

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Mohammed Seddik Ben Yahia - Jijel -
جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل -

Faculté des Sciences
Exactes et informatique
Département : Chimie



كلية العلوم الدقيقة والاعلام الالي
قسم الكيمياء

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master en chimie

Option

Chimie Pharmaceutique

Thème

**Etude phytochimique et biologique des métabolites secondaires
et des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis L.* de la
région de Jijel**

Réalisé par : **BAKIR Sara & BOUAMOUCHE Khawla**

Membres de jury :

Mme BOUIDER	Nafila	M.C.B	Présidente
Mr BOUHEDJA	Mourad	M.C.B	Examineur
Mme BOUNAR	Haniya	M.C.B	Promotrice

Année universitaire 2021/2022

Remerciements

En premier lieu nous tenons à remercier le bon dieu de nous avoir donné le courage et la foi pour la réalisation de ce travail.

*Nous adressons nos remerciements à notre promotrice **Mme H. BOUNAR** pour avoir encadré et orienté ce travail en nous faisant bénéficier de ses connaissances et ses conseils. Qu'elle trouve ici nos sentiments de gratitude et de reconnaissance.*

*Nos très vifs remerciements vont aussi à **Mme N. BOUIDER** pour l'honneur qu'elle nous fait en présidant le jury de notre mémoire.*

*Nous remercions également **Mr M. BOUHEDJA** d'avoir accepté de se joindre à ce jury comme examinateur.*

*Notre plus grand merci s'adresse à **Mr O. BOUKROUCHE**, Directeur du laboratoire des analyses médicales, pour sa générosité, et son accueil au sein de laboratoire en nous mettant dans d'excellentes conditions de travail.*

Nous désirons aussi remercier tous le personnel du laboratoire de chimie et de biologie, qui ont participé par leur disponibilité, leur gentillesse et leur aide chaque jour.



Dédicace

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

A mes chers parents, pour leur amour et leurs encouragements durant toutes mes années d'études. Que Dieu le tout puissant les garde pour moi.

*A mes chères sœurs **Djihane** et **Aya***

*A mon petit frère **Aymen***

*A mon binôme **Khawla***

*A mes amis **Cheima, Madjeda, Rayane** et **Mima***

*A mes cousins et mes cousines surtout **Amdjed** et **Selma***

A toute ma grande famille

*A mes collègues d'études plus particulièrement **Nouha** et **Djihane** et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit réalisé.*

Sara



Dédicace

Je dédie ce mémoire de fin d'étude à:

L'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect: mon cher père Abde lhak que dieu lui fasse miséricorde... j'espère que son âme repose en paix et qu'il me regarde avec fierté.

La femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse: ma chère mère Hayat que dieu te garde et te donne une longue vie pour que tu puisses bénéficier d'avantage des fruits de tant d'années des sacrifices.

Mes sœurs Nesrine, Amina, Loubna, plus particulièrement ma petite sœur Ines qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille, que dieu leur garde et leur donne une longue et joyeuse vie.

A mes nièces et neveux : Anes, Djawad, Ziad, Yahia et Yasmine.

Mes grands-mères et mes grands- pères, que dieu leur fasse miséricorde. Mes oncles, mes tantes et mes cousines, plus particulièrement yousra et rayane, que dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

Ma chère amie et binôme: Sarah, pour sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail.

Mes chères copines Cheima, Rayane, Madejda et Yousra pour leur existence.

Tous mes collègues, plus particulièrement Djihane et Nouha, pour les merveilleux souvenirs que nous avons partagés ensemble.

Tous nos professeurs qui nous ont enseigner et Tous le personnel du laboratoire sans exception.

Tous ceux qui me connaissent et qui m'ont encouragé de près ou de loin.

Khawla

Table des matières

Remerciement.....	i
Dédicaces.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	x
Liste des schémas.....	xiii
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des abréviations.....	xvi
Introduction générale.....	1
Références bibliographiques.....	3

Première Partie : Recherche Bibliographique

Chapitre I : *Rosmarinus officinalis L*

I.1. Généralités.....	4
I.2. Espèce.....	4
I.3. Dénominations internationales.....	4
I.4. Caractéristiques systématiques.....	5
I.5. Description botanique.....	5
I.6. Distribution géographique.....	6
I.7. Composition chimique.....	6
I.8. Utilisation médicinale et traditionnelle.....	7
I.9. Usage et propriétés thérapeutiques.....	7
Références bibliographiques.....	9

Chapitre II : Les métabolites secondaires

II.1. La phytothérapie et les plantes médicinales	10
II.2. Les éléments actifs des plantes médicinales.....	10
II.3. Les métabolites secondaires.....	10

II.4. Classification des métabolites secondaires.....	10
II.4.1. Les composés phénoliques.....	11
II.4.1.1. Classification des composés phénoliques.....	11
II.4.1.2. Localisation des composés phénoliques.....	14
II.4.1.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques des composés phénoliques....	14
II.4.2. Les composés terpéniques.....	15
II.4.2.1. Classification des composés terpéniques.....	15
II.4.2.2. L'aromathérapie et les huiles essentielles.....	16
II.4.2.3. Localisation des huiles essentielles.....	16
II.4.2.4. Composition chimique des huiles essentielles.....	17
II.4.2.5. Propriétés biologiques et pharmacologiques des huiles essentielles.....	17
II.4.3. Alcaloïdes.....	18
II.4.3.1. Définition.....	18
II.4.3.2. Classification des alcaloïdes.....	18
II.4.3.3. Localisation des alcaloïdes.....	19
II.4.3.4. Les propriétés biologique et pharmacologique des alcaloïdes.....	19
Références bibliographiques.....	20

Chapitre III : Les activités biologiques

III.1. L'activité antioxydante.....	23
III.1.1. Définition d'un radical libre.....	23
III.1.2. La production des radicaux libre.....	23
III.1.3. Le stress oxydant.....	24
III.1.4. Rôles physiologiques des radicaux libres.....	24
III.1.5. Les antioxydants.....	25
III.1.5.1. Définition.....	25
III.1.5.2. Les systèmes de défense des antioxydants.....	25

III.1.5.3. Les différentes localisations cellulaires des antioxydants.....	26
III.1.5.4. Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante.....	26
III.2. L'activité antimicrobienne.....	30
III.2.1. Définition d'une bactérie.....	30
III.2.2. Classes des bactéries.....	30
III.2.3. Description des souches bactériennes étudiées.....	31
III.2.4. Définition d'un Champignon.....	31
III.2.5. Champignon étudié.....	31
III.2.6. Les antibiotiques.....	32
III.2.6.1. Définition.....	32
III.2.6.2. Mode d'action des antibiotiques.....	32
III.2.6.3. Résistance.....	33
III.3. L'activité anti-inflammatoire.....	33
III.3.1. Inflammation.....	33
III.3.2. Inflammation bénéfique ou néfaste.....	33
III.3.3. Types d'inflammation.....	34
III.3.4. Le déroulement de la réaction inflammatoire.....	34
III.3.5. Médiateurs de l'inflammation.....	35
III.3.6. Anti-inflammatoires.....	36
III.3.6.1. Définition.....	36
III.3.6.2. Types d'anti-inflammatoires.....	37
III.3.7. L'évaluation de l'activité Anti-inflammatoire.....	38
Références bibliographiques.....	40

Deuxième Partie: Travaux personnels

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

IV.1. Matériel végétal.....	45
IV.1.1. Le moment de récolte.....	45
IV.1.2. Détermination de la teneur en eau.....	45
IV.2. Etude chimique.....	46
IV.2.1. L'étude des huiles essentielles.....	46
IV.2.1.1. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	46
IV.2.1.2. Détermination du rendement en huiles essentielles.....	47
IV.2.1.3. Contrôle de qualité des huiles essentielles.....	48
IV.2.2. L'étude des métabolites secondaires	48
IV.2.2.1. Extraction des métabolites secondaires (extraction solide/ liquide).....	48
IV.2.2.2. Détermination des rendements d'extraction des métabolites secondaires	48
IV.3. L'analyse qualitative et quantitative des extraits	50
IV.3.1. Screening phytochimiques.....	50
IV.3.2. Dosage des polyphénols totaux.....	51
IV.3.3. Dosage des flavonoïdes totaux.....	52
IV.4. Les activités biologiques.....	53
IV.4.1. L'activité antioxydante.....	53
IV.4.1.1. Test au DPPH.....	54
IV.4.1.2. Test de l'ABTS.....	56
IV.4.1.3. Test de la réduction du fer (FRAP)	58
IV.4.1.4. Test de H ₂ O ₂	61
IV.4.1.5. Test de PPM.....	62
IV. 4.2. L'activité antimicrobienne.....	62
IV.4.2.1. L'activité antibactérienne.....	62

IV.4.2.2. L'activité antifongique.....	64
IV.4.3. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire par la méthode de la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC).....	65
Références bibliographiques.....	68

Chapitre V: Résultats et Discussion

V.1. Détermination de la teneur en eau du matériel végétal.....	71
V.2. Extraction des huiles essentielles.....	71
V.2.1. Rendement d'extraction.....	71
V.2.2. Contrôle de qualité des huiles essentielles.....	72
V.3. Extraction des métabolites secondaires.....	72
V.4. L'analyse qualitative et quantitative des extraits.....	73
V.4.1. Screening phytochimiques.....	73
V.4.2. Dosage des polyphénols totaux.....	76
V.4.3. Dosage des flavonoïdes totaux.....	78
V.5. Les activités biologiques.....	79
V.5.1. L'activité antioxydante.....	79
V.5.1.1. Test au DPPH.....	80
V.5.1.2. Test de l'ABTS.....	82
V.5.1.3. Test de FRAP.....	84
V.5.1.4. Test de H ₂ O ₂	86
V.5.1.5. Test de PPM.....	89
V.5.1.6. Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux.....	92
V.5.2. L'activité antimicrobienne.....	93

V.5.2.1. L'activité antibactérienne.....	93
V.5.2.2. L'activité antifongique.....	95
V.5.3. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire par la méthode de la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC).....	96
Références bibliographiques.....	101
Conclusion et Perspectives.....	104
Annexes.....	xviii

Liste des figures

Figure I.1: <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	4
Figure I.2: Rameaux feuillés à fleurs de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	6
Figure II.1: Structure de base des flavonoïdes.....	13
Figure II.2: Structures de base des principaux flavonoïdes.....	13
Figure II.3: Structure de base de l'isoprène.....	15
Figure II.4: Structure de pyridine.....	18
Figure II.5: Structure de coïne.....	18
Figure II.6: Structure de mescaline.....	19
Figure III.1: Principales étapes de formation des espèces réactives oxygénées (ERO).....	23
Figure III.2: Sites d'action des nutriments et des enzymes antioxydantes.....	26
Figure III.3: Les parois cellulaires des bactéries Gram positif et Gram négatif.....	30
Figure III.4: Mode d'action des antibiotiques.....	33
Figure III.5: structure de diclofénac.....	37
Figure III.6: structure de rofécoxib.....	37
Figure III.7: structure de prednisone.....	38
Figure IV.1: Carte géographique de la région Ouled Bounar – Jijel.....	45
Figure IV.2: La structure de l'acide gallique.....	51
Figure IV.3: Structure de la quercétine.....	52
Figure IV.4: Piégeage du radical libre DPPH'.....	54
Figure IV.5: Réduction du radical cation ABTS ^{•+}	56
Figure IV.6: Réduction des ions ferriques (FRAP).....	59
Figure V.1: Graphique représentatif du taux d'humidité et la matière sèche (MS) de <i>Rosmarinus officinalis</i>	71
Figure V.2: Rendements des extraits de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i>	73
Figure V.3: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	77
Figure V.4: Teneurs en polyphénols des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i>	77

Figure V.5: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	78
Figure V.6: Teneurs en flavonoïdes des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i>	79
FigureV.7: Représentation graphique des pourcentages d'inhibition de radical DPPH en présence des extraits et d'acide ascorbique.....	81
FigureV.8: Histogramme représente l'activité antioxydante exprimée en IC ₅₀ des extraits vis-à-vis le radical DPPH.....	81
FigureV.9: Représentation graphique des pourcentages d'inhibition de radical ABTS en présence des extraits et d'acide ascorbique.....	83
FigureV.10: Histogramme représente l'activité antioxydante exprimée en IC ₅₀ des extraits vis-à-vis le radical ABTS.....	84
FigureV.11: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test FRAP.....	85
FigureV.12: Variation du pouvoir réducteur des extraits en fonction de la concentration.....	85
FigureV.13: Pouvoir réducteur des différents extraits.....	86
FigureV.14: Représentation graphique de la diminution de la concentration de H ₂ O ₂ en fonction de la concentration des extraits et de l'acide ascorbique.....	87
FigureV.15: Représentation graphique des pourcentages d'inhibition de H ₂ O ₂ en présence des extraits et d'acide ascorbique.....	88
FigureV.16: Histogramme représente l'activité antioxydante exprimée en IC ₅₀ des extraits vis-à-vis le H ₂ O ₂	89
FigureV.17: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test PPM.....	90
FigureV.18: Variation de la capacité antioxydante totale des extraits en fonction de la concentration.....	90
FigureV.19: La capacité antioxydante totale des différents extraits.....	91
FigureV.20: Corrélation entre l'activité antiradicalaire et les teneurs en polyphénols totaux des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i>	92
FigureV.21: Représentation graphique des pourcentages de protection de la membrane HRBC en présence des extraits, d'HE et de l'Aspirine.....	98
FigureV.22: Activité anti-hémolytique des extraits phénoliques, d'HE et de	

l'aspirine.....	99
FigureV.23: corrélation d'activité anti-hémolytique et contenu en polyphénols.....	99

Liste des schémas

Schéma III.1: Les différents systèmes de défense des antioxydants.....	25
Schéma III.2 : La réaction inflammatoire schématisée.....	35
Schéma III.3 : mécanismes d'action des anti-inflammatoires.....	38
Schéma IV.1: Les étapes d'extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation..	47
Schéma IV.2: Différentes étapes de l'extraction des métabolites secondaires.....	49
Schéma IV.3: Protocole du dosage des polyphénols totaux.....	52
Schéma IV.4: Protocole du dosage des flavonoïdes totaux.....	53
Schéma IV.5: Protocole de la mise en œuvre du test du radical DPPH.....	55
Schéma IV.6: Protocole de la mise en œuvre du test de l'ABTS.....	58
Schéma IV.7: Protocole de la mise en œuvre du test de FRAP.....	60
Schéma IV.8: Protocole de la mise en œuvre du test de H ₂ O ₂	61
Schéma IV.9: Protocole de la mise en œuvre du test de PPM.....	62
Schéma IV.10: Protocole d'aromatogramme.....	64
Schéma IV.11: Protocole de stabilisation de la membrane des globules rouges humains.....	67

Liste des tableaux

Tableau I.1: Caractéristiques systématiques de la plante <i>Rosmarinus officinalis</i> L...	5
Tableau I.2: Description botanique de la plante <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	5
Tableau I.3: Constituants chimiques de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	6
Tableau I.4: Composants majoritaires d'huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	7
Tableau II.1: Classification des polyphénols.....	11
Tableau II.2: Classification des terpénoïdes.....	15
Tableau III.1: Mécanismes réactionnels de quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	27
Tableau III.2 : Avantages et inconvénients de quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	27
Tableau III.3: Résumé succinct des effets biologiques et origines des principaux médiateurs de l'inflammation.....	36
Tableau IV.1: Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.....	63
Tableau V.1: Rendement d'extraction des huiles essentielles.....	71
Tableau V.2: Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	72
Tableau V.3: Couleurs et rendements en % des extraits secs de la plante.....	72
Tableau V.4: Criblage phytochimique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	74
Tableau V.5: Teneur en polyphénols des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i>	77
Tableau V.6: Teneur en flavonoïdes des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i>	79
Tableau V.7: Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en IC ₅₀ des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i>	81
Tableau V.8: Activité anti-radicalaire (ABTS) exprimée en IC ₅₀ des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i>	83
Tableau V.9: Pouvoir réducteur des différents extraits testés.....	86

Tableau V.10: Activité anti-radicalaire (H ₂ O ₂) exprimée en IC ₅₀ des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i>	88
Tableau V.11: La capacité antioxydante totale des différents extraits testés.....	91
Tableau V.12: Résultats du test antibactérien des quatre extraits et de l'HE.....	94
Tableau V.13: Résultats du test antifongique des quatre extraits et de l'HE.....	96
Tableau V.14: Activité anti-hémolytique exprimée en EC ₅₀ des extraits, d'HE et de l'aspirine.....	98

Liste des abréviations

Abs	Absorbance.
ABTS	Acide 2,2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-dihydrochloride 6-sulfonique.
AcOEt	Acétate d'éthyle.
ADN	Acide désoxyribonucléique.
AFNOR	Association Française de Normalisation.
AINS	Anti-inflammatoires non-stéroïdiens.
AIS	Anti-inflammatoires stéroïdiens
ARN	Acide ribonucléique.
BSA	Bovine Serum Albumin.
CAT	La capacité antioxydante totale.
D	Diamètre.
DMSO	Diméthylsulfoxyde.
DPPH	1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl.
EC₅₀	Concentration efficace 50%.
ERO	Espèces réactives oxygénées
ET	Transfert d'électrons
FRAP	Ferric reducing antioxydant power
GC	Les glucocorticoids.
H %	Taux d'humidité exprimé en pourcentage.
H	Heure.
HAT	Transfert d'atome d'hydrogène
HE(s)	Huile(s) essentielle(s).
HRBC	Human red blood cell
I%	Pourcentage d'inhibition.
IC₅₀	Concentration inhibitrice 50.

mg EAA/g EXS	Milligramme équivalent de l'acide ascorbique par gramme de l'extrait sec.
mg GAE/g EXS	Milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec.
mg EQ/g EXS	Milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec.
mg EAG /g MS	Milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche.
mg EQ /g MS	Milligramme équivalent de la quercétine par gramme de la matière végétale sèche.
MH	Muller Hinton
min	Minute.
ml	Millilitre.
mM	Millimolaire.
mm	Millimètre.
PPM	Phosphomolybdate.
PR	Pouvoir réducteur.
TP	Teneurs en polyphenols.
°C	Degré Celsius.
µg	Microgramme.
µl	Microlitre.
µm	Micromètre.
%	Pourcentage.

Introduction générale

Introduction générale

La recherche des substances naturelles à activité pharmacologique connaît depuis quelques années une importance progressive, et elle suscite de plus en plus l'intérêt des scientifiques, les plantes étant considérées comme une source importante de ces substances.

La flore mondiale comprend environ 390 800 espèces. Jusqu'à présent, moins de 10 % des plantes ont été étudiées en terme de recherche de substances potentiellement thérapeutiques et le nombre de molécules bioactives issues du monde végétal qui restent encore à découvrir est inestimable ^{[1][2]}.

Les régions tempérées telles que la région méditerranéenne sont caractérisées par la richesse et la diversité de leur flore. Les Lamiacées ou Labiacées constituent une famille distribuée dans le monde entier, mais la région méditerranéenne offre le meilleur exemple de la grande diversité de cette famille ^[3]. Cette famille présente un intérêt qui se manifeste par des applications variées. Dans le domaine de la parfumerie, elle est une importante source d'huiles essentielles, telles que : celles des fleurs de la menthe (*Mentha*), de la lavande (*Lavandula*) et du patchouli (*Pogostemon*). Dans le domaine agroalimentaire, elle renferme de nombreuses herbes et condiments qui sont importants pour notre alimentation, telles que : le basilic (*Ocimum basilicum*), le romarin (*Rosmarinus officinalis*), le thym (*Thymus vulgaris*) ^[4] ^[5].

Dans ce travail nous nous sommes intéressées à une étude de l'espèce *Rosmarinus officinalis* L. récoltée de la région de Jijel.

Nous discuterons dans le cadre de ce travail les études phytochimiques et pharmacologiques de cette espèce, en se basant sur l'extraction de son huile essentielle, l'isolement des métabolites secondaires, l'évaluation de l'activité biologique des extraits, ainsi que de son huile.

L'étude phytochimique a été réalisée au laboratoire de Chimie Organique, Faculté des sciences exactes Université de Jijel.

Une partie des activités biologiques a été étudiées au laboratoire d'analyses médicales Dr Boukrouche Oussama Jijel.

Les résultats de cette étude seront présentés sous forme d'une introduction et cinq chapitres :

Le premier chapitre présente une revue bibliographique sur la famille des Lamiacées, le genre *Rosmarinus* et l'espèce *Rosmarinus officinalis L.*

Le deuxième chapitre présente une revue sur les métabolites secondaires.

Le troisième chapitre présente l'étude des méthodes d'évaluation des activités biologiques.

Le quatrième chapitre est consacré aux travaux personnels concernant l'étude phytochimique : qui comprend l'extraction, le fractionnement des extraits, le screening phytochimique, le dosage des flavonoïdes et des polyphénols et l'étude des activités biologiques qui traite l'activité antioxydante, l'activité antibactérienne et l'activité anti inflammatoire.

Le cinquième chapitre reporte la discussion des résultats obtenus de l'étude phytochimique et de l'évaluation des activités biologiques des extraits et l'huile essentielle.

Une conclusion générale clôturera la présentation de ce travail.

Références bibliographiques

- [1] Chapman, A. D. (2009). Numbers of living species in Australia and the world.
- [2] Abraham, I., El Sayed, K., Chen, Z. S., & Guo, H. (2012). Current status on marine products with reversal effect on cancer multidrug resistance. *Marine drugs*, 10(10), 2312-2321.
- [3] Dorman, H. D., Bachmayer, O., Kosar, M., & Hiltunen, R. (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4), 762-770.
- [4] Wu, Y. B., Ni, Z. Y., Shi, Q. W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y. C., & Cong, B. (2012). Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chemical reviews*, 112(11), 5967-6026.
- [5] Ben Farhat, M., Jordan, M. J., Chaouech-Hamada, R., Landoulsi, A., & Sotomayor, J. A. (2009). Variations in essential oil, phenolic compounds, and antioxidant activity of tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10349-10356.

Première Partie :
Recherche
Bibliographique

Chapitre I :
Rosmarinus officinalis L

I.1. Généralités

La famille des lamiacées connue également sous le nom des labiées, comporte environ 258 genres pour 6900 espèces, la plupart se concentrent dans le bassin méditerranéen. Les lamiacées sont des herbacées ayant la consistance et la couleur de l'herbe, parfois sous-arbrisseaux ou ligneuses. Une grande partie de ces plantes sont aromatiques riches en l'huile essentielle d'où leur intérêt économique et médicinal. Un grand nombre de genres de la famille des Lamiacées sont des sources de terpénoïdes et flavonoïdes ^[1].

I.2. Espèce

Le nom latin *Rosmarinus* est interprété, comme dérivé de "ros" rosée et "marinus" appartenant à la mer autrement rosée marin, ce qui fait référence à la présence du romarin sur les côtes et les îles de la Méditerranée ^[2].



Figure I.1: *Rosmarinus officinalis* L ^[1].

I.3. Dénominations internationales

Le romarin est connu sous différentes dénominations selon les pays ^[3] :

France : romarin, encensier, herbe aux couronnes, herbe aux troubadours ;

en provençe : roumaniéou ;

en catalan : romari.

Allemagne : Rosmarin, Weihrauchkraut, Bodekraut.

Angleterre : rosemary, old man.

Espagne : romero.

Italie : rosmarino, taesmarino.

Belgique : rosmarijn (flamand).

Grèce : dendrolibano.

Inde : rusmari.

Chine : mi tie hiang.

Afrique du Nord : iklil el jabal, Hashishat el Iklil, klil ou aklil, iazir ou azir ou yiazir.

I.4. Caractéristiques systématiques

Le tableau I.1 représente la classification systématique de *Rosmarinus officinalis L.*

Tableau I.1: Caractéristiques systématiques de la plante *Rosmarinus officinalis L.* ^[4].

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta
Sous-embranchement	Magnoliophytina
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Rosmarinus
Espèce	Rosmarinus officinalis L.

I.5. Description botanique

Cette plante appartient à la famille des lamiacées. Elle se présente sous forme d'arbuste, sous arbrisseau ou herbacée mesurant environ de 0,8 à 2 m de hauteur et est couverte d'une écorce grisâtre. Elle se divise en nombreux rameaux opposés, tortueux ^[5].

Tableau I.2: Description botanique de la plante *Rosmarinus officinalis L.* ^[5].

<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	
Les fleurs	D'une couleur varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches, hermaphrodites, visibles de janvier en mai. Elles sont groupées à l'extrémité des rameaux à la base des feuilles.
Les feuilles	Opposées décussées insérées sur une tige à section carrée, étroites, lancéolées, linéaires, à bords roulés en dessous, sont vertes foncé et luisantes à la face supérieure.
Le fruit	Tétramère (de couleur brune), ovoïde, est entouré par un calice persistant et sec. Il attire les insectes (entomophiles) pour assurer la pollinisation.

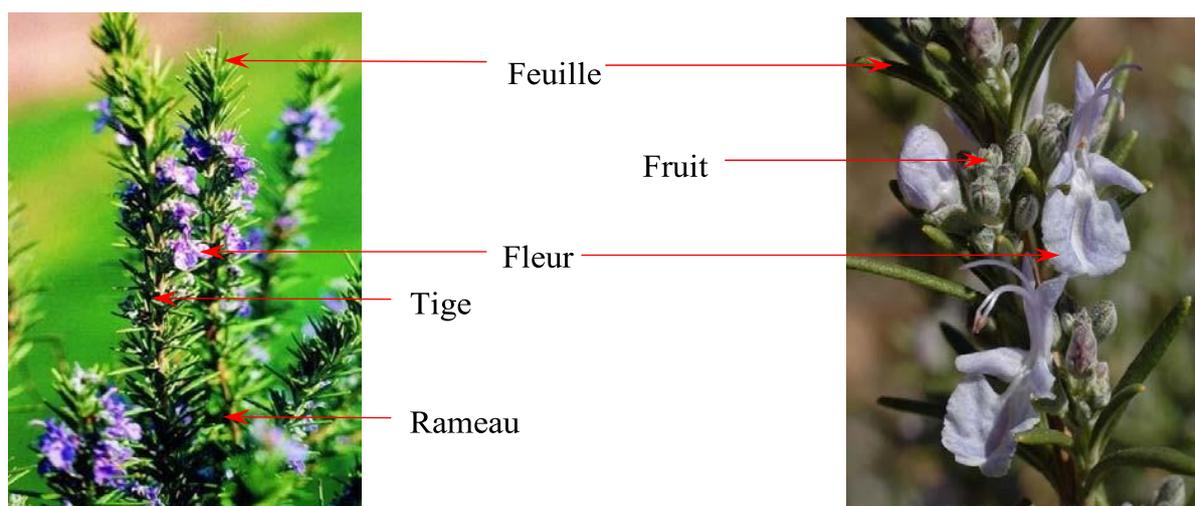


Figure I.2: Rameaux feuillés à fleurs de *Rosmarinus officinalis* L ^[6].

I.6. Distribution géographique

Le romarin est une plante commune du bassin méditerranéen en dont l'aire de répartition s'étend jusqu'au sud-ouest de l'Asie, il se développe sur les sols calcaires, en particulier en France et en Afrique du Nord ^[7]. Cette plante indigène poussant spontanément dans toute l'Algérie ^[8].

I.7. Composition chimique

Le tableau ci-dessous résume les constituants chimiques de *Rosmarinus officinalis* L.

Tableau I.3: Constituants chimiques de *Rosmarinus officinalis* L ^[4].

Familles de constituants	Constituants
Huile essentielle (1 à 2,5 %)	Camphre, 1,8-cinéole, α -pinène, bornéol, acétate de bornyle, camphène, α -terpinéol, β -pinène, β -caryophyllène, myrcène...
Diterpènes phénoliques tricycliques	Acide carnosolique, carnosol, rosmanol, rosmadial...
Flavonoïdes	- Hétérosides de la lutéoline, de la diosmétine - Flavones méthoxylés : genkwanine et dérivés, cirsimarine, scutellaréine
Acides phénols (3,5 %) = « tanins des Labiées »	Acides caféique, chlorogénique, rosmarinique
Triterpènes, stéroïdes	Acide oléanolique (10 %), dérivés de l'acide

	ursolique et α - et β -amyrine (5 %)
Lipides (cuticule cireuse des jeunes feuilles)	n-alcanes, isoalcanes, alcènes
Constituants divers	Polysaccharides acides (6 %), traces de salicylate

Le composé majoritaire de l'huile essentielle du Romarin varie d'une région à l'autre. La composition chimique de certaines huiles essentielles de Romarin de différents pays est représentée dans le tableau I.4.

Tableau I.4: Composants majoritaires d'huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* [5].

Composé	Localité et % de composé							
	Algérie	Tunisie	France	Grèce	Chine	Afrique du sud	Turque	Iran
α -pinène	5,4	-	20,8	-	19,43	18,18	9,4	14,9
Camphène	7,2	5,9	5,1	-	11,52	6,08	-	-
1,8-cinéole	12,2	33,1	36,9	12,89	27,23	31,12	50,7	7,43
camphre	14,6	18,0	34,2	22,24	14,26	30,12	5,9	4,94
Terpinen-4-ol	-	6,0	-	-	-	-	-	-
Bornéol	10,6	8,0	-	7,37	-	-	6,8	-
Pipéritone	-	-	-	-	-	-	-	23,7
α -terpinéol	5,2	-	-	5,67	-	-	6,8	-
Carbophyllène oxyde	10,9	-	-	-	-	-	-	-
B-pinène	8,5	-	-	-	6,71	-	-	-
Camphrène	-	-	-	-	19,43	18,18	-	-
Linalol	-	-	-	-	-	-	-	14,9

I.8. Utilisation médicinale et traditionnelle

Le romarin a été cité en médecine arabe pour ses propriétés diurétique et emménagogue. Il a été décrit comme étant une plante qui provoque l'écoulement de l'urine et des règles, résout les obstructions du foie et de la rate, utile contre l'asthme, la toux et contre les palpitations cardiaques [9].

I.9. Usage et propriétés thérapeutiques

Rosmarinus officinalis a fait l'objet de plusieurs études validant ses effets hépato protecteurs, antibactériens, anti thrombotique, diurétique, antioxydant et anti-

inflammatoire. Les extraits du *Rosmarinus officinalis L.* sont utilisés également pour traiter quelques désordres psychologiques comme la dépression. Il est également insecticide, et anti parasite. L'administration de l'huile essentielle de romarin par voie orale et inhalation, stimule l'activité respiratoire et locomotrice du système nerveux central chez la souris, suggérant une action directe d'un ou plusieurs de ses constituants ^[7].

Références bibliographiques

- [1] Ouibrahim, A. (2015). *Évaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (Laurus nobilis L., Ocimum basilicum L. et Rosmarinus officinalis L.) de l'Est Algérien* (Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba).
- [2] Guinochet, M. (1973). *Phytosociologie*. Masson. Paris, 227p.
- [3] Hoefler, C. (1994). *Contribution à l'étude pharmacologique des extraits de Rosmarinus officinalis L., et notamment des jeunes pousses: activités cholérétiques, antihépatotoxiques, anti-inflammatoires et diurétiques* (Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine-Metz).
- [4] Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). *Rosmarinus officinalis (Lamiaceae): Romarin*. In *Phytothérapie anti-infectieuse* (pp. 341-347). Springer, Paris.
- [5] Belkhodja, H. (2016). *Effet des biomolécules extraites à partir de différentes plantes de la région de Mascara: Evaluation biochimique des marqueurs d'ostéoarticulation et de l'activité biologique* (Thèse de doctorat, Université Mustapha Stambouli-Mascara).
- [6] Meziane, D. (2014). *Extraction assistée par micro-ondes des antioxydants à partir du Rosmarinus officinalis L. et de ses coproduits* (Thèse de doctorat, Université Houari Boumediene).
- [7] Namer, A., & Musleh, R. M. (2014). *Valorisation pharmacologique de la Rosmarinus Officinalis et de la Vandula Officinalis: Toxicité aiguë, potentiel psychotrope et antibactérien* Thèse de doctorat, Université Mohammed V-Agdal).
- [8] Quezel P., et Santa S. (1963) *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome II. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique. Paris, 788p.
- [9] Khia, A., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A., Aberchane, M., Quaboul, B., ... & Charrouf, Z. (2014). Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L.* du Maroc. *Phytothérapie*, 12(6), 341-347.

Chapitre II :

Les métabolites secondaires

II.1. La phytothérapie et les plantes médicinales

La phytothérapie, du grec *phyto* et *therapeia*, est l'art de se soigner par les plantes, mais pas n'importe quelles plantes, les plantes médicinales. Ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse des drogues ^[1].

II.2. Les éléments actifs des plantes médicinales

Les effets curatifs de certaines plantes sont bien connus. La camomille par exemple, est utilisée depuis des milliers d'années contre les troubles digestifs. Or, ce n'est que récemment que les éléments actifs des plantes médicinales ont été isolés et étudiés. Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme ^[2].

II.3. Les métabolites secondaires

La plante est le siège d'une activité métabolique aboutissant à la synthèse des métabolites primaires (les protéines, les glucides et les lipides) et des métabolites secondaires ^[3]. Les métabolites secondaires diffèrent en fonction des espèces, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, agents pathogènes et prédateurs. Ils n'exercent aucune fonction directe aux niveaux des activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, reproduction...) mais peuvent jouer différents rôles pour la survie du végétal lui-même, rôle de défense ou de résistance ^[4].

II.4. Classification des métabolites secondaires

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes, dont les plus importants en terme de nombre de structures connues sont:

- Les composés phénoliques
- Les composés terpéniques
- Les composés azotés dont les alcaloïdes ^[4].

Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine. Ils présentent une énorme valeur économique en particulier pour l'industrie pharmaceutique et la cosmétique ^[5].

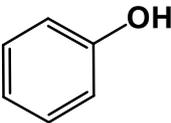
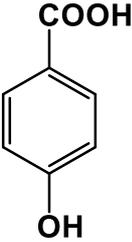
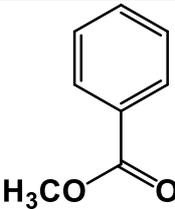
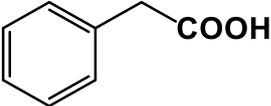
II.4.1. Les composés phénoliques

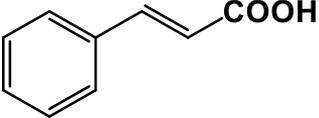
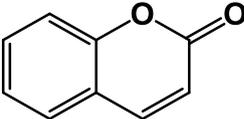
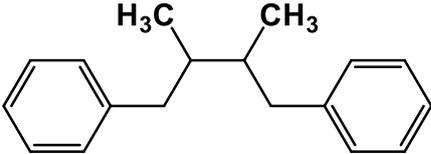
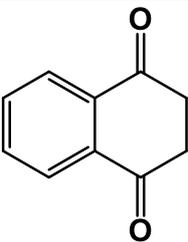
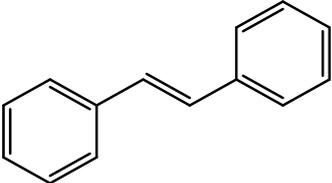
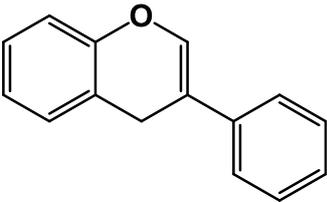
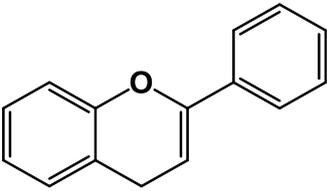
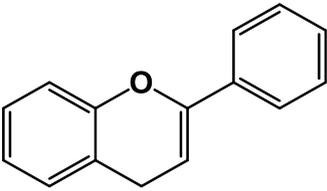
Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'ils sont difficiles de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside [6]. Ces composés sont synthétisés par l'ensemble des végétaux dont un certain nombre contribuent aux propriétés médicinales et ont longtemps été utilisés comme médicaments [7].

II.4.1.1. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont un groupe très vaste et diversifié de produits chimiques. Il est à noter qu'il se trouve un certain nombre de façons pour classer les composés phénoliques. Ils peuvent être classés en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique en les dérivés en C6-C1, les dérivés en C6-C3 ou phenylpropanoïdes et les composés en C6-C3-C6 sont les plus importants.

Tableau II.1: Classification des polyphénols [6][8].

Squelette carboné	classe	exemple	Structure de base
C ₆	Phénols simples	hydroquinone	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	Acide gallique	
C ₆ -C ₂	Acétophénone	Gallacetophénone	
	Acide phénylacétiques	Acide para-Hydroxyphénylacétique	

C ₆ -C ₃	Acides Hydroxycinnamiques	Acide paracoumarique	
	Coumarines	Ombelliférone	
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Entérodiol	
(C ₆ -C ₃) _n	Liginines		
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbénoides	Trans-resvératrol	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Isoflavonoïdes	Daidzéine	
	Flavonoïdes	Kaempférol	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	Procyanidine	

▪ Les Flavonoïdes

Le terme flavonoïde (de flavus, « jaune » en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ce sont des métabolites secondaires ubiquitaires des plantes jouent le rôle de protection des tissus végétaux contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet (280-315 nm) [3]. Plus de 4000 flavonoïdes naturels ont été identifiés à ce jour. Les composés flavoniques sont des pigments exclusivement végétaux très répandus. Ce sont des composés C₁₅ qui ont tous la structure C₆-C₃-C₆. Chimiquement, ils sont construits à partir d'un hétérocycle de type flavane (deux noyaux benzéniques A et B, encadrant un hétérocycle oxygéné) (Figure II.1). Le noyau B est plus ou moins hydroxylé et méthylé. Ils forment des hétérosides de glucose, galactose, xylose ou rhamnose (fixés en général sur les carbones 3 et 5) (Figure II.2) [9].

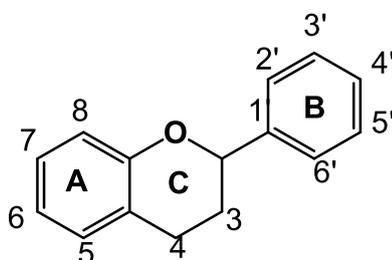


Figure II.1 : Structure de base des flavonoïdes [10].

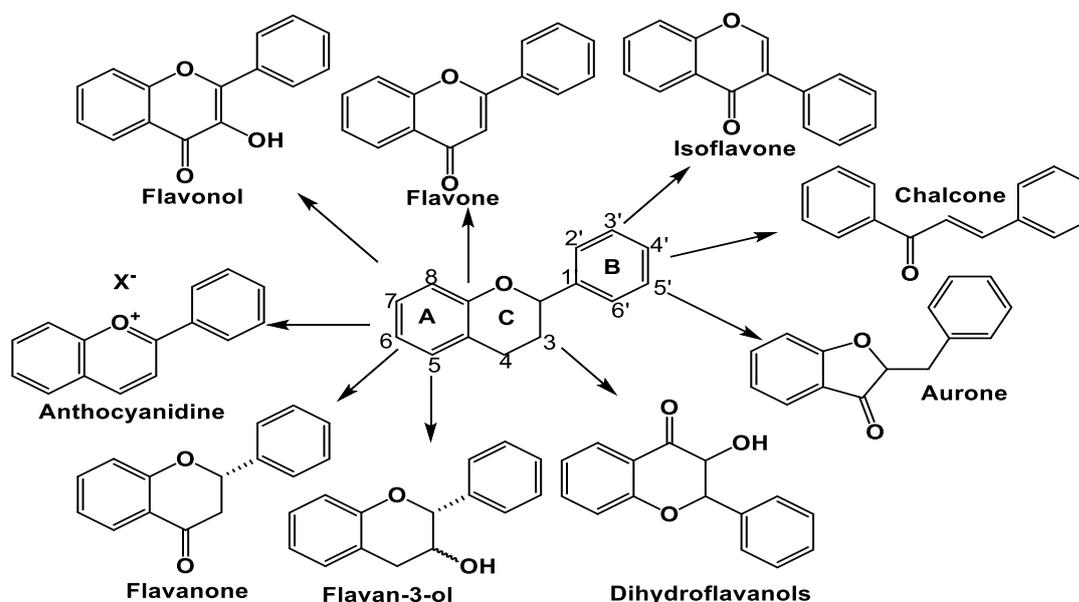


Figure II.2 : Structures de base des principaux flavonoïdes [9].

Les flavones et les flavonols sont les composés les plus répandus, alors que les flavanones, les flavonols, les chalcones et les anthocyanidines sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires ^[9].

▪ Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes

La principale propriété biologique reconnue des flavonoïdes est d'être «veino-actifs» (veinotrope, vitaminique) c'est-à-dire qu'ils permettent de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance ^[3].

Les recherches récentes sur les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme : les activités antiallergique, anti-inflammatoire, hépato-protective, Antimicrobienne, anticarcinogénique ^[11].

Théoriquement, les flavonoïdes auraient une activité anti-tumorale *in vitro*, mais leur efficacité clinique est rarement démontrée ^[12]. Des études épidémiologiques ont montré que la consommation de quantités élevées des flavonoïdes peut avoir un effet protecteur contre la maladie de parkinson, cet effet semblerait être plus perceptible chez les hommes ^[13].

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes, ce sont des molécules antifongiques et antibactériennes ^[11].

II.4.1.2. Localisation des composés phénoliques

A l'échelle cellulaire les composés phénoliques s'accumulent principalement au niveau de la paroi cellulaire où sont présentes les lignines (et quelquefois certains flavonoïdes et des molécules associées aux lignines comme l'acide férulique) et au niveau de la vacuole où sont stockés les phénols solubles (acide chlorogénique, anthocyanes, flavonols, tanins...) ^[14]. En effet, certains flavonoïdes comme la quercétine et le kaempférol peuvent être également présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique mais toujours à très faible concentration ^[15].

II.4.1.3. Propriétés biologiques et pharmacologiques des composés phénoliques

Un certain nombre de composés phénoliques ont des propriétés médicinales et ont longtemps été utilisés comme médicaments ^[7], Par ailleurs ils sont bénéfiques pour l'homme vis-à-vis de certaines maladies due par leur action sur le métabolisme humain et leur propriété antioxydante ^[16]. La consommation de ces produits, présents en quantité notable dans les

fruits et légumes, contribue à la prévention des affections cardiovasculaires et dégénératives. L'acide chlorogénique et l'acide caféique inhibent *in vitro* les réactions de nitrosation et certains processus d'altération des acides nucléiques [6], ils peuvent exercer des effets anti-inflammatoires par différents mécanismes [17]. Ils sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement due à leurs diversités structurales [18].

Des nombreux lignanes comme aryltétrahydronaphtaléniques et dibenzocyclo-oaniques possèdent des propriétés cytostatiques ou antitumorales établies *in vitro* ou *in vivo*. À ce jour, seuls les dérivés hémisynthétiques de la podophyllotoxine font l'objet d'une exploitation dans un but thérapeutique [6]. Par exemple, l'étoposide et le teniposide, deux lignanes, sont des médicaments anticancéreux [7].

II.4.2. Les composés terpéniques

Avec les polyphénols, les terpénoïdes sont classés aussi parmi les substances secondaires importantes du métabolisme chez les végétaux. Les terpènes peuvent être considérés comme étant des dérivés de l'isoprène (Figure II.3). D'où le nom d'isoprénoïdes sous lequel ils sont parfois désignés.

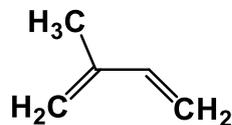


Figure II.3 : Structure de base de l'isoprène [8].

II.4.2.1. Classification des composés terpéniques

Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue différentes classes résumées dans le tableau II.2 :

Tableau II.2 : Classification des terpénoïdes [4].

Nombre de carbone	Nom
10	Les monoterpènes
15	Les sesquiterpènes
20	Les diterpènes
30	Les triterpènes

40	Les tetraterpènes
400	Les polyterpènes

Les composés terpénoïdes constituent un groupe de molécules très différentes tant d'un point de vue structurel que fonctionnel. Avec près de 15000 structures moléculaires connues, ils constituent probablement la classe la plus vaste et plus diversifiée de composés organiques végétaux ^[19].

II.4.2.2. L'aromathérapie et les huiles essentielles

D'une manière générale, l'aromathérapie peut se définir comme une thérapeutique naturelle utilisant les HEs appelées encore essences ou essences aromatiques végétales. Sont des substances odorantes, volatiles et de consistance huileuse, contenues dans les plantes ^[20] ^[21].

Les huiles essentielles sont des liquides, volatils, limpides et colorés, elles sont solubles dans les lipides et les solvants organiques qui ont une densité inférieure à l'eau ^[22].

De point de vue biologique, les HEs sont des substances obtenues à partir d'une matière végétale par des procédures d'extraction telles que l'entraînement à la vapeur, l'hydrodistillation, la distillation sèche et par l'extraction mécanique à partir de l'épicarpe de certaines plantes telles que le citrus ^[23].

De point de vue biochimique, les HEs sont des mélanges complexes de composés naturels de structures organiques diverses (sauf les corps gras contenus dans les huiles végétales). Le mot huile est attribué à son caractère hydrophobe et à ses propriétés de solubilisation dans les graisses, alors que le mot essentiel reflète l'odeur distinctive dégagée par la plante productrice ^[24]. Les HEs sont biométabolisées par les plantes dites aromatiques comme métabolites secondaires et ont habituellement l'odeur caractéristique de la plante productrice.

II.4.2.3. Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être présentes dans tous les organes de la plante, y compris les bourgeons, les fleurs, les graines, les brindilles, les tiges, les fruits, les racines, le bois ou l'écorce, et sont généralement stockées par la plante dans les cellules sécrétrices, les cavités, les canaux, les trichomes glandulaires ou les cellules épidermiques ^[22].

De point de vue physiologique, les plantes aromatiques synthétisent les HEs dans des structures végétales très spécifiques. Ces structures sont de nature différente en fonction de la plante aromatique. En général, on trouve les trichomes glandulaires, les cavités sécrétrices et les canaux sécréteurs ^[25]. Ces trois structures peuvent être présentes chez certaines espèces dans tous les organes végétatifs (fleurs, feuilles et écorces). La teneur et la composition d'une HE peuvent varier entre la même espèce provenant de deux origines différentes et parfois même au sein de la même plante entre deux organes différents ^[22].

II.4.2.4. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique d'une HE est formée essentiellement des terpènes et de leurs dérivés oxygénés. Même si la plupart des plantes synthétisent des molécules terpéniques, il n'y a qu'à peu près 2 000 d'entre elles qui sont aromatiques appartenant environ à 60 familles botaniques ^[23].

Les constituants des HE sont répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes. Les terpénoïdes, dont 25 000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq atomes de carbone, l'isopenténylpyrophosphate^[26]. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C5) qui sont formés d'une seule unité isoprénique. Les autres molécules, appartenant à cette classe, proviennent de la condensation de plusieurs isoprènes et forment ainsi les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes ^[27]. Les composés phénoliques (phénylpropanoïdes) sont biométabolisés à partir de deux précurseurs essentiels (acides aminés aromatiques) ^[26]. Ces composés phénoliques sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle ^[28]. D'autres variétés de molécules peuvent aussi être rencontrées, tels que les acides, les alcools, les aldéhydes, les esters, les hydrocarbures aliphatiques acycliques ou les lactones ; rarement de l'azote et des composés contenant du soufre, des coumarines ^[29].

II.4.2.5. Propriétés biologiques et pharmacologiques des huiles essentielles

Chaque huile essentielle ne possède pas qu'une action unique. Elle peut avoir de multiples propriétés : cholérétique, cicatrisante, neurosédative, spasmolytique, digestive, stomachique, antimicrobienne, anti-inflammatoire ^[9], et ceci du fait de la variété des éléments chimiques. Si leur composition est complexe, les huiles essentielles sont cependant caractérisées par 2 à 3 composés majoritaires présents relativement en forte concentration de 20 à 70% par rapport aux autres constituants présents parfois sous forme de traces. Ce sont

eux qui confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés thérapeutiques. Par exemple, le menthol et la menthone représentent respectivement 59 et 19% de la composition de l'huile essentielle de menthe poivrée ^[30].

II.4.3. Alcaloïdes

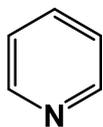
II.4.3.1. Définition

Un alcaloïde est un composé d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte. L'appartenance aux alcaloïdes est confirmée par les réactions communes de précipitation avec les réactifs généraux des alcaloïdes ^[4]. Ils sont des structures très diverses et dérivent de différents acides aminés en passant par différentes voies biosynthétiques ^[6].

II.4.3.2. Classification des alcaloïdes

On distingue :

- **Les alcaloïdes vrais** : Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ce sont des substances douées d'une grande activité biologique, même à faibles doses. Ils apparaissent dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme d'un sel, ou combinés avec tanins, exemple : pyridine ^[6].



Pyridine

Figure II.4 : Structure de pyridine.

- **Les pseudo-alcaloïdes** : Ils ne sont pas dérivés d'acides aminés. Ils peuvent cependant être indirectement liés à la voie des acides aminés par l'intermédiaire d'un de leurs précurseurs, ou d'un de leurs dérivés, exemple : coïne ^[6].

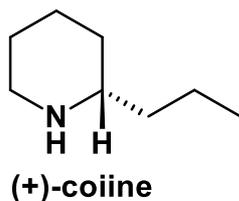


Figure II.5 : Structure de coïne.

- **Les proto-alcaloïdes** : Ce sont des amines simples, dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle. Ils dérivent aussi d'acides aminés, exemple: mescaline ^[6].

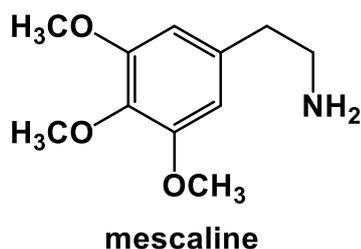


Figure II.6 : Structure de mescaline.

II.4.3.3. Localisation des alcaloïdes

La synthèse des alcaloïdes s'effectue le plus souvent au niveau des racines en croissance, cellules spécialisées de laticifères et chloroplastes, ils sont ensuite transportés dans leur site de stockage ^[31], Généralement ils sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Chez de nombreuses plantes, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles ^[32].

II.4.3.4. Les propriétés biologique et pharmacologique des alcaloïdes

Les alcaloïdes en raison de leurs propriétés toxiques ou médicamenteuses, ont toujours présenté pour le pharmacien un intérêt exceptionnel (caféine, cocaïne...) ^[33]. Il y a plus de 10000 alcaloïdes connus sont utilisés par exemple comme antidépresseur, stimulants, anesthésiques, antitumoraux, antipaludique ^[4]. Ils ont des effets sur la conscience et la motricité car ils agissent directement sur le système nerveux et à cet effet ils peuvent avoir une action antispasmodique, mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique ^[34].

Les alcaloïdes ont des utilisations dans d'autres domaines comme des curarisants, d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antifibrillants (quinidine), d'antitumoraux (vinblastine, ellipticine), d'antimalarique (quinine) et d'amoebicides (émétine), ils jouent aussi le rôle d'antibiotique comme la ciclosporine, lamytomycine ^[6].

Références bibliographiques

- [1] Sofowora, A. (2010). *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique*. KARTHALA Editions.
- [2] Iserin, P., Masson, M., & Restellini, J. P. (Eds.). (2007). *Encyclopédie des plantes médicinales*. Larousse.
- [3] Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24),2831-2846.
- [4] Merghem , R.(2009).Eléments de biochimie végétale. Ed. Bahaeddine éditions.
- [5] Aref, M., & Heded, M. (2015). Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica* L (Région d'Oued Souf).
- [6] Bruneton , J. (2009). Pharmacognosie Phytochimie des Plantes médicinales.Techniques et documentations Lavoisier, paris,(4).
- [7] Nahar, L., & Sarker, S. D. (2019). *Chemistry for pharmacy students: general, organic and natural product chemistry*. John Wiley & Sons.
- [8] Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (Eds.). (2008). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons.
- [9] Bruneton , J.(1999). Pharmacognosie Phytochimie des Plantes médicinales.Techniques et documentations lavoisier,Paris,(3).
- [10] Lhuillier, A. (2007). *Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauria salicifolia* Hook. f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae)* (Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse).
- [11] Abedini, A. (2013). *Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit.(Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes* (Thèse de doctorat, Université du Droit et de la Santé-Lille II).
- [12] Richard, A. (2012). *Synthèse bibliographique de la phytothérapie et de l'aromathérapie appliquées à la dermatologie* (Thèse de doctorat, Université Claude–Bernard,lyon I – France).
- [13] Gao, X., Cassidy, A., Schwarzschild, M. A., Rimm, E. B., & Ascherio, A. (2012). Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology*, 78(15),1138-1145.

- [14] Le Bourvellec C., Bouchet B. and Renard C.M. (2005). Non-Covalent Interaction between Procyanidins and Apple Cell wall Material. Part II: Quantification and Impact of Cell wall drying. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1725,1-9.
- [15] Peer, W. A., Brown, D. E., Tague, B. W., Muday, G. K., Taiz, L., & Murphy, A. S. (2001). Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of Arabidopsis. *Plant physiology*, 126(2), 536-548.
- [16] Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques,4-5.
- [17] Yahfoufi N., Alsadi N., Jambi M. & Matar C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*. 10(11): 1618-1628.
- [18] Chaouche, T. M., Haddouchi, F., Atik-Bekara, F., Ksouri, R., Azzi, R., Boucherit, Z., ... & Larbat, R. (2015). Antioxidant, haemolytic activities and HPLC–DAD–ESI–MSn characterization of phenolic compounds from root bark of Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus. *Industrial Crops and Products*, 64, 182-187.
- [19] Hopkins, W. G. (2003). Physiologie végétale traduction de la 2ème édition américaine par SERGE RAMBOUR. *Révision scientifique de Charle Marie Evrard. Edition DEBOEK Université, Bruxelles*, 66-81.
- [20] Balz, R. O. D. O. L. P. H. E. (1986). Les huiles essentielles. *Éditions Crest, Eygluy-L'escoulin*.
- [21] Lardry, J. M., & Haberkorn, V. (2003). Les formes galéniques destinées à l'usage externe: Pharmacologie galénique. *Kinésithérapie*, (16), 21-25.
- [22] Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., ... & Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 1-11.
- [23] Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F. J., & Reglero, G. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of food protection*, 68(4), 790-795.
- [24] Talbaoui, A., Jamaly, N., Aneb, M., Il Idrissi, A., Bouksaim, M., Gmouh, S., ... & Bakri, Y. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(31), 4593-4600.

- [25] Zizovic, I., Stamenić, M., Orlović, A., & Skala, D. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modelling on the micro-scale. *The journal of supercritical fluids*, 39(3), 338-346.
- [26] Dubey, V. S., Bhalla, R., & Luthra, R. (2003). An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of biosciences*, 28(5), 637-646.
- [27] Bohlmann, J., & Keeling, C. I. (2008). Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal*, 54(4), 656-669.
- [28] Kalemba, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
- [29] Finland, M. (1979). Emergence of antibiotic resistance in hospitals, 1935-1975. *Reviews of infectious diseases*, 1(1), 4-21.
- [30] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- [31] Maldonado, M. R. (2012). *PeumusBoldus M. De La Botanique A La Thérapeutique: Etat Des Connaissances En 2012* (Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier-Grenoble).
- [32] Krief, S. (2003). *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées* (Thèse de doctorat, Museum national d'histoire naturelle Mnhn-Paris).
- [33] Guignard J.L., Cosson, L., & Henry, M. (1985). *Abrégé de Phytochimie*. Ed. Masson Paris, 155-174.
- [34] Scoullou, M., Plavšić, M., Karavoltzos, S., & Sakellari, A. (2006). Partitioning and distribution of dissolved copper, cadmium and organic matter in Mediterranean marine coastal areas: The case of a mucilage event. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 67(3), 484-490.

Chapitre III :
Les activités biologiques

III.1. L'activité antioxydante

III.1.1. Définition d'un radical libre

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés, cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre ^[1].

III.1.2. La production des radicaux libre

L'oxygène est un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques, c'est un radical libre peu réactif présent le plus souvent sous forme de dioxygène. Physiologiquement, et sous certaines circonstances, il est à l'origine de la formation de dérivés très réactives appelés espèces réactives oxygénées (ERO). Ces molécules sont très nombreuses et fortement toxiques ^[2] ^[3]. Ils incluent non seulement des radicaux libres : anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyle ($\cdot OH$), radical hydroperoxyde (HO_2^{\cdot}), radical peroxyde (RO_2^{\cdot}), radical alcoyle (RO^{\cdot}), mais d'autres espèces non radicalaires : peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), acide hypochloreux ($HOCl$), Ozone (O_3), Oxygène singulet (1O_2), peroxydinitrite ($ONOO^-$) ^[4], qui ne sont pas réactives mais peuvent être des précurseurs de radicaux ^[5].

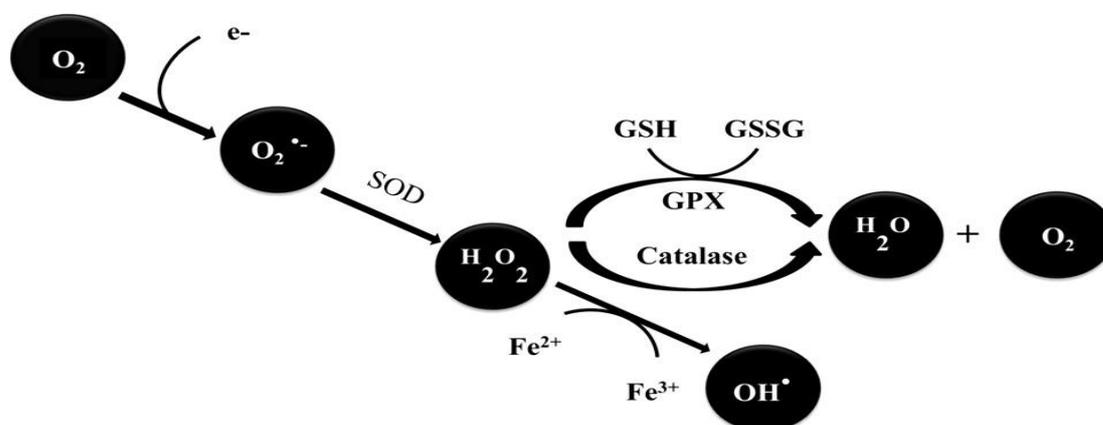


Figure III.1 : Principales étapes de formation des espèces réactives oxygénées (ERO).

Les radicaux oxygénés sont produits physiologiquement par divers mécanismes telles que la respiration aérobie dans les mitochondries ^[6] ; l'inflammation qui est une source importante de ERO produits directement par le complexe enzymatique NADPH oxydase des cellules phagocytaires activées ^[7] ; les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages. Lors

de l'activation, les macrophages provoquent une augmentation de l'absorption d'oxygène donnant lieu à une variété de ERO y compris l'anion superoxyde, l'oxyde nitrique et le peroxyde d'hydrogène ^[8]. Les ERO peuvent également être produits par une multitude de sources exogènes telles que les polluants de l'air, les gaz échappés des véhicules, la fumée des cigarettes, les contaminants industriels qui contiennent une grande quantité des dérivés de monoxyde d'azote ^{[9] [10]}. L'exposition aux rayonnements UV constituent aussi une source importante de ERO ^[11].

III.1.3. Le stress oxydant

Les ERO sont présentes dans la cellule à des doses raisonnables, leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants. Ainsi, à l'état quiescent, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants (balance rédox) est en équilibre. Cependant cette homéostasie rédox peut être rompue, soit par une production excessive d'ERO, soit par une diminution des capacités antioxydantes. On parle alors de stress oxydant ^[12].

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogénèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression ^[5].

III.1.4. Rôles physiologiques des radicaux libres

Les radicaux libres générés de façon permanente par le métabolisme normal de l'oxygène, ne sont pas seulement des produits agressifs mais aussi des modulateurs de voies de transduction du signal et de l'expression de gènes qui participent à l'homéostasie vasculaire. Ils jouent le rôle de messenger pour la cellule, dans l'apoptose et dans la défense contre les infections ^[13].

III.1.5. Les antioxydants

III.1.5.1. Définition

Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou inhiber la génération d'un oxydant toxique, d'arrêter ceux qui sont déjà produits et de les inactiver, bloquer de ce fait la réaction en chaînes de propagation produite par ces oxydants ^[14].

III.1.5.2. Les systèmes de défense des antioxydants

Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent être d'origine enzymatiques et non enzymatiques (Schéma III.1).

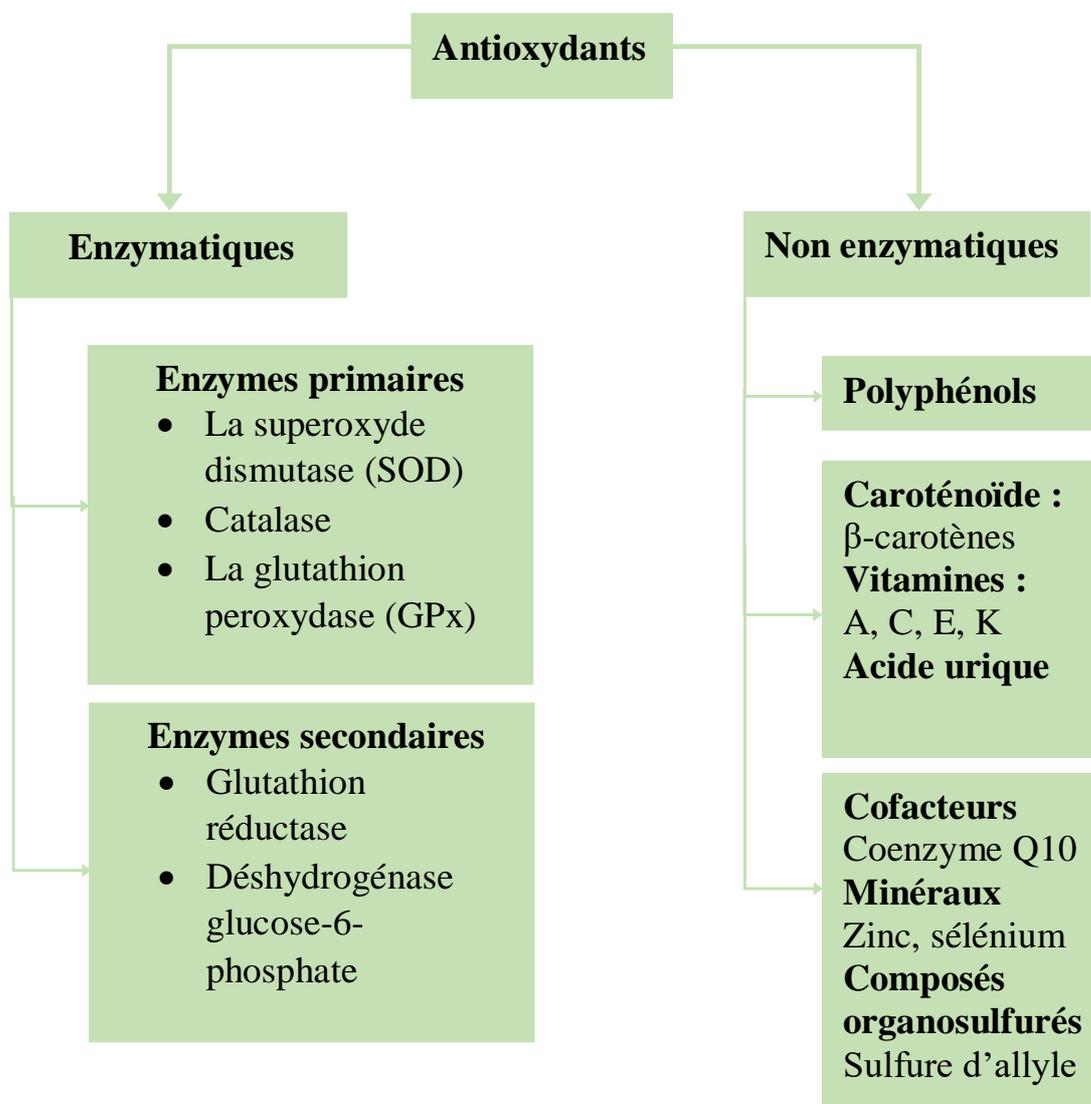


Schéma III.1: Les différents systèmes de défense des antioxydants ^[15].

III.1.5.3. Les différentes localisations cellulaires des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle : les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles. Ils seront particulièrement efficaces sur les radicaux libres présents dans chaque type de milieu, respectivement ^[16].

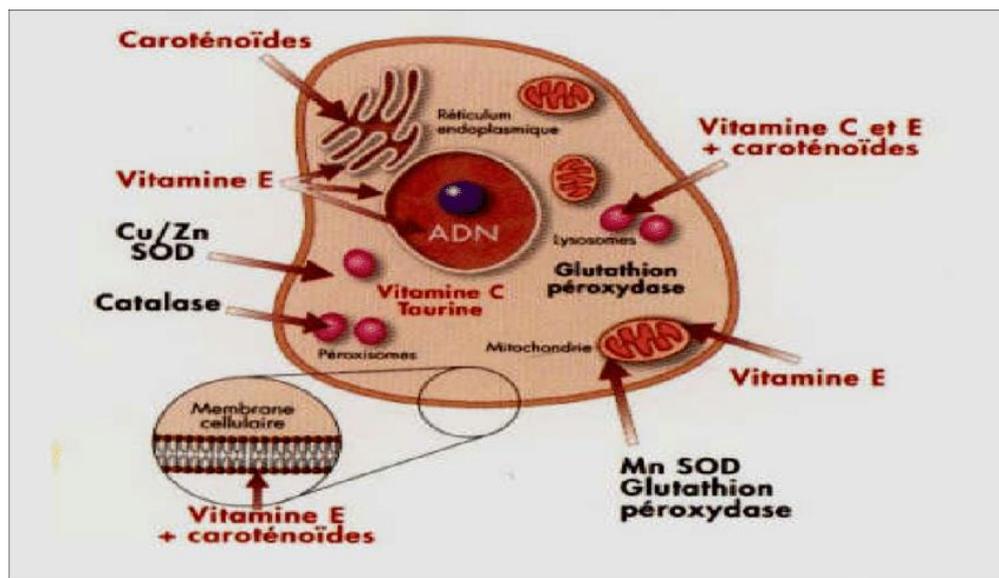


Figure III.2 : Sites d'action des nutriments et des enzymes antioxydantes ^[16].

III.1.5.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante ^{[17] [18]}

La capacité antioxydante des molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*.

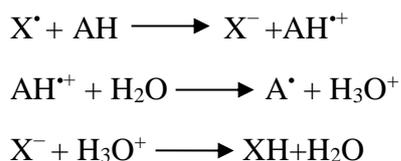
Il existe plusieurs tests *in vitro* pour évaluer l'activité antioxydante. Ces tests varient à différents égards. Par conséquent, il est difficile de comparer pleinement une méthode à une autre. En général, les tests antioxydants *in vitro* utilisant des pièges à radicaux libres sont relativement simples à réaliser. Sur la base de la réaction chimique impliquée entre les composés antioxydants et les radicaux libres, les tests de la capacité antioxydante sont généralement classés en deux types :

- Dosages basés sur la réaction de transfert d'atome d'hydrogène (HAT)
- Dosages basés sur la réaction de transfert d'électrons (ET).

Il faut noter, que ces deux réactions peuvent se produire en parallèle, et qu'elles sont parfois difficiles à distinguer.

Dosages basés sur la réaction de transfert d'électrons (ET)

Ces dosages mesurent la capacité réductrice des composés antioxydants. Ils sont basés sur une simple réaction redox, où les composés antioxydants réduisent les radicaux libres et s'oxydent. La réduction par les composés antioxydants entraîne le changement de couleur du réactif, qui est en corrélation avec la capacité antioxydante, qui est mesurée par le changement d'absorbance.

**Dosages basés sur la réaction de transfert d'atomes d'hydrogène (HAT)**

Ces tests mesurent/quantifient la capacité de don d'atomes d'hydrogène des composés antioxydants par une réaction ET couplée au proton, où il mesure la capacité antioxydante de rupture de chaîne.



Tableau III.1 : Mécanismes réactionnels de quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*.

Transfert d'atomes d'hydrogène	Transfert d'électrons
<ul style="list-style-type: none"> ● Méthode d'ABTS (acide 2,2, azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline) -6-sulfonique) ● Méthode de H₂O₂ 	<ul style="list-style-type: none"> ● Méthode de FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) ● Méthode de DPPH (2,2-dipényl-1-picrylhydrazyl) ● Méthode PPM (Réduction phosphomolybdate)

Tableau III.2 : Avantages et inconvénients de quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* ^{[19] [20] [21]}.

Méthodes	Avantages	Inconvénients
DPPH (2,2-DiPhenyle-1-PicrylHydrazyle) (Piégeage du radical DPPH).	<ul style="list-style-type: none"> ● Relativement simple et rapide. ● Peu coûteuse. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Instable à la lumière ● N'est soluble que dans des solvants organiques (les

		<p>alcools), ce qui rend la mesure de la capacité antioxydante des composés hydrophiles difficile.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Quelques antioxydants sont inertes face au DPPH. ● Certaines réactions avec le DPPH sont réversibles et peuvent mener à une sous-estimation du potentiel des produits testés. ● Beaucoup d'antioxydants réagissent lentement avec le DPPH.
<p>FRAP (Pouvoir réducteur de l'ion ferrique).</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Simple, rapide et peu coûteuse. ● Robuste et ne nécessite pas d'équipement spécial. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Un temps de réaction court. En effet, le potentiel de plusieurs molécules ne peut pas être mesuré par cette méthode, comme certains phénols qui réagissent lentement et demandent un temps de réaction plus long pour leur détection. ● Ne détecte pas les protéines et les thiols, qui peuvent transférer l'hydrogène. ● Toute substance qui donne les électrons même sans propriétés antioxydantes avec

		un potentiel redox inférieur à celui du couple redox Fe(III)/Fe(II) peut contribuer à la valeur FRAP et indiquer des valeurs faussement élevées.
ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)	<ul style="list-style-type: none"> ● Simple et rapide. ● Soluble dans l'eau et dans les solvants organiques ceux qui permet d'évaluer l'activité des antioxydants hydrophiles et hydrophobes. ● Peut être appliqué sur un large intervalle de pH. 	<ul style="list-style-type: none"> ● N'est pas adéquate pour les réactions lentes. ● Le radical ABTS^{•+} doit être précédemment régénérer par une réaction chimique (persulfate de potassium...). ● La formation du radical prend du temps (16 h).
H₂O₂	<ul style="list-style-type: none"> ● Une seule étape. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Interférence des métabolites secondaires qui absorbent dans la région 230 nm. ● Fluctuation des absorbances.
PPM (Réduction phosphomolybdate)	<ul style="list-style-type: none"> ● Evaluation de l'activité antioxydante totale. ● Linéaire, répétitif, reproductible. 	<ul style="list-style-type: none"> ● L'utilisation d'une haute température (95°C), ce qui engendre la dégradation des molécules thermolabiles.

III.2. L'activité antimicrobienne

III.2.1. Définition d'une bactérie

Les bactéries sont parmi les plus anciens et les plus abondants êtres vivants sur terre. Ce sont des micro-organismes unicellulaires procaryotes, visibles au microscope [22]. Selon leur mode de nutrition et leur comportement vis-à-vis de l'oxygène, les bactéries sont classées en aérobies et en anaérobies [23]. Les bactéries pathogènes spécifiques désignent des germes qui déclenchent une infection caractéristique chez un sujet sain [24].

III.2.2. Classes des bactéries [25]

▪ Les bactéries à Gram positif

Ont une importante structure de peptidoglycane. Certaines bactéries à Gram positif sont capables de former des spores qui permettent aux bactéries de survivre à une exposition à des conditions extrêmes et peuvent conduire à une recontamination.

▪ Les bactéries à Gram négatif

Ont une petite couche de peptidoglycane mais ont une membrane supplémentaire, la membrane externe. Cela crée une barrière de perméabilité supplémentaire et nécessite des mécanismes de transport à travers cette membrane.

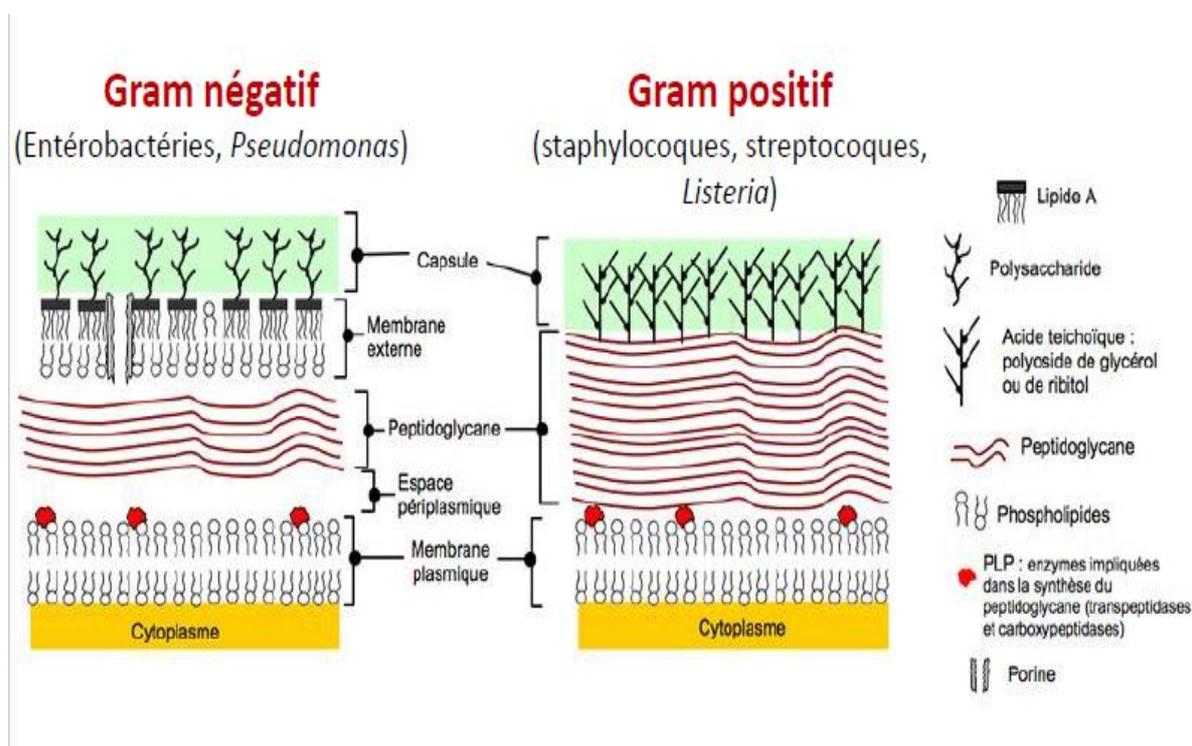


Figure III.3 : Les parois cellulaires des bactéries Gram positif et Gram négatif [26].

III.2.3. Description des souches bactériennes étudiées

▪ *Pseudomonas aeruginosa*

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* autrement connues sous le nom de bacilles pyocyaniques ont été isolées pour la première fois en 1882 par Gessard. Ce sont des bâtonnets à Gram négatif aérobie stricte. Ils sont fins, droits et très mobiles. Ces souches sont dépourvues de spores et de capsules et apparaissent la plupart du temps isolées ou sous forme de diplobacilles [27] [28]. Les espèces de ce genre sont considérés comme des pathogènes opportunistes nosocomial pouvant induire chez des patients immunodéprimés des infections pulmonaires et urinaires. *P. aeruginosa* est responsable de 36% des infections [29].

▪ *Escherichia coli*

Escherichia coli nommé aussi colibacille. C'est un bacille d'environ 2-3 µm de long et 0,6 à 0,7 µm de diamètre, Gram négatif, non sporulée, souvent mobile, de la famille des *Enterobacteriaceae* [30] [31]. Bien que cette bactérie, banale et commensale du tube digestif soit sans danger pour l'homme, certaines souches ayant acquis des facteurs de virulence, peuvent produire des toxines, appelées Shiga-toxines. Elles sont à l'origine de diverses pathologies intestinales. Celles-ci peuvent aller de la simple diarrhée à des complications graves [32].

▪ *Proteus mirabilis*

Ce sont des bacilles Gram négatif, anaérobies facultatifs et mobiles. Les bacilles de ce genre font partie de la flore intestinale. Ils peuvent être responsables d'infections nosocomiales et présentent une résistance naturelle à la polymyxine B et à la colistine [33].

III.2.4. Définition D'un champignon

Les champignons représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes [34]. Les champignons représentent un groupe d'eucaryotes anciens qui est constitué d'organismes très diversifiés [35]. Ce sont des êtres vivants qui se nourrissent par absorption (décomposition) et non par ingestion [36] [37].

III.2.5. Champignon étudié

▪ *Candida albicans*

Candida albicans est une levure commensale de la voie orale, vaginale, gastro-intestinale, cutanée et des surfaces muqueuses. Elle est considérée comme pathogène fongique opportuniste le plus commun chez l'humain. En réponse à des changements dans l'équilibre nutritif, la température et le pH, des transitions morphologiques entre la forme levure et la

forme hyphale peuvent être subites. Exceptionnellement et sous certaines conditions, *Candida albicans* peut former des chlamydospores [38]. Cette levure possède des mécanismes d'adaptation complexes, lui permettant de survivre dans diverses conditions environnementales et de causer une grande variété d'infection : superficielles (candidoses muco-cutanées) ou profondes (candidoses systémiques, souvent mortelles). La transition saprophyte-pathogène s'opère à la suite d'une baisse des défenses immunitaires de l'hôte (locales ou générales), permettant la multiplication des levures [39] [40].

III.2.6. Les antibiotiques

III.2.6.1. Définition

Un antibiotique est une substance chimique naturelle produite par un microorganisme (le plus souvent un champignon), synthétique ou hémisynthétique capable de détruire (bactéricide) ou d'empêcher la croissance d'autres microorganismes (bactériostatique). Par extension, toute substance susceptible d'empêcher le développement des microorganismes est appelée antibiotique [41].

III.2.6.2. Mode d'action des antibiotiques [42]

▪ Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne

Certaines bactéries sont protégées de l'environnement extérieur par une paroi. Il existe une machinerie de synthèse qui fabrique les composants de cette paroi et qui est composée du peptidoglycane, d'enzymes et de systèmes de transport acheminant les composants à la surface cellulaire. Il existe un ensemble d'antibiotiques qui bloquent différentes étapes de cette machinerie ; exemple en inhibant la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane.

▪ Action sur la membrane cellulaire

Un pore (un trou) dans la membrane qui va permettre la fuite des composés cellulaires. Il existe certains antibiotiques qui agissent comme des détergents qui désorganisent les lipides. Ce qui produit de graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur.

▪ Inhibition de la synthèse protéique

La synthèse des protéines est un processus essentiel des cellules vivantes, dans ce cas les molécules antibiotiques sont capables de bloquer l'action des facteurs de traduction associés au ribosome. Ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales.

▪ Inhibition de la synthèse de l'acide nucléique

La synthèse des acides nucléiques, ADN et ARN sont absolument vitaux pour les cellules, sans eux, la division cellulaire et la fabrication des protéines est impossible.

4 cibles bactériennes

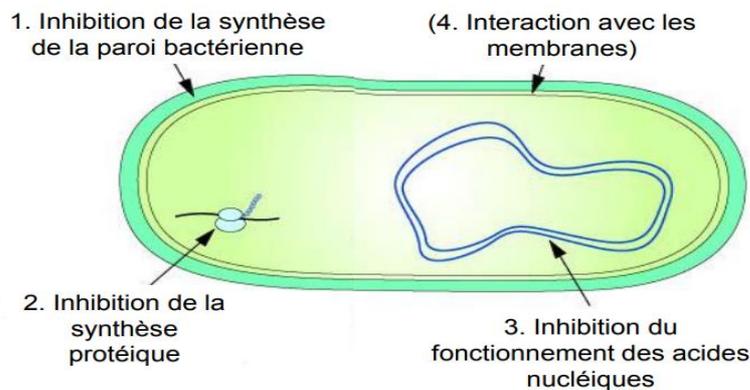


Figure III.4 : Mode d'action des antibiotiques ^[26].

III.2.6.3. Résistance

Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante, lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique, comparativement à d'autres souches, qui lui sont phylo-génétiquement liées. Selon la définition clinique, une souche est qualifiée de résistante, lorsqu'elle survit à la thérapie antibiotique mise en place ^[43].

III.3. L'activité anti-inflammatoire

III.3.1. Inflammation

L'inflammation désigne l'ensemble des réactions déclenchées dans des tissus vivants, vascularisés, suite à une lésion ou une stimulation cellulaire excessive ou normale due à une agression d'origine mécanique, chimique ou immunologique ^[44]. Dont le but est d'éliminer l'agent pathogène, réparer les lésions tissulaires et favoriser le retour à l'homéostasie et à la cicatrisation du tissu lésé ^[45].

III.3.2. Inflammation bénéfique ou néfaste

La réaction inflammatoire correspond à un processus bénéfique dont le but est d'éliminer les agents pathogènes et de réparer les lésions tissulaires ^[46]. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de

l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation ^[47].

III.3.3. Types d'inflammation

L'inflammation est classée en deux catégories selon la durée et la cinétique du processus inflammatoire :

▪ Inflammation aiguë

Réponse immédiate. Elle est de courte durée et de l'ordre de quelques jours à quelques semaines maximum. Elle est caractérisée par un important infiltrat de cellules inflammatoires au niveau du site lésionnel. Sa résolution est dans la majorité des cas spontanée et ne laisse que très peu de séquelles tissulaires ^[46].

▪ Inflammation chronique

L'inflammation chronique correspond à un échec de l'inflammation aiguë. La persistance de l'inflammation va être responsable de séquelles anatomiques et fonctionnelles qui font la gravité des maladies inflammatoires chroniques. Le mécanisme de la chronicité n'est pas toujours compris. Il peut s'agir de la persistance de la substance pathogène. Mais il est possible que cette inflammation se perpétue en l'absence de tout agent pathogène ^[47].

III.3.4. Le déroulement de la réaction inflammatoire

La réponse inflammatoire se déroule en trois étapes :

- Une phase d'initiation qui fait suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène et qui met en jeu des effecteurs primaires.
- Une phase d'amplification avec la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires.
- Une phase de résolution et de réparation qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé.

Ces trois phases mettent en action différents systèmes et impliquent de nombreux médiateurs. La nature du développement de chacune de ces trois phases et la nature des effecteurs primaires et secondaires impliqués (cellules résidentes et recrutées ; médiateurs préformés et néoformés) conditionnent le profil d'expression clinique et biologique de la réponse inflammatoire (aiguë ou chronique, locale ou systémique, protectrice ou délétère) ^[48].

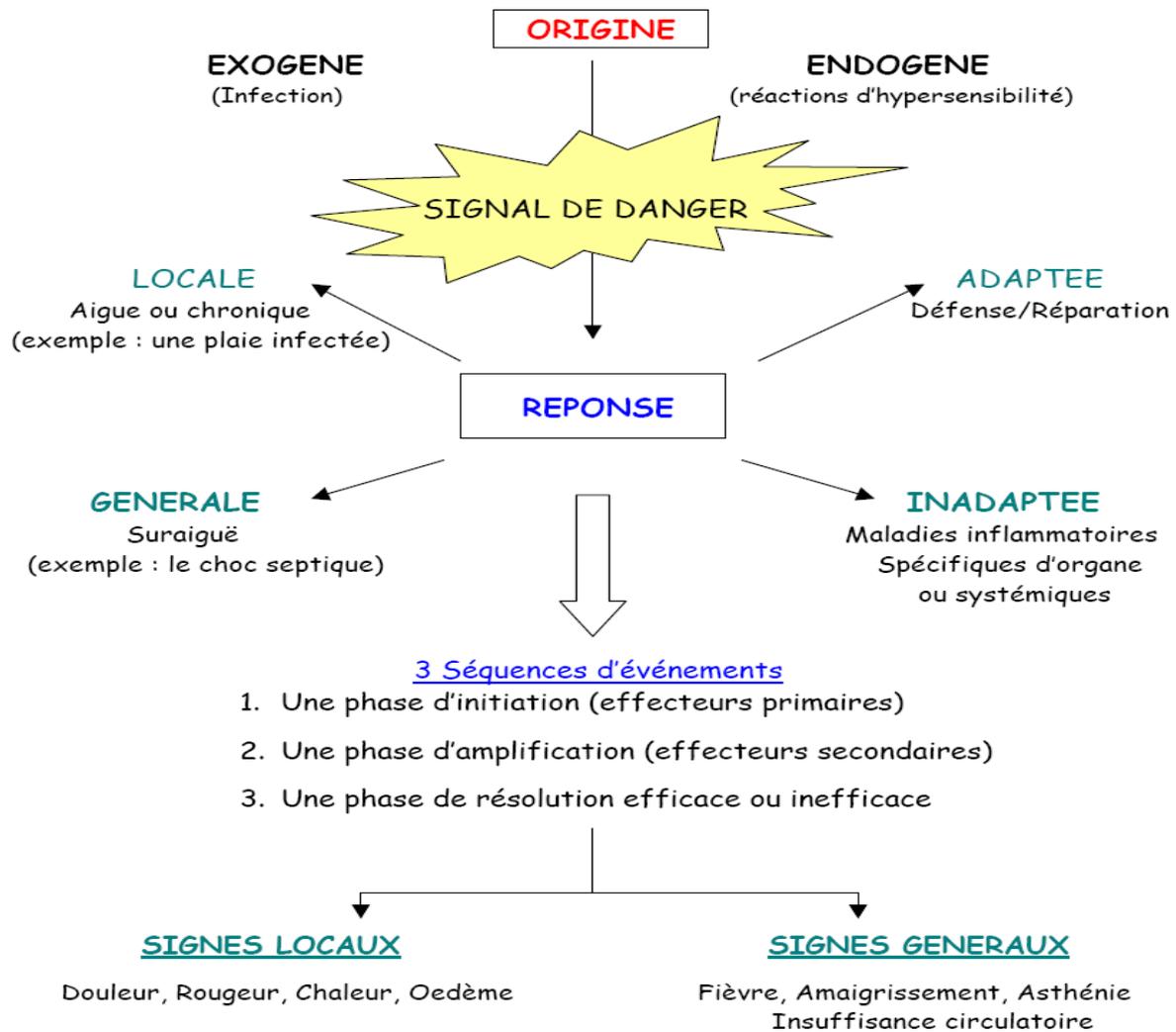


Schéma III.2 : La réaction inflammatoire schématisée ^[48].

III.3.5. Médiateurs de l'inflammation

Toutes les cellules impliquées dans l'inflammation sécrètent divers médiateurs cytotoxiques et/ou effecteurs et amplificateurs de la réponse immunitaire ^[49]. Les principaux médiateurs inflammatoires sont résumés dans le tableau :

Tableau III.3 : Résumé succinct des effets biologiques et origines des principaux médiateurs de l'inflammation ^[50].

Médiateurs	Origine	Effets biologiques
Histamine	Mastocytes, Basophiles, Plaquettes	Vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, activation endothéliale et douleur.
Cytokines (IL-1, IL-6)	Macrophages Mastocytes et neutrophiles	Activation endothéliale, diapédèse.
Cytokines IL-4, IL-10	Macrophages Mastocytes et neutrophiles	Inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires et leurs effets délétères.
Tumor necrosis factor α (TNFα)	Macrophages et Mastocytes	Recrutement des globules blancs, diapédèse, effet microbicide et élimination de l'agent pathogène.
Oxyde nitrique (NO)	Macrophages et Mastocytes	Effet cytotoxique sur l'agresseur et induction d'effet cytotoxique et relaxation des muscles.
Prostaglandines, prostacylines et thromboxanes	Acide arachidonique	Vasodilatation, augmentation perméabilité vasculaire, douleur, fièvre, agrégation plaquettaire ³

III.3.6. Anti-inflammatoires

III.3.6.1. Définition

Les anti-inflammatoires sont des substances capables d'atténuer ou de supprimer le processus inflammatoire ^[51].

III.3.6.2. Types d'anti-inflammatoires

▪ Anti-inflammatoire non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) forment une vaste classe médicamenteuse dont l'activité anti-inflammatoire, antipyrétique et antalgique les rend très utiles [52]. Le mécanisme d'action des AINS a été précisé par les travaux de Vane en 1971, il repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase (COX-1 et COX-2), enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique [53]. Cette caractéristique commune à tous les AINS conduit à une diminution de la production des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), importants médiateurs de l'inflammation. L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINS semblait donc, jusqu'à récemment, devoir obligatoirement s'accompagner d'effets favorables et délétères [54]. Selon le COX inhibé il existe AINS 1^{ère} génération qui inhibe les deux isoformes COX1 et COX2 tel que diclofénac et AINS 2^{ème} génération qui inhibe sélectivement l'isoforme COX2 tel que les Coxibs.

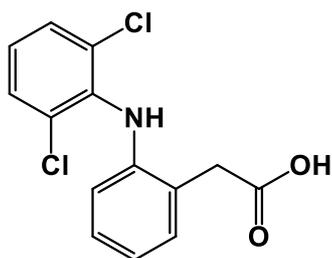


Figure III.5: structure de diclofénac.

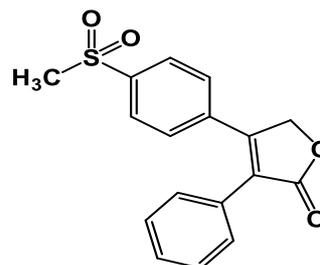


Figure III.6: structure de rofécoxib.

▪ Anti-inflammatoires stéroïdiens (Glucocorticoïdes)

Les médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. Les glucocorticoïdes (GC) traversent librement les membranes cellulaires, se fixent sur des récepteurs spécifiques qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux stéroïdes et migrent vers le noyau et agissent directement sur l'ADN en se fixant sur des séquences spécifiques, dites GRE (Glucorticoid Response Element). Ce complexe intervient dans la régulation de la transcription des gènes cibles en réduisant la perméabilité capillaire, la production de facteurs chimiotactiques, la phagocytose, bloquant ainsi la libération de sérotonine, d'histamine et de bradykinines. De plus, les GC peuvent augmenter la transcription des gènes anti-inflammatoires et inhiber l'action de certaines protéines nucléaires transactivatrices, inhibant ainsi l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, récepteurs et molécules d'adhésion et la production de la phospholipase A2 [53] [55].

Parmi les anti-inflammatoires stéroïdiens on peut citer comme exemple : prednisone.

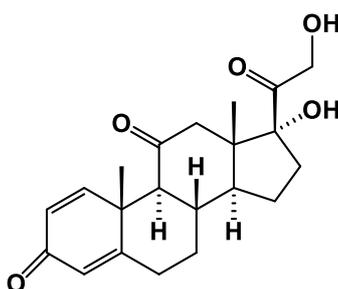


Figure III.7: structure de prednisone.

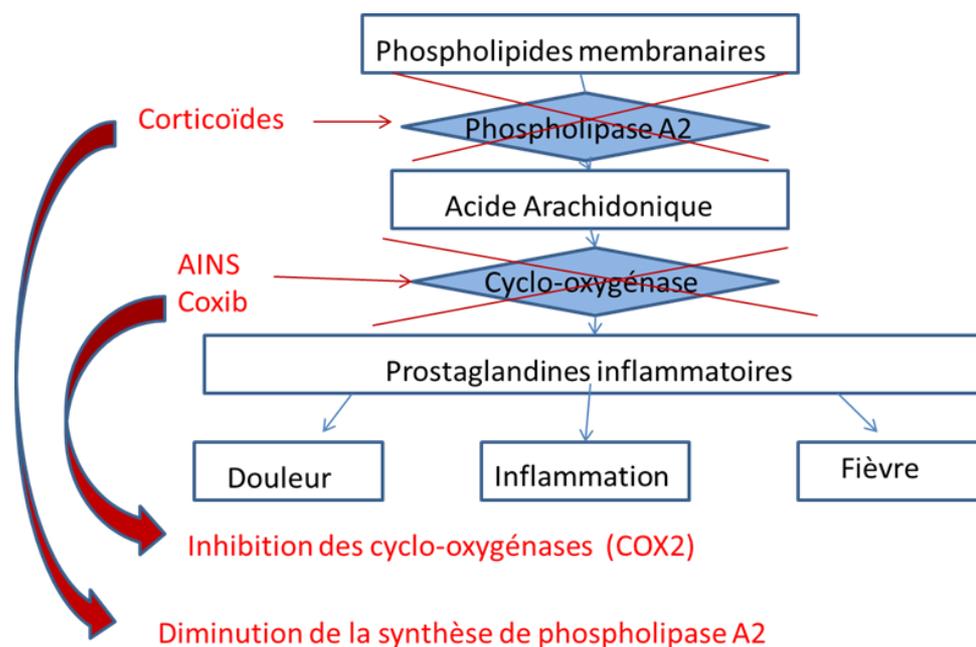


Schéma III.3 : mécanismes d'action des anti-inflammatoires.

III.3.7. L'évaluation de l'activité Anti-inflammatoire

Lors de la tentative de l'évaluation de l'activité anti inflammatoire d'une plante médicinale, les chercheurs utilisent différents tests *in vitro* et des modèles d'inflammation *in vivo*.

Les études *in vitro* sont utiles pour développer une compréhension du mécanisme de l'activité anti-inflammatoire des constituants de plantes.

Parmi les tests *in vitro* les plus fréquents utilisés pour tester l'activité anti-inflammatoire des extraits de plantes :

- **Méthode de stabilisation membranaire**

Au cours de l'inflammation, une lyse de la membrane lysosomale peut se produire en libérant leurs composants enzymatiques qui produisent une variété de troubles. Les AINS manifestent leurs effets soit en inhibant la libération d'enzymes lysosomales, soit en stabilisant les membranes lysosomales. La lyse des membranes des globules rouges avec hémolyse et oxydation de l'hémoglobine peut se produire suite à une exposition des globules rouges aux substances nocives. Les substances nocives sont le milieu hypotonique, la chaleur, le salicylate de méthyle et la phénylhydrazine. Étant donné que les membranes des globules rouges humains sont similaires à la membrane lysosomale, l'inhibition de l'hypotonicité et de la lyse induite par la chaleur de la membrane des globules rouges sera considérée comme une mesure du mécanisme de l'activité anti-inflammatoire. La solution hypotonique provoque l'accumulation excessive de liquide dans les globules rouges, ce qui entraîne la rupture de sa membrane. Enfin, l'hémolyse des globules rouges a lieu. La membrane des globules rouges lésée rend la cellule plus sensible aux dommages secondaires par la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres. Des enzymes bactériennes et des protéases existent dans les lysosomes des neutrophiles activés. La fuite de constituants lysosomiques provoque une inflammation et des dommages tissulaires supplémentaires lors de la libération extracellulaire. Par conséquent, la stabilisation membranaire des lysosomes est importante pour contrôler la réponse inflammatoire. Cela conduit à la prévention des fuites de ses constituants.

L'activité de stabilisation de la membrane des extraits peut être déterminée par hémolyse induite par la chaleur ou hémolyse induite par une solution hypotonique en utilisant des érythrocytes humains, des érythrocytes de rats ou des érythrocytes de souris. Les analogues de la membrane érythrocytaire à la membrane lysosomale donc l'effet des extraits sur la stabilisation des érythrocytes appliqués à la stabilisation de la membrane lysosomale [56].

- **Test d'inhibition de dénaturation des protéines**

La dénaturation des protéines entraîne une perte des propriétés biologiques des molécules de protéines. La dénaturation des protéines a été corrélée à la formation de troubles inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, le diabète et le cancer. Par conséquent, la capacité de la substance à empêcher la dénaturation des protéines peut également aider à prévenir les troubles inflammatoires. Dans cet essai, on utilise soit le BSA ou le blanc d'œuf comme protéine [56].

Références bibliographiques

- [1] Martinez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77(3), 147-161.
- [2] Manallah, A. (2012). *Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive*. Mémoire de magister, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie.
- [3] Levraut, J., urgence Samu–Smur, P., & de Nice, C. H. U. (2012). Désordres métaboliques en réanimation: de la physiopathologie au traitement. *Ann. Fr. Med. Urgence*, 2, 75.
- [4] Bonnefont-Rousselot, D., Théron, P., & Delattre, J. (2003). Radicaux libres et antioxydants. *Biochimie Pathologique. Aspects Moléculaires et Cellulaires*, 59-81.
- [5] Favier, A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108, 115.
- [6] Nanda, N. (2016). Oxidative stress in hypothyroidism. *International Journal of Clinical and Experimental Physiology*, 3(1), 4-9.
- [7] Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*, 2(2), 219.
- [8] Conner, E. M., & Grisham, M. B. (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*, 12(4), 274-277.
- [9] Koren, H. S. (1995). Associations between criteria air pollutants and asthma. *Environmental health perspectives*, 103(suppl 6), 235-242.
- [10] Victorin, K. (1994). Review of the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 317(1), 43-55.
- [11] Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6), 620-650.
- [12] Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.
- [13] Harman, D. (2002). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2002(37),14.
- [14] Tang, S. Y., & Halliwell, B. (2010). Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies?. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(1), 1-5
- [15] Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.

- [16] Pastre, J. (2005). *Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques* (Thèse de doctorat, Université paul sabatier-toulouse)
- [17] Sunitha, D. (2016). A review on antioxidant methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(2), 14-32.
- [18] Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- [19] Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food analytical methods*, 2(1), 41-60.
- [20] Fernando, C. D., & Soysa, P. (2015). Optimized enzymatic colorimetric assay for determination of hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenging activity of plant extracts. *MethodsX*, 2, 283-291.
- [21] Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
- [22] Khaldi, Z. (2018). *Elaboration et évaluation biologique de nouveaux matériaux lignocellulosiques antibactériens* (Thèse de doctorat, Université Limoges-France).
- [23] Aboul Ela, M. A., El-Shaer, N. S., & Ghanem, N. B. (1996). Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*, 51(12), 993-994.
- [24] Lowenfels, J., & Lewis, W. (2008). *Collaborer avec les bactéries: et autres micro-organismes*. Éd. du Rouergue.
- [25] Dadi, R. (2019). *Synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques et leur activité antibactérienne* (Thèse de doctorat, Université Paris-Nord-Paris XIII).
- [26] Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2018). *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.
- [27] Schaechter, M., Medoff, G., & Eisenstein, B. I. (1999). *Microbiologie et pathologie infectieuse*. De Boeck Supérieur.
- [28] Singleton, P. (1999). Bactériologie (cours 2^{ème} cycle). *Dunod, Paris*,(4),330-351.
- [29] Revathi, G., Puri, J., & Jain, B. K. (1998). Bacteriology of burns. *Burns*, 24(4), 347-349.
- [30] Nolan, L. K., Barnes, H. J., Vaillancourt, J. P., Abdul-Aziz, T., & Logue, C. M. (2013). Colibacillosis. *Diseases of poultry*, 751-805.
- [31] Hufnagel, D. A., Depas, W. H., & Chapman, M. R. (2015). The biology of the Escherichia coli extracellular matrix. *Microbiology spectrum*, 3(3), 3-3.

- [32] Paton, J. C., & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 450-479.
- [33] Donnenberg, M. S. (2015). Enterobacteriaceae. In *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*,(5), 2503-2517.
- [34] Mueller, G. M., & Schmit, J. P. (2007). Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. *Biodiversity and conservation*, 16(1), 1-5.
- [35] Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. *Mycological research*, 105(12), 1422-1432.
- [36] Courtecisse, R., & Duhem, B. (1994). Guide des Champignons de France et d'Europe. *Delachaux et Niestle, Lausanne, CH*.
- [37] Bon, M. (2004). *Champignons de France et d'Europe occidentale*. Paris: Flammarion.
- [38] Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 12(7), 317-324.
- [39] Segal, E. (2004). *Candida*, still number one-what do we know and where are we going from there. *Mikologia Lekarska*, 11(2), 133-138.
- [40] Sarazin, A. (2010). *Les glycannes pariétaux de levures et leur implication dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte* (Thèse de doctorat, Université du Droit et de la Santé-Lille II).
- [41] MAZRI, R. (2015). *Nouvelle approche des relations structures-activités dans des molécules antibiotiques* (Thèse de doctorat, Université Mohamed Khider-Biskra).
- [42] Mesbah, M. (2018). *Synthèse Caractérisation et Application Biologique de Nouveaux Ligands Bases de Schiff et Leurs Complexes métalliques* (Thèse de doctorat, Université Ferhat A-Sétif).
- [43] Guardabassi, L., & Courvalin, P. (2006). Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*, 1-18.
- [44] Henrotin, Y., Deby-Dupont, G., & Reginster, J. Y. (2001). Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Revue Médicale de Liège*, 56(6),433-442.
- [45] Ryan, G. B. (1977). Majno: Acute inflammation. A review. *Am J Pathol*, 86(1), 183-276.
- [46] Lacavé-Lapalun, J. V. (2013). *Réponse immunitaire induite par l'irradiation colorectale: manipulation thérapeutique des «toll like receptors»* (Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie-Curie-Paris).
- [47] Hajjaj, G. (2017). *Screening phytochimique, étude toxicologique et valorisation pharmacologique de *matricaria chamomilla l.* et de *l'ormenis mixta l.(asteraceae)** (Thèse de doctorat, Université Mohamed V-Rabat).

- [48] Zerbato, M. (2010). *Interet du dosage par micromethode de la proteine C reactive au cabinet de pediatrie* (Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré-Nancy).
- [49] Demoly, P. (2001). Bases physiopathologiques de l'inflammation en ORL. *La Presse médicale* (1983), 30(39-40), 8-18.
- [50] Diallo, I. (2019). *Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de Lentinula edodes (Shiitake) sous différentes conditions de culture* (Thèse de doctorat, Université Montpellier-France).
- [51] Annick, A.A. (2018). *Evaluation des activités anti-inflammatoire et antioxydante de l'extrait hydro-éthanolique de l'écorce de racines de Dichrostachys cinerea L. Wight et Arn. (Fabaceae)*. (Thèse de doctorat, Université Félix Houphouët Boigny-Côte d'Ivoire).
- [52] de Sutter, V., Guitton, S., & Boyer, A. (2020). Attitude du pharmacien face à une demande d'ibuprofène sans ordonnance. *Actualités Pharmaceutiques*, 59(592), 39-44.
- [53] Barnes, P. J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical science*, 94(6), 557-572.
- [54] Blain, H., Jouzeau, J. Y., Netter, P., & Jeandel, C. (2000). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *La revue de médecine interne*, 21(11), 978-988.
- [55] Rhen, T., & Cidlowski, J. A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1711-1723.
- [56] Sarveswaran, R., Jayasuriya, W. J. A. B., & Suresh, T. S. (2017). In vitro assays to investigate the anti-inflammatory activity of herbal extracts a review.

Deuxième Partie:

Travaux personnels

Chapitre IV :

Matériels et Méthodes

Le présent travail contribue à la valorisation d'une plante aromatique utilisées en médecine traditionnelle *Rosmarinus officinalis*.

Afin de réaliser cette étude, nous avons effectué :

- ✓ Une extraction des huiles essentielles des parties aériennes de *Rosmarinus officinalis* par hydrodistillation et des métabolites secondaires par macération.
- ✓ Une évaluation des activités biologiques des huiles essentielles et des extraits de *Rosmarinus officinalis* (pouvoir antioxydant, activité antibactérienne, activité antifongique et l'activité anti-inflammatoire).
- La plus grande partie de ce travail est réalisé au sein de laboratoire de chimie à la faculté des sciences exactes et informatique de l'université de Jijel.
- L'étude de l'activité antibactérienne et antifongique a été effectuée au niveau de laboratoire d'analyse médicale Dr. Boukrouche Oussama –Jijel.
- L'activité anti-inflammatoire a été réalisée au sein de laboratoire de biologie Faculté des Sciences de la nature et de la vie de l'université de Jijel.

IV.1. Matériel végétal

IV.1.1. Le moment de récolte

La plante *Rosmarinus officinalis* a été récoltée en décembre 2021, dans la région de Ouled Bounar, Jijel.

Après le lavage de la partie aérienne de la plante étudiée, afin de la débarrasser de la poussière et d'autres impuretés, elle est aussitôt séchée à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité. Le matériel végétal (feuilles et fleurs) a été découpé en petits morceaux avant son utilisation.

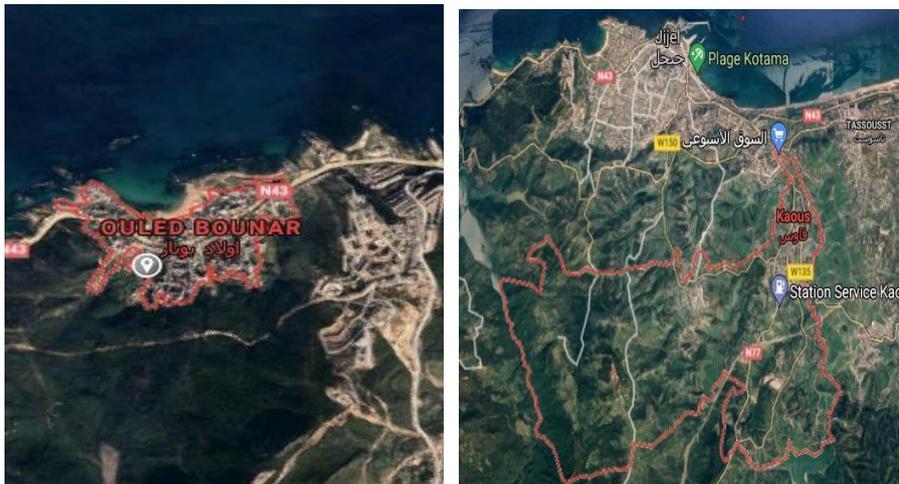


Figure IV.1 : Carte géographique de la région Ouled Bounar – Jijel ^[1].

IV.1.2. Détermination de la teneur en eau

Une masse (P1) des feuilles de la plante fraîchement récoltée est portée au séchage à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

Une masse (P2) la quantité des feuilles obtenue après le séchage.

- **Méthode de calcul :** Le taux d'humidité est calculé par la formule suivante ^[2]:

$$H \% = ((P1-P2) / P1) \times 100$$

H% : taux d'humidité exprimé en pourcentage ;

P 1 : poids de la plante fraîche(g) ;

P 2 : poids de la plante après séchage (g).

IV.2. Etude chimique

IV.2.1. L'étude des huiles essentielles

IV.2.1.1. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

L'hydrodistillation proprement dite est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle ^[3], le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, la vapeur d'eau va se charger en huiles essentielles. Ce mélange huile-vapeur d'eau traverse ensuite un réfrigérant puis redevient liquide, les huiles sont récupérées par décantation grâce à la différence de densité des deux liquides ^[4].

❖ Protocole

Nous avons divisé 140 g des parties aériennes de notre matière végétale en petites quantités. Puis nous avons introduit 30 g de cette matière végétale dans un ballon de 1 L contenant une quantité suffisante d'eau distillée sans le remplir complètement (environ les deux tiers de volume du ballon) pour éviter les débordements au cours de l'ébullition, le mélange est porté à l'ébullition à l'aide d'un chauffe-ballon pendant 1 heure et 30 minutes ce procédé est répété 3 fois. La vapeur d'eau remplie d'huile essentielle est condensée par un réfrigérant et recueillie dans une ampoule à décanter, l'huile essentielle est séparée de l'hydrolat par une simple extraction liquide-liquide en introduisant le chlorure de sodium jusqu'à la saturation du distillat, suivie par environ 100 ml de n-Hexane, après le dégazage et la décantation la phase organique est récupérée, les mêmes étapes ont été répétées avec la quantité de la matière végétale restante.

Après l'évaporation du solvant à l'air libre l'huile essentielle récupérée est quantifiée (pesée).

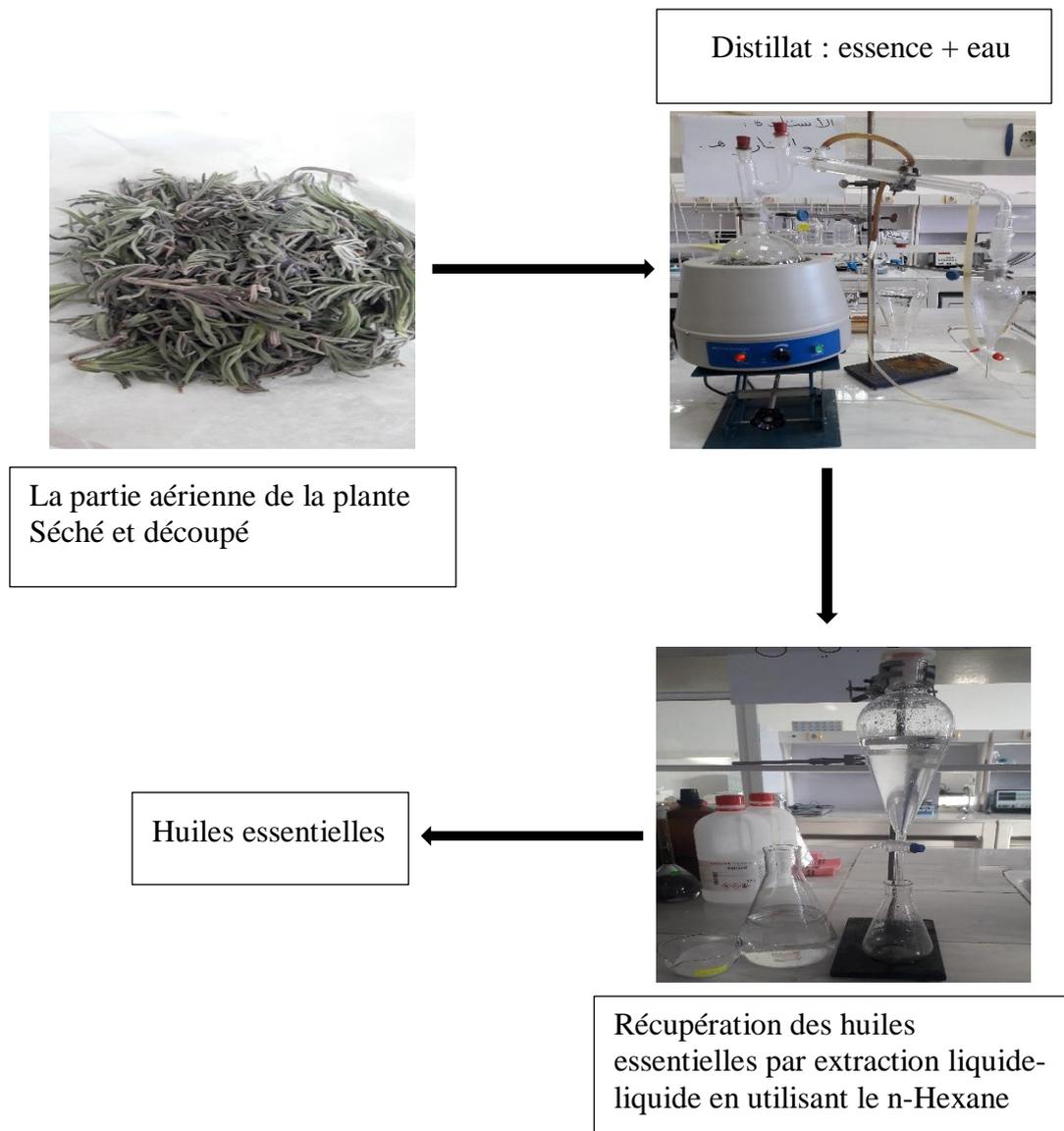


Schéma IV.1: Les étapes d'extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation.

IV.2.1.2. Détermination du rendement en huiles essentielles

Selon la norme AFNOR (1992) ^[3], le rendement en huile essentielle (R_{HE}), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (m') et la masse de la matière végétale utilisée (m). Il est donné par la formule suivante :

$$R_{HE} = (m' \div m) \times 100$$

R_{HE} : rendement en huile essentielle des parties aériennes de *Rosmarinus officinalis* ;

m' : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme ;

m : masse du matériel végétal en gramme.

IV.2.1.3. Contrôle de qualité des huiles essentielles

❖ Caractère organoleptique

L'évaluation des propriétés organoleptiques constitue généralement une partie des études visant à analyser les facteurs qui affectent la qualité de l'huile essentielle. Dans cette étude, nous nous sommes basés sur trois paramètres essentiels qui sont l'aspect la couleur et l'odeur.

IV.2.2. L'étude des métabolites secondaires

IV.2.2.1. Extraction des métabolites secondaires (extraction solide/ liquide)

115 g de la partie aérienne de la plante sèche et découpée sont laissés macérer dans un mélange hydroalcoolique (méthanol /eau) avec proportions (80 /20) à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 heures. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Le macérat est filtré et le filtrat est récupéré. L'extrait hydroalcoolique obtenu est concentré sous vide à température n'excédant pas 40°C, puis il est repris avec 300 ml d'eau distillée (à raison 400 ml pour 1000 g du matériel végétal sec), ce mélange est filtré. Le filtrat est soumis à une extraction liquide- liquide successivement avec l'éther de pétrole, le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le n-butanol. Les quatre phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées.

IV.2.2.2. Détermination des rendements d'extraction des métabolites secondaires

Le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante :

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

R : le rendement en % ;

m_{ext} : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g ;

$m_{\text{éch}}$: la masse sèche de l'échantillon végétal en g.

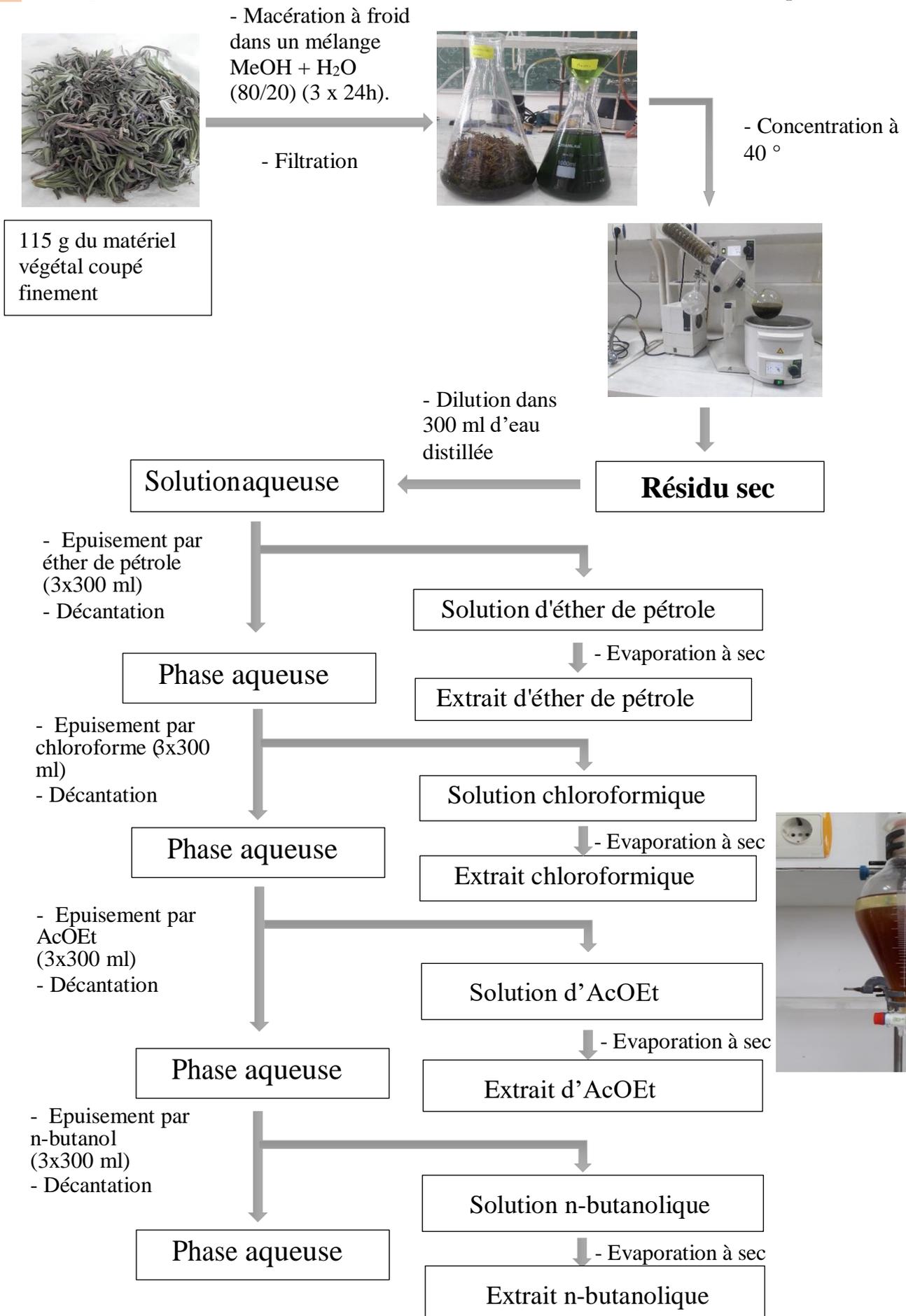


Schéma IV.2 : Différentes étapes de l'extraction des métabolites secondaires.

IV.3. L'analyse qualitative et quantitative des extraits

IV.3.1. Screening phytochimiques

Les différentes réactions chimiques ont pour objectif de caractériser et rechercher les principaux groupes et familles chimiques dans les extraits de la partie aérienne de la plante. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés ainsi que des examens en lumière ^[5].

Cette caractérisation chimique préliminaire se fait dans des tubes à essais en utilisant les techniques standards décrites par Evans, 1989 ^[6] ; Harborne, 1998 ^[7] ; Bruneton, 1999 ^[8].

▪ Test pour la mise en évidence des flavonoïdes

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à tester, ajouter 1ml d'acide chlorhydrique (HCl) et 3 copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rouge ou jaune révèle la présence des flavonoïdes.

▪ Test pour la mise en évidence des tanins

A 1 ml d'extrait à analyser, ajouter 0,5 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 1 %. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

▪ Test pour la mise en évidence des alcaloïdes

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer et Wagner. 1ml de chaque extrait est divisé en deux volumes égaux. Un volume est traité par 0,5ml de réactif de Mayer, l'autre par 0,5 ml de réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement révèle la présence des alcaloïdes.

❖ **Réactif de Mayer** : on dissout 1.758g de HgCl₂ dans 60 ml de l'eau distillée, puis 5g de KI dans 10 ml de l'eau distillée, et on mélange les deux solutions.

❖ **Réactif de Wagner** : on dissout dans 75 ml de l'eau distillée 2g de KI et 1.27g de I₂, le volume est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

▪ Test pour la mise en évidence des terpénoïdes

5ml d'extrait est ajouté à 2ml de chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et un couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

▪ Test pour la mise en évidence des quinones

Sur un volume de chacune des extraits, on ajoute quelques gouttes de NaOH, l'apparition d'un couleur jaune, rouge ou violet confirme la présence des quinones.

▪ Test pour la mise en évidence des coumarines

Introduire 5ml d'extrait dans un tube, ajouter 0,5ml de NH₄OH à 10%, mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

IV.3.2. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, selon la méthode de dosage décrite par Muller.

Ce réactif constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀), il est réduit lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes de tungsten (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃).

La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux possédant une absorption maximale aux environs de $\lambda = 750-765$ nm. L'acide gallique est utilisé comme étalon.

La courbe d'étalonnage est obtenue à partir des solutions d'acide gallique de différentes concentrations en fonction de l'absorbance de chaque solution déterminée à $\lambda = 760$ nm^[9].

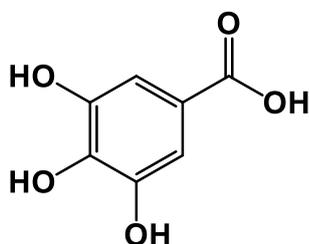


Figure IV.2: La structure de l'acide gallique.

➤ Protocole

1ml de réactif de Folin (10 fois dilué) préparé fraîchement est ajouté à 200 μ l d'échantillon (extrait méthanolique). Après 4 min, 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (7.5%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 30 minutes d'incubation dans un bain ultrason à 40°C, l'absorbance est mesurée à 760 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique à différentes concentrations (0.1, 0.5, 1, 3, 6, 10) μ g / ml dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg GAE/g EXS)^[9].

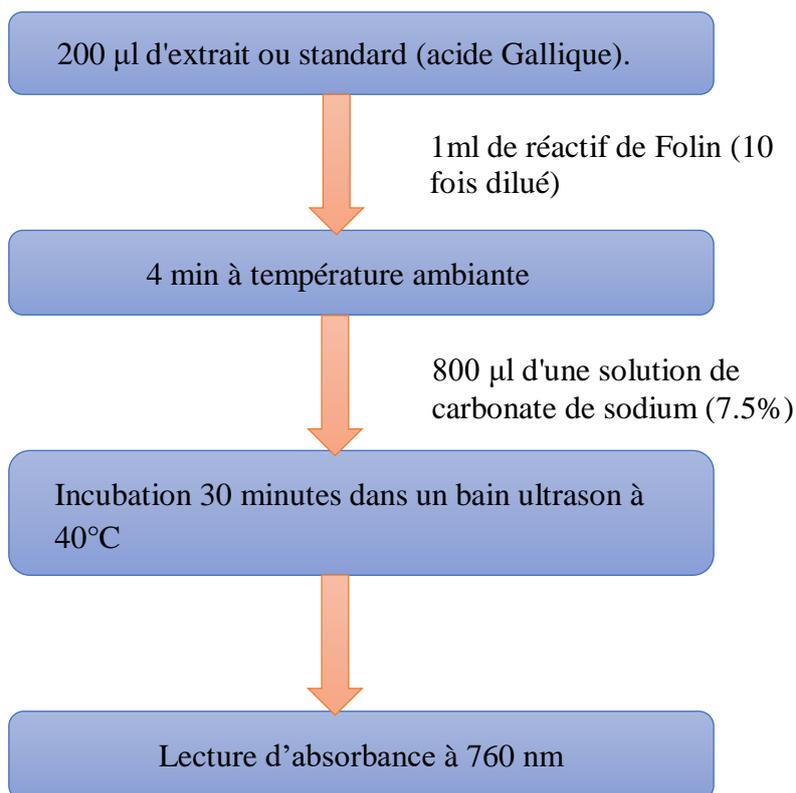


Schéma IV.3 : Protocole du dosage des polyphénols totaux.

IV.3.3. Dosage des flavonoïdes totaux

Ce dosage est basé sur la formation d'un complexe entre le trichlorure d'aluminium et les groupements hydroxyles des flavonoïdes. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde $\lambda = 415$ nm.

La quercétine est utilisée comme étalon. La courbe d'étalonnage est obtenue à partir des solutions de la quercétine de différentes concentrations en fonction de l'absorbance de chaque solution déterminée à $\lambda = 415$ nm ^[9].

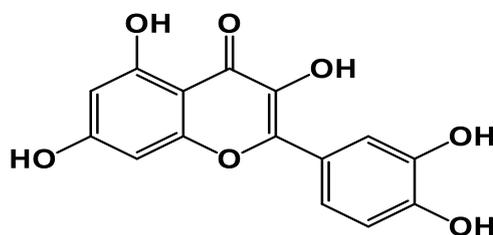


Figure IV.3: Structure de la quercétine.

➤ Protocole

À 1 ml d'échantillon (préparé dans le méthanol) est ajouté 1 ml de la solution de trichlorure d'aluminium (2 % dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm. La teneur en flavonoïdes a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée par la quercétine à différentes concentrations (0.5, 1, 2, 3 et 5) $\mu\text{g} / \text{ml}$ dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g EXS)^[9].

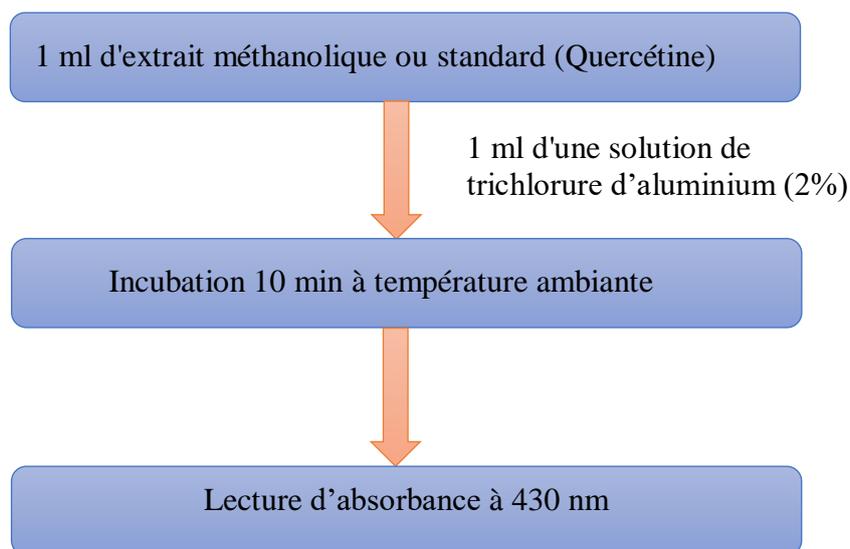


Schéma IV.4: Protocole du dosage des flavonoïdes totaux.

IV.4. Les activités biologiques

IV.4.1. L'activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode définitive par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Généralement il faut combiner les réponses de tests différents pour avoir une indication sur l'activité antioxydante du composé à tester.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* ou *in vivo*, l'activité antioxydante. Parmi ces méthodes, on a choisi d'appliquer cinq méthodes, à savoir : Piégeage du radical libre DPPH[•], Réduction du radical cation ABTS^{•+} (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-Azino-Bis (3-éthylbenzoThiazoline-6-Sulphonique), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et la méthode de phosphomolybdate PPM.

IV.4.1.1. Test au DPPH

Le test au radical libre DPPH[•] est recommandé pour des composés contenant les groupes -SH, -NH et -OH [10]. Il s'effectue à température ambiante, pour éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est largement utilisé pour l'évaluation des extraits très riches en composés phénoliques [11][12].

➤ Principe

Le composé 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante [13][14]. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH[•], mesurable par spectrophotométrie à $\lambda = 517$ nm.

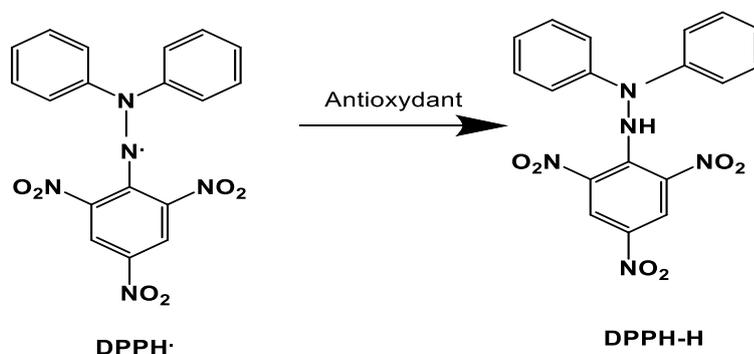


Figure IV.4: Piégeage du radical libre DPPH[•].

➤ Mode opératoire

Un volume de 50 μ l de différentes concentrations de chaque extrait ou de standard (acide ascorbique) est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH 60 μ M fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 μ l du méthanol avec 1,950 ml d'une solution méthanolique de DPPH utilisée à la même concentration. Après incubation à l'obscurité dans un bain ultrason pendant 30 minutes et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour chaque concentration le test est répété 3 fois [15].

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$$I\% = \left[\frac{\text{Abs contrôle négatif} - \text{Abs extrait}}{\text{Abs contrôle négatif}} \right] \times 100$$

Abs contrôle négatif : correspond à l'absorbance du DPPH sans antioxydant après le temps de la réaction.

Abs extrait : correspond à l'absorbance de l'échantillon avec DPPH après le temps de la réaction.

➤ **Calcul des IC_{50}**

Les valeurs des concentrations inhibitrices nécessaires pour le piégeage et la réduction de 50% de moles du radical libre DPPH (IC_{50}) sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés : pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées. Plus la valeur d' IC_{50} est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande [16].

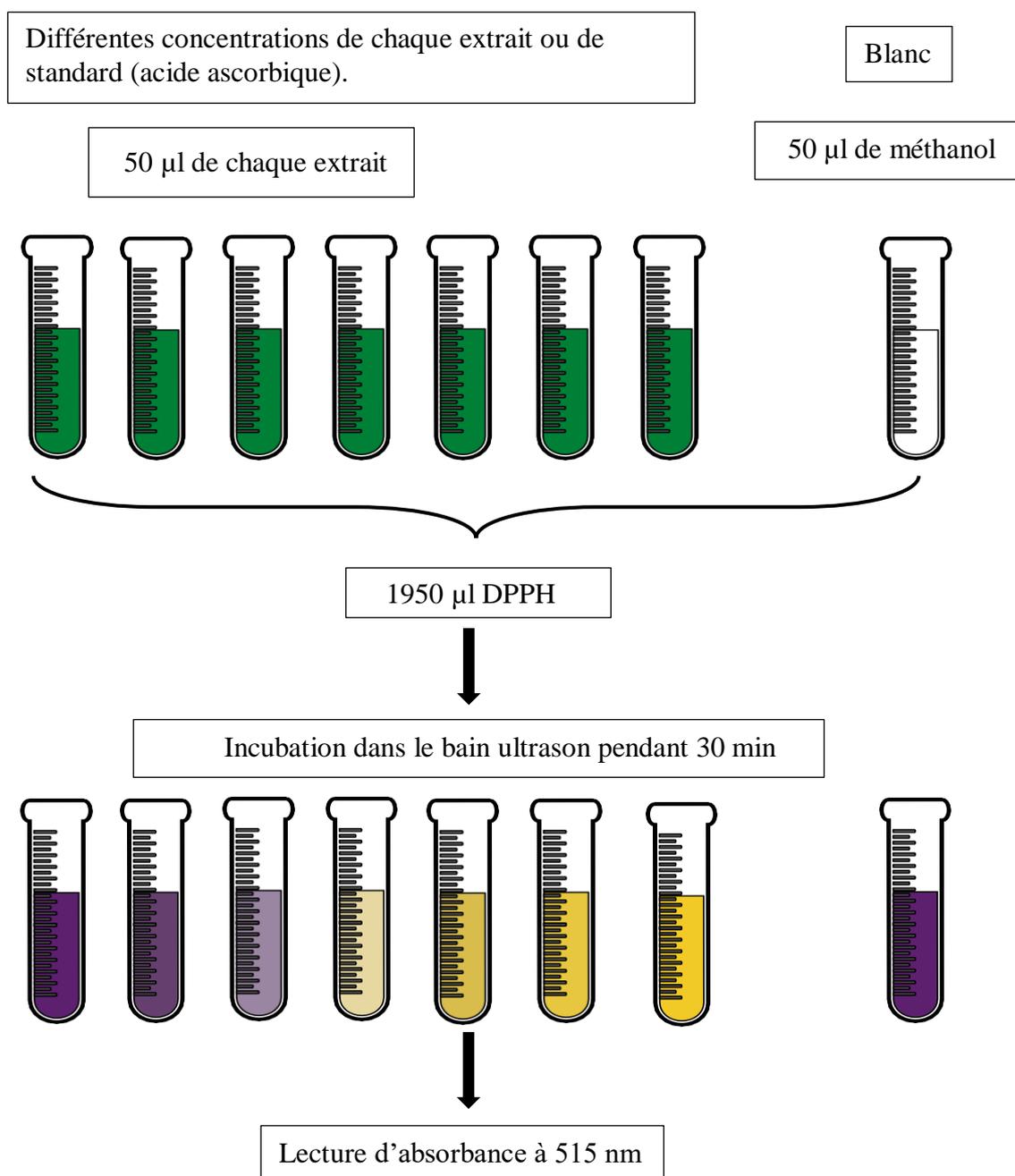


Schéma IV.5: Protocole de la mise en œuvre du test du radical DPPH.

IV.4.1.2. Test de l'ABTS

Le test de l'ABTS (Acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu en le transformant en ABTS incolore.

Le radical préformé ABTS^{•+} est généré en présence des ions persulfates.

En présence d'un antioxydant, le passage du radical ABTS^{•+} à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de la coloration bleu intense qui peut être suivie par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 734 nm ^[17].

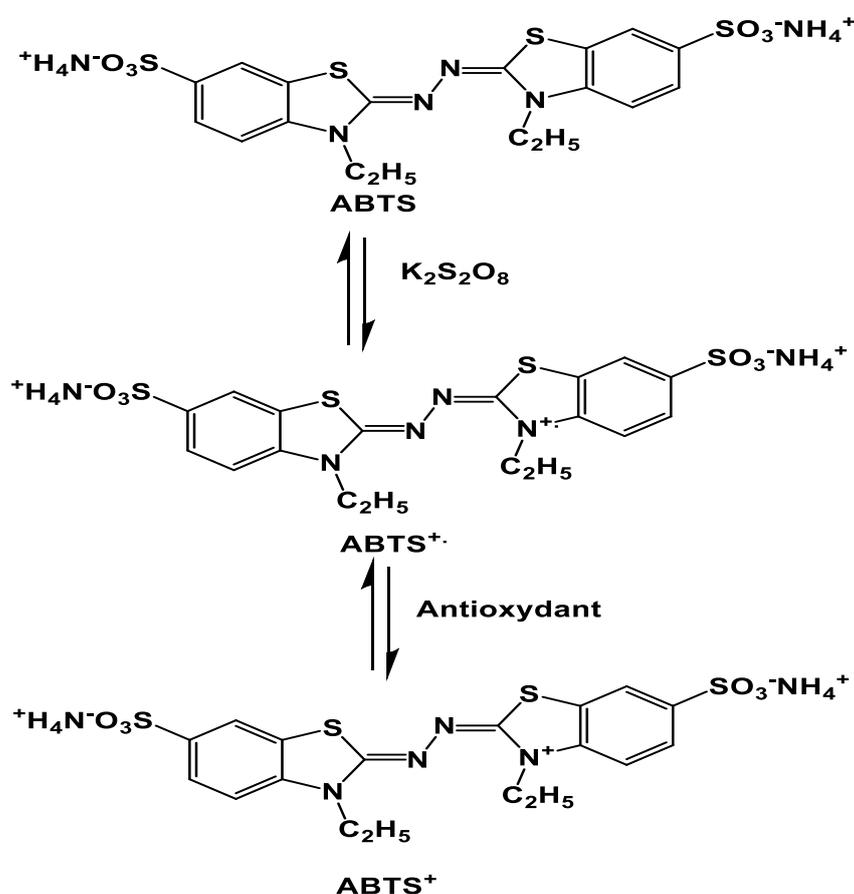


Figure IV.5: Réduction du radical cation ABTS^{•+}.

➤ **Mode opératoire**

Le test a été réalisé selon la méthode de Re et al avec quelques modifications. L'ABTS a été dissous dans de l'eau à une concentration de 7 mM. Le cation radical ABTS^{•+} a été produit en faisant réagir une solution ABTS avec du persulfate de sodium 2,45 mM. Le mélange réactionnel est mis en incubation, à l'obscurité, pendant 16 h à température ambiante. La solution ABTS^{•+} a été diluée avec le méthanol afin d'obtenir une absorbance de 0,7 à 734 nm.

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait ou de standard (acide ascorbique) est ajouté à 1,950 ml de la solution diluée d'ABTS^{•+}. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1,950 ml de la solution diluée d'ABTS^{•+}. Après incubation à l'obscurité pendant 1h et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour chaque concentration le test est répété 3 fois ^[18].

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle négatif} - \text{Abs extrait})}{\text{Abs contrôle négatif}} \times 100$$

Abs contrôle négatif : correspond à l'absorbance de l'ABTS sans antioxydant après le temps de la réaction.

Abs extrait : correspond à l'absorbance de l'échantillon avec L'ABTS après le temps de la réaction.

➤ Calcul des IC₅₀

L'IC₅₀ est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical ABTS.

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés: pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

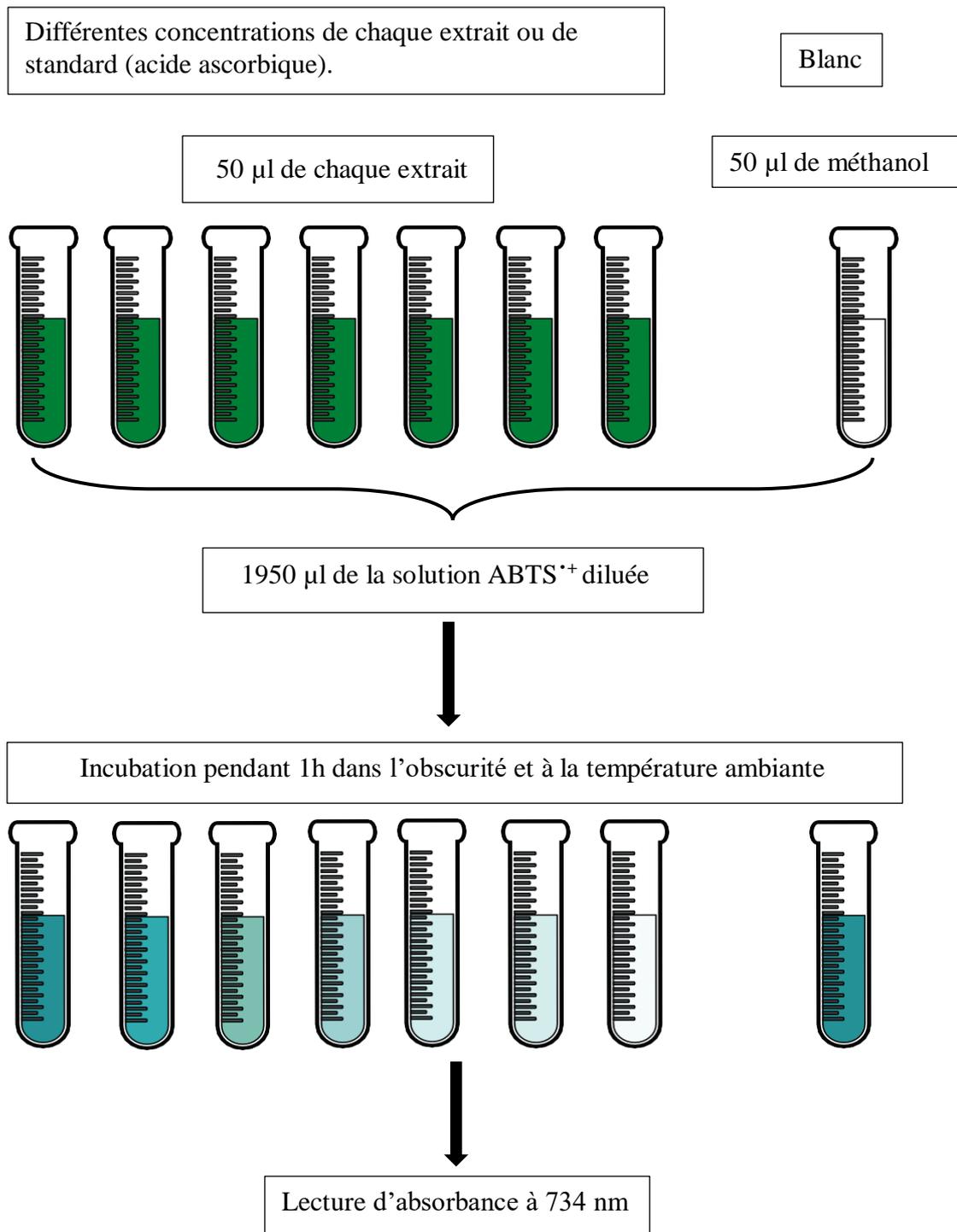
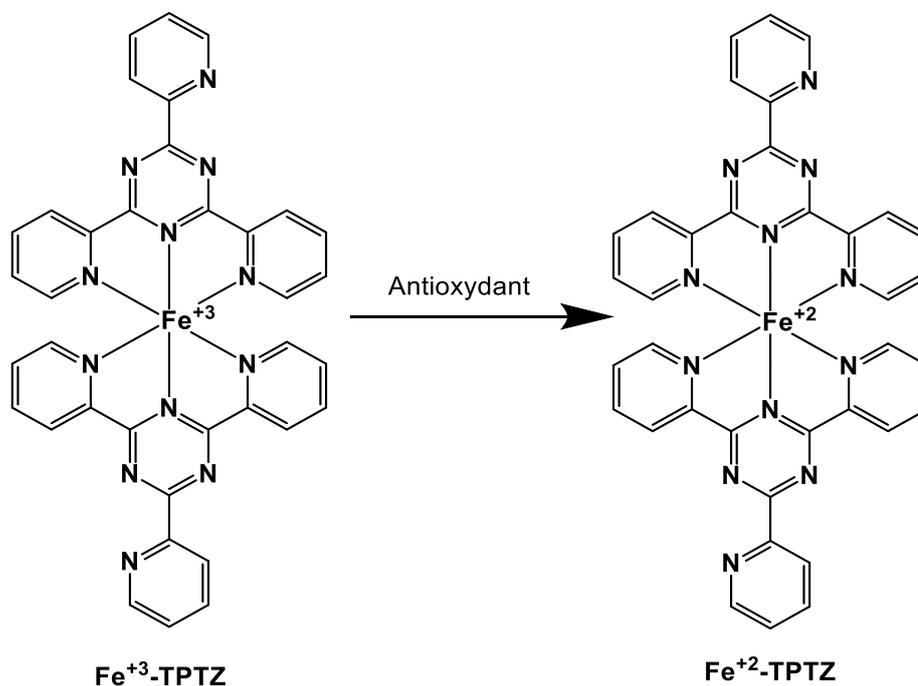


Schéma IV.6: Protocole de la mise en œuvre du test de l'ABTS.

IV.4.1.3. Test de la réduction du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Dans cette technique la présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} /complexe ferricyanide à la forme ferreuse. Par conséquent, le Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu

réactionnel à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés ^{[19] [20]}.



FigureIV.6: Réduction des ions ferriques (FRAP).

➤ Mode opératoire

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2,5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ à 0,1% sont additionnées. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm. Le blanc est semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Pour chaque concentration le test est répété 3 fois ^[21].

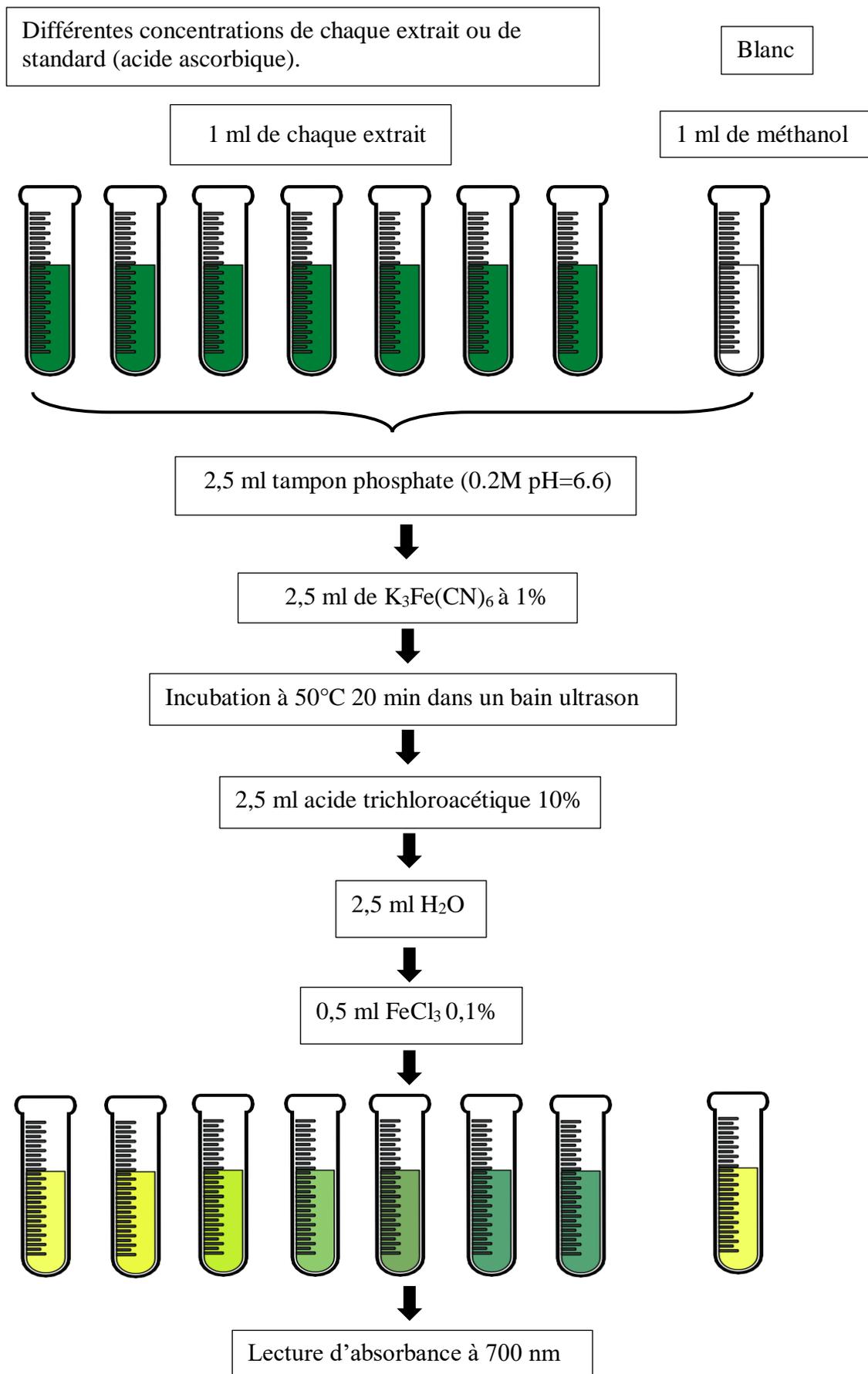


Schéma IV.7: Protocole de la mise en œuvre du test de FRAP.

IV.4.1.4. Test de H₂O₂

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV. Comme la concentration de H₂O₂ diminue par les composés piègeurs, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230 nm diminue également [22].

➤ Mode opératoire

Pour étudier l'activité du piégeage du H₂O₂, nous avons utilisé la méthode décrite par Ruch et *al* avec quelques modifications.

Une solution de peroxyde d'hydrogène (4 mM) a été préparée dans un tampon phosphate (pH = 7,4) à 20°C.

Un volume de 200 µl de différentes concentrations de chaque extrait ou de standard (acide ascorbique) préparé dans le DMSO est ajouté à 1,800 ml de la solution de H₂O₂ déjà préparé dans le tampon phosphate, après 20 min la lecture des absorbances est effectuée à 230 nm à l'aide d'un spectrophotomètre par rapport à une solution contenant le tampon phosphate et l'extrait sans peroxyde d'hydrogène.

Le control négatif est préparé dans les mêmes conditions par un volume de 200 µl de DMSO ajouté à 1,800 ml de la solution de H₂O₂ préparé dans le tampon phosphate [23].

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) de la même façon que le DPPH et l'ABTS.

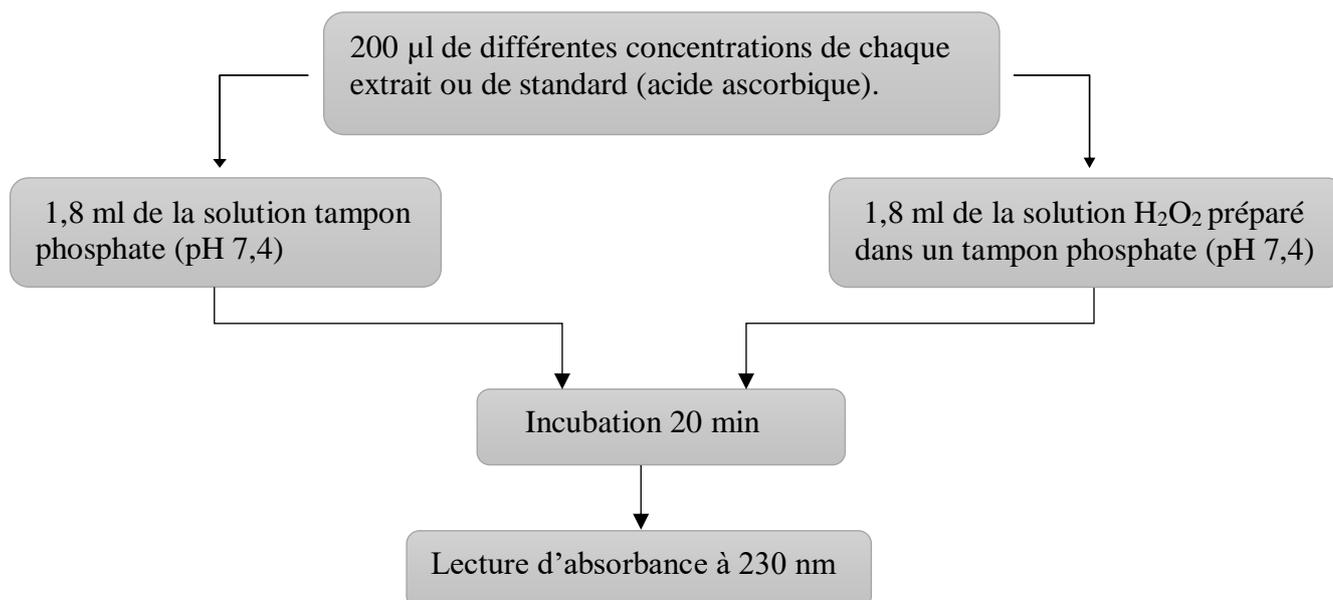


Schéma IV.8: Protocole de la mise en œuvre du test de H₂O₂.

IV.4.1.5. Test de PPM

La capacité anti-oxydante totale a été mesurée par un spectrophotomètre en utilisant la méthode de phosphomolybdate qui est basée sur la réduction de Mo(VI) en Mo(V) en présence des antioxydants et la formation d'un complexe vert de phosphate/ Mo (V) à pH acide [24].

➤ Mode opératoire

Un volume de 200 µl de différentes concentrations de chaque extrait ou de standard (acide ascorbique) préparé dans le méthanol a été mélangé avec 2 ml de solution réactif (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Les tubes contenant la solution de réaction ont été incubés à 95 °C pendant 90 minutes. Après refroidissement l'absorbance de la solution a été mesurée à 695 nm en utilisant le spectrophotomètre. Le blanc est semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol. Pour chaque concentration le test est répété 3 fois. La capacité anti-oxydante totale a été exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait [24].

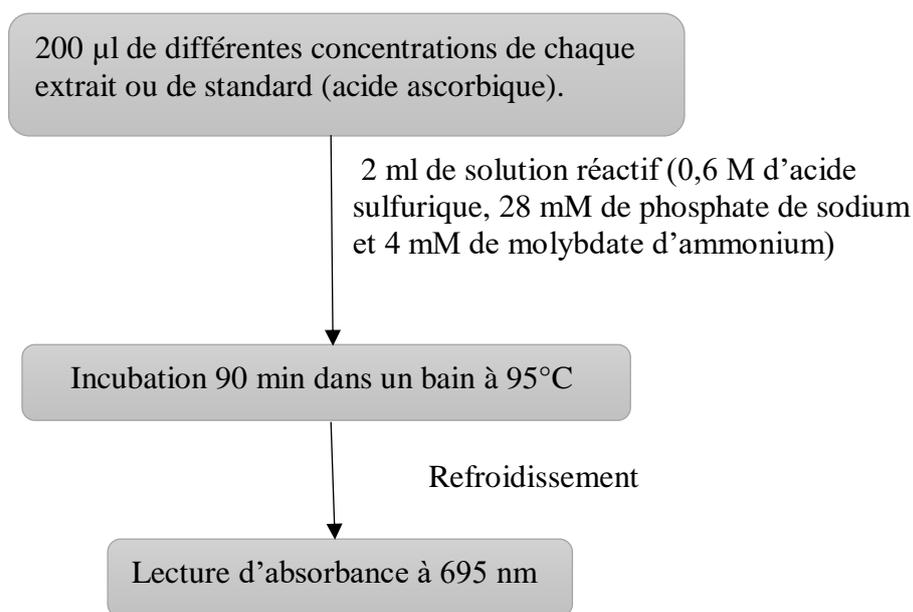


Schéma IV.9: Protocole de la mise en œuvre du test de PPM.

IV.4.2. L'activité antimicrobienne

IV.4.2.1. L'activité antibactérienne

L'évaluation des activités antibactérienne de nos échantillons d'huiles essentielles et des quatre extraits chloroforme, acétate d'éthyle, n- butanol et extrait brut a été réalisée par la méthode de diffusion en gélose dite méthode de diffusion sur disques en raison sa simplicité et

son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries. Ce test a été réalisé au niveau du laboratoire de Dr. Boukrouche Oussama (Jijel).

▪ Souches bactériennes testées

Notre étude a porté sur 3 souches bactériennes pathogènes à Gram - qui sont les suivantes : *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Le tableau IV.1 représente les caractéristiques des souches bactériennes utilisées :

Tableau IV.1: Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.

Bactéries	Famille	Gram
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Négatif
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonaceae</i>	Négatif

▪ Technique d'aromatogramme

L'activité antibactérienne est évaluée par la méthode d'aromatogramme qui permet de déterminer la sensibilité des différentes espèces bactériennes vis à vis de l'huile essentielle ou l'extrait donnée. La méthode de l'aromatogramme consiste à utiliser des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé convenable, déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en papier filtre, préalablement imprégnés de quantités connues d'huile essentielle ou d'extrait, sont alors placés en surface de la gélose. Généralement, les microorganismes seront classés susceptibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition ^[25].

▪ Milieu de culture

Le milieu de culture gélose nutritive de Muller Hinton (MH) pour étudier la sensibilité des souches bactériennes.

▪ Préparation de suspension bactérienne

Chaque souche bactérienne a étéensemencée en traites sur des boîtes de pétri contenant la gélose nutritive et incubée pendant 18h afin d'obtenir une culture jeune des bactéries à partir de ces boîtes et à l'aide d'une pipette pasteur on prélève une colonie bien isolée dans un tube à visse stérile contenant 10ml de l'eau physiologique. On homogénéise tous les tubes de suspension bactérienne à l'aide du vortex (2-5 minutes).

▪ Mode opératoire

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques du papier filtre imbibé par 2000 µg/ml des extraits et des HEs préparé dans le DMSO sont disposés sur la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension bactérienne.

▪ Lecture

La lecture des diamètres d'inhibition se fait après 24 h d'incubation à l'étuve à 37°C par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque en (mm). La sensibilité des souches vis-à-vis les HEs et les extraits est déterminée comme suit :

Non sensible (-) ou résistante, si le diamètre est inférieur à 8mm ; Sensible (+) si le diamètre est compris entre 9mm et 14mm ; Très sensible (++) si le diamètre est compris entre 15mm et 19mm ; Extrêmement sensible (+++), si le diamètre est supérieur à 20 mm ^[26].

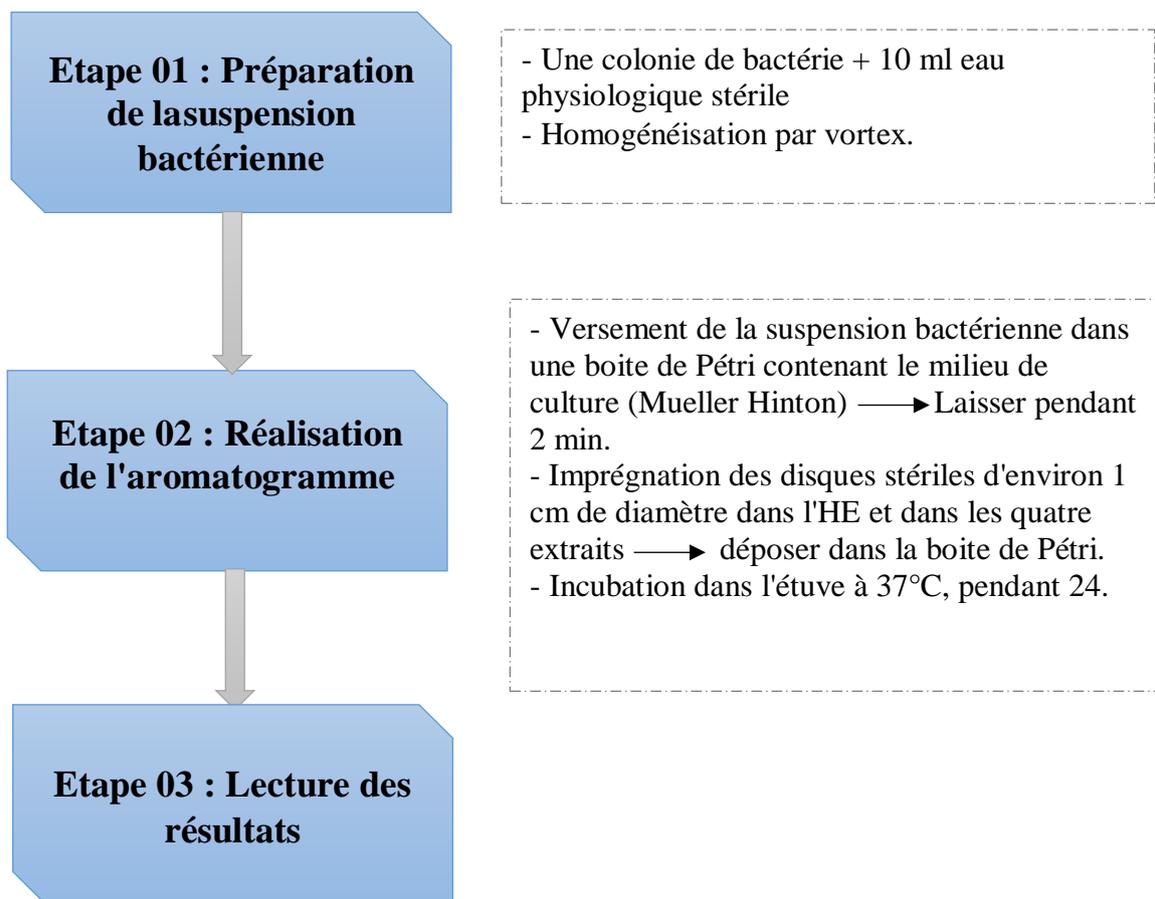


Schéma IV.10: Protocole d'aromatogramme.

IV.4.2.2. L'activité antifongique

- **Souches de champignon testées**

L'activité antifongique de l'HE et des extraits été testée sur une seule souches *Candida albicans*.

- **Milieu de culture**

Le milieu de culture gélose nutritive de Muller Hinton (MH) et le milieu Sabourand pour étudiée la sensibilité de la souche étudiée.

- **Mode opératoire**

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques du papier filtre imbibé par 2000 µg/ml des extraits et des HES préparé dans le DMSO sont disposés sur la surface de la gélose et du Sabourand uniformémentensemencée avec une suspension fongique.

- **Lecture**

La lecture des diamètres d'inhibition se fait après 24 h d'incubation à l'étuve à 37°C, les colonies se développent à la surface du milieu de culture laissant des zones vierges autour des disques appelées zones d'inhibition.

IV.4.3. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire par la méthode de la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC)

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits et des huiles essentielles de notre plante est la méthode de la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC).

- **Principe**

Cette technique consiste à un dosage *in vitro* pour évaluer l'effet préventif des extraits et des huiles essentielles contre la lyse membranaire des globules rouges (HRBC) induite par l'hypotonie. La teneur en hémoglobine dans la suspension a été estimée par un spectrophotomètre à 560 nm ^[27].

- **Mode opératoire**

Le sang a été recueilli auprès d'un volontaire humain en santé qui n'avait pas pris des anti-inflammatoires pendant 2 semaines avant l'expérience et a été mélangé avec un volume égal de la solution Alsevers stérilisée (2 % de glucose, 0,8 % de citrate de sodium, 0,5 % d'acide citrique et 0,42 % de chlorure de sodium dans l'eau distillé). Cette solution sanguine a été centrifugée à 3000 tr/min pendant 10 min et les cellules emballées ont été séparées. Une

suspension à 10% v/v a été préparé avec de l'isosaline (0,85 %, pH = 7,2) et les cellules emballées ^[28].

Les solutions suivantes ont été utilisées :

▪ **La solution d'essai :**

Composé de 1 ml tampon phosphate (pH=7,4 ; 0,15M), 2 ml solution hyposaline (0,36%), 0,5 ml de l'extrait ou HE à différentes concentration (100, 50 et 10 µg / ml) et 0,5 ml de suspension de globules rouges préparé à 10 % v/v.

▪ **Le test de contrôle :**

Composé de 1 ml de tampon phosphate et 2,5 ml d'eau physiologie et 0,5 ml de suspension de globules rouges humains 10% v/v.

▪ **La Solution standard :**

Composé de 1 ml de tampon phosphate, 2 ml de solution salée hypotonique, 0,5 ml de solution standard de l'acide acétylsalicylique (Aspirine) à différentes concentrations (100, 50 et 10 µg / ml) et 0,5 ml de suspension de globules rouges préparé à 10 % v/v.

Tous les mélanges d'essai ont été incubés à 37°C pendant 30 min. puis centrifugé à 3000 tr/min pendant 20 min. Le liquide surnageant a été séparé et la teneur en hémoglobine a été estimée par un spectrophotomètre à 560 nm. Le pourcentage d'hémolyse a été estimé en supposant que l'hémolyse produite dans le contenu était 100% ^[29]. Le pourcentage de stabilisation ou de protection de la membrane HRBC a été calculé en utilisant la formule suivante ^[30] :

$$\text{Inhibition de l'hémolyse \%} = 100 \times (\text{AT-AE}/\text{AT})$$

Où :

AT: absorbance du contrôle ;

AE : absorbance des échantillons.

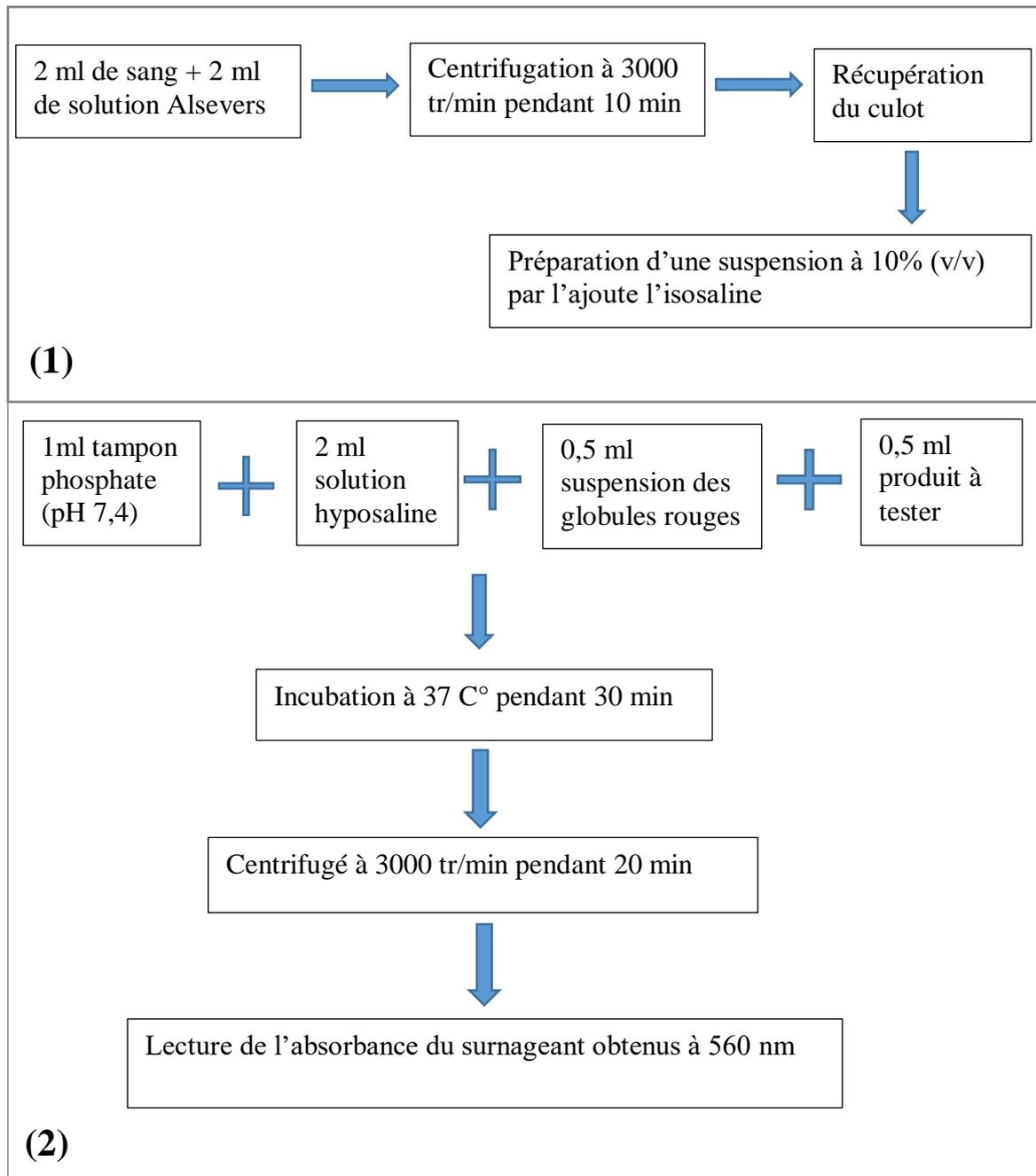


Schéma IV.11: Protocole de stabilisation de la membrane des globules rouges humains.

Références bibliographiques

- [1] <https://goo.gl/maps/rSELYg1jDMizz9Cg8>
- [2] Twidwell, E. K., Wagner, J. J., & Thiex, N. J. (2002). Use a microwave oven to determine moisture content of forages.
- [3] Afnor, N. (1992). Recueil des Normes Françaises: Huiles Essentielles. *AFNOR: Paris*.
- [4] Lamassiaude-Peyramaure, S. (2008). Nouvelles thérapeutiques à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*, 475(47), 27-28.
- [5] Hagermann, A., Harvey-Mueller, I., & Makkar, H. P. S. (2000). Quantification of tannins in tree foliage. *Viena: FAO/IAEA Working Document*.
- [6] Evans, W. C. (2009). *Trease and Evans' pharmacognosy*. Elsevier Health Sciences.
- [7] Harborne, A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer science & business media.
- [8] Bruneton, J. (1999). *Toxic plants dangerous to humans and animals*. Intercept Limited.
- [9] Benniou ép Gherbi, L. (2018). *Etude phytochimique et pharmacologique d'espèces de deux familles Lamiacées et Apiacées Salvia phlomoides Asso. et Ferula vesceritensis Coss. et Dur* (Doctoral dissertation Université des Frères Mentouri-Constantine).
- [10] Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P., & Riceevans, C. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of biochemistry and biophysics*, 322(2), 339-346.
- [11] Cai, Y. Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., & Corke, H. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life sciences*, 78(25), 2872-2888.
- [12] Hatzidimitriou, E., Nenadis, N., & Tsimidou, M. Z. (2007). Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry*, 105(4), 1504-1511.
- [13] Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- [14] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

- [15] Benhammou, N., Bekkara, F. A., & Panovska, T. K. (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. AND *Pistacia atlantica* Desf. *Advances in Food Sciences*, 29(3), 155-161.
- [16] Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. H. (Eds.). (2001). *Antioxidants in food: practical applications*. CRC press.
- [17] Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free radical research*, 36(2), 177-187.
- [18] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- [19] Hubert, J. (2006). *Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja: étude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines* (Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse).
- [20] Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F., & Chou, S. T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(8), 2454-2458.
- [21] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
- [22] Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*, 613(1), 1-19.
- [23] Ruch, R. J., Cheng, S. J., & Klaunig, J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6), 1003-1008.
- [24] Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
- [25] Wilkinson, J. M. (2006). Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. *Modern phytomedicine: turning medicinal plants into drugs*, 157-171.

- [26] Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.
- [27] Deffa, O., Ammedah, S., & Mekkiou, R. *Les interactions fonctionnelles des flavonoïdes de l'extrait butanolique de la plante Heliotropium undulatum vis-à-vis des mécanismes de l'hépatotoxicité de l'hydrazine chez le rat* (Thèse de doctorat, Université des frères mentouri-Constantine).
- [28] Kar, B., Kumar, R. S., Karmakar, I., Dola, N., Bala, A., Mazumder, U. K., & Hadar, P. K. (2012). Antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of Mimosa elengi leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), 976-980.
- [29] Rahman, H., Eswaraiah, M. C., & Dutta, A. M. (2015). In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of Oryza Sativa Var. joha rice (an aromatic indigenous rice of Assam). *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci*, 15(1), 115-121.
- [30] Bouzid, DJ.(2018). *Evaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle d'une plante endémique Hélichrysumitalicum* (Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas-Sétif I)

Chapitre V:

Résultats et Discussion

V.1. Détermination de la teneur en eau du matériel végétal

Les végétaux sont riches en eau, la détermination du taux d'humidité de la matière végétale a été obtenue par le séchage des parties aériennes de la plante fraîche.

Notre plante a montré un taux d'humidité important correspond à environ 54.28 %. Cela signifie approximativement plus de la moitié du poids de la plante fraîche est constituée par l'eau et le reste du poids de la plante 45.72 % c'est la matière sèche. Les résultats sont représentés dans la figure V.1.

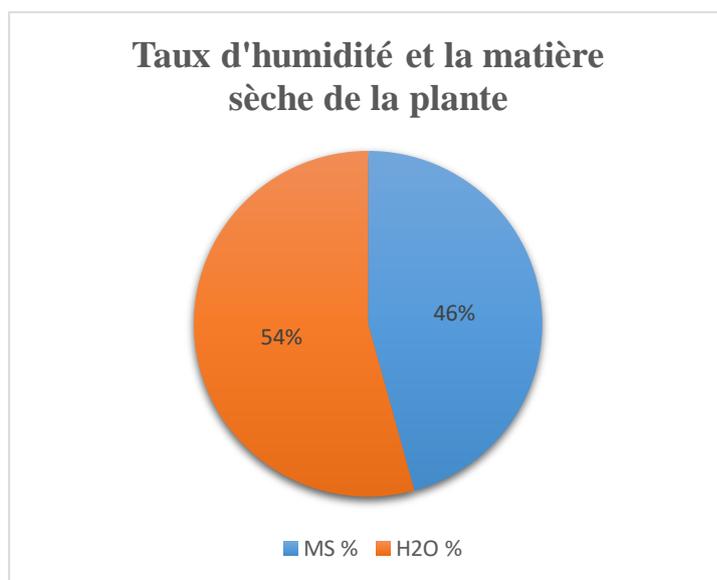


Figure V.1: Graphique représentatif du taux d'humidité et la matière sèche (MS) de *Rosmarinus officinalis*.

V.2. Extraction des huiles essentielles

V.2.1. Rendement d'extraction

Les huiles essentielles des parties aériennes de l'espèce végétale *Rosmarinus officinalis* sont obtenues par hydrodistillation. Le rendement est calculé par rapport à la matière végétale sèche. Le tableau suivant représente le rendement exprimé en pourcentage de la plante en huile essentielles.

Tableau V.1 : Rendement d'extraction des huiles essentielles.

Matière végétale	Masse (g)	Rendement (%)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	140	0.38

Le résultat obtenu concernant le rendement en huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est nettement inférieur au résultat trouvé par Djeddi et al ^[1] qui est de 0,82 %. Par contre Bousbia et al ^[2] ont trouvé des valeurs assez proches de la nôtre qui sont de 0.33 % et 0.35 % selon la méthode d'extraction.

Des études de Jamshidi et al ^[3] et de Ojeda-Sana et al ^[4] ont montré l'influence de différents facteurs tels que la région, le climat et la nature de la plante elle-même sur le rendement en HE et plus probablement sur sa composition.

V.2.2. Contrôle de qualité des huiles essentielles

❖ Détermination des paramètres organoleptiques des huiles essentielles :

Les paramètres organoleptiques de nos huiles essentielles sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau V.2 : Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis*

Huile essentielle	Couleur	Aspect	Odeur
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Jaune pâle	Huileuse	Très aromatique

Ces caractéristiques sont identiques à ceux données par les normes AFNOR pour l'HE de *Rosmarinus officinalis*.

V.3. Extraction des métabolites secondaires

Le rendement de chaque extrait a été déterminé par rapport à 115 g de matériel végétal sec. Les résultats ont été exprimés en pourcentage massique (tableau V.3 et figure V.2).

Tableau V.3 : Couleurs et rendements en % des extraits secs de la plante.

Matière végétale	Extrait	Couleur	Masse (g)	Rendement (%)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Ether de pétrole	Vert	0.11	0.09
	Chloroforme	Vert foncé	1.01	0.87
	Acétate d'éthyle	Jaune	0.51	0.44
	n-butanol	Marron	2.317	2.01

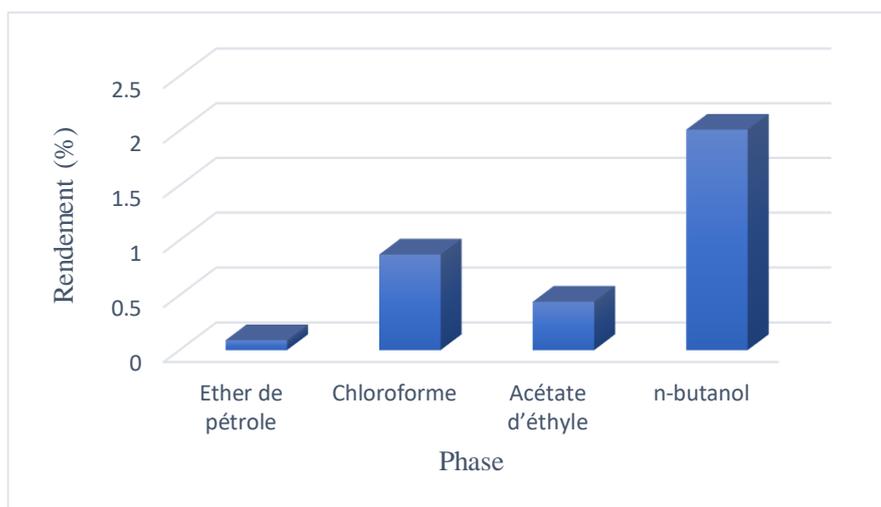


Figure V.2 : Rendements des extraits de l'espèce *Rosmarinus officinalis*.

Pour le fractionnement de l'extrait brut de notre espèce, les résultats obtenus montrent que l'extrait n-butanolique est le plus riche dont il représente le rendement le plus élevé (2.01%) suivi par l'extrait chloroformique (0.87%), se poursuit par l'extrait d'acétate d'éthyle (0.44%) et enfin l'éther de pétrole (0.09%).

Le rendement n'est que relatif, il dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

V.4. L'analyse qualitative et quantitative des extraits

V.4.1. Screening phytochimiques

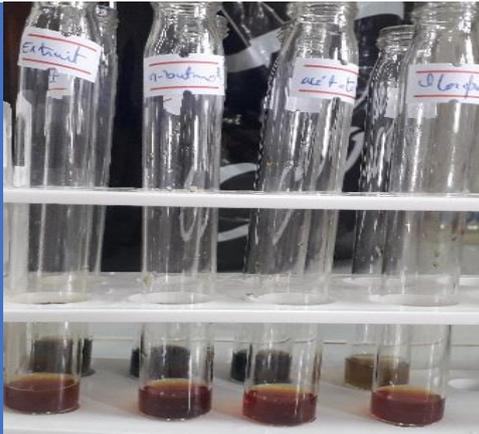
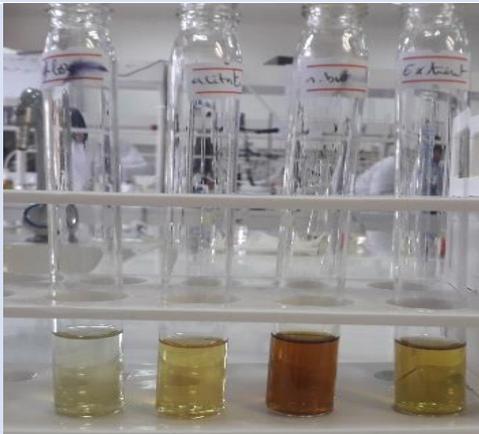
Les tests préliminaires qui ont été effectués sur le matériel végétal sec nous ont permis de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. Les résultats expérimentaux de ces tests phytochimiques sont illustrés dans le tableau suivant :

Les résultats qualitatifs sont classés en :

- Réaction très positive +++ : Présence confirmée ;
- Réaction positive ++ : présence modérée ;
- Réaction plus au moins positive + : présence en tant que trace ;
- Réaction négative - : absence.

Tableau V.4: Criblage phytochimique de *Rosmarinus officinalis*.

Métabolite testé	Photographié des résultats	Extrait	Résultats
Flavonoïdes		Chloroformique	+
		Acétate d'éthyle	+++
		n-butanolique	+++
		Extrait brut	+++
Tanins		Chloroformique	++
		Acétate d'éthyle	+++
		n-butanolique	+++
		Extrait brut	+++
Alcaloïdes traité par le réactif de Mayer		Chloroformique	-
		Acétate d'éthyle	-
		n-butanolique	-
		Extrait brut	-

Alcaloïdes traité par le réactif de Wagner		Chloroformique	-
		Acétate d'éthyle	-
		n-butanolique	-
		Extrait brut	-
Terpénoides		Chloroformique	+++
		Acétate d'éthyle	++
		n-butanolique	+++
		Extrait brut	+++
Quinones		Chloroformique	++
		Acétate d'éthyle	+++
		n-butanolique	+++
		Extrait brut	+++
Coumarines		Chloroformique	+
		Acétate d'éthyle	++
		n-butanolique	+++
		Extrait brut	+++

Les tests phytochimiques effectués sur les extraits de *Rosmarinus officinalis* ont révélé d'un côté la présence des flavonoïdes, tannins, terpénoïdes, quinones et coumarines, et d'autre côté l'absence des alcaloïdes.

La présence des flavonoïdes est révélée par l'apparition d'une coloration rouge ou jaune, ainsi que pour les tanins par une coloration bleu noir ou verte, ce qui signifie la présence de ces composés. Le tableau V.4 laisse constater que les extraits de la plante renferment des terpénoïdes, ces derniers sont confirmés par la formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase. Le tableau illustre également le contenu des extraits en quinones et en coumarines. Ces derniers sont confirmés par une coloration jaune ou une fluorescence intense respectivement. En revanche, une absence totale des alcaloïdes est observée.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de : Johar et al ^[5] ; Fadili et al ^[6] et Makhloufi ^[7].

La richesse de ces extraits en composés chimiques actifs pourrait expliquer son utilisation traditionnelle.

V.4.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode basée sur leurs réactions au réactif de Folin-Ciocalteu. La couleur bleue après incubation confirme la présence des polyphénols qui ont réduit le réactif. L'intensité de la couleur qui varie entre le bleu clair et le bleu foncé est en fonction de la teneur en polyphénols. Cette quantification est réalisée à partir d'une courbe d'étalonnage représentant les absorbances des différentes concentrations de l'acide gallique considéré comme un standard (0,1-10 µg/ml), et déterminé par l'équation de type : $y = 0,0578 x - 0,0058$ sachant que le coefficient de corrélation est : $R^2 = 0,9981$ (Figure V.2). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG /g EXS) et en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG /g MS).

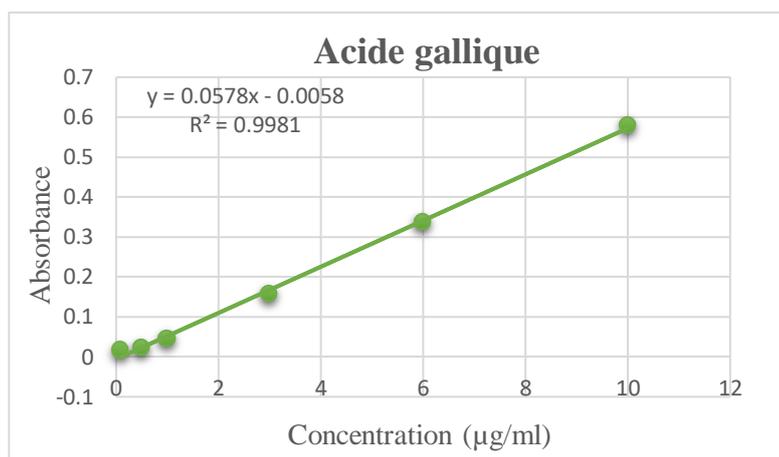


Figure V.3 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

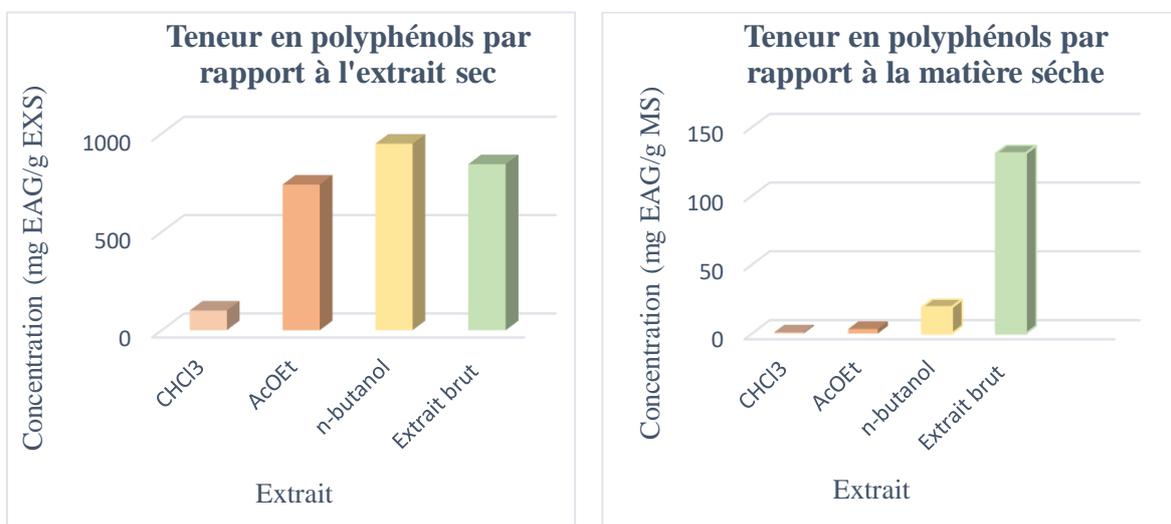


Figure V.4 : Teneurs en polyphénols des extraits de *Rosmarinus officinalis*.

Tableau V.5: Teneur en polyphénols des extraits de *Rosmarinus officinalis*.

Extrait	Teneur en mg EAG/g EXS	Teneur en mg EAG/g MS
Chloroformique	100 ± 0,002	0,87 ± 0,002
Acétate d'éthyle	740 ± 0,001	3,25 ± 0,001
n-butanolique	948 ± 0,001	19,05 ± 0,001
Extrait brut	844 ± 0,002	130,9 ± 0,002

D'après les résultats, nous pouvons constater que tous les extraits de la plante étudiés, sont riches en polyphénols mais avec des quantités différentes.

La figure V.4 montre clairement que la meilleur teneur 948 ± 0,001 mg EAG/g EXS a été obtenu avec l'extrait n-butanolique, suivi par l'extrait acétate d'éthyle avec une valeur de

740 ± 0,001 mg EAG/g EXS, tandis que l'extrait chloroformique présente la plus faible teneur qui est de l'ordre de 100 ± 0,002 mg EAG/g EXS.

Pour l'extrait brut les résultats montrent qu'il est très riche en polyphénols avec une teneur de 844 ± 0,002 mg EAG/g EXS.

La spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est faible. Il est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines ^[8], donnant un taux phénolique apparent élevé.

V.4.3. Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d'AlCl₃. Cette quantification est réalisée à partir d'une courbe d'étalonnage représentant les absorbances des différentes concentrations de la quercétine considéré comme un standard (0,5 – 5 µg/ml), et déterminé par l'équation de type : $y = 0,3521x - 0,1131$ sachant que le coefficient de corrélation est : $R^2 = 0,9884$ (Figure V.5). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de la quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ /g EXS) et en milligramme équivalent de la quercétine par gramme de la matière végétale sèche (mg EQ/g MS).

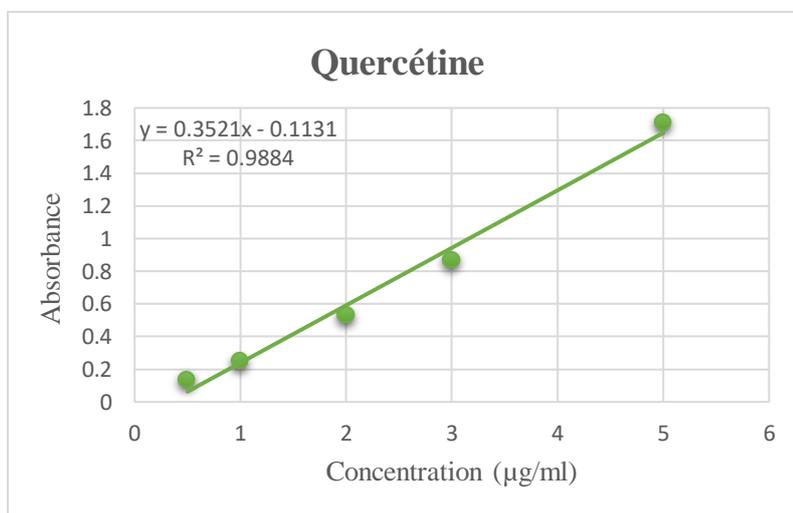


Figure V.5 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

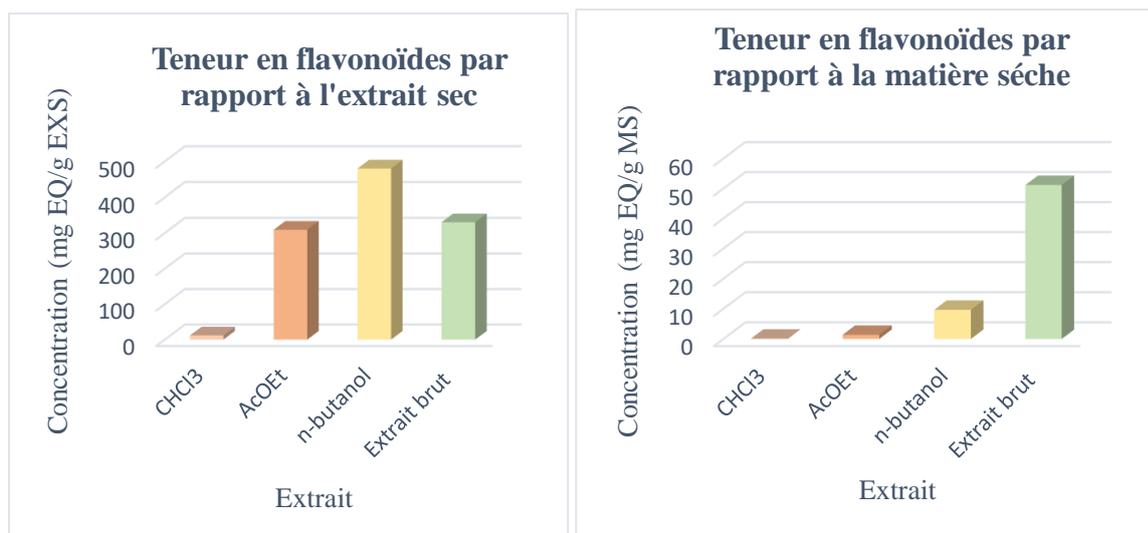


Figure V.6 : Teneurs en flavonoïdes des extraits de *Rosmarinus officinalis*.

Tableau V.6 : Teneur en flavonoïdes des extraits de *Rosmarinus officinalis*.

Extrait	Teneur en mg EQ/g EXS	Teneur en mg EQ/g MS
Chloroformique	11,8 ± 0,004	0,102 ± 0,004
Acétate d'éthyle	309 ± 0,006	1,359 ± 0,006
n-butanolique	480 ± 0,005	9,648 ± 0,005
Extrait brut	330 ± 0,003	51,18 ± 0,003

Selon l'histogramme présenté dans la figure V.6 nous avons remarqué que l'extrait n-butanolique présente la teneur la plus élevée en flavonoïdes, de $480 \pm 0,005$ mg EQ/g EXS suivi par l'extrait acétate d'éthyle avec un taux de $309 \pm 0,006$ mg EQ/g EXS, tandis que l'extrait chloroformique a présenté une faible teneur de l'ordre de $11,8 \pm 0,004$ mg EQ/g EXS.

Pour l'extrait brut les résultats montrent qu'il est riche en flavonoïdes avec une teneur de $330 \pm 0,003$ mg EQ/g EXS.

V.5. Les activités biologiques

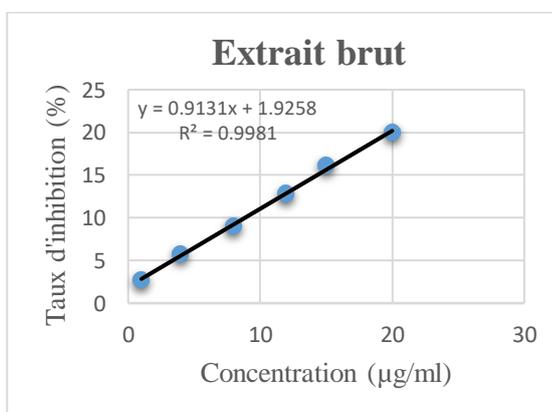
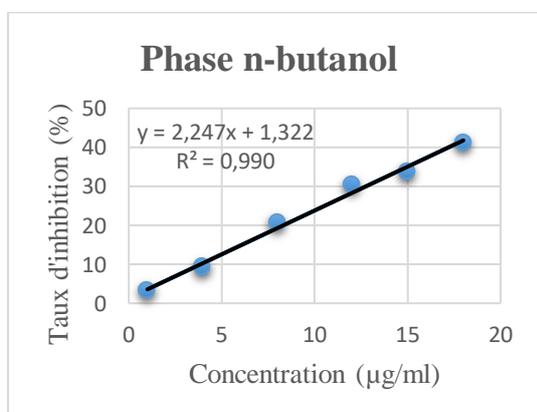
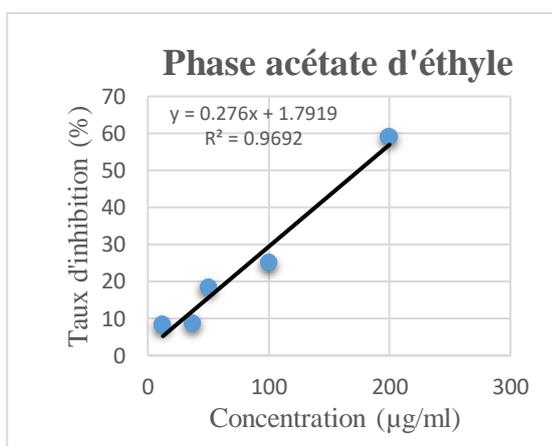
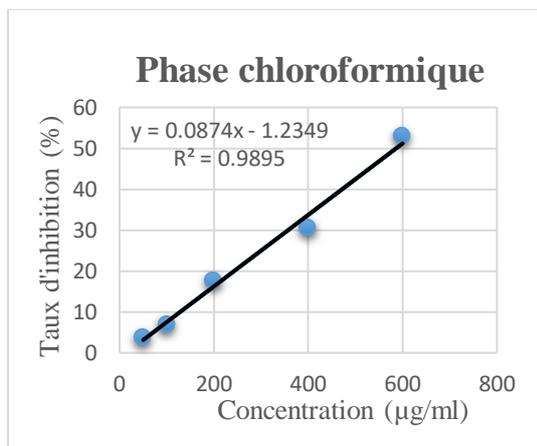
V.5.1. L'activité antioxydante

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger de l'effet antioxydant global d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire ^[9]. Dans ce présent travail, l'activité antioxydante des extraits de *Rosmarinus officinalis* a été

évaluée *in vitro* par différentes méthodes : le test du DPPH, ABTS, FRAP, H₂O₂ et PPM ce qui nous a permis de mieux étudier l'effet antioxydant.

V.5.1.1. Test au DPPH

L'activité antiradicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée [10]. Au cours du dosage une dégradation de la couleur de la solution DPPH en présence de l'échantillon ou de la référence (acide ascorbique) peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à une longueur d'onde 515 nm. En calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant, on a tracé la courbe, qui représente la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait ou de standard, cela permet de déterminer l'IC₅₀, qu'est inversement liée à la capacité antioxydante, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%.



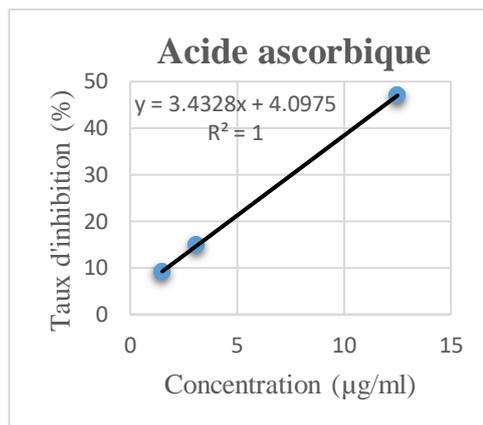


Figure V.7 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition de radical DPPH en présence des extraits et d'acide ascorbique.

Tableau V.7 : Activité anti-radicalaire (DPPH) exprimée en IC_{50} des extraits de *Rosmarinus officinalis*.

Phase	IC_{50} (µg/ml) ± Ecart type
Chloroforme	586,21±31,29
Acétate d'éthyle	174,66± 22,45
n-butanol	21,66 ± 0,31
Extrait brut	52,64 ± 0,64
Référence	IC_{50} (µg/ml) ± Ecart type
Acide ascorbique	13,37 ±0,17

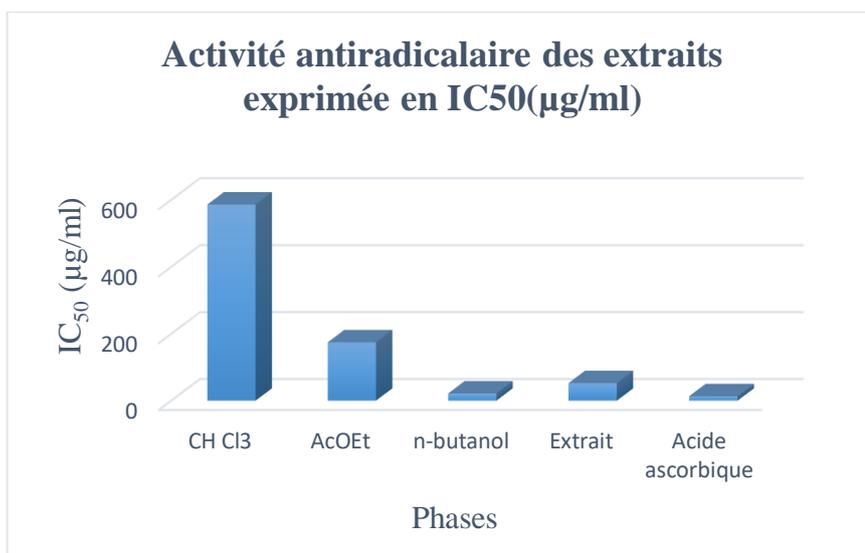


Figure V.8 : Histogramme représente l'activité antioxydante exprimée en IC_{50} des extraits vis-à-vis le radical DPPH.

Tous les extraits ont un pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH. Plus la valeur de l'IC₅₀ est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant, elle est de 586,21 pour l'extrait chloroformique et 174,66 µg/ml pour l'extrait d'acétate d'éthyle, alors qu'avec l'extrait brut et l'extrait n-butanolique les valeurs d'IC₅₀ sont de l'ordre de (52,64 ± 0,64) µg/ml et (21,66 ± 0,31) µg/ml respectivement. Parmi les quatre extraits phénoliques de *Rosmarinus officinalis*, l'extrait n-butanolique montre la meilleure activité antiradicalaire, suivi par l'extrait brut. En outre, l'extrait d'acétate d'éthyle montre une bonne activité antiradicalaire par rapport à l'extrait chloroformique qui montre une activité relativement faible.

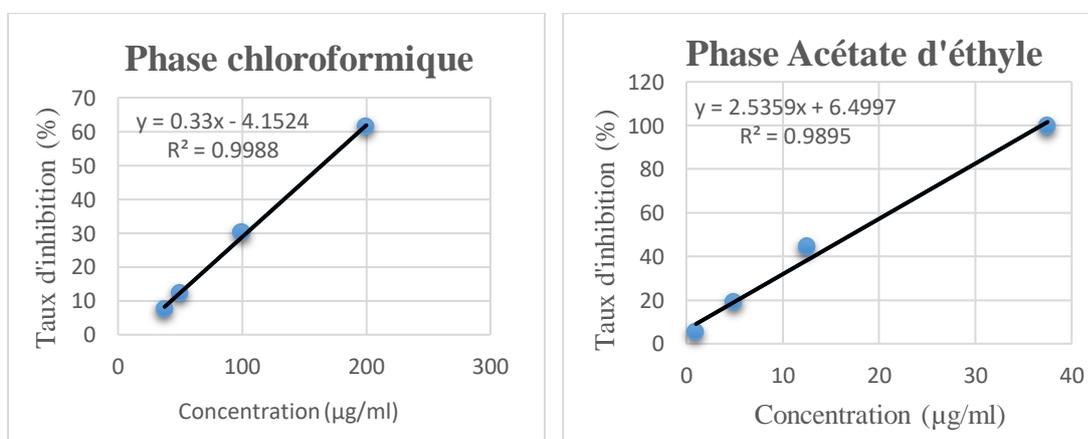
En comparant ces extraits avec le témoin positif antioxydant, l'acide ascorbique (IC₅₀ égale 13,37 µg/ml), les quatre extraits présentent une activité inférieure à celle de l'acide ascorbique.

Ces résultats montrent que la capacité antiradicalaire dépend du solvant d'extraction.

V.5.1.2. Test de l'ABTS

L'activité antioxydante des extraits est déduite de leur capacité à inhiber le radical ABTS^{•+}, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) comparativement à un antioxydant de référence (acide ascorbique). Au cours du dosage une dégradation de la couleur bleu-vert de la solution de ABTS en présence de l'échantillon ou de la référence (acide ascorbique) peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à une longueur d'onde 734 nm. En calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant, on a tracé la courbe, qui représente la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait.

Les valeurs des CI₅₀ sont déterminées par la figure V.9 et représentées dans le tableau V.8.



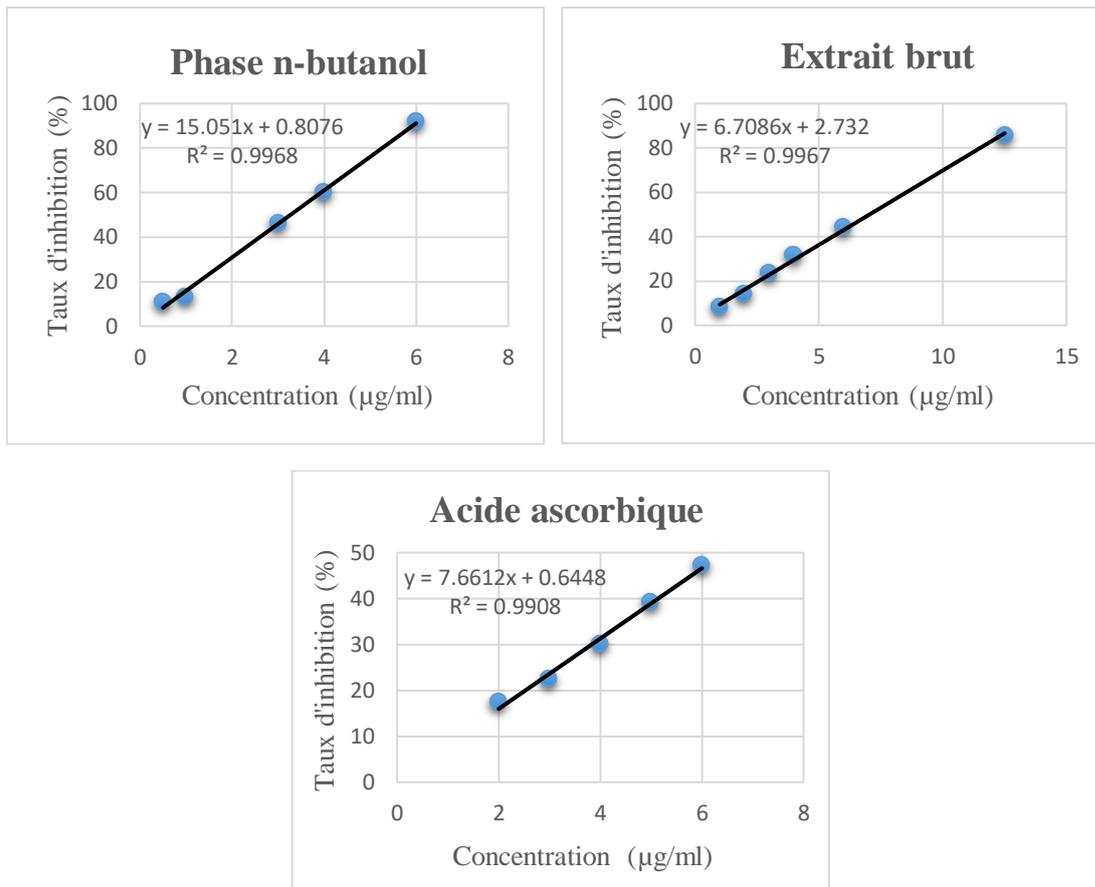
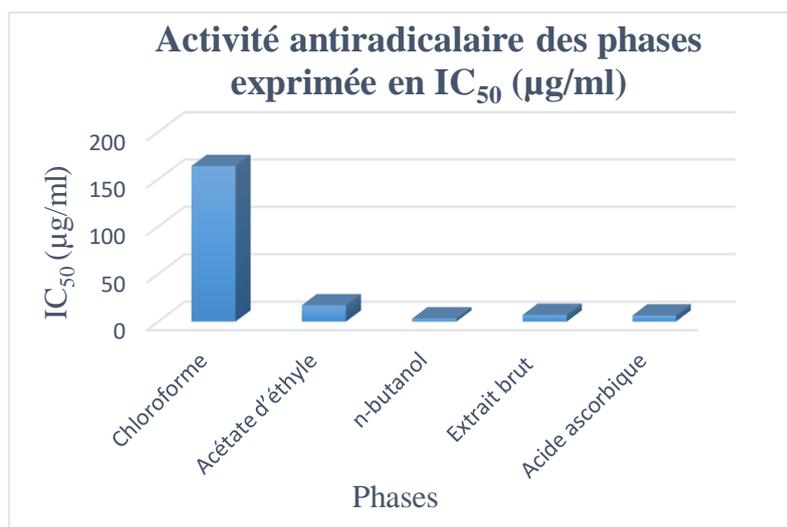


Figure V.9 : Représentation graphique des pourcentages d'inhibition de radical ABTS en présence des extraits et d'acide ascorbique.

Tableau V.8: Activité anti-radicalaire (ABTS) exprimée en IC_{50} des extraits de *Rosmarinus officinalis*.

Phase	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm Ecart type
Chloroforme	$164 \pm 0,85$
Acétate d'éthyle	$17,16 \pm 0,07$
n-butanol	$3,26 \pm 0,03$
Extrait brut	$7,04 \pm 0,07$
Référence	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm Ecart type
Acide ascorbique	$6,44 \pm 0,04$



FigureV.10 : Histogramme représente l'activité antioxydante exprimée en IC₅₀ des extraits vis-à-vis le radical ABTS.

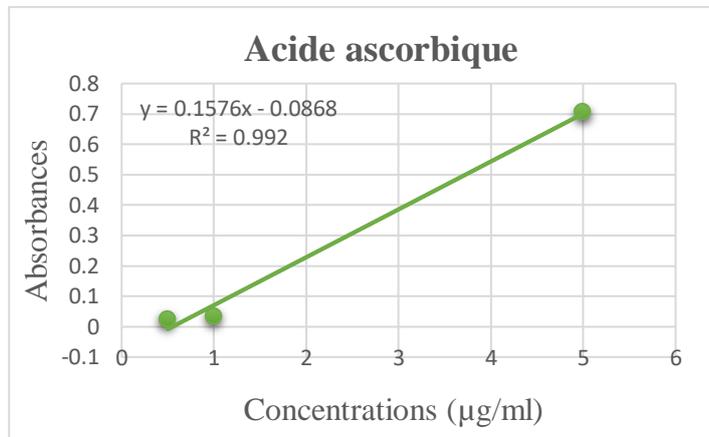
Parmi les extraits de *Rosmarinus officinalis*, l'extrait n-butanolique et l'extrait brut montrent la meilleure activité antiradicalaire vis-vis le radical cationique ABTS^{•+}, avec des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre (3,26 ± 0,03) µg/ml et (7,04 ± 0,07) µg/ml respectivement, suivi par l'extrait acétate d'éthyle avec IC₅₀ égale (17,16 ± 0,07) µg/ml. Cependant l'extrait chloroformique a montré une activité relativement faible avec IC₅₀ égale à (164 ± 0,85) µg/ml.

Les extraits chloroforme, acétate d'éthyle et extrait brut possèdent une activité antioxydante inférieure à celle de l'acide ascorbique (IC₅₀ égale à 6,44 ± 0,04 µg/ml) qui est utilisé comme une molécule de référence, par contre l'activité de l'extrait n-butanolique est 2 fois plus grande que celle de la référence.

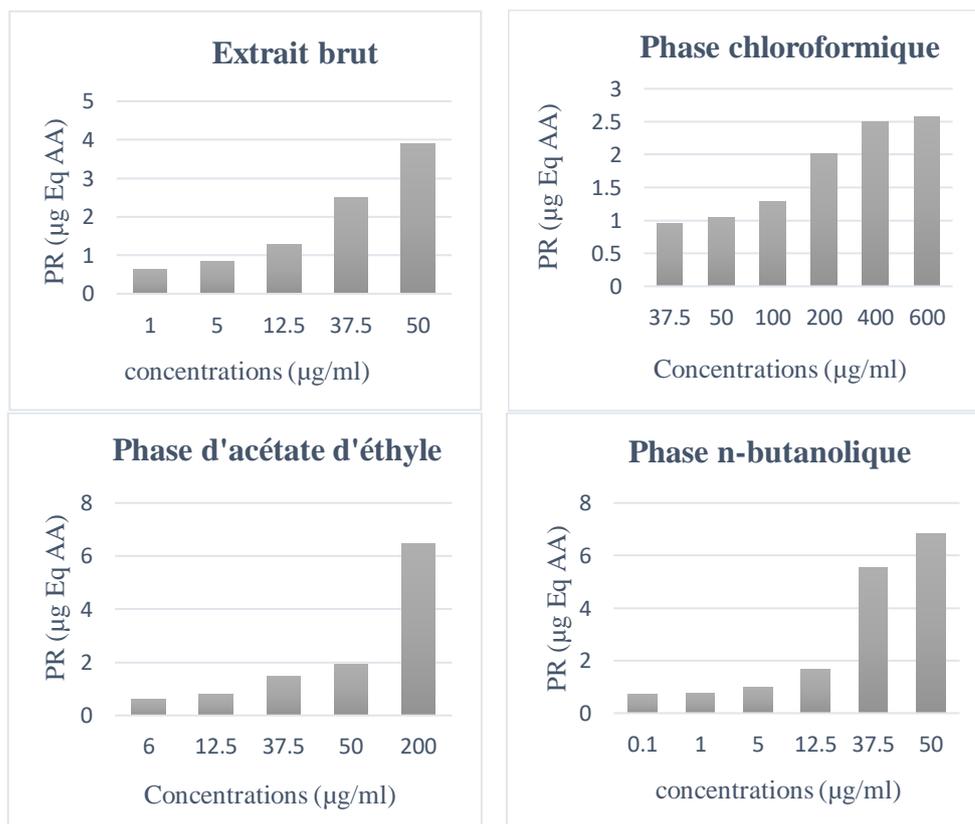
V.5.1.3. Test de FRAP

L'activité antioxydante des extraits méthanolique de notre plante a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible [11]. La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe³⁺/complexe ferricyanide à la forme ferreuse. Par conséquent, Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu-vert dans le milieu réactionnel à 700nm [12]. Une augmentation de l'absorbance signifie une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. Les résultats de l'activité antioxydante des extraits sont établis à partir d'une courbe d'étalonnage représentant les absorbances des différentes concentrations de l'acide ascorbique considéré comme un standard, et déterminé par l'équation de type : $y = 0,1576 x - 0,0868$ sachant que le coefficient de corrélation est : $R^2 = 0,992$ (FigureV.11). Ils

sont représentés en μg équivalent de l'acide ascorbique en fonction de la concentration (FigureV.12).



FigureV.11 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test FRAP.



FigureV.12 : Variation du pouvoir réducteur des extraits en fonction de la concentration.

D'après les résultats représentés dans la (FigureV.12), nous pouvons constater que les extraits de notre plante ont un pouvoir réducteur significatif même à des faibles

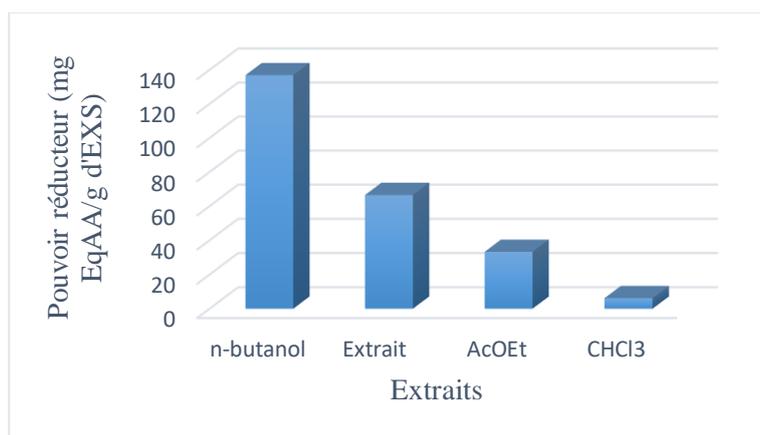
concentrations. Ce pouvoir est proportionnel à la concentration, il est dose dépendant (concentration dépendant).

Le pouvoir réducteur signifie la capacité antioxydante est exprimé en milligramme équivalant de l'acide ascorbique par gramme de l'extrait sec mg EAA/g EXS.

Les résultats obtenus sont présentés dans le (Tableau V.9) et reformulés en histogramme (FigureV.13).

Tableau V.9 : Pouvoir réducteur des différents extraits testés.

Phase	pouvoir réducteur (mg EqAA/g EXS) ± Ecart type
Chloroforme	6,2 ± 0,26
Acétate d'éthyle	33,28 ± 0,82
n-butanol	136,87 ± 5,92
Extrait brut	66,52 ± 2,12

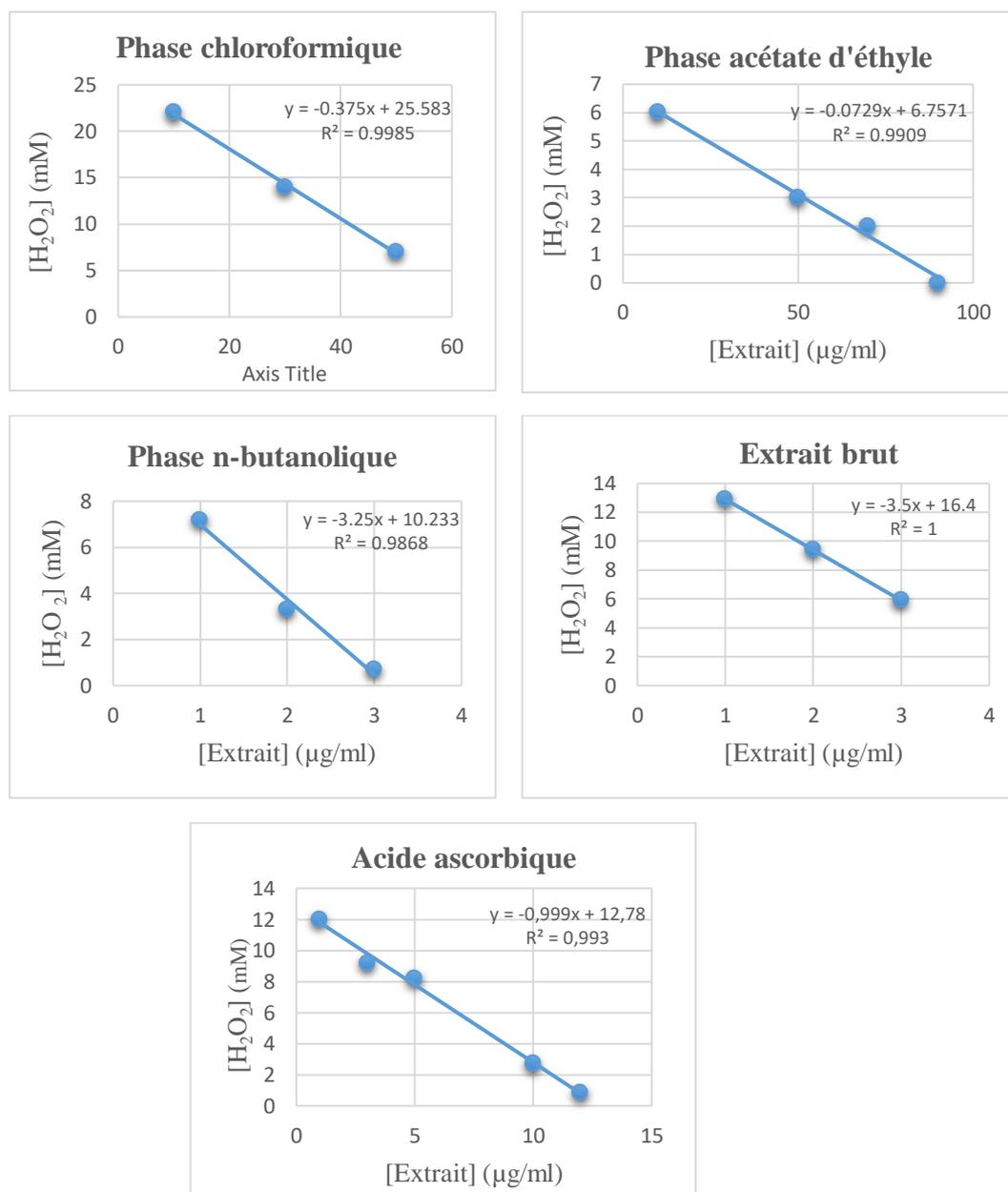


FigureV.13 : Pouvoir réducteur des différents extraits.

Le pouvoir réducteur le plus important a été noté pour l'extrait n-butanolique avec une valeur de $136,87 \pm 5,92$ mg EqAA/g EXS, suivi par l'extrait brut $66,52 \pm 2,12$ mg EqAA/g EXS, tandis que la fraction de l'acétate d'éthyle et du chloroforme montrent des valeurs plus faibles, qui sont de l'ordre $33,28 \pm 0,82$ mg EqAA/g EXS et $6,2 \pm 0,26$ mg EqAA/g EXS respectivement.

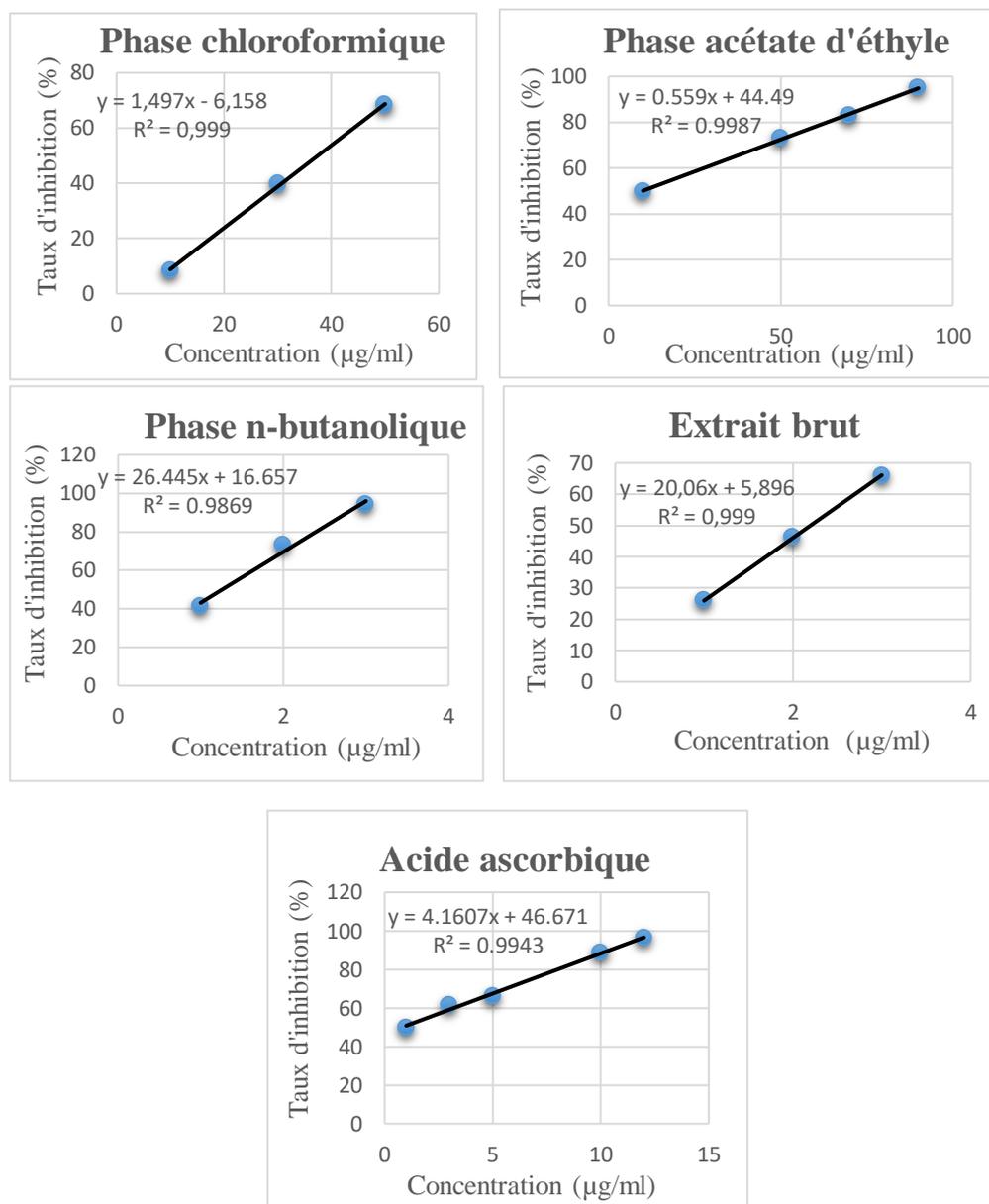
V.5.1.4. Test de H₂O₂

L'activité antiradicalaire est réalisée par la méthode du piégeage du peroxyde d'hydrogène. Cette méthode est basée sur la neutralisation de H₂O₂ ça veut dire que la concentration de H₂O₂ diminue par les composés piègeurs, donc la valeur d'absorbance de ce dernier à 230 nm diminue ^[13].



FigureV.14 : Représentation graphique de la diminution de la concentration de H_2O_2 en fonction de la concentration des extraits et de l'acide ascorbique.

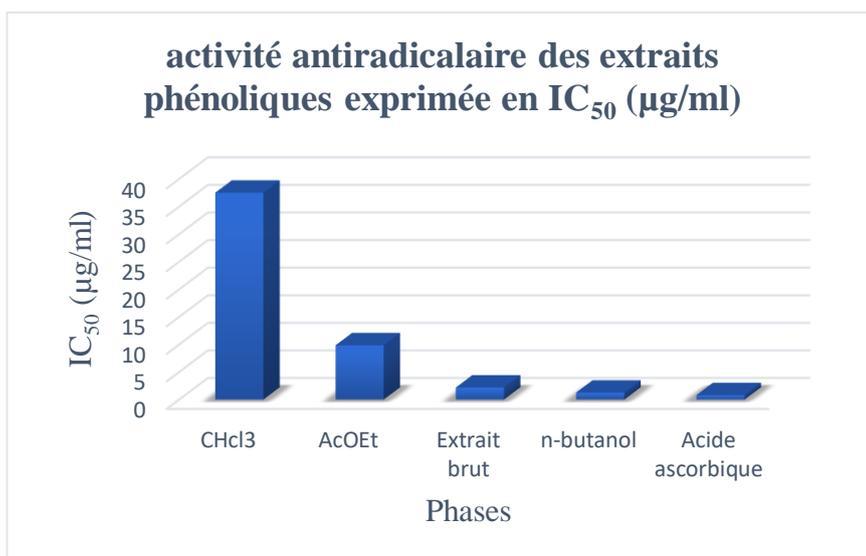
La variation du pourcentage d'inhibition de H_2O_2 est en fonction de la concentration des différents extraits ou du témoin positif (acide ascorbique). L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC_{50} , déterminées à partir des graphes (FigureV.15).



FigureV.15 : Représentation graphique des pourcentages d’inhibition de H₂O₂ en présence des extraits et d’acide ascorbique.

Tableau V.10: Activité anti-radicalaire (H₂O₂) exprimée en IC₅₀ des extraits de *Rosmarinus officinalis*.

Phase	IC ₅₀ (µg/ml) ± Ