.2.1. Dépôt	39
4.2.2. Révélation	40
5.Dosage calorimétrique.....	40
5.1. Dosage des polyphénols	40
5.2. Dosage des flavonoïdes	40
6.L'évaluation de l'activité anti-oxydante : Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)	41

7.	Matériel animal.....	42
7.1.	Extraction du foie des souris.....	42
8.	Préparation de la fraction cytosolique des cellules hépatiques.....	43
8.1.	Mesure du taux du Malon dialdéhyde mitochondrial (MDA).....	43
8.2.	Mesure de la concentration du Glutathion réduit cytosolique (GSH).....	44
8.3.	Dosage de l'activité enzymatique de la catalase	45
8.4.	Dosage des proteines cytosoliques par la méthode de Bradford	45
	Chapitre IV : Résultats et Discussion	47
	Conclusion.....	65
	Référence bibliographique.....	647

Introduction

Introduction

L'Homme, en émergeant sur terre, a dû, au fil du temps faire le choix ; ceux qui tuent, ceux qui nourrissent, ceux qui soignent. Ce résultat d'une alchimie merveilleuse entre le ciel et la terre a fait des plantes médicinales une vraie pharmacie du bon Dieu (**Caroline, 2018**).

Au XII^e siècle, la médecine était étudiée dans les facultés ou dans un cursus de plusieurs années. Avec les temps modernes, la perception de la médecine se modifia et l'ancienne phytothérapie recula devant une nouvelle médecine dans laquelle on utilisait principalement un seul composant (**Iris, 2011**).

Les plantes médicinales sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leurs actions proviennent de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (**Sanago, 2006**).

Grâce aux propriétés médicamenteuses des plantes médicinales, les industries pharmaceutiques ont fait beaucoup de recherche pour découvrir leurs compositions chimiques afin de pouvoir fabriquer des médicaments possédant des effets thérapeutiques ou préventif pour guérir les maladies (**Amroune, 2018**).

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

Partant de nombreux travaux récents ayant en effet montré les effets pro-oxydants de beaucoup de métabolites secondaires dans les graines, les racines et les feuilles de nombreuses espèces végétales, ces derniers sont utilisés comme agents cytotoxiques.

En effet une production importante de radicaux libres oxygénés pouvant menacer la vie de la cellule tumorale. Ces substances naturelles constituent actuellement une nouvelle approche thérapeutique anti-tumorale. Certaines recherches indiquent qu'une diminution du stress oxydatif est bénéfique alors que d'autres prouvent qu'en l'augmentant il est possible d'augmenter aussi la longévité. C'est le paradoxe du stress cellulaire.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés aux feuilles de *Rosmarinus officinalis*, une plante très répandue poussant à l'état sauvage et ayant prouvé plusieurs activités pharmacologiques dont l'activité antioxydante est la plus étudiée. Nous avons ciblé le cytosol du tissu hépatique pour préciser le rôle qu'elle devrait jouer dans l'apparition d'un stress oxydatif. Notre recherche est réalisée sur le rat Wistar albinos *in vitro*.

Dans la première partie, nous aborderons les différentes connaissances bibliographiques sur le *Rosmarinus officinalis* et le stress oxydant. Dans la partie expérimentale, nous développerons les matériels et les méthodes analytiques utilisées pour l'extraction, le rendement, le dosage colorimétrique de polyphénols et flavonoïdes, l'activité antioxydante et finalement l'activité enzymatique de la catalase et des marqueurs du stress oxydatif comme le glutathion réduit (GSH) et le malon dialdéhyde mitochondriale (MDA). La deuxième partie sera consacré aux résultats obtenus dans notre étude. A la lumière des résultats obtenus, différentes perspectives de recherche seront évoquées en évaluant l'activité prooxydante de *Rosmarinus officinalis*.

Revue Bibliographique

Chapitre I :

Rosmarinus officinalis

1. *Rosmarinus officinalis*

Le Romarin (*Rosmarinus officinalis*) est une plante des coteaux arides Garrigues et lieux rocheux de la région méditerranéenne et même un peu plus au Sud Jusqu'aux confins sahariens depuis l'antiquité, il est employé pour améliorer et Stimuler la mémoire encore aujourd'hui en Grèce, les étudiants en font brûler dans Leurs chambres en période d'examens (Okamura et al., 1994).

Rosmarinus officinalis est une plante médicinale originaire de la région méditerranéenne et cultivé autour du monde. Outre le but thérapeutique, il est couramment utilisé comme condiment et conservateur alimentaire (Jonatas et al., 2019).

Rosmarinus officinalis est une plante herbacée à feuillage persistant, Il est indigène à la Méditerranée où il pousse sauvage, Il peut notamment être trouvé près du littoral méditerranéen en Espagne, au Portugal, au Maroc et en Tunisie où il peut atteindre 6 pieds de haut. - Le romarin prospère mieux dans les régions chaudes et ensoleillées près des plages, ce qui fait du littoral méditerranéen un lieu de croissance parfait, *R. officinalis* a reçu son nom commun d'où il peut être trouvé en abondance, près de la mer ; le terme romarin signifie "rosée de la mer" (González-Trujano et al., 2007)

1.1. Description de la plante

Le romarin est une plante médicinale qui fait partie de la famille des Lamiaceae. Cet arbrisseau originaire du bassin méditerranéen est une plante aromatique. C'est une herbe médicinale très appréciées dans la médecine populaire. De nos jours, elle est parmi l'une des sources les plus appréciées en raison de sa richesse en composés bioactifs qui présentent un fort intérêt pour l'industrie alimentaire (Borras et al., 2011).

La plante de romarin possède plusieurs utilisations telles que, Augmenter la sécrétion de la bile, régulation du système digestif et la guérison des blessures. Et pour ces raisons, il est également utilisé dans les domaines tels que, la médecine, la production pharmaceutique et l'agriculture. Les produit chimiques composants de la plante de romarin sont 20% α -pinene, 20% cineol, 18% camphre, 6% β -pinen 1borneol, 5% mirsen, 3% acétate de bornicyl, 2% terpineol, limonène, terpineol et cariophyllen (Rutkay et al., 2020).

Elle possède des fleurs groupées par trois ou quatre qui sont positionnées au niveau de l'aisselles des feuilles jusqu'aux rameaux en courtes grappes auxillaires et terminales formant un ensemble spiciforme. Elles ont des bractées lancéolées, value plus courtes et caduques (**Leplat, 2017**).



FIGURE 1: *Rosmarinus officinalis* (variété cultivée) (**Leplat, 2017**)



FIGURE 2: fleurs et feuilles de *Rosmarinus officinalis* (**Bouajemi, 2018**).

1.2. Classification de la plante

Rosmarinus Officinalis dans la classification des végétaux (Marion, 2017).

Règne : Plantes

Embranchement : Spermaphytes

Sous-Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-Classe : Gamopétales

Ordre : Tubiflorales

Sous-Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *Rosmarinus officinalis*



FIGURE 3 : aspects morphologiques du romarin (Athamena, 2009).

1.3. Utilisation de la plante

Tous comme les fleurs et les racines, les feuilles de romarin peuvent être utilisés de multiples façons : infusion, bains, huile essentielle, teinture et vin (Iris, 2011). Dans la médecine traditionnelle, le romarin est utilisé pour faciliter la digestion, stimuler les fonctions biliaire et hépatique en cas de trouble digestif, traiter les migraines et les céphalées, soigner les troubles circulatoires et les rhumatismes (Makhloufi, 2012).

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des principes actifs comme la macération, la décoction, l'infusion ; ce processus nécessite l'utilisation de la plante entière ou d'une partie de la plante (racine, fleur, feuille) (Amroune, 2018).

Il existe plusieurs types d'utilisation du romarin :

1.1.1. Usage thérapeutique

L'ANSM (l'Agence National de Sécurité du Médicament et des produits de santé) a indiqué en 1998, pour les sommités fleuries et les fleurs de romarin, les indications thérapeutiques suivantes :

Le romarin est utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement des troubles digestifs comme : éructations, ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, flatulence ; pour faciliter les fonctions d'élimination urinaire et digestif ; comme cholérétique ou cholagogue (**Bruneton, 2009**).

Le romarin peut être utilisé de différentes manières en raison de la stabilité de ses principes actifs dans l'eau, l'huile, l'alcool, et dans l'acide acétique du vinaigre (**Leplat, 2017**).

1.1.2. Usage culinaire

Le romarin est une plante aromatique qui rend plusieurs plats plus digestes et leur donne une saveur particulière qui est due à son arôme très prononcé, il faut l'utiliser avec précaution (**Iris, 2011**).

Il est utilisé comme épice à cause de ses propriétés digestives et apéritives. S'il est utilisé en grande quantité, son goût peut dissimuler celui des autres ingrédients (**collectif, 2010**).

1.1.3. Usage phytosanitaire

L'huile essentielle du romarin est utilisée pour son action insecticide. Le romarin est capable de synthétiser des polyphénols et des terpènes toxiques pour un grand nombre d'insectes. Son huile essentielle est antiappétente et répulsive pour les insectes phytophages (**Regnault-Roger, 2008**).

L'huile essentielle du romarin est active contre les stades larvaires du moustique *Aedes aegypti* et contre le charançon du blé *Sitophilus granarius*. Au Malawi, les rameaux du romarin sont utilisés après distillation de l'huile essentielle pour agir contre certains insectes : *Ephesea kuehniella* et *tribolium* (**Gurib-Fakim, 2014**).

1.1.4. Usage agroalimentaire

La feuille et l'extrait de romarin y compris ceux dépourvus d'huile essentielle ainsi que l'acide carnosolique, l'acide agroalimentaire, le rosmanol sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire. En effet, Ils servent d'antioxydante et de conservateur dans les viandes, les produits alimentaires riche en graisse (**Anton, 2005**).

D'après le Règlement Arômes européen, l'huile essentielle (HE) de Romarin est permise bien que restreinte dans plusieurs aliments en raison des principes actifs biologiques potentiellement dangereux (méthylchavicol et méthyl eugénol). L'HE chémotype 1,8-cinéole est utilisé dans les sauces, viandes et potages ; comme arôme oignon et herbes de Provence (**Fernandez, 2012**).

1.1.5. Usage cosmétique et parfum

En cosmétique l'huile essentielle du romarin est utilisée dans les huiles corporelles et aussi parfumé des produits d'hygiène comme les savons, les dentifrices etc. (**Faucon, 2012**).

Les extraits de romarin ont des propriétés antioxydantes et antiseptiques, ils sont : astringents, générateur et protecteur solaire (**Boisvert, 2011**).

L'infusion des feuilles du romarin peut être utilisée afin d'atténuer les rides, donner un teint frais et raffermir la peau (**Debuigne, 2009**).

Une fumigation aux agrumes peut être préparée en mélangeant un citron en rondelles, six brins de romarin frais et cinq gouttes d'huiles essentielles de citronnelle dans de l'eau bouillante pour soulager les peaux abimer (**collectif, 2010**).

1.2. Composition chimique (principaux phytoconstitués)

Dans la composition chimique de *Rosmarinus officinalis*, il existe deux types de métabolites :

Les métabolites primaires : ce sont des molécules utiles à la vie des végétaux, ce type de métabolite présente une activité pharmacologique de base (les lipides, l'amidon, les enzymes ainsi que les glucides à titre d'exemple la cellulose) (**Grenez, 2019**).

Les métabolites secondaires : possèdent des paramètres très complexe. Il existe quelque famille chimique que sont les polyphénols, les terpernoïdes et les alcaloïdes (**Grenez, 2019**).

Selon la pharmacopée européenne, la feuille entière séchée du romarin doit avoir une teneur minimale de :

- 3 % de dérivés hydroxycinnamiques totaux exprimée en acide rosmarinique ($C_{18}H_{16}O_8$; M_r 360,3) (drogue anhydride)
- 12 ml/kg d'HE (drogue anhydre) (**Leplat, 2017**).

La composition chimique de la plante dépend de son lieu de croissance de sa récolte ainsi que le moment de sa récolte dans le cycle végétatif (Ideal quand le végétale a le maximum d'essence) (**Staub, 2013**).

Dans le but de déterminer la composition de feuilles et de sommités des fleuries du romarin des études ont été menée par (**Leplat, 2017**) afin de déterminer des valeurs moyennes pour certaines molécules :

1. Acide phénols :

1.1.Acide rosmarinique 1,7- 2,83 % en Moyenne (Figure 4)

1.2.Acide caféique : cité (= aucune valeur précisée) associée avec l'acide chlorogénique

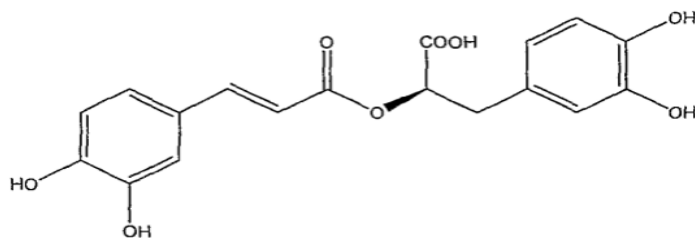


FIGURE 4 : Acide rosmarinique (**Baudoux, 2006**).

2. Diterpènes phénoliques tricycliques :

2.1.Acide canos(ol) ique = 0,35 % (Figure 5)

2.2.Rosmadiol : cité

2.3. Rosmanol : cite

2.4. carnosol = picrosalvine : cité (valeur variable, jusqu'à 4,6% ou majoritaire) (Figure 6)

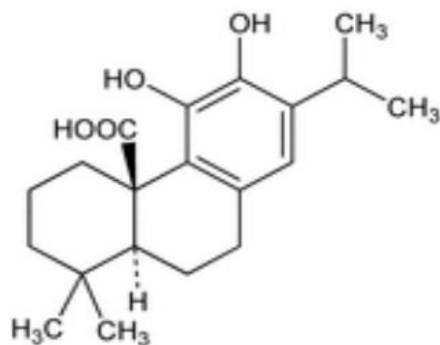


FIGURE 5: Acide carnosique (Leplat, 2017)

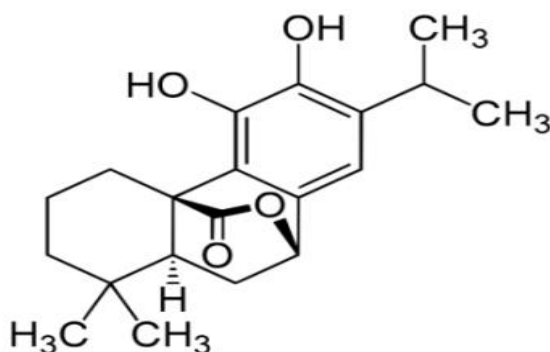


FIGURE 6: Carnosol (Leplat, 2017)

3. Triterpènes :

3.1. Acide urosolique : 2- 4 % en Moyenne et 5 % de dérivé de l'acide urosolique

3.2. Acide oléanolique : = 10 %

3.3. α - et β - amyryne: citées

4. Flavones mythlés :

4.1. luteoline : citée

4.2. genkwamine : citée

5. Huile essentielle (monoterpènes) :

5.1. α – pinene: 3,48 – 27,1 % en Moyenne (figure 7)

5.2.1,8-cinéole : 12,84-42,9% en moyenne (Figure 8)

5.3.Camphre : 10,22-31,4% en moyenne (Figure 9)

5.4.Bornéol libre et estérifié : cités

5.5.Camphène : 3,53-9,8% en moyenne

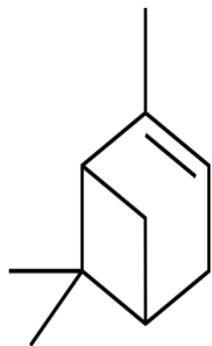


FIGURE 7: α -pinène

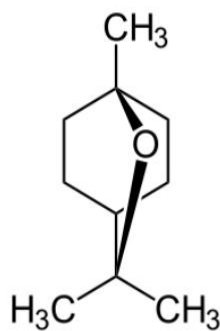


FIGURE 8: 1,8-cinéole

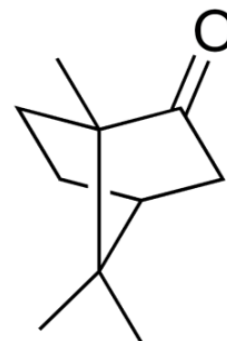


FIGURE 9: Camphre

Tableau 1 : Composition chimique de l'HE de *Rosmarinus officinalis* de différents pays du bassin méditerranéen (Boutekedjiret et al., 2013)

Origine / constituant (%)	α -pinène	camphène	β -pinène	1,8 cinéole	Camphre	bornéol	verbénone	β -caryo phyllène
Tunisie	8.6-11.4	2.7-3.8	-	47.6-55.1	6.4-14.8	4.2-12.1	-	0.9-1.1
Grèce	10.3	4.0	-	51.2	5.5	4.7	-	-
Maroc	9.5-12.0	3.2-4.0	7.0-7.8	50.0-58.0	7.4-8.2	3.0-4.5	0.2-0.5	-
Corse	24.0	-	-	6.0	3.0	2.0	27.0	-
France	19.0	8.9	4.3	24.8	7.5	3.2	1.3	-
Espagne	19.1-26.9	7.0-9.9	4.9-5.0	17.0-25.1	12.7-20.7	2.4-3.4	-	-

1.3. Propriétés pharmacologiques

Le *Rosmarinus officinalis* est constitué de molécules bioactives, les phytoconstitués, responsables de la mise en œuvre de plusieurs propriétés pharmacologiques, telles que anti-inflammatoires, antioxydantes, antimicrobiennes, antiprolifératives, antitumorales et protectrices, inhibitrices et activités atténuantes (**Jonatas et al., 2019**).

1.3.1. Activité antibactérienne

Les huiles essentielles sont connues pour leurs activités antibactériennes. De nombreuses études ont été établies pour connaître l'efficacité de l'huile essentielle du romarin dans ce contexte d'activité antibactérienne. Le biofilm joue un rôle important dans le phénomène de résistance au traitement antimicrobien observé en pathologie humaine. Les agents antibactériens sont les moyennes les plus courants qui affecte la viabilité des bactéries dans le biofilm (**Leplat, 2017**).

(**Zaouali et al, 2010**) ont mentionnés que par rapport au *Staphylococcus aureus*, l'activité antimicrobienne s'améliore avec la présence des α -pinènes comme composant majeur. Cet effet peut être corrélé au fait que les terpènes peuvent désorganiser la membrane cellulaire, et donc favoriser la lyse comme le précise (**Bjapai et al., 2012**).

1.3.2. Activité antioxydantes

Les extraits méthanoliques et les huiles essentielles contiennent une quantité très importante d'antioxydant tandis que ce dernier est essentiellement constitué d'acide coromarinique et d'acide rosmarinique. On conclut que des extraits méthanolique et éthanolique produisent une grande capacité de naturalisation des radicaux libres (**Mansouri et al., 2018**).

Au niveau cellulaire, les cellules soumises à un stress oxydatif peuvent entraîner un dysfonctionnement métabolique grave, notamment une peroxydation lipidique, une oxydation des protéines, une rupture des membranes et des liaisons de l'ADN (**Leplat, 2017**).

1.3.3. Activité anti-inflammatoire

Il existe plusieurs maladies qui sont associées à des processus inflammatoires les maladies neurologiques (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, démence) ; les maladies vasculaires (AVC, athérosclérose, cardio-vasculaire) ; les maladies métaboliques (diabète) ;

les maladies pulmonaires ; l'arthrose ; le cancer etc. L'inflammation est une réponse complexe de l'hôte à une lésion, qui implique l'extravasation des protéines plasmatiques et le recrutement de leucocytes (**Rodriguez, 2015**).

Les propriétés anti-inflammatoires de l'acide rosmarinique d'un extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* dans l'inflammation locale ont été évaluées ainsi que l'effet protecteur de l'acide rosmarinique pour des modèles d'inflammation systémique chez les rats : modèles d'ischémie/reperfusion hépatique et modèles lésions thermiques. (**Rocha et al., 2015**).

1.3.4. Activité antiproliférative

Le romarin a affiché des activités antiprolifératives importante contre plusieurs cellules cancéreuses humaine grâce aux composés les plus courant qui sont présente dans l'extrait de la plante tels que l'acide carnosique, le carnosol et l'acide rosmarinique ont induit l'apoptose de ces cellules cancéreuses à travers la production d'oxyde nitrique et d'acide carnosique (**Mansouri et al., 2018**).

1.3.5. Activité hépato-protectrice

L'effet hépato-protectrice du romarin a été étudié à l'aide de plusieurs études par (**Claire, 1994**) : les extraits aqueux de jeune pousse de *Rosmarinus officinalis* testés dans ces protocoles révèlent leur activité hépato-protectrices chez le rat et la souris par une baisse significative du taux des ALAT plasmatiques par rapport aux témoins intoxiqués et ceci pour des doses supérieur ou égal à 1000mg/kg (comme traitement préventif). En effet, l'augmentation moyenne des ALAT plasmatiques induites par le CCL₄ chez les animaux témoins intoxiqués (placebo) n'est pas toujours de mêmes intensités.

Chapitre II : Le Stress oxydatif

1. Rappel sur le stress oxydatif

Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre au sein d'un même organisme entre la production d'espèces radicalaires (ou réactives) de l'oxygène (ERO) et les capacités cellulaires antioxydantes. **(Camille et Mireille, 2011)**

Ce déséquilibre, dont les multiples conséquences touchent aussi bien les acides nucléiques que les protéines ou les lipides, peut provenir soit d'une production exagérée de radicaux libres, soit d'une altération des mécanismes de défense. Evaluer le stress oxydant c'est donc estimer la production de radicaux libres, apprécier les mécanismes de défense et enfin quantifier les produits secondaires qui peuvent en résulter **(Delbosc et al., 2001)**.

Il peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants et même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants **(Magder, 2006)**.

Les ERO sont impliquées dans d'innombrables fonctions cellulaires et bien que leur production soit physiologique, les ERO produites en excès nuisent à la structure et la fonction des tissus entraînant apoptose ou nécrose **(Hamma et al., 2015)**

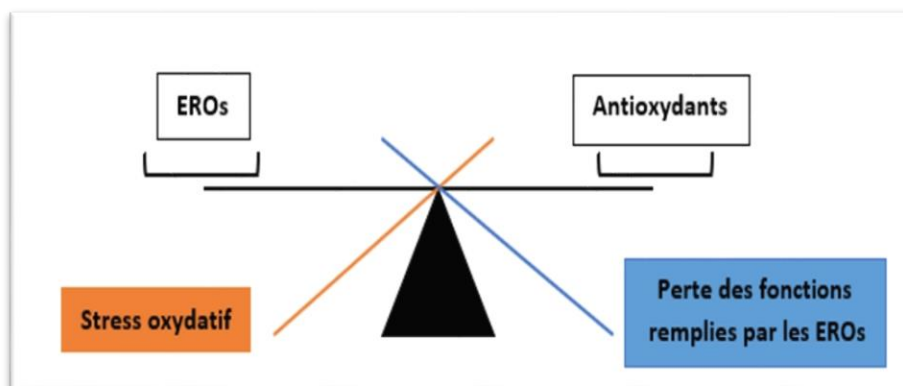


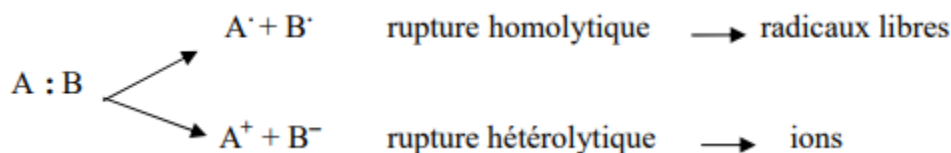
FIGURE 10: Le stress oxydatif **(Laplace, 2020)**.

2. Les radicaux libres

2.1. Définition

Dans la plupart des molécules organiques, les atomes voisins sont liés les uns aux autres par des liaisons covalentes. Lors d'une irradiation, ou de réactions chimiques d'oxydoréduction, le couple électronique peut être rompu. La molécule ou l'atome se trouve de ce fait porter un ou plusieurs électrons « célibataires » sur son orbitale externe et est désigné sous le terme de « radical libre ». (Béatrice, 2022).

Ces radicaux peuvent se former par transferts mono-électroniques ou par scission homolytique de liaison covalente selon le schéma suivant :



Après une rupture homolytique, chacun des deux électrons intervenant dans la liaison entre les atomes A et B gagne l'orbitale externe de ces atomes, qui deviennent alors des radicaux libres (Bonfont et al., 2003).

Ils peuvent réagir avec les molécules les plus stables pour appairer leurs électrons avec la possibilité d'oxyder ou de réduire donc peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices. Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne (très rapide d'ordre 10^{-4}) de nouveaux radicaux libres (cascade radicalaire). (Jore et al., 2003; Béatrice, 2022).



FIGURE 11: formation des radicaux libres (Christine, 2020).

2.2.Sources des radicaux libres

Les radicaux libres, tant les espèces réactives de l'oxygène (ERO) que les espèces réactives de l'azote (ERA), proviennent à la fois de sources endogènes (mitochondries, peroxyosomes, réticulum endoplasmique, cellules phagocytaires, etc.) et de sources exogènes (pollution, alcool, fumée de tabac, métaux lourds, solvants industriels, pesticides, certains médicaments comme l'halothane, le paracétamol et les radiations). (Alujoju et al., 2015).



FIGURE 12: sources des radicaux libres (Jonathan, 2019).

3. Espèce réactives d'oxygène (ERO)

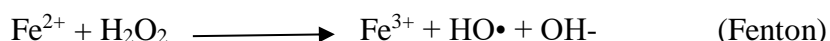
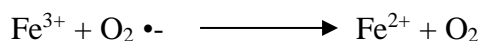
Dans son état le plus stable, l'oxygène existe sous forme de dioxygène, O_2 . La cause de son éventuelle toxicité provient de son évolution vers d'autres espèces plus dangereuses appelées espèces réactives de l'oxygène. Elles peuvent être produites dans n'importe quel type cellulaire. Lorsque la production des ERO n'est plus contrôlé par les défenses antioxydantes, cela entraîne de nombreuses perturbations (Rutkowski et al., 2007).

Ces ERO correspondent à des radicaux libres et sont divisées en 2 groupes :

3.1. Les espèces radicalaires :

3.1.1. Anion superoxyde (O₂•⁻)

L'anion superoxyde est formé par la réduction monoélectronique de l'oxygène. Le superoxyde peut aussi être généré par l'activité enzymatique des xanthines oxydases, des peroxydases et d'autres oxydases. Bien que O₂•⁻ puisse être à la fois oxydant et réducteur, il est généralement considéré comme peu réactif chimiquement vis-à-vis des systèmes biologiques. La toxicité du superoxyde est liée à sa capacité à réduire le Fe³⁺ en Fe²⁺, favorisant ainsi la réaction de Fenton et la production de l'espèce très toxique, le radical d'hydroxyle HO• (Bonnot, 2009).



3.1.2. Radical hydroxyle (HO•)

C'est le plus puissant oxydant qui puisse être généré au sein des cellules. Le radical hydroxyle est très réactif et réagit instantanément de façon non sélective avec toutes les macromolécules biologiques ainsi qu'avec les acides organiques. Il est donc extrêmement toxique pour la cellule (Valentine et coll, 1998).

3.1.3. Radical hydroperoxyde (HO₂•)

En milieu acide, O₂•⁻ se protone pour donner le radical hydroperoxyde HO₂• qui est beaucoup plus réactif que O₂•⁻. Ces espèces comprennent aussi le radical peroxyde (RO₂•) et le radical alcoxyde (RO•) (Pryor, 1986).

3.2. Les espèces non radicalaires :

3.2.1. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

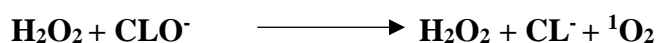
Le peroxyde d'hydrogène est formé par la réduction à deux électrons de l'oxygène. H₂O₂ peut être aussi directement produit au niveau de la chaîne respiratoire, essentiellement par auto-oxydation de la NADH déshydrogénase II. H₂O₂ peut se déprotoner pour donner l'anion hydroperoxyde (HO₂⁻) et l'ion peroxyde (O₂²⁻) (Bonnot, 2009).

3.2.2. Peroxynitrite (ONOO⁻)

Chez les organismes supérieurs qui synthétisent du monoxyde d'azote (NO) par l'activité de NO synthase (NOS), le superoxyde peut réagir avec NO pour former l'anion peroxynitrite (ONOO⁻) très délétère vis-à-vis des composés biologiques et un puissant oxydant (Bonnot, 2009).

3.2.3. Oxygène singlet (¹O₂)

L'oxygène singlet est un état excité de la molécule de dioxygène. Il se forme par photoexcitation ou pendant la réaction de l'eau oxygénée dans l'eau de javel par action des ions hypochlorite ClO⁻ sur le peroxyde (Bellik, 2019)



On a aussi l'acide hypochloreux (HOCl), l'Ozone (O₃). Ces espèces ne sont pas réactives mais peuvent être des précurseurs de radicaux et des dérivés anioniques de l'oxygène moléculaire (Asada, 2006 ; Favier, 2003).

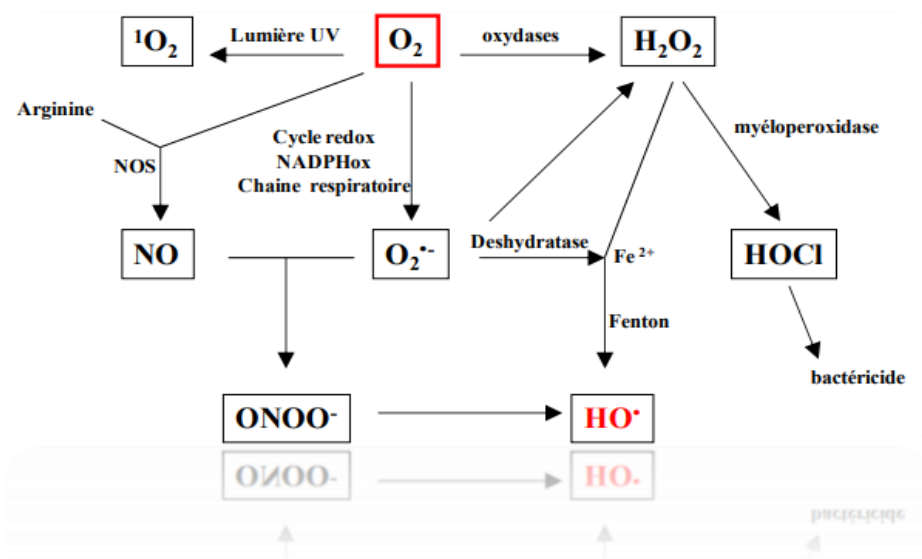


FIGURE 13: espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote. (Bonnet, 2009).

3.3. Mécanisme de production des ERO dans l'organisme

La majeure partie de l'oxygène dans la chaîne mitochondriale subit une réduction tétravalente conduisant à la production d'eau et d'oxygène. La synthèse d'énergie (sous forme d'ATP) à partir de l'oxygène appelée phosphorylation oxydative se fait notamment par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons présentes dans la membrane interne des mitochondries, 80 % de l'anion superoxyde proviennent du fonctionnement de la chaîne respiratoire (**Bouزيد, 2014**).

Cette réaction est catalysée par le cytochrome C (coenzyme Q) accepteur terminal d'électrons présent dans le complexe IV de la chaîne de transport (**Mazat et al., 2010 ; Bouزيد, 2014**). Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser « fuir » une certaine proportion d'électrons qui vont réduire environ 2 % de l'oxygène. Cette réduction monoélectronique (addition d'un seul électron) conduit à la formation du radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q) (**Cadenas et al., 2000**).

Comparativement aux complexes III et IV, une inhibition de seulement 25 % du complexe I (NADH ubiquinone oxydoréductase) est suffisante pour provoquer une formation d'espèces réactives (**Adam-Vizi, 2005**).

Par ailleurs, l'apparition de radicaux superoxydes peut résulter de l'auto-oxydation (oxydation par l'oxygène) de composés tels que des neuromédiateurs (adrénaline, dopamine...), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits ($FMNH_2$, $FADH_2$) par exemple la xanthine oxydase : $Xanthine + 2O_2 + H_2O \rightarrow Acide\ urique + 2 O_2^{\cdot-} + 2H^+$, mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique (**Halliwell et al., 1999**).

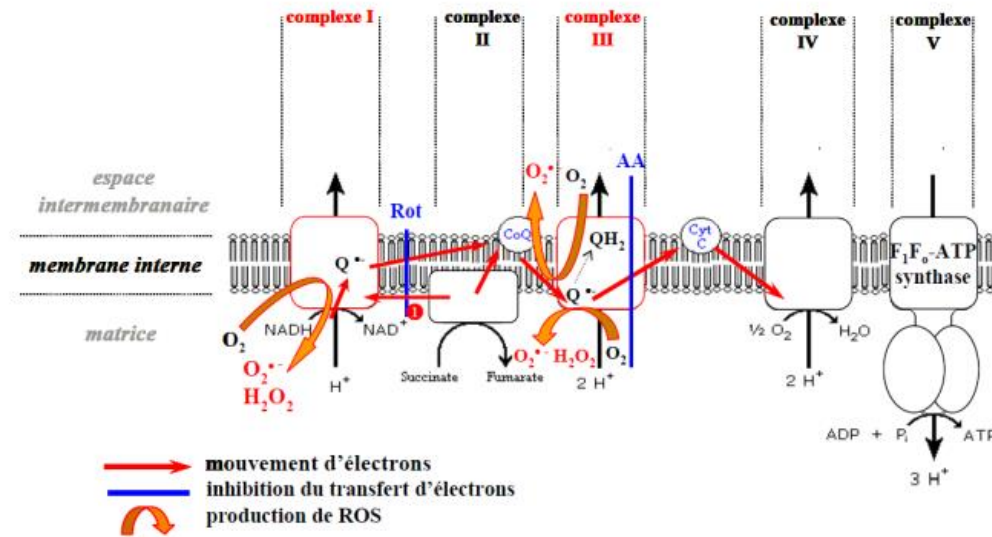


FIGURE 14: représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale, (Boveris et Turner, 1980).

3.4. Rôle physiologique des espèces réactives d'oxygène :

À des concentrations stables, l'oxyde nitrique (NO), l'anion superoxyde et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) apparentées jouent un rôle important en tant que médiateurs régulateurs dans les processus de signalisation des cellules contre le stress oxydatif par le rétablissement de « l'homéostasie redox » (Dröge, 2002). Ainsi les radicaux libres peuvent être bons ou mauvais et ceux dérivés de l'oxygène sont bénéfiques pour l'hôte à travers divers processus vitaux tels que : la régulation des gènes et le fonctionnement de certaines enzymes, la défense immunitaire contre les agents pathogènes et la destruction par apoptose de certaines cellules tumorales (Aziz, 2017).

4. Système de défense antioxydants

Pour garder un équilibre entre le statut pro oxydant/antioxydant, les cellules adoptent plusieurs stratégies antioxydantes et consomment énormément d'énergies afin de contrôler leur niveau de ERO. Il existe trois ordres de systèmes de défense antioxydantes : les systèmes antioxydantes comprenant certains éléments trace essentiels à leur bon fonctionnement et les vitamines ou autres composés qui permettent de stopper la chaîne oxydative, ainsi que les protéines liant les métaux de transition (Bouthillier, 2005).

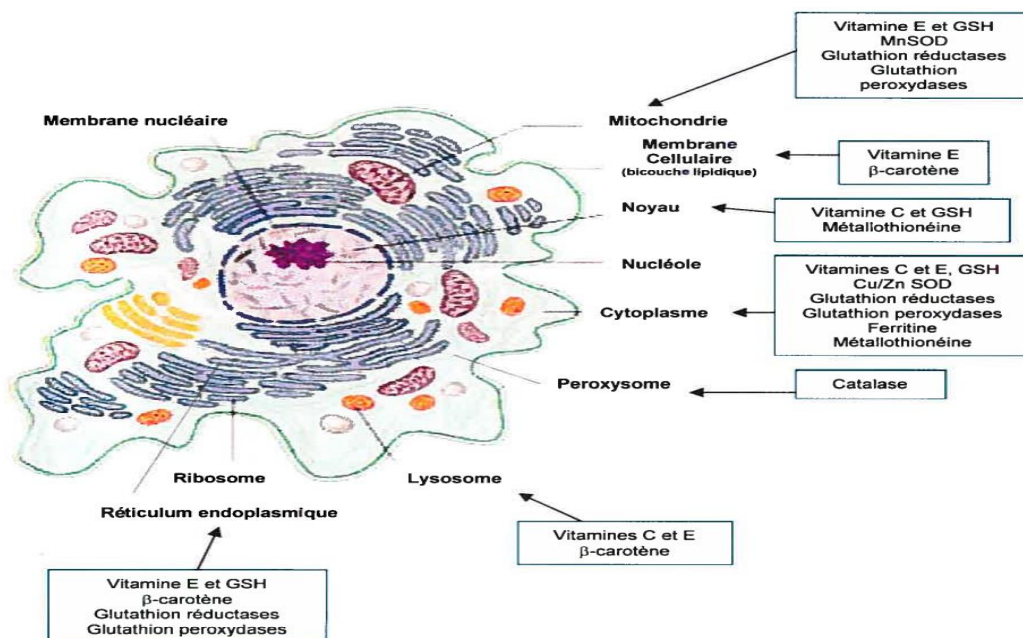


FIGURE 15: système de défense des antioxydants au niveau de la cellule (Lindsay, 2002 ; Biologienet, 2005)

4.1. Système antioxydant enzymatique

La classe d'antioxydants enzymatique comprend : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX) et la glutathion réductase (GR) (Valco et al., 2007 ; Thérond et al., 2005).

4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD):

La SOD est une métalloenzyme (enzyme qui possède des ions métalliques liés à la structure protéique) présente chez beaucoup d'organismes et participe à la réaction de dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde hydrogéné et en oxygène (Thérond et al., 2005).

La SOD1 (CuZnSOD) est une isoforme de la SOD, elle est massivement présente dans le cytoplasme, dans l'espace inter membranaire de la mitochondrie, dans les microsomes et dans le noyau. Les ions Zinc (Zn^{2+}) et cuivre (Cu^{2+}) donne à la SOD1 une activité catalytique et une stabilité lui attribuant un rôle majeur dans la défense antioxydante (Thérond et al., 2005).

La SOD2 (MnSOD) et la SOD3 sont respectivement dans la mitochondrie et dans la matrice extracellulaire et sont synthétisés par les fibroblastes et les cellules endothéliales (Trachootham et al., 2008).

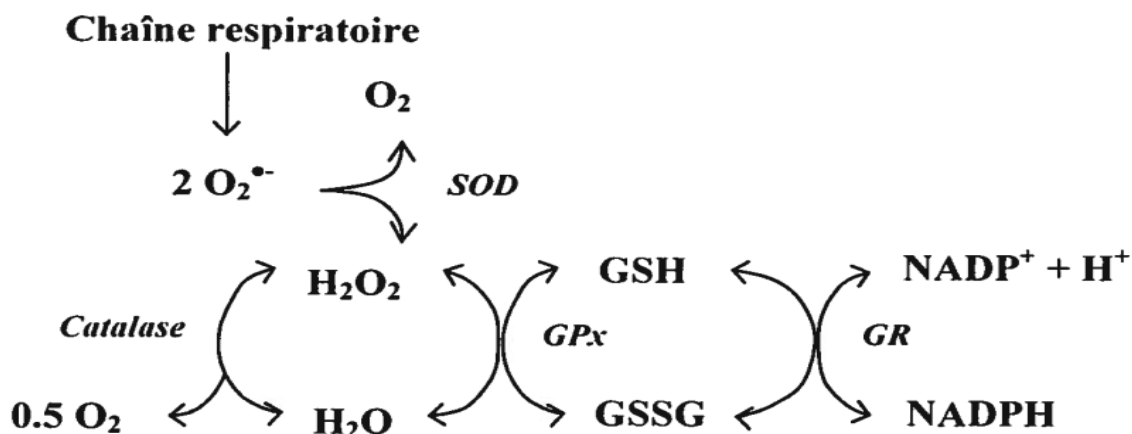
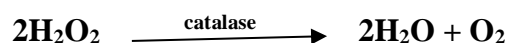


FIGURE 16: la génération et disposition de l'anion peroxyde et du peroxyde d'hydrogène (Modifiée de Dringen, 2000).

4.1.2. Catalase (CAT):

La catalase (CAT) est une enzyme que l'on trouve généralement dans les peroxysomes des cellules à la faculté de transformer le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. La catalase est surtout constituée d'un cofacteur positionné dans le site actif de l'enzyme et contient une molécule de fer appelé Hème. C'est une enzyme qui peut dégrader plus de 6 millions d' H_2O_2 par minute, la classant parmi l'une des plus efficaces pour cette fonction (Trachootham et al., 2008).

Son activité est présente dans les érythrocytes, le foie et aussi dans tous les tissus (Matés et al., 1999).



4.1.3. Glutathion peroxydase (GPX):

L'activité de la glutathion peroxydase (GPX) permet la dégradation d' H_2O_2 en 0.5O_2 et une molécule d'eau (H_2O). Chez les êtres humains, ils existent cinq isoformes de la GPX qui dépendent du sélénium (Se) localisée dans les quatre sous unités de la GPX sous forme de sélénocystéine (un acide aminé rare). La GPX1 est ubiquitaire et dégrade majoritairement le H_2O_2 et les hydroperoxydes lipidiques, produits résultant de la peroxydation lipidique (Théron et al., 2005).

La GPX2 est contenu dans le tractus gastrointestinale et est spécifique des tissus épithéliaux, tandis que la GPX3 se trouve le plasma et dispose du GSH, de la thioredoxine et de la glutaredoxine (protéines rédox) comme donneurs d'électron et finalement la GPX4 se trouve au niveau de la mitochondrie, du cytoplasme et du noyau. Une isoforme GPX6 a été nouvellement quantifiée au niveau des muqueuses olfactives et les tissus embryonniques (Trachootham et al, 2008).

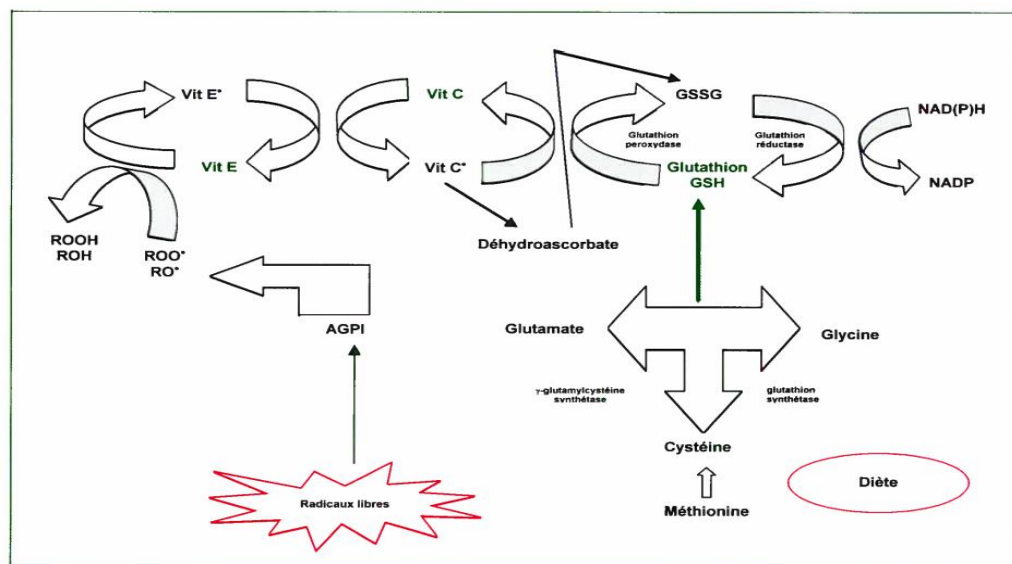


FIGURE 17: système en chaîne des réactions antioxydantes (Adapté de Leverage, 2002 et Seidman, 2002).

4.1.4. Glutathion réductase (GR)

La distribution des glutathion réductases ressemble beaucoup à celles de GPX. Pour réduire le peroxyde d'hydrogène, le GPX est une enzyme vitale au sein de la mitochondrie alors que la catalase n'est présente que dans les peroxysomes. Un stress oxydant sévère amène une diminution importante de GSH. Le ratio GSH/GSSG permet de quantifier le stress oxydant au sein du tissu. De nombreuses conditions cliniques sont liées à un taux réduit de GSH qui réduit le potentiel rédox de la cellule (**Bouthillier, 2005**).

4.2. Système antioxydant non enzymatique

Contrairement aux enzymes antioxydants, la majorité de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par alimentation. Parmi ces catégories d'antioxydants il y a les oligoéléments, l'ubiquinone, le cytochrome C, le glutathion réduit (GSH) et les vitamines E et C (**Blandine, 2006**).

4.2.1. Glutathion réduit (GSH):

Le GSH est un antioxydant dont la concentration est la plus élevée, il est le principal antioxydant dans le corps. Presque toutes les cellules sont capables de synthétiser ce tripeptide intracellulaire. Le foie est le seul organe à exporter le glutathion dans la circulation du sang (**Grimble, 1999**).

Le GSH réduit le peroxyde d'hydrogène grâce à la réaction catalysée par le glutathion peroxydase (GPX). Il est capable de réduire les radicaux formés par l'oxydation de vitamine E et C, faisant ainsi baisser le niveau de peroxydation lipidique (**Power et Lennon, 1999 ; Packer et al., 1997**).

4.2.2. Vitamine C (acide ascorbique):

La vitamine C est présente dans le cytosol, le plasma, les fluides intra et extracellulaire, c'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles. Elle peut réagir avec les ERO comme HO \cdot ou O $_2\cdot$ est capable de recycler l' α -tocophérol pour aider à prévenir l'oxydation des lipides (**Vertuani et al., 2004**).

Comme la plupart des vitamines, elle est apportée par l'alimentation et peut être régénérée par le NADPH et le glutathion (**Durand, 2018**).

4.2.3. Vitamine E (tocophérol):

La vitamine E (α -tocophérol) est une vitamine liposoluble très importante dans la lutte contre le stress oxydant. Elle se fixe aux membranes lipidiques, les séparent des radicaux libres empêchant ainsi la propagation des réactions de peroxydation lipidique (**Evans, 2000 ; Packer et al., 1997**).

Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au côté des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines (**Vertuani et al., 2004**).

Un taux élevé de cholestérol devrait s'accompagner d'un taux élevé de vitamine E. Lors d'un stress oxydant, avec la vitamine C, la vitamine E joue un rôle de détoxification (**Durand et al., 2018**).

4.2.4. Oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPX de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action prooxydante (**réaction de Fenton, d'Haber-Weiss**).

4.2.5. Polyphénols flavonoïdes

Les flavonoïdes font partie de la famille des polyphénols, ils sont responsables de la couleur, de la saveur et de la texture des aliments. Ils ont la faculté de dégrader les EROs, comme les radicaux superoxydes, hydroxyles et peroxydes de même que la fonction d'agents chélateurs d'ions métalliques (fer, cuivre). On les retrouve dans plusieurs produits tels que le vin rouge, le curcuma, le thé vert et dans de multiples fruits et légumes comme le brocoli, les baies, la pomme grenade. Les polyphénols constituent une famille importante d'antioxydant, ils sont généralement présents chez les végétaux. (**Singh et al., 2008 ; Ramassamy, 2006 ; Durant, 2018**).

4.2.6. Ubiquinones et Cytochrome C

Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production d'ERO. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant (**Power et Lennon, 1999**). L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxy. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les EROs (**Packer et al., 1997**).

Le cytochrome C présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d' $O_2^{\cdot-}$ produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome C oxydé et de l' H_2O (**Korshunov, 1997**).

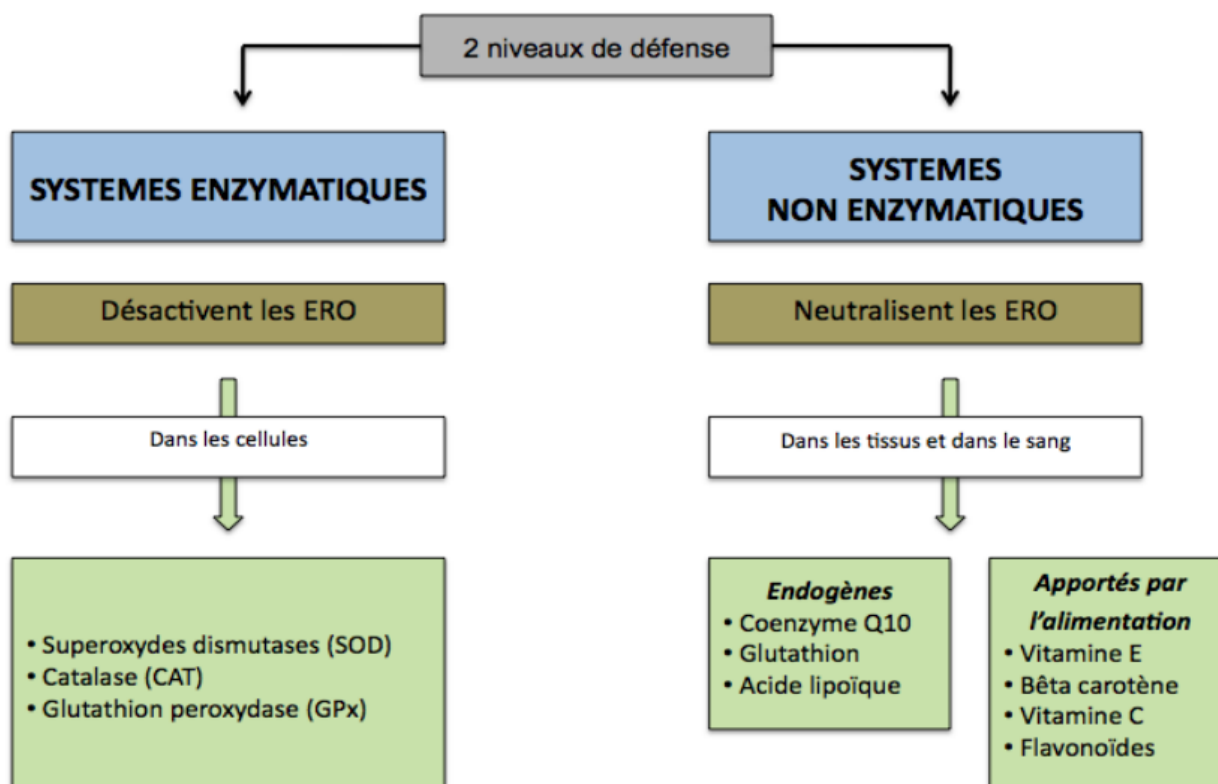


FIGURE 18: récapitulatif des défenses antioxydantes (**Durant, 2018**).

5. Stress oxydant et conséquences cellulaires

Les dommages induits par les ERO comme la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines et des mutations de l'ADN peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée) (Outaleb, 2013)

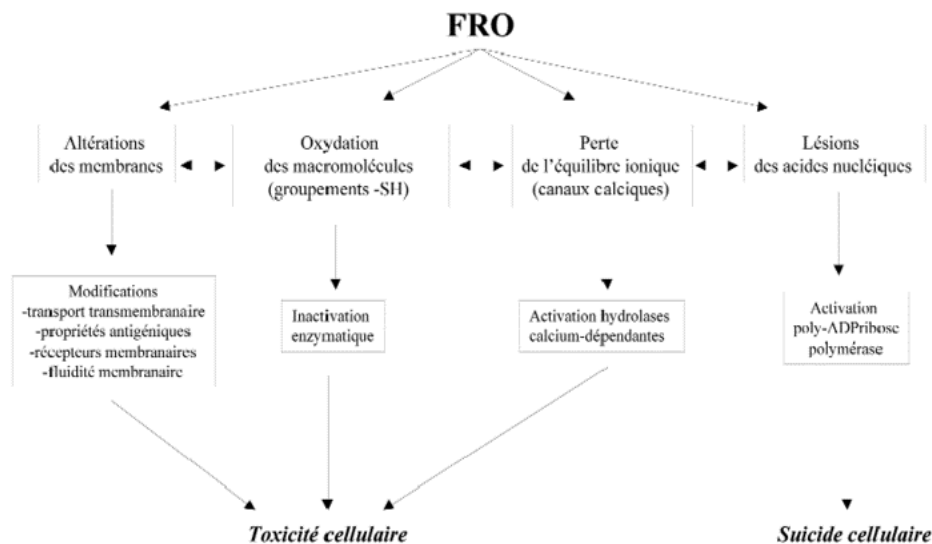


FIGURE 19: les principales modifications biochimiques et métaboliques cellulaires conséquence d'un stress oxydant, selon (Roberfroid et Calderon, 1995).

5.1. Peroxydation lipidique

Les premières cibles des ERO sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires riches en acides gras polyinsaturés (AGPI), en raison de leur degré élevé d'insaturation (Garait, 2006).

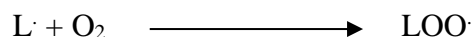
L'oxydation des lipides polyinsaturés en présence d'oxygène est un processus radicalaire de réactions en chaîne connue sous le nom de peroxydation lipidique et se décompose en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison.

Initiation : La phase d'initiation est due à l'attaque d'une espèce radicalaire suffisamment réactive pour arracher un hydrogène du groupement méthylène d'un acide gras polyinsaturé

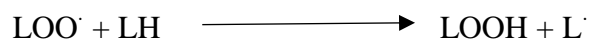
(LH) pour former un radical lipidique (radical centré sur l'atome de carbone ; $\cdot\text{CH}$ ou $\text{L}\cdot$) (Michel et al, 2008). Dans le cas du radical hydroxyle $\text{OH}\cdot$, il se transforme en eau.



Propagation : Le radical lipidique réagit avec O_2 pour former un radical peroxy ($\text{ROO}\cdot$).

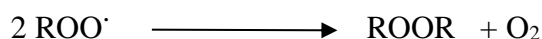
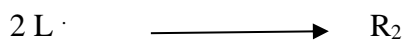


La combinaison du radical peroxy avec l'atome d'hydrogène conduit à la formation d'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) qui, sous l'action des métaux (Fe^{2+} ou Cu^+), formera des radicaux alkoxy ($\text{LO}\cdot$) et hydroxyles ($\text{HO}\cdot$).



Terminaison : la phase terminale de dégradation intervient lorsque :

-Deux radicaux libres, appartenant ou non à la molécule, se réunissent, créant ainsi entre eux deux ponts.



Un radical libre rencontre une molécule « piège » (ex : alpha-tocophérol) (Cerou, 1994).

L'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux.

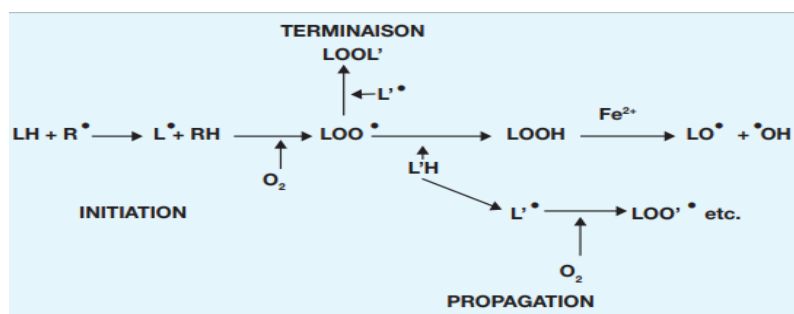


FIGURE 20: peroxydation lipidique (Thérond et al., 2008).

5.2. Oxydation des protéines

De même les lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ERO. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine qui contribuent progressivement à l'altération de leurs propriétés structurales et fonctionnelles (**Garait, 2006 ; Desmons et al., 2013**).

Cumulatif et souvent irréversible, ce « vieillissement moléculaire des protéines » est impliqué dans le dysfonctionnement de neurotransmetteurs, le vieillissement de l'organisme (**Desmons et al., 2013**).

Les protéines modifiées par oxydation ne sont pas réparées et doivent être éliminées soit par les lysosomes (pour les protéines extracellulaires) ou les protéasomes (protéines intracellulaires). Ces protéines perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (**Théron, 2006**).

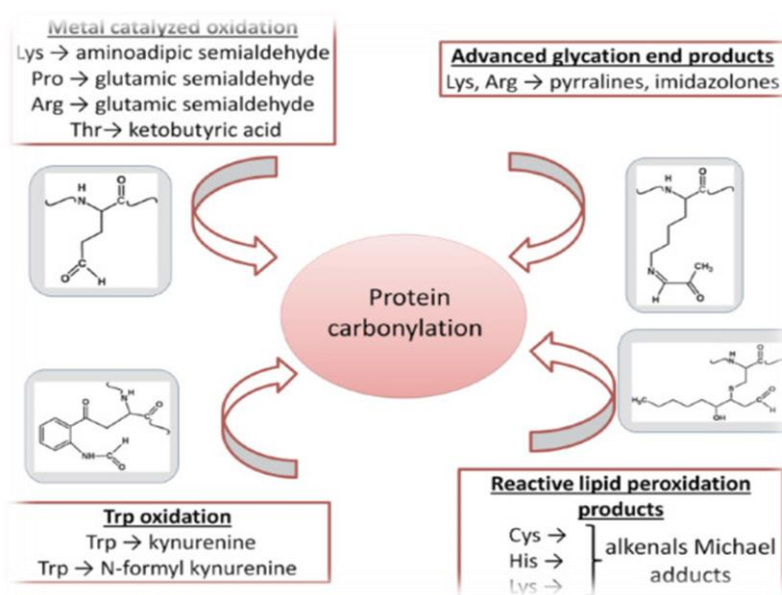


FIGURE 21: les réactions d'oxydations des protéines (**Ouznadji et al., 2020**).

5.3. Alteration de l'ADN

Les bases puriques et pyrimidiques modifiées constituent l'une des principales classes de dommages à l'ADN médiés par les radicaux hydroxyle avec les ruptures de brins d'oligonucléotides, les liaisons croisées ADN-protéine et les sites abasiques (**Delatour et al., 1999**).

Il réagit avec les purines en s'additionnant sur la double liaison en 7,8 et sur la double liaison en 5,6 des pyrimidines ; ou arracher un atome d'hydrogène des groupements méthyles ou des résidus désoxyribose (**Cadet, 1999**). Dans ce cas, les lésions non réparées vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et entraîner soit une mutation ponctuelle dans le génome, soit une impossibilité de copie de l'ADN qui aboutira à la mise en route du suicide programmé des cellules par apoptose (**Favier, 2003**).

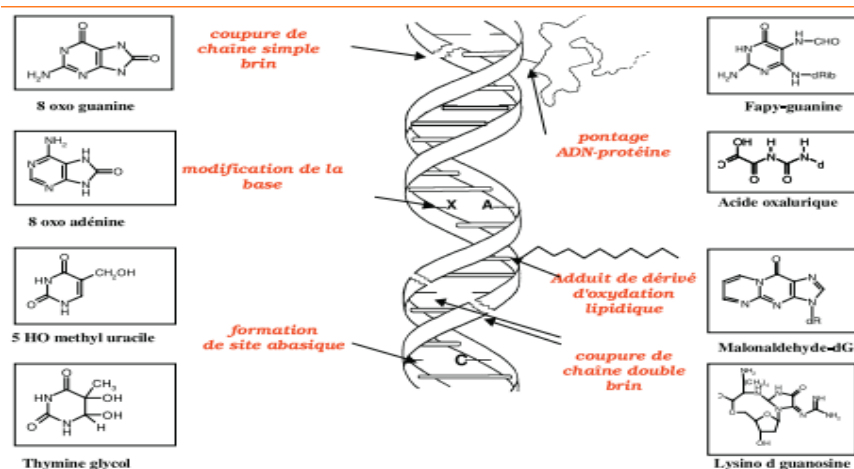


FIGURE 22: lésion de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (**Favier, 2003**).

6. Stress Oxydatif et pathologies

L'excès de radicaux libres non neutralisés par les défenses est très dommageable pour les macromolécules essentielles de nos cellules entraînant donc des conséquences cellulaires. Dans plusieurs maladies graves, le stress oxydant est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires (**Favier, 2006**).



FIGURE 23: rôle pathologique des radicaux libres (Alujoju et al., 2014).

6.1. Stress oxydatif et maladies cardiovasculaires : cas de l'arthrosclérose

L'athérosclérose est une pathologie artérielle à évolution lente caractérisée par la formation de plaques d'athérome par accumulation de lipoprotéines de basse densité (LDL), de leucocytes, la migration des cellules musculaires lisses et l'altération des cellules endothéliales (Belcastro, 2016).

Le stress oxydant intervient dans toutes les phases du développement de l'athérosclérose et de multiples manières ; mentionnons les effets mitogéniques des LDL oxydées, les propriétés chimiotactiques et génotoxiques des produits de la peroxydation lipidique, la formation d'Advanced glycation end-Product et la production de monoxyde d'azote (Favier, 2003 ; Baudin, 2006).

6.2. Stress oxydatif et cancer

Le développement du cancer se divise en trois grandes étapes dans lesquelles le stress oxydatif est impliqué : initiation (altération du matériel génétique des cellules), promotion et progression. Les radicaux libres interviennent dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes créent des lésions de l'ADN qui amplifient les signaux de prolifération et inhibent les gènes suppresseurs de tumeur comme p53 dont le rôle est de stopper la division cellulaire. Cette modification de l'ADN induit des mutations par transversions GC (guanine/cytosine) vers TA (thymine/adénine) souvent observées dans les cellules cancéreuses. Ces sont les premières étapes de la carcinogène (Favier, 2003).

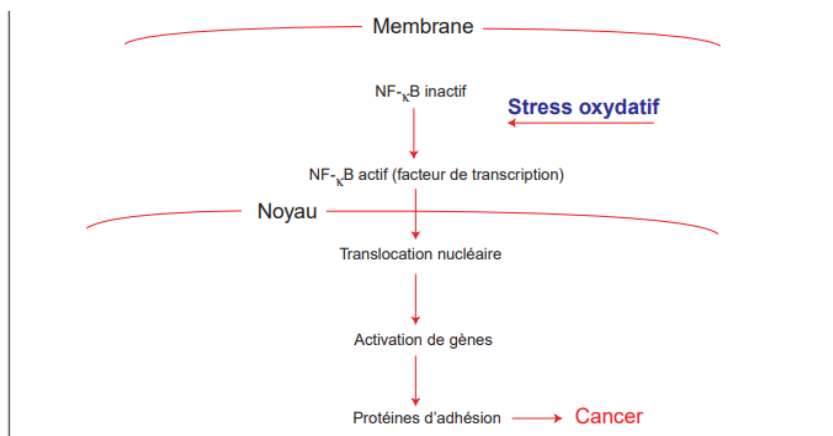


FIGURE 24: Induction de la cancérogenèse via l'activation du facteur transcriptionnel NF-κB induite par le stress oxydatif (**Pincemail et al., 1999**)

Une prévention de cette maladie peut être apportée par la prise régulière d'antioxydants. Expérimentalement, il a été prouvé que les antioxydants présentent des activités anticancéreuses non seulement en piégeant les ERO mais aussi en augmentant la réponse immunitaire, en stimulant les gènes récessifs du cancer ou en inhibant l'angiogenèse des tumeurs (**Shklar, 1998**).

6.3. Stress oxydant et diabète

La physiopathologie du diabète est liée à un certain nombre de facteurs dont le stress oxydant. Dans le diabète de type I, il serait à l'origine des lésions de la cellule bêta du pancréas et de l'inhibition de la sécrétion d'insuline par la diminution du rapport ATP/ADP intra cytosolique et une surexpression du complexe I de la chaîne respiratoire menant à l'apoptose des cellules β (**Charef et al., 2019**).

Concernant le diabète de type 2, le stress oxydatif est la conséquence de plusieurs anomalies dont l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie et la dyslipidémie, chacune contribuant à la surproduction mitochondriale de superoxyde dans les cellules endothéliales (**Bonnefont-Rousselot, 2004**).

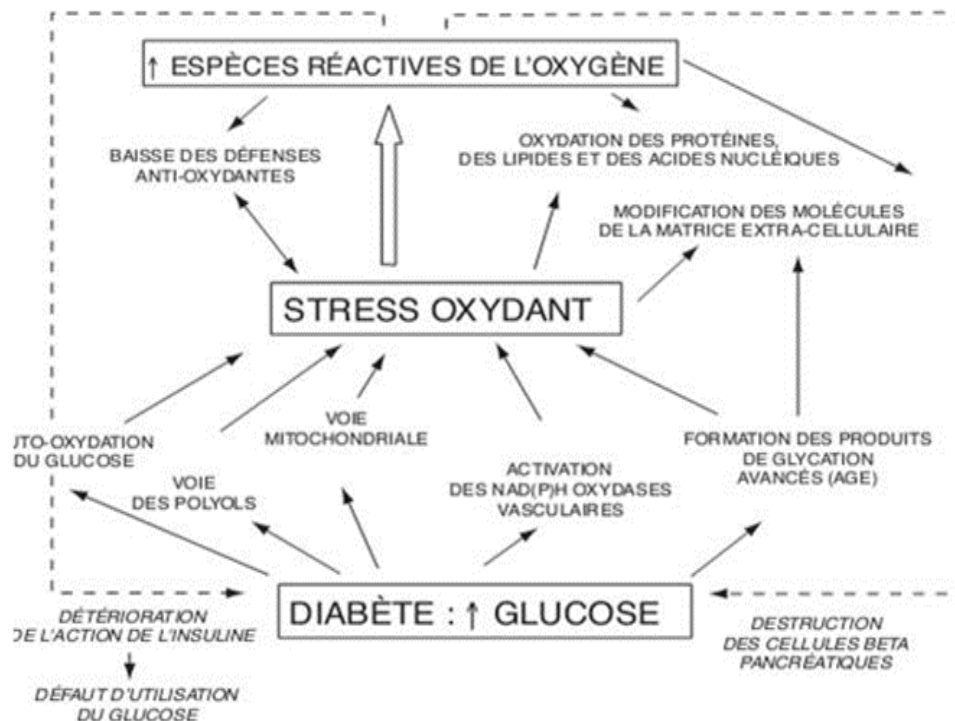


FIGURE 25: relation entre hyperglycémie et stress oxydant (Bonnefont-Rousselot., 2004).

6.4. Stress oxydatif et inflammation

Dans les maladies inflammatoires de l'intestin tel que la maladie de Crohn comme exemple, la production des ERO est suivie par la peroxydation lipidique ce qui conduit à l'altération de certaines fonctions de l'épithélium intestinal. Lors des maladies inflammatoires chroniques respiratoire comme l'asthme, les ERO ont des effets sur les différentes composantes de la fonction en altérant leurs structures (JDIR, 2013).

6.5. Stress oxydatif et maladies hépatiques

Le foie est un organe qui est souvent exposé à un stress oxydatif significatif due à ses différentes activités. Des études récentes ont montré que le stress oxydatif pourrait être un pivot originaire de la pathogenèse des maladies (Ayacha, 2012)

La surproduction de radicaux libres est toxique pour les hépatocytes. Elle est responsable de l'initiation d'une cascade intermédiaire des espèces réactives de l'oxygène causant la mort des hépatocytes de ce fait une dégradation hépatique aiguë (Naveau, 2009).

7. Elimination des ERO de l'organisme

Afin de limiter la concentration en ERO, les cellules sont équipées de système de défenses qui agissent de plusieurs manières (**Gutteridge, 1994**) : soit en inhibant la formation des ERO par la séquestration des métaux de transition comme le Fe^{2+} et le Cu^{2+} qui agissent comme catalyseurs dans la formation du radical hydroxyle empêchant ainsi la réaction de Fenton et la production de $\cdot\text{OH}$,

Soit en les métabolisant grâce à des enzymes comme la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase ou avec des piègeurs de radicaux libres (glutathion, vitamine C, vitamine E, coenzyme Q) ou, encore, en réparant les dommages oxydatifs par des molécules, glutathion et thiorédoxine réduite (**Casteilla et al., 2006**).

Les radicaux libres peuvent aussi réagir entre eux pour mettre fin au processus radicalaire. C'est notamment le cas entre deux superoxydes (O_2^-) ou entre le superoxyde (O_2^-) et le monoxyde d'azote (NO) :

--> La réaction superoxyde-superoxyde (dismutation) engendre du peroxyde d'hydrogène :
 $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$.

--> La réaction superoxyde-monoxyde d'azote produit du peroxynitrite (ONOO^-).

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

Notre travail a été réalisé dans le laboratoire pédagogique de biochimie à l'université 08 mai 1945 de Guelma en 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*. Les feuilles de *Rosmarinus officinalis* ont été récoltées au mois de février 2022 dans la faculté centrale de Université 08 mai 1945 de la wilaya de Guelma, loin de tout impact de pollution. Après la récolte, les feuilles de la plante ont été lavées 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 14 jours. Les feuilles ont été d'abord coupées en petits morceaux dans le but d'accélérer leur séchage.

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits hydro-éthanoliques

2.1.1. 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 utilisation.



FIGURE 26: la poudre des feuilles du romarin après broyage

2.1.2. 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 dans des bocaux opaques à température ambiante (**Lagnika, 2005**). Des extraits hydro-éthanoliques sont préparés par macération de 1 g de la poudre végétale dans 10 ml d'éthanol (7 : 3) pendant 10 jours.



FIGURE 27: la macération du romarin dans des bocaux opaques

2.1.3. Filtration

Après la macération, les macérats sont récupérés dans un premier temps puis filtré dans un erlenmeyer à l'aide d'un entonnoir à travers un papier filtre wattman.



FIGURE 28: la filtration de l'extrait du romarin après macération

2.1.4. Evaporation

Les filtrats sont réunis et concentrés sous pression réduite dans un rotavapeur de marque Buchi switzerland à 65°C. Après l'évaporation de l'éthanol, l'extrait obtenue a été conservé au congélateur à 0°C pour le congeler.



FIGURE 29: l'évaporation du solvant à l'aide de rotavapeur

2.1.5. Lyophilisation

Après la congélation les extraits ont été lyophilisés dans un lyophilisateur de marque Christ alpha1-2 LD plus pour les rendre en poudre. La poudre obtenue est ensuite conservée à l'abri de la lumière.



FIGURE 30: lyophilisateur

2.1.6. Détermination du rendement

Le rendement désigne la masse de l'extrait obtenu, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction (**Mahmoudi et al., 2013**).

3. Screening phytochimique

Le screening 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.

3.1. Alcaloïdes

Introduire 10 g de poudre végétale séchée dans un erlenmeyer de 250 ml, ajouter 50 ml de H_2SO_4 à 10 %. Après agitation pendant 30 minutes, laisser macérer 24 heures à la température du laboratoire, puis filtré sur papier filtre. Ensuite, compléter le filtrat à 50 ml avec de l'eau distillée. Introduire 1 ml de filtrat dans un tube à essais puis ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer. La présence d'alcaloïdes est indiquée par la formation d'un précipité blanc jaunâtre (**Edeoga et al., 2005**).

3.2. Tanin

Dans un Erlenmeyer, disperser 5 g de poudre dans 100 ml d'eau bouillante. Après infusion pendant 15 mn, filtrer et compléter le filtrat à 100 ml avec de l'eau distillée. Introduire 5 ml d'infusé à 5 % dans un tube à essais, puis ajouter 1 ml de solution aqueuse de $FeCl_3$ à 1 %. En présence de tanin, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noir (**Edeoga et al., 2005**).

3.3. Flavonoïdes

Macérer 10g de la poudre sèche dans 150 ml d'HCl dilué à 1% pendant 24h, filtrer et procéder au test suivant : prendre 10 ml du filtrat, rendu basique par l'ajout du NH_4OH à (10%) en utilisant le pH mètre. Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure de tube à essai (**Edeoga et al., 2005**).

3.4.Saponosides

Porter à ébullition 100 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 250 ml puis ajouter 1g de la poudre ensuite maintenir une ébullition modérée pendant 15 mn. Après filtration, ajuster le filtrat à 100 ml. Remplir 1ml du décocté à 1 % préparé dans un tube à essais et ajuster le volume à 10ml avec de l'eau distillée. Ensuite, agiter le tube. Pour confirmer la présence de saponosides, il faut qu'une mousse apparaît après avoir laissé au repos pendant 15 minutes le tube à essais (**Karumi et al., 2004**).

3.5.Composés réducteurs

Mettre 5 ml de décocté aqueux à 10% dans un bécher de 100ml, et évaporer à sec au bain-marie, puis ajouter 1 ml de réactif de Fehling (0,5 ml de réactif A et 0,5 ml de réactif B) la présence de composés réducteurs est indiquée par la formation d'un précipité rouge brique (**Karumi et al., 2004**).

3.6.Oses et holosides

Introduire les 5 ml de décocté aqueux à 10% au résidu obtenu dans un bécher de 100ml et évaporer à sec au bain-marie, 2 à 3 gouttes de H_2SO_4 (>99%) concentré et après 5 minutes, additionner 03 à 04 gouttes d'éthanol. Le développement d'une coloration rouge révèle la présence d'oses et holosides (**Karumi et al., 2004**).

3.7.Mucilages

Introduire 1 ml du décocté à 10 % dans un tube à essai et ajouté 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux par mélange, indique la présence de mucilages (**Karumi et al., 2004**).

4. La chromatographie sur couche mince de l'extrait hydro-éthanolique

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successive sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase (**Antonot R, 1998**).

A l'origine, la CCM a été utilisée pour la séparation des substances colorées. Aujourd'hui, elle est considérée comme une méthode puissante pour les analyses qualitatives et quantitatives. Aussi, permet-elle de suivre l'évolution d'une réaction et de tester la pureté d'un solvant (Delmeyda, 2001).

4.1.Principe

La séparation des constituants du dépôt se fait à l'aide de deux phases : une phase mobile qui est un solvant ou un mélange de solvants ; et une phase stationnaire qui est un adsorbant de 0.25 mm d'épaisseur, maintenu sur une plaque de verre ou de plastique rigide.

L'échantillon à analyser doit se trouver dans un solvant volatil. Le dépôt se fait alors sur une extrémité de la phase stationnaire. Les extraits de notre échantillon sont alors posés sur ce premier. Les constituants de l'échantillon sont alors élués par la phase mobile qui monte par capillarité vers le haut de la plaque (Delmeyda, 2001).

4.2.Mode opératoire

A. Phase stationnaire

Dans notre cas, nous avons utilisé deux plaques de silice (phase normale) prêtent à l'emploi de longueur 12.5 cm et 20 cm, pour l'extrait hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis*.

B. Phase mobile

On a essayé deux systèmes de solvants :

Tableau 2: les systèmes des solvants utilisés

N	Système de solvant	Proportion
1	Hexane/ acétate d'éthyle / éthanol/ n-butanol/ chlorofome	2 : 8 : 1.5 :3 : 20
2	Ethanol/ H ₂ O	7 : 3

4.2.1. Dépôt

L'échantillon est déposé à l'aide d'un tube capillaire en appuyant légèrement et brièvement l'extrémité, Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable

d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application plutôt que de déposer en une seule fois un grand volume d'échantillon qui produirait une tache plus large (Antonot R, 1998).

4.2.2. Révélation

Dans la présente étude, la visualisation des taches (spots) se fait sous UV à 365nm puis déterminée alors, pour chaque constituant, le rapport frontal (Rf) :

D1 : Distance parcourue par le soluté

D2 : Distance parcourue par le front de solvant

5. Dosage calorimétrique

5.1. Dosage des polyphénols

La teneur en composés phénoliques est estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon (Li et al., 2007). 1 ml de réactif de Folin (dilué 10 fois) est ajouté à 200 μ l d'échantillon ou de standard (préparés dans l'éthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (7,5%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesuré 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200 μ g/ml) et est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

5.2. Dosage des flavonoïdes

L'évaluation quantitative des flavonoïdes est réalisée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun et al., 1996). Les échantillons sont préparés par la dissolution de 1mg (extrait) / ml (éthanol). 1 ml de chaque échantillon est ajouté 1 ml de la solution d' $AlCl_3$ (2%, dans l'éthanol). Dix minutes après le début de la réaction, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une gamme étalon est établie séparément avec la quercitrine (0-40 µg/ml) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans l'extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de lyophilisat (Bahorun et al., 1996).

6. L'évaluation de l'activité anti-oxydante : Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

La méthode utilise le DPPH comme un radical libre relativement instable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites anti oxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphénylpicryl-hydrazine : de couleur jaune) n'absorbe plus à 515 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance (Sanchez-moreno, 2002).

Selon le protocole décrit par (Mansouri et al., 2005). La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de l'éthanol (6×10^{-5} M). 25 µl des solutions d'extraits ou standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 975 µl DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant la solution de DPPH et de l'éthanol est mesurée à 517 nm.

L'activité antioxydante de l'extrait vis-à-vis du radical DPPH est évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

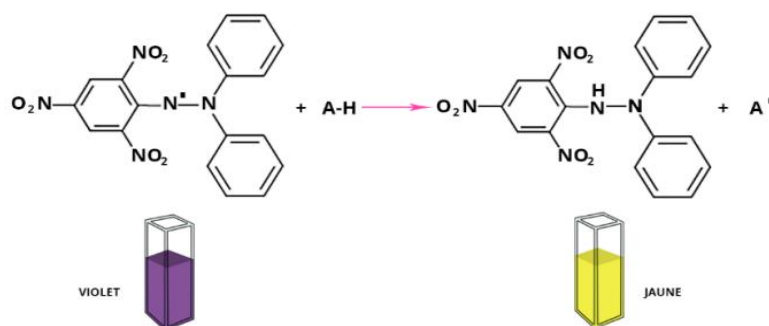


FIGURE 31: réaction d'antioxydant avec un radical de DPPH

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

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

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

A (c) : Absorbance du contrôle ;

A (t) : Absorbance d'extrait ou standard

7. Matériel animal

La présente étude a été réalisée sur des rats mâles adulte de la souche Wistar au nombre de 4 rats, provenant de l'institut Pasteur d'Alger, âgés de 06 à 08 semaines pesant environ ($250 \pm 25\text{g}$). Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs largement utilisés dans divers domaines de la recherche expérimentale. Les rats avaient libre accès à la nourriture standard de rat : pin et l'eau.



FIGURE 32: un rat Wistar

7.1. Extraction du foie des souris

Après sacrifice des rats, le prélèvement des organes a été fait au niveau de l'animalerie de l'université 08 mai 1945 de Guelma, Après la récupération des foies, ils ont été prélevés, lavés dans l'eau physiologique, pesés et puis stockés au niveau du congélateur pour les dosages des différents paramètres biochimiques et enzymatiques.



FIGURE 33: extraction du foie de souris

8. Préparation de la fraction cytosolique des cellules hépatiques

Quand les foies sont prélevés, on les jette rapidement dans le tampon phosphate contenant du kcl, ils sont pesés, puis coupé en petits morceaux, avant d'être potterisé dans 9 ml du tampon phosphate (0,1M, PH=7,2). La potterisation est faite par un sonicateur. L'homogénat obtenu est ensuite centrifugé à 3700 t/mn pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant ainsi obtenu est centrifugé à 3700 t/mn pendant 45 minutes à 4°C. Le surnageant issu de cette dernière centrifugation est le cytosol qui est utilisé pour les différents dosages (Bruneton j, 1993).

8.1.Mesure du taux du Malon dialdéhyde mitochondrial (MDA)

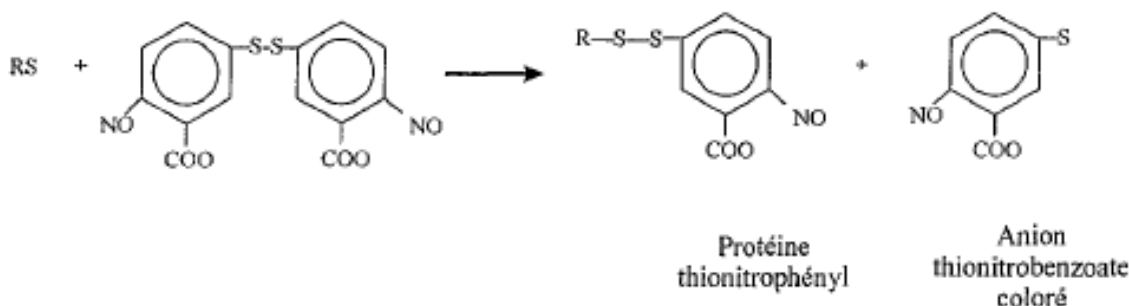
Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médié par les radicaux libres. Le dosage repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100°C) entre le MDA et deux molécules de l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol. Le MDA est l'un des biomarqueurs fiables de l'oxydation des membranes cellulaire et mitochondriale car c'est l'un des produits terminaux de la lipoperoxydation. Le principe de la méthode repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100 °C) entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) d'un complexe chromogène de couleur rose absorbant la lumière à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n-butanol. (Ohkawa H et al., 1979).

À 0,5 ml de la fraction cytosolique du foie, 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 % sont additionnés. Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 532 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec de l'eau distillée (Ohkawa H et al., 1979).

Le taux de MDA est déduit à partir d'une courbe d'étalonnage réalisé à partir du 1,1,3,3-tétraéthoxypropane qui lors de son hydrolyse acide libère du MDA. L'activité du MDA est exprimée en nmole/gramme de tissu hépatique (Ohkawa H et al., 1979).

8.2. Mesure de la concentration du Glutathion réduit cytosolique (GSH)

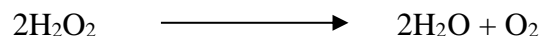
Le niveau de glutathion a été estimé dans le cytosol des foies spectrophotométriquement par le 5-5'-DiThiobis (2-acide NitroBenzoïque) (DTNB) réduit par les groupements -SH en libérant l'acide thionitrobenzoïque (TNB), un composé jaunâtre ayant une densité optique maximale à $\lambda = 412$ nm (Ellman, 1959).



50 μ l du cytosol sont additionnés à 10 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH=8. Prélever 3 ml du mélange à qui on a ajouté 20 μ l d'une solution de DTNB 0,01 M (dissoudre dans le méthanol absolu). Après 15 min d'incubation à la température ambiante, l'absorbance du mélange réactionnel a été lue contre un blanc de réactif à 412 nm dans un spectrophotomètre. Les concentrations du GSH sont exprimées en mmol/g du foie. Elles sont déduites à partir d'une gamme étalon de GSH préparée dans les mêmes conditions que le dosage (Ellman, 1959).

8.3. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase

Le cytosol (sources enzymatiques) est récupéré afin de doser l'activité enzymatique de la catalase. L'activité de la catalase est déterminée par la méthode de **(Clairbone, 1985)**. Le dosage spectrophotométrique est basé sur la disparition de l' H_2O_2 à 240 nm pendant 2 min.



La quantité d' H_2O_2 décomposé est directement proportionnelle à la concentration en substrat et la concentration en enzyme.

1 ml de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M, pH=7,2 est additionné à 0,95 ml de peroxyde d'hydrogène 0,019 M et 25 μl de la source enzymatique, puis l'absorbance a été mesurée par le spectrophotomètre.

La cinétique de la catalase n'obéissant pas au modèle Michaelien, on n'a pas utilisé la loi de Beer-Lambert. La constante de vitesse de la catalase est définie par la relation :

$$K = 2.3 / \Delta t \times \log_{10} (DO_0 / DO_t)$$

L'activité enzymatique est exprimée en unités UI/g de protéines.

DO_0 : absorbance à 0 min

DO_t : absorbance au moment "t"

Δt : intervalle de temps

K: UI

8.4. Dosage des protéines cytosoliques par la méthode de Bradford

Le bleu de Commassie G250 se complexe avec les chaînes latérales des acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine) et sur les fonctions amines libres de la chaîne polypeptidique en formant un complexe chromogène présentant un maximum d'absorption à

595nm. Il y a donc une corrélation entre la quantité de colorant formé dans une solution et la concentration en protéine.

Cette méthode est une méthode relative c'est à dire que l'on réalise d'abord une gamme (ou étalon) à partir de quelques tubes de concentrations connues. On utilise généralement de la BSA (Bovine Serum Albumin) comme protéine standard. Cette gamme permet d'établir une courbe étalon de la concentration en fonction de l'absorbance mesurée (**Bradford, 1976**).

Chapitre IV : Résultats et Discussion

1. Rendement d'extraction

L'extraction hydro-éthanolique du *Rosmarinus officinalis* par macération permet de déterminer le rendement qui est calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = M_{\text{ext}} / M_{\text{éch}} \times 100$$

M_{ext} : masse de l'extrait après extraction

$M_{\text{éch}}$: masse totale de la poudre après broyage

L'extrait hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis* nous a permis d'obtenir une poudre vert foncé après lyophilisation avec un rendement de l'ordre de **7,84 %**.



FIGURE 34: l'extrait hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis*

Le rendement d'extrait éthanolique en comparaison avec d'autres chercheurs est élevé par rapport à (**Hilan et al., 2006 ; Boutabia, 2006 ; Belkhodja et al., 2006 ; Atik Bekkara et al., 2007**) qui ont enregistré des rendements de (**1.52% ,2.3% et 1.29%, 0.8%**) respectivement.

D'un autre côté, le résultat obtenu est inférieur ce qui est trouvé par (**Menaceur, 2011 ; Kamal Fadili et al., 2015 ; Bendif Hamdi, 2017**) qui ont enregistré des rendements d'extraction dans le solvant éthanol de l'ordre : **13.6%, 20.55% et 19.60%**) respectivement.

Notre résultat est très bas par rapport au rendement obtenu par **(Mata et al., 2007)** qui ont trouvés un rendement de **51.1%** avec l'extrait hydro-éthanolique.

En comparant notre résultat à celle de **(Benbott et Bouali, 2018)**, qui ont réalisé une extraction méthanolique (**21.7% et 18.2%**) pour le romarin de M'Lila et Ouargla respectivement, notre résultat est inférieur.

Cette différence pourrait être expliquer par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en termes de rendement et qualité de l'extrait. Le climat, la zone géographique, la période de séchage...etc sont des facteurs entre et autre qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement de l'extrait **(Vekiari et al., 2002 ; Kelen et Tepe,2008)**.

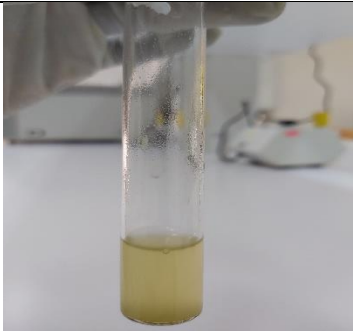
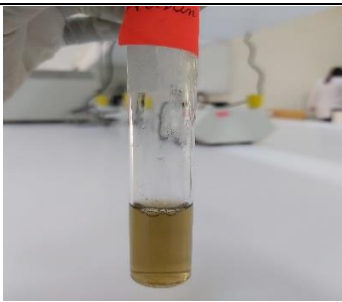
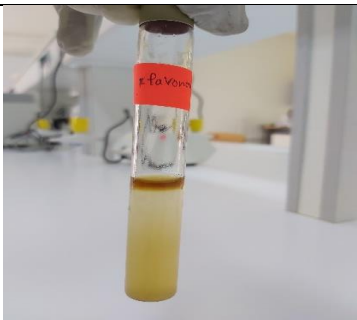
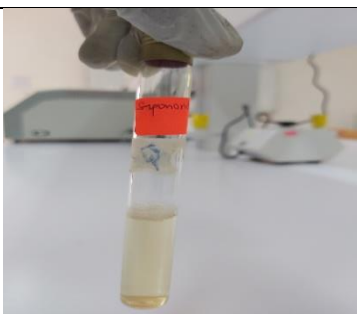
2. Analyse qualitative




2.1. Screening phytochimique

La technique de Screening phytochimique permet d'identifier la présence de composés des métabolites secondaires et le degré de sa présence dans le tissu végétal de *Rosmarinus officinalis*.

Nous avons utilisé des composés chimiques qui interagissent avec ces composés pour leur présence ou leur absence dans le tissu végétal et les changements peuvent être observés à travers, un changement de couleur spécifique ou un examen s. - Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal broyé de *Rosmarinus officinalis* sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 3: résultats du screening phytochimique de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis*

Métabolite secondaire	Observation	Résultats
Alcaloïdes		++
Tanin		++
Flavonoïdes		+++
Saponosides		+++

Composés réducteurs	 A glass beaker containing a dark brown, almost black, liquid. The liquid is concentrated at the bottom and has a slightly viscous appearance.	+++
Oses et holosides	 A glass beaker containing a dark brown, almost black, liquid. The liquid is concentrated at the bottom and has a slightly viscous appearance.	+++
Mucilages	 A test tube containing a yellowish, translucent liquid. The liquid is concentrated at the bottom and has a slightly viscous appearance. The test tube has a red label with the word 'Mucilages' written on it.	+++

❖ (+++) = Réaction fortement positive

❖ (++) = Réaction moyennement positive

2.2. Résultat de la chromatographie sur couche mince (CCM)

Nous avons réalisé la chromatographie sur couche mince pour identifier les polyphénols présents dans *Rosmarinus officinalis*, en testant l'extrait.

Les chromatogrammes résultants comportent une série de spots, l'identification des composés est basée sur la comparaison des R_f et les couleurs observés sous lampe UV des taches apparues sur CCM avec ceux de la littérature.

Le tableau suivant comporte les R_f des différents spots apparus, ainsi que la couleur révélée sous une lampe UV :

Tableau 4: les classes des composés phénoliques identifiés dans *Rosmarinus officinalis* selon (Markham, 1982)

Le système 1 (Hexane : acétate d'éthyle : éthanol : n-butanol : chloroforme) 2 : 8 : 1.5 : 3 : 20 par volume			
Spot	Couleur	R_f	Composé phénolique présente
1	Rouge	0.94	Anthocyanine 3 glucoside
2	Rose	0.87	Flavonoïdes
3	Violet	0.76	Flavonols, flavonones, Isoflavonones, flavones
4	Bleu	0.73	Acide phénols
5	Rose	0.57	Flavonoïdes
6	Rose	0.51	Flavonoïdes
7	Bleu	0.36	Acide phénols
8	Jaune	0.27	Flavonols
9	Violet	0.03	Flavonols, flavanones, Isoflavonones, flavone
Le système 2 (éthanol / H₂O) 7 : 3 par volume			
Spot	Couleur	R_f	Composé phénolique présent
1	Rose	0.9	Flavonoïdes
2	Jaune	0.8	Flavonols
3	Rose	0.66	Flavonoïdes
4	Violet	0.46	Flavonols, flavonones, Isoflavonones, flavone
5	Bleu	0.24	Acide phénols

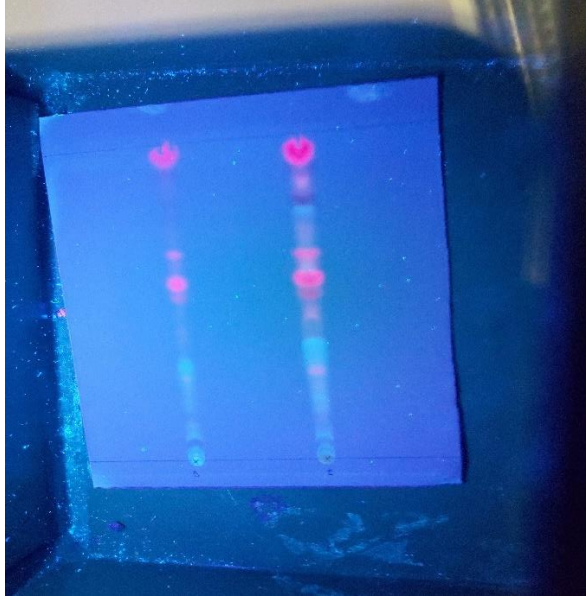
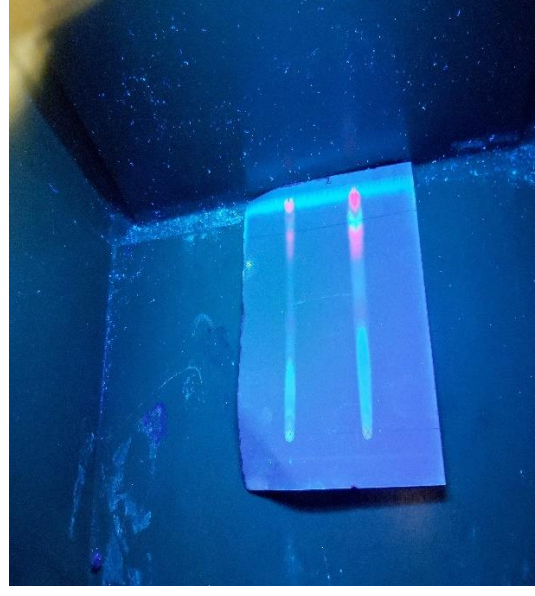
Le système 1(Hexane : acétate d'éthyle : éthanol : n-butanol : chloroforme) (2 :8 :1.5 : 3 : 20) V/V/V/V/V	Le système 2 (éthanol : H ₂ O) (7 :3) V/V
	

FIGURE 35: les résultats de Chromatogramme photographié CCM sous lampe UV à 365 nm dans les 2 systèmes

D'après les résultats indiqués dans le tableau 4, nous pouvons dire que le *Rosmarinus officinalis* de la région de Guelma est très riche en flavonoïdes notamment (Flavonols, flavonones, isoflavonones, flavone) et Anthocyanidine 3 glucoside et flavonoïdes.

En comparant notre résultat à celui de (**Benbott et Bouali, 2015**), on constate que le *Rosmarinus officinalis* de la région de Guelma contient les mêmes composés phénoliques que celui de la région de M'Lila et Ouargla.

3. Dosage des polyphénols totaux

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.

L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans cette méthode. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage ayant l'équation : $y = 0.0026x$ et $R^2 = 0.9816$.

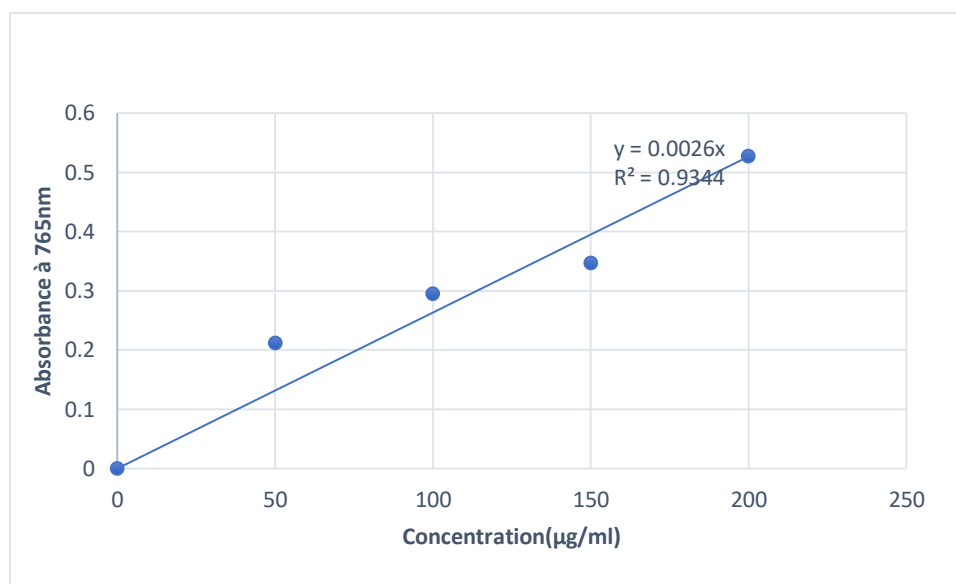


FIGURE 36: courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour les polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols sont exprimées en $\mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait et les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures \pm son écart type.

La teneur en polyphénols totaux de *Rosmarinus officinalis* dans la région de Guelma spécifiquement dans la faculté centrale de l'université 08 mai 1945 de Guelma est ainsi estimé au cours de notre analyse à $168,85 \pm 2,308 \mu\text{g EAG/ mg}$ d'extrait hydro-éthanolique.

En comparant notre résultat à ceux des autres sur la même variété, on constate que la teneur en polyphénols totaux rapporté par (Fadili et al., 2015) estimé à $185,71 \pm 4 \text{ mg EAG/ ml}$ d'extrait méthanolique est supérieur à notre à notre résultat, la même chose pour (Kahouli, 2010) qui a trouvé une teneur de 225 mg EAG/ g et (Athamena et al., 2015) qui ont trouvé une teneur en polyphénols totaux de l'extrait hydro-méthanolique de l'ordre de $195,45 \pm 4,16 \text{ mg EAG/ g}$ d'extrait.

Les résultats rapportés par (Erkan et al., 2008) estimé à 162 mg EAG / g d'extrait sont très proche de notre résultat mais très inférieur à ceux de (Tsai et al., 2007) et (Tawaha et al., 2007) qui ont rapporté $58,1 \pm 0,9 \text{ mg EAG/ g}$ et $39,1 \pm 3,6 \text{ mg EAG/ g}$ respectivement.

La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant la croissance de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (Falleh et al., 2008 ; Zaouli et al., 2010). La teneur phénolique d'une plante dépend aussi d'un certain nombre de facteurs tels que, les conditions climatiques, le moment de la récolte, le solvant d'extraction, les conditions de stockage (Podsedeck, 2007).

4. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) pour chaque extrait a été rapportée en μg équivalent de Quercétine/mg d'extrait. Les résultats de la courbe d'étalonnage de Quercétine sont représentés dans la figure 37.

Le taux des flavonoïdes a été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0.0169x$ ayant que $R^2 = 0.9724$.

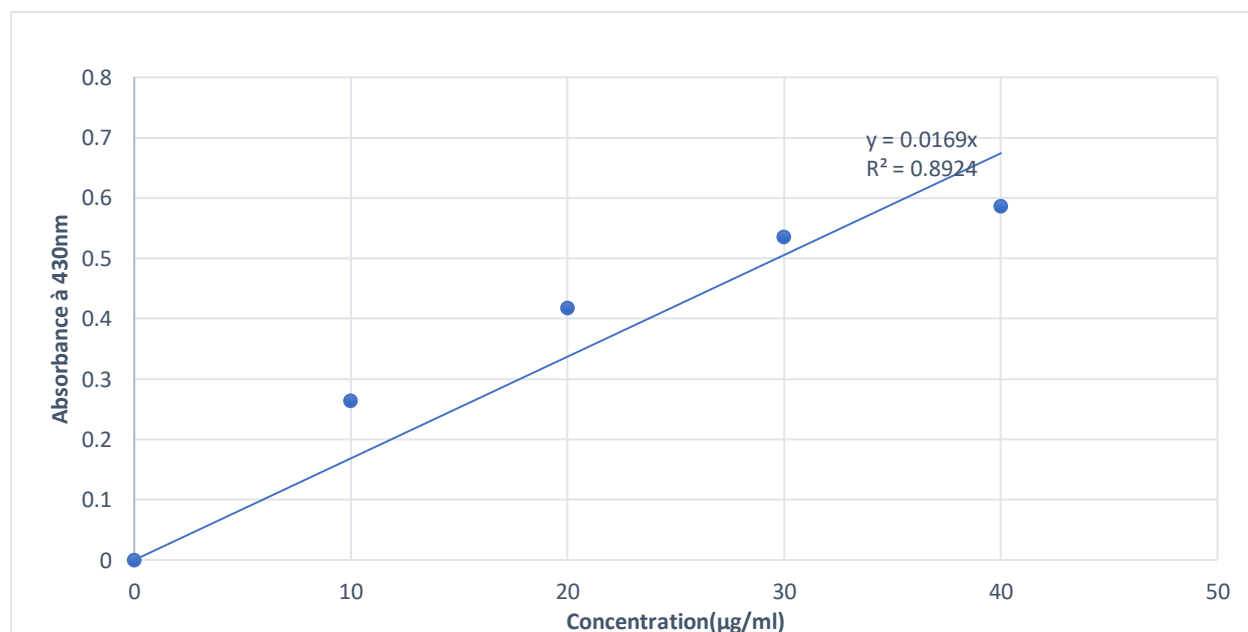


FIGURE 37: courbe d'étalonnage de la quercétine

Notre résultat est exprimé μg d'équivalent en quercétine par mg d'extrait ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait).

Les teneurs en flavonoïdes totaux de *Rosmarinus officinalis* de la région Guelma est ainsi estimée au cours de notre analyse à $109.44 \pm 0.0155\mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait pour l'extrait hydro-éthanolique. Notre résultat montre que la plante *Rosmarinus officinalis* de la région de Guelma est très riche en flavonoïdes.

En comparant notre résultat avec à celui de **(Rached et al., 2009)** qui ont eu une teneur estimée entre 135 à 175 $\text{mg EQ}/\text{g}$ d'extrait à Oran, notre résultat est inférieur.

Dans un autre côté, notre est très supérieur à ceux de **(Ho et al., 2008)** et **(Tsai et al., 2007)** qui ont trouvés des teneurs de $20.1 \pm 1.30 \text{ mg EC}/\text{g}$ et $60.7 \pm 1.1 \text{ mg EC}/\text{g}$

** EC = équivalent en catéchine

Cette différence trouve probablement son explication dans la différence du standard utilisé pour le dosage des flavonoïdes. Les variations, rencontrées dans les teneurs en flavonoïde dans nos échantillons, comparées à certains travaux antérieurs, peuvent être probablement dues à certains facteurs écologiques, à la partie de la plante utilisée, à l'âge de la plante et la période du cycle végétatif, ou même à des facteurs génétiques.

5. Evaluation de l'activité antioxydant par le DPPH

L'activité antioxydante de l'extrait hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis* et de l'antioxydant standard (quercétine) 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^{*}) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à longueur d'onde de 517nm. 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 **(Majhenic et al., 2007)**.

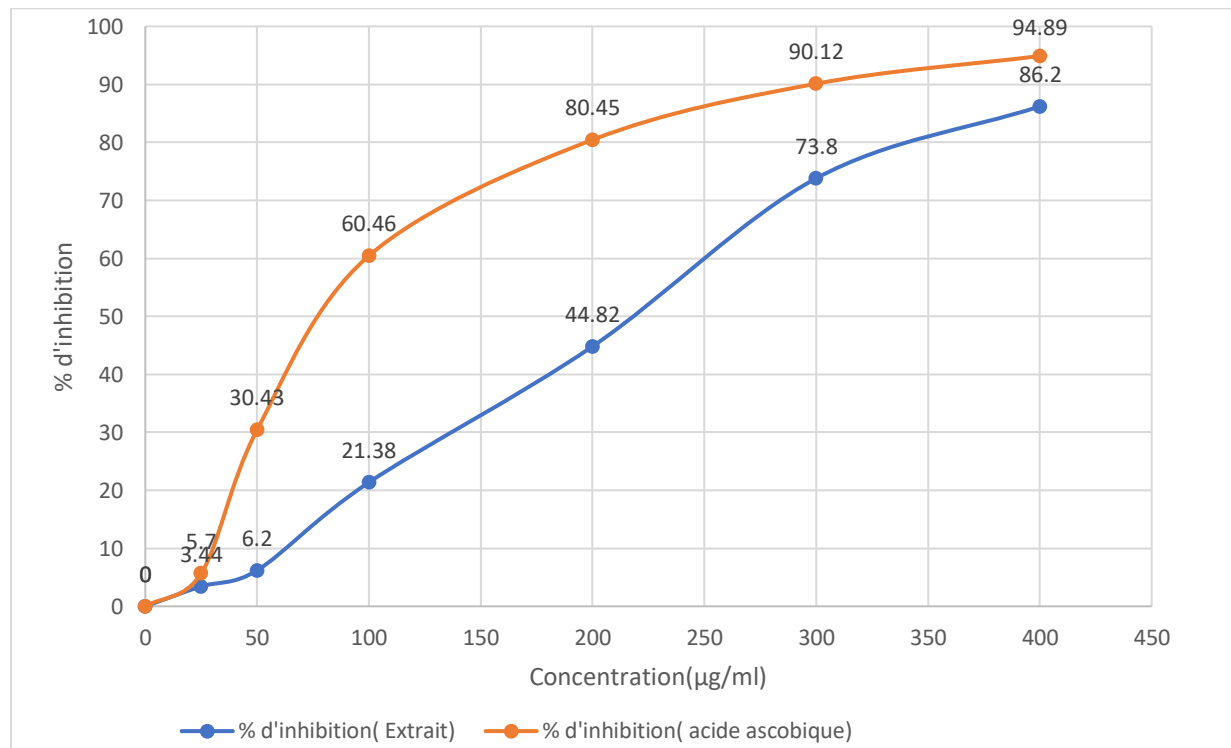


FIGURE 38: pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de différentes concentrations de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* et de l'acide ascorbique

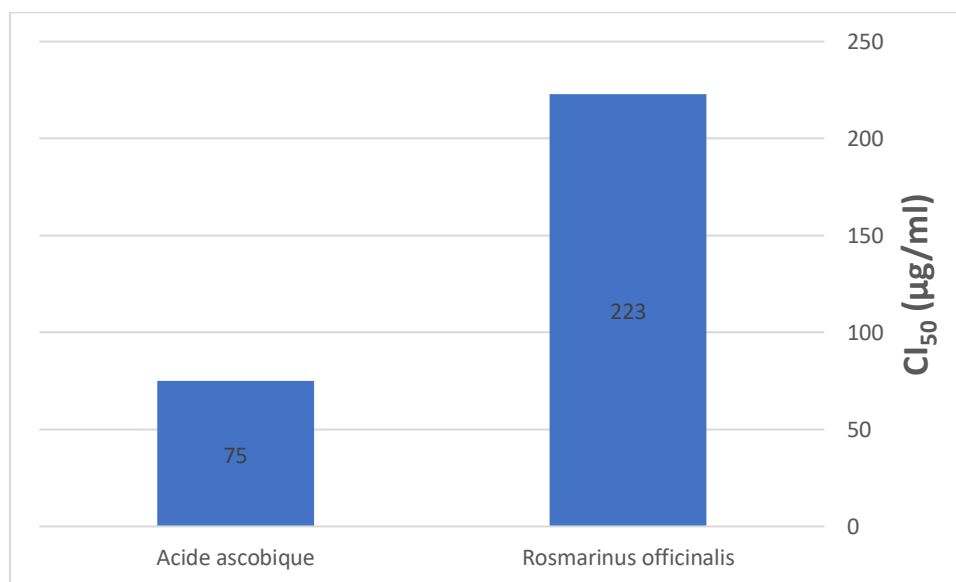


FIGURE 39: concentration d'inhibition de 50 % de l'acide ascorbique et l'extrait de *Rosmarinus officinalis* par le DPPH

Selon les résultats enregistrés, l'extrait hydro-éthanolique est doté d'un pouvoir antioxydant important, CI_{50} est de 223 $\mu\text{g/ml}$ mais relativement grande que celle de l'acide ascorbique utilisé comme le standard dont la valeur est de l'ordre de 75 $\mu\text{g/ml}$.

En comparant nos résultats obtenus à ceux rapporté par (**Fadili et al., 2015**) dont les CI_{50} sont 52,5 $\mu\text{g/ml}$ et 103,86 $\mu\text{g/ml}$ pour l'acide ascorbique et de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* respectivement, nos résultats dont 75 $\mu\text{g/ml}$ et 223 $\mu\text{g/ml}$ du standard de l'acide ascorbique et de l'extrait hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis* sont supérieur ce qui implique que le pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* de (**Fadili et al., 2015**) est plus fort que notre extrait hydro-éthanolique de *Rosmarinus officinalis*.

Une valeur faible d' CI_{50} indique une activité antioxydante forte. 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 hydro-éthanolique des feuilles de *R. officinalis* sont très efficaces comme antioxydants. D'un autre côté, nous notons qu'il y a une corrélation entre la concentration des polyphénols et l'activité antioxydante, ce qui confirme que les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. Ces résultats sont conformes à ceux de plusieurs auteurs qui ont rapporté une telle corrélation positive entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante (**Fadili et al., 2015**).

En effet (**Falleh et al., 2008**) a montré que l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la concentration des polyphénols, mais également de la nature et la structure des antioxydants dans l'extrait. Généralement, les polyphénols ayant un nombre élevé des groupements hydroxyles présentent une activité antioxydante très importante (**Heim et al., 2002 ; Torres et al., 2007**).

6. Mesure du taux de Malon dialdéhyde cytosolique (MDA)

Le MDA est un biomarqueur fiable de l'oxydation de membrane cellulaire et mitochondriale car c'est l'un des produits terminaux de la lipopéroxydation.



FIGURE 40: le milieu réactionnel pour la mesure du taux de MDA avant l'ajout de différentes concentrations de l'extrait de romarin

Les résultats obtenus après la mesure du taux de MDA sont représentés sous forme d'histogramme :

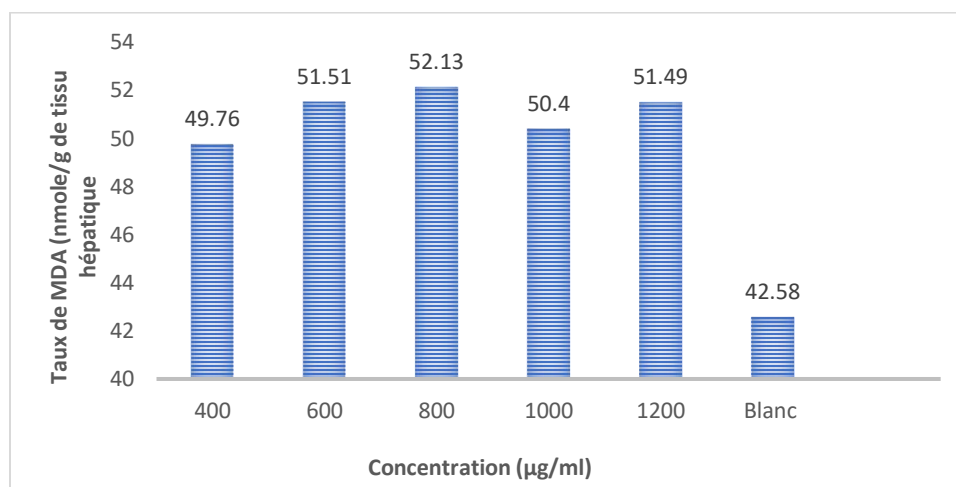


FIGURE 41: variation du taux de MDA moyenne dans le cytosol après l'ajout de différente concentration de l'extrait du romarin et ceux des blancs sans l'extrait du romarin.

L'ajout de différentes concentrations d'extrait brut de *Rosmarinus officinalis* (400, 600, 800, 1000 et 1200) µg/ml a été accompagné d'une augmentation de la peroxydation lipidique qui est exprimé par l'élévation du taux de produit de peroxydation lipidique qui est le malon dialdéhyde mitochondrial (MDA).

Nous avons noté que la plus grande concentration du MDA était avec la concentration 800 µg/ ml de l'extrait.

7. Mesure de la concentration du Glutathion réduit cytosolique (GSH)

La mesure de la concentration du GSH a été réalisée à partir d'une gamme étalon de GSH préparé dans les mêmes conditions que le dosage de GSH dans le cytosol.

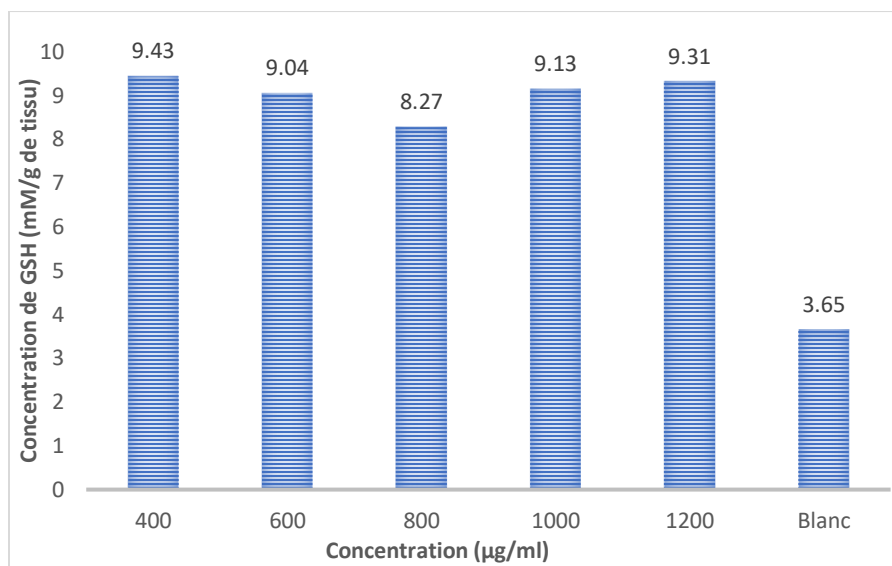


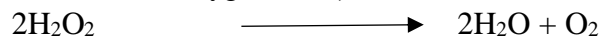
FIGURE 42: variation du taux de GSH moyenne dans le cytosol après l'ajout de différente concentration de l'extrait du romarin et ceux des blancs sans l'extrait du romarin.

L'ajout des concentrations de 400 µg/ml à 800 µg/ml d'extrait brut de *Rosmarinus officinalis* a été accompagné d'une diminution du taux de GSH après, la concentration de GSH à commencer à augmenter par l'ajout des concentrations 1000 µg/ml et 1200 µg/ml.

Nous avons noté que l'ajout de concentration de 800 µg/ml a enregistré la concentration de GSH la plus basse.

8. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase

La catalase est une enzyme responsable de la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 en eau (H_2O) et oxygène (O_2) comme illustré dans l'équation suivante :



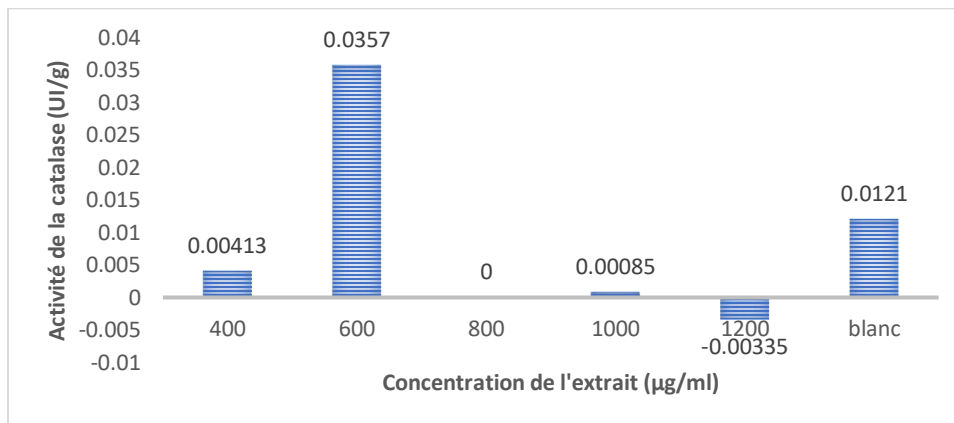


FIGURE 43: variation de l'activité de la catalase moyenne dans le cytosol après l'ajout des différentes concentrations de l'extrait

9. Dosage des protéines totaux dans les cytosols

L'évaluation du taux de protéine totaux a été réalisée à l'aide d'une gamme d'étalon selon la méthode de Bradford en utilisant Bovin serum Albumin (BSA) comme le standard.

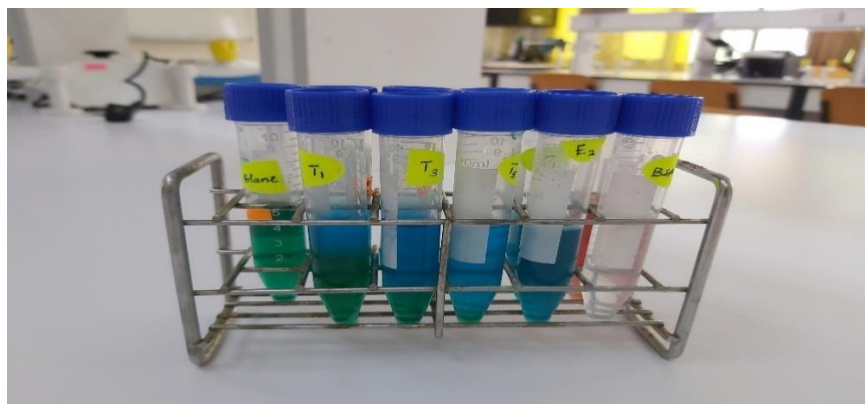


FIGURE 44: dosage des protéines totaux dans les fractions cytosolique des foies

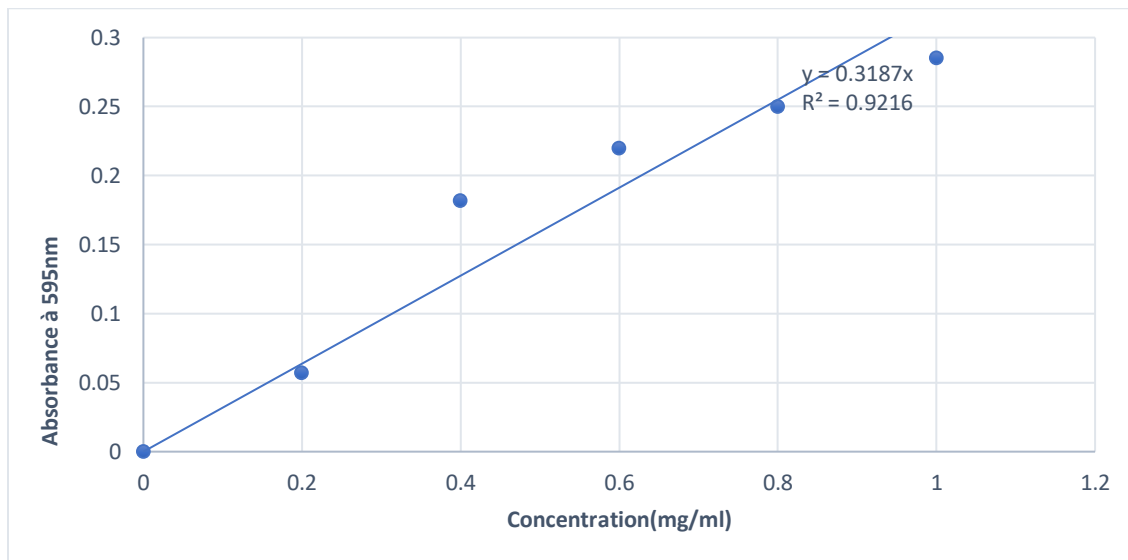


FIGURE 45: courbe d'étalonnage de BSA pour le dosage des protéines totaux.

En utilisant la gamme d'étalon de BSA, les protéines totales sont mesurées dans les fractions cytosoliques des 4 foies. La moyenne des protéines totaux issue des 4 foies a été déduit \pm l'écart type.

Nous estimons que les protéines totales dans les cytosols sont **1.69 ± 1.08 mg/ml**.

Notre résultat illustré sur l'histogramme montre une diminution constante de l'activité de la catalase en fonction des différentes concentrations de l'extrait brut de *Rosmarinus officinalis*.

Parmi les concentrations ajoutées au cytosol, 800 μ g/ml de l'extrait brute montre un effet remarquable, avec l'indication que l'activité de la catalase est à zéro. Nous constatons que la concentration de 800 μ g/ml de l'extrait a un effet d'inhibition totale sur l'activité de la catalase.

Peu de recherches ont été effectuées sur l'activité pro-oxydante en utilisant l'extrait brute du romarin ainsi que les paramètres que nous avons utilisés comme la mesure du taux de MDA, la mesure du taux de GSH et le dosage de la catalase dans le cytosol du foie.

Le malondialdéhyde mitochondrial est présent naturellement dans les tissus, où il est une manifestation du stress oxydant. Il est issu notamment de l'action des dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés (**Herbert, 1996**). Le taux de MDA est directement

proportionnel au stress oxydant qui peut être provoqué par des agents prooxydant (**Firas, 2019**).

Notre résultat illustré sur la **Figure 43** montre aussi une augmentation du taux de MDA dans l'ordre croissant des concentrations de l'extrait du romarin. La concentration de 800 µg/ml a donné un taux de MDA le plus élevé de l'ordre 52.13 nmol/g de tissu. Après l'ajout de concentration de 1000 µg/ml, on a observé une chute du taux de MDA. Pour la concentration 1200 µg/ml le taux du MDA enregistré est approximativement égale à celui de 600 µg/ml. L'augmentation du taux de MDA est une indication du stress oxydatif dans le cytosol causé par la lipoperoxydation qui génère le MDA comme l'un de ces produits terminaux.

La peroxydation des lipides de la membrane plasmique est l'étape biochimique essentielle de la ferroptose, récemment décrite comme une forme de mort cellulaire nécrotique, sélectionné sur sa capacité à tuer les cellules cancéreuses porteuses. Dans les cellules exposées aux inducteurs de ferroptose, des perturbations majeures du métabolisme redox engendrent des altérations de la perméabilité membranaire et une perte de viabilité cellulaire. Une meilleure compréhension de la ferroptose pourrait permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs et des traitements médicaux innovants contre les cancers (**Lachaier et al., 2014**).

Le glutathion réduit est un autre marqueur pris en considération pour évaluer le statut antioxydant. Il joue un rôle multifactoriel dans le mécanisme de la défense antioxydante. Le glutathion est un tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Le glutathion a une forte capacité de donneur d'électrons combinée à une concentration intracellulaire élevée qui lui confèrent un grand pouvoir de réduction, lui permettant de prendre une part active dans la destruction des composés oxygénés réactifs. C'est le principal antioxydant hydrosoluble dans les cellules avec de fortes propriétés enzymatiques (**Shekhar, 2004**).

Notre résultat montre une diminution de la concentration du GSH avec l'ajout dans l'ordre croissant de différentes concentrations de l'extrait de 400 µg/ml à 800 µg/ml. A partir de 1000 µg/ml jusqu'à 1200 µg/ml, on observe une augmentation du taux de GSH.

Le rapport glutathion réduit (GSH) / glutathion oxydé (GSSG) est un excellent marqueur du stress oxydant et de son importance. En effet, le GSH réagit très rapidement avec les ERO pour former le GSSG ; plus la valeur de ce rapport est basse, plus le stress oxydant est élevé (**Haleng et al., 2007**).

Selon **Haleng et al., 2007** une diminution du taux de GSH dans une cellule indique une augmentation du stress oxydatif. En considérant notre résultat, la concentration de l'extrait brute du romarin à 800 µg/ml correspond à la concentration qui donne le taux de stress oxydatif le plus élevé.

Les principales enzymes antioxydantes, telles que le superoxyde dismutase (SOD), plusieurs peroxydases et catalase catalysent une cascade de réactions pour convertir les ERO en plus molécules stables telles que H₂O et O₂. Une molécule de la catalase peut convertir 6 milliards de molécules peroxyde d'hydrogène. La superoxyde dismutase catalyse la dismutation d'anion superoxyde (O₂⁻) à H₂O₂ et O₂. Le taux de cette dismutation enzymatique est d'environ 10 000 fois supérieur au taux spontané. La SOD convertit les anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène sous la forme d'un substrat pour la catalase (**Rahman, 2007**).

Notre résultat montre une augmentation de l'activité de la catalase après l'ajout des concentrations 400 µg/ml et 600 µg/ml de l'extrait brut du romarin et un déclenchement total de l'activité de la catalase à l'ajout de la concentration de 800 µg/ml de l'extrait. Une diminution de l'activité de la catalase a été enregistré après l'ajout des concentrations de 1000 µg/ml et 1200 µg/ml. Au vu des résultats obtenu, la concentration de l'extrait à 800 µg/ml ajouté a inhibé totalement l'activité de la catalase.

L'ensemble de tous les résultats enregistrés montrent que l'extrait brute de *Rosmarinus officinalis* à concentration de 800 µg/ml dessine un effet exceptionnel en favorisant le stress oxydatif.

Une diminution du taux de GSH intracellulaire et une inhibition de l'activité de la catalase, aboutissent sans doute à une élévation du taux du peroxyde d'hydrogène qui à son tour induit la mort cellulaire programmée. Ce principe est exploité par les chercheurs pour induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses. (**Maureen, 2016**) a démontré que les cellules ont été sensibilisé à l'apoptose induite par le H₂O₂. Ce qui a augmenté le niveau d'induction

des trois voies principales de l'apoptose : la mitochondrie, des récepteurs de mort et du réticulum endoplasmique.

Des taux élevés de H₂O₂ peuvent conduire la cellule à une autophagie et des très nombreux travaux rapportent l'induction d'un processus d'autophagie en réponse à diverses thérapies anti-cancéreuses (**Gewirtz, 2014**). L'autophagie a également été décrite comme une barrière à la prolifération des cellules cancéreuses en intervenant dans la dégradation de protéines clés de la division cellulaire telles que la lamine B1 (**Ivanov et al., 2013**).

Selon (**Rahal et al., 2014**), Les prooxydants sont définis comme des substances chimiques qui induisent le stress oxydatif, par la formation de ERO ou par l'inhibition du système antioxydant. En considérant cette définition, l'extrait brute du romarin montre un très bon effet prooxydant à concentration de 800 µg/ml.

En considérant cette définition, l'extrait brute du Romarin semble avoir un bon effet prooxydant à concentration de 800 µg/ml, ce résultat doit être confirmé par le dosage du reste des paramètres du stress oxydatif ainsi que par une étude *in vivo* bien approfondie.

Conclusion

Conclusion

De nos jours, les plantes médicinales sont connues pour leur propriété thérapeutique c'est pourquoi les recherches se sont intensifiées à leur sujet car ils représentent une source indéniable de principe actif.

Notre travail s'est porté sur l'évaluation de l'activité pro-oxydante sur les feuilles du *Rosmarinus officinalis*.

L'extraction hydro-éthanolique des feuilles de romarin nous a permis d'avoir un rendement de 7,84 %. Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en utilisant la méthode de Folin-ciocalteu et le dosage des flavonoïdes totaux par la méthode de $AlCl_3$ nous mène à conclure que la plante de *Rosmarinus officinalis* de la région de Guelma est très riche en polyphénols et flavonoïdes.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, les résultats indiquent que la concentration d'inhibition à 50 % (CI_{50}) de l'extrait brute du romarin est 223 $\mu g/ml$ en utilisant l'acide ascorbique comme le standard. Cette valeur obtenue est très importante comme une activité antiradicalaire de DPPH.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la propriété prooxydante de *Rosmarinus officinalis* qui a montré une activité antioxydante selon plusieurs recherches.

Certaines substances peuvent agir à la fois comme antioxydants à la fois comme pro-oxydants, en fonction d'un ensemble de conditions. Certaines des conditions les plus importantes sont la concentration de la substance chimique et la présence d'oxygène ou les métaux de transition (**Herbert, 1996**).

Nous avons réalisé notre travail par l'augmentation de la concentration de l'extrait du romarin pour chercher son activité prooxydante dans le cytosol par le dosage des marqueurs du stress oxydant (la mesure du taux de MDA, GSH et l'évaluation de l'activité enzymatique de la catalase).

Dans notre réalisation d'étude *in vitro*, nous constatons que l'extrait brute du romarin semble avoir un effet prooxydante à une concentration de 800 $\mu g/ml$. Cet effet a été mis évidence par l'inhibition totale de la catalase ainsi que la production des EROs pour

augmenter le stress oxydant lors de la mesure du taux de GSH et MDA dans le cytosol vis-à-vis l'extrait brute du romarin.

L'effet prooxydant de l'extrait du romarin peut être bénéfique pour lutter contre les tumeurs par l'augmentation du stress dans les cellules tumorales qui peut endommager les cellules tumorales. Cet effet prooxydant est dû à la présence des métabolites secondaire comme les polyphénols et flavonoïdes qui ont montré des effet anti tumorale.

Référence bibliographique

A

- ❖ Adam-Vizi. (2005). Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources
- ❖ Aherne S.A., Kerry J.P. and O'Brien N.M. Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition*, 2007; 97; 321-8
- ❖ Alain Favier (2003, 391–396). Stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Société chimique de France. Mécanisme Biochimique*
- ❖ Alain Favier (2006, Pages 390-396). Stress oxydant et pathologies humaines
- ❖ Alugoju Phaniendra, Dinesh Babu Jestadi et Latha Periyasamy (2015, Volume 30, pages11–26). *Journal indien de biochimie clinique*.
- ❖ Amroune Salah Eddine. (2018).Phytothérapie et Plantes Médicinales. Université des Frères Mentouri Constantine. 66p.
- ❖ Anton R., Lobstein A. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments, et huiles essentielles. Paris et Cachan : Tec&Doc, 2005, 522p
- ❖ Audrey Carrière, Anne Galinier, Yvette Fernandez1, Maria-Carmen Carmona, Luc Pénicaud et Louis Casteilla (2006, 47 – 53). Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species. *Med Sci (Paris)*. Volume 22
- ❖ Aziz (2017) Faculty of Sciences, Cadi Ayyad University : Métabolisme de l'oxygène et production d'espèces d'oxygène réactives (ros)

B

- ❖ Bajpai, V.K.; Kwang-Hyun Baek, K.; Kang, S.C. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food Res. Int.* 2012, 45, 722–734.
- ❖ Béatrice Sjöberg (2013). Oxydation des protéines par les espèces réactives de l'oxygène : l'importance de l'environnement protéique. *Chimie organique*. Université de Franche-Comté

- ❖ Benbot Mourad et Bouali Youcef., Etude des activités biologiques de *Rosmarinus officinalis*-L des régions Ouargla et Ain M'Lila., Université L'Arbi Ben Mhibli-Oum El Bouaghi., Thèse en Biotechnologie Végétale, 2018.
- ❖ Blandine G.,2006., le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par gazeuses (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. Université de Joseph Fourier.
- ❖ Blandine GARAIT (2006). Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire de l'université Joseph Fourier : Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®.
- ❖ Boisvert C., Aucante P. 100 plantes et remèdes naturels : des chemins au jardin. Paris : La Martinière, 2011, 223p.
- ❖ Borrás. L, Arráez-Romána. D, Herrero. M, Ibáñez. E, Segura Carretero. A, Fernández-Gutiérrez. A. (2011). Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 7682– 7690p.
- ❖ Bouthilier L., 2005, statut prooxydant, antioxydant et lipidique chez les pédiatriques avec maladie de Crohn, université de Montréal, pg 31-33.
- ❖ Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4e édition revue et augmentée. Paris : Éd. Tec & doc, 2009, 1269p.
- ❖ Bruno Baudin (2006, p 43-52). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires.

C

- ❖ Cadenas et Davies (2000, p. 222). Free Radical. *Biol. Med.*
- ❖ Cabalion, P., Mazars, G., Dos Santos, J., Younos, C., 23 au 25 mars 1990, Metz, PARfS METZ : ORSTOM SFE, 248-269
- ❖ Camille Migdal et Mireille Serres (2011, 27 : 405–412). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris)*

- ❖ Cerou Sylvia (1994). Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie : Radicaux libres et pathologies humaines, Actualisation et perspective d'avenir
- ❖ Charef Amina, Tadjine Rayane, et Mansouri widad (2019). Mémoire de fin d'étude en Toxicologie : L'intérêt thérapeutique de la plante *Moringa oleifera* ; à l'égard du Diabète et du stress oxydant
- ❖ Claire H., Contribution à l'étude pharmacologique des extraits de *Rosmarinus officinalis* L., et notamment des jeunes pousses : activités cholérétiques, anti-hépatotoxiques, anti-inflammatoires et diurétiques., thèse du doctorat, université de Metz ; pg 120
- ❖ Clémentine POISSON (2013). Thèse de doctorat. Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. Université paris-sud 11. Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué. Pôle : pharmacologie et toxicologie.
- ❖ Collectif. Le grand livre des plantes aromatiques médicinales. Bagnaux : Sélection Reader's Digest, 2010, 398 p.

D

- ❖ David Lambeth (2004, 181–189). Les enzymes NOX et la biologie de l'oxygène réactif
- ❖ Debuigne G., Couplan F., Vignes P., Vignes D. Petit Larousse des plantes médicinales. Paris : Larousse, 2009, 383p.
- ❖ Delmeyda, W., (2001). Méthodes analytiques en chimie instrumentale (site). Chromatographie sur couche mince
- ❖ Denham Harman (1956, 11 : 298-300). Aging : a theory based on free radical and radiation Chemistry. J Gerontol.
- ❖ Direction Européenne de la qualité du médicament et soins de santé (deQm). Pharmacopée Européenne 8.0. Tome I. 8è édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe, 2013, 1568p.
- ❖ Direction Européenne de la qualité du médicament et soins de santé (deQm). Pharmacopée Européenne 8.0. Tome I. 8è édition. Strasbourg : Conseil de l'Europe, 2013, 1568p.

- ❖ Droge W (2002; 82: 47–95). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*

E

- ❖ Edeoga et al., 2005., phytochemical constituent of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology* vol.4(7). 685-688.
- ❖ Edith Antonot et Robert Marchall, *Chromatographie* ; lycée Louis Vincent -Metz, 1998.
- ❖ Eline Padeloup Grenez. (2019). *Phytothérapie - exemples de pathologies courantes à l'officine : Fatigue, Insomnie, Stress, Constipation, Rhume, Douleur et Inflammation.* Université de Lille. 141p
- ❖ ERKAN N, AYRANCI G and AYRANCI E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* Vol 110. (2008). pp.76-82.
- ❖ Eugenia Belcastro (2016). Thèse de doctorat en Sciences de la vie et de la santé : Inflammation et stress oxydant dans l'athérosclérose : rôle dans les réponses vasculaires des S-nitrosothiols. Université de lorraine
- ❖ Evans WJ (2000) Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 72, 647S-652S.

F

- ❖ F. Michel, Bonnefont-Rousselot, E. Mas J. Draï et P. Thérond (2008, 605-617). Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Ann Biol Clin*
- ❖ Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies.* 331: 372-379. 2008.
- ❖ Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies.* 331: 372-379. 2008.
- ❖ Faucon M. *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : fondements & aide à la prescription : monographies : huiles essentielles, huiles végétales, hydrolats aromatiques.* Paris : Sang de la Terre et Médical, 2012, 879p.

- ❖ Fernandez X., Chemat F., Do T.K.T. Les huiles essentielles : vertus et applications. Paris : Vuibert, 2012, 159p
- ❖ FLEURENTIN, J, JOYEUX, M., 1990, [es tests in vivo et in vitro dans l'évaluation des propriétés anti-hépatotoxiques de substances d'origine naturelle, in le colloque européen d'ethnopharmacologie, Sources, Méthodes, Objectifs, FLEURENTIN, J.,

G

- ❖ Giedrė Kasparavičienė, Kristina Ramanauskienė , Arūnas Savickas , Saulė Velžienė , Zenona Kalvėnienė , Daiva Kazlauskienė , Ona Ragažinskienė , Kostas Ivanauskas., Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of different *Rosmarinus officinalis* L. ethanolic extracts., *BIOLOGIJA*. 2013. Vol. 59. No. 1. P. 39–44
- ❖ González-Trujano, M., Peña, E., Martínez, A., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Déciga-Campos, M., & López-Muñoz, F. (2007). Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of ethnopharmacology*, 111(3), 476-482.
- ❖ Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000 ; 494–501). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*
- ❖ Grimble R.F. Nutritional influences on inflammation. In Bistrian B.R., Walker-Smith J.A., eds. *Nestlé Nutrition Workshop Series Clinical and Performance Programme* 1999; 2: 63-81.
- ❖ Guillaume F. Combes, François-Xavier Pelly et Miroslav Radman (2020). Cause commune et mécanisme commun aux maladies du vieillissement ? *médecine/sciences, EDP Sciences*
- ❖ Gurib-Fakim A. Novel plant bioresources: applications in food, medicine and cosmetics. Chichester, West Sussex : Wiley Blackwell, 2014, 528 p.
- ❖ Gutteridge JM (1994 ; 91 : 133–40). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*

H

- ❖ Halliwell et Gutteridge (2015). *Free radicals in biology and medicine, 2e ed. Oxford, UK : Clarendon*

- ❖ Hamida JDIR (2013). Thèse de doctorat en sciences biologiques : Diplotaxis simplex : Etudes phyto-chimiques, propriétés biologiques et application alimentaire
- ❖ Heim, K-E., Tagliaferro, A-R., Bobilya, D-J. Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 13: 572–584. 2002.
- ❖ Heyworth PG, Cross AR et Curnutte JT (2003, 578 – 584) Maladie granulomateuse chronique. *Curr Opin Immunol* 15.
- ❖ Hiroshi ohkawa, Nobuki ohishi, Kuhio Yagi; Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbuturic acid reaction; *Analytical biochemistry* 95, P 351-358., 1979.
- ❖ HO S.C, TSAI T.H, TSAI P.J and LIN C.C. Protective capacities of certain spices against peroxynitrite-mediated biomolecular damage. *Food and Chemical Toxicology*. Vol 46 (2008). pp.920-928.
- ❖ Hydroxyl radicals and DNA base damage

I

- ❖ Iris S., 2011_Encyclopédie essentielle des plantes médicinales. Pg 10.

J

- ❖ J Cadet, T Delatour, T Douki, D Gasparutto, J P Pouget, J L Ravanat, S Sauvaigo (1999, p1-2). Hydroxyl radicals and DNA base damage
- ❖ J Pincemail, M Meurisse, R Limet, JO Defraigne (1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer
- ❖ J. Delattre, M. Gardès, D. Jore (2001, 375-376). Stress oxydant et diabète sucré. Laboratoire de Biochimie Métabolique et Clinique, Faculté de Pharmacie, Université Paris
- ❖ J. Haleng, J. Pincemail, J.O. Defraigne, C. Charlier, J.P. Chapelle (2007, 62 : 10 : 628). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*
- ❖ Jean Cadet, Thierry Delatour, Thierry Douki, Didier Gasparutto, Jean-Pierre Pouget Jean-Luc Ravanat et Sylvie Sauvaigo (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage
- ❖ Jonatas R. et al., 2019. Rosmarinus officinalis as a therapeutic and prophylactic agent. Doi.org/10.1186/s12929-019-0499-8

K

- ❖ Kamal FADILI, Smail AMALICH, Soro K. N'DEDIANHOU, Mohammed Bouachrin , Malika MAHJOUBI , Fatima EL HILALI , and Touria ZAIR., Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc: Rosmarinus Officinalis et Thymus Satureioide., International Journal of Innovation and Scientific Research,. 2015.
- ❖ Karumi et al., 2004., Identification of active principles of Balsamina(Balsam Apple) leaf extract. J.med sci.: 179-182.
- ❖ Kim D.,2018, Diabète et stress oxydant ; Aix-Marseille Université, Thèse de doctorat ;pg 30-31
- ❖ Klein J.A., Ackerman S.L., J. Clin. Invest., 2003, 111, p. 785.
- ❖ Korshunov, S.S.; Skulachev, V.P.; Starkov, A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. FEBS Lett. 416, 15-18; 1997.
- ❖ Kozi Asada (2006). Reactive Oxygen Species: Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology*,

L

- ❖ 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
- ❖ Leplat M.,2017. Romarin, Rosmarinus officinalis une Lamiacée médicinale de la région de la garrigue provençale. Université de Aix- Marseille.

M

- ❖ Magder S (2006, Vol 10, pp. 208-216). Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life. *Critical Care Med Journal*
- ❖ Mahmoudi, S., Khali, M., Mahmoudi, N., (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, 35.

- ❖ Majhenic L., Kerget M-S., et Knez Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*. 104, 1258–1268.
- ❖ Makhloufi. A. (2012). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Université Aboubaker Belkaid. 166p
- ❖ Mansouri.F, Messabhia. H. (2018). Etude de l'effet larvicide de l'extrait hydroalcoolique de *Rosmarinus officinalis* à l'égard de *Culex pipiens*. Université Larbi Ben M'Hidi Oum El Bouaghi. 69p.
- ❖ Matés J.M., Pérez-Gomez C., Nunez De Castro I., Antioxydant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999 ; 32(8) ; 595- 603.
- ❖ Michelle Démarchez (2012). Vieillesse de peau : le stress oxydant cutané. *Biologie de la peau*
- ❖ Mohamed Amine BOUZID (2014). Exercice physique, marqueurs antioxydants et peroxydation lipidique : effets de l'âge et du niveau d'aptitude physique. Université de Lille2 : École Doctorale 446 Biologie Santé Lille Nord de France. Thèse de doctorat en physiologie
- ❖ Mohammed et al. Antioxidant and antiproliferative activities of bioactive compounds contained in *Rosmarinus officinalis* use in the mediterranean diet; 2019; <https://doi.org/10.1155/2019/7623830>.
- ❖ Monique Gardès-Albert, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh et Daniel Joreet (2003, pp 59-81) Radicaux libres et anti-oxydants. In : *Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires. Médecine-sciences. Flammarion (Ed). Paris,*

O

- ❖ Outaleb Ayacha (2013). Quelques plantes médicinales de la région de Bejaia utilisées en médecine traditionnelle pour traiter les pathologies hépatiques. Mémoire de fin de cycle Filière : Biologie Moléculaire Option : biochimie

P

- ❖ P. Therond (2006). Stress oxydant Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant
- ❖ Pierre L., 2016, les composants du stress oxydants et les radicaux libres, DOI 10.3917/heg.062.0218.
- ❖ Podsedek, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. LWT. 40:1-11. 2007.
- ❖ Pourrut Bertrand (2008). Thèse de Doctorat en Ecotoxicologie de l'université de Toulouse : Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*

R

- ❖ Regnault-Roger C., Fabres G., Philogène Bernard J.R. Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Paris : Ed. Tec & Doc, 2008, 1013 p.
- ❖ Rocha J., Eduardo-Figueira M., Barateiro A. et al. Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2015 ; 116(5) ; 398-413
- ❖ Rodriguez J.O., Ucelli S.P., Lima G.D. et al. Evaluation of in vitro antiinflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO2 extraction on macrophage and tumor cell line the influence of vehicle type. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2015 ; 15 ; 390-405
- ❖ Rufino, A.T., Ribeiro, M., Sousa, C., Judas, F., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Mendes, A.F., 2015. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of E-caryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. *Eur. J. Pharmacol.* 750, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.018>
- ❖ Rutkay. A, UÇAR. E, GÜRSOY. Ö. (2020). Investigation of Salt Stress in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with the Remote Sensing Technique. *Türkiye TarımsalAraştırmalarDergis*.7(2). 120-127p

- ❖ Rutkowski R, Pancewicz SA, Rutkowski K, Rutkowska. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process. *Pol Merkur Lekarski*. 23: 131-136 (2007, p. 131-136).

S

- ❖ S. Athamena, S. Laroui, M. Athamena., PHENOLIC COMPOSITION, ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Rosmarinus officinalis*., Sciences & Technologie N°41 Juin (2015), pp.21-30.
- ❖ S. Naveau (2009). Hépatite alcoolique aiguë. Université Paris 11, Service d'hépatologie et de gastroentérologie.
- ❖ SANAGO R., 2006 _ Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université de Bamako
- ❖ Schneider A. Arbres et arbustes thérapeutiques : les connaître, les protéger, les utiliser. Montréal : Ed. De l'Homme, 2002, 384p.
- ❖ Silva A.M., Machado I.D., Santin J.R. et al. Aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* L. inhibits neutrophil influx and cytokine secretion. *Phytotherapy Research*, 2015; 29; 125-33
- ❖ Sorescu D, Szocs K, Griendling KK (2001; 11-124). NAD(P)H oxidases and their relevance to atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*
- ❖ Staub H., Bayer L. Traité approfondi de phyto-aromathérapie : avec présentation de 750 huiles essentielles connues. Paris : Grancher, 2013, 685p. (Collection : Le Corps et l'esprit (Paris. 1997)
- ❖ Stéphane Jaisson, Aurore Desmons, Laëticia Gorisse et Philippe Gillery (2013). Vieillesse moléculaire des protéines. Université de Reims Champagne-Ardenne, Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire

T

- ❖ TAWAHA K, ALALI F.Q, GHARAIBEH M, MOHAMMAD M and ELELIMAT T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem*. (2007) (in press)

- ❖ Teixeira, B.; Marques, A.; Ramos, C.; Neng, N.R.; Nogueira, J.M.F.; Saraiva, J.A.; Nunes, M.L. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Ind. Crops Prod.* 2013, 43, 587–595.
- ❖ Théron P. et D. Bonnefont-Rousselot. 2005., systèmes antioxydants endogènes. In radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Edited by Lavoisier.
- ❖ Tony Ashton, Christopher C. Rowlands, Eleri Jones, Ian S. Young, Simon K. Jackson, Bruce Davies & John R. Peters et al, (1998, 498–502). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in Human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol*
- ❖ Tornuk, F.; Cankurt, H.; Ozturk, I.; Sagdic, O.; Bayram, O.; Yetim, H. Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on fresh cut carrots and apples. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 148, 30–35
- ❖ Torres de pinedo, A., Pen alver, P., Morales, J.C. Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant : structureactivity relationship. *Food Chemistry*, 103 :55-
- ❖ Trachootham D., W. Lu, M. A. Ogasawara, R. D. Nilsa et P. Huang, 2008. Redox regulation of cemm survival. *Antioxid Redox signal* 10(8): 1343-74.
- ❖ TSAI P, TSAI T and HO S. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chem.* (2007) (in press)
- ❖ TSAI P, TSAI T and HO S. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chem.* (2007) (in press).

W

- ❖ Wichtl M., Anton R., Lassechere-Bernard M. *Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique.* 2e éd. Française (4e éd. Allemande). Paris : Tec [et] Doc, 2003, 692p.

Y

- ❖ Yosr Zaouali ; Taroub Bouzaine ; Mohamed Boussaid; Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology* 48, 3144–3152. 2010

Z

- ❖ Zaouali, Y.; Bouzaine, T.; Boussaid, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem. Toxicol.* 2010, 48, 3144–3152.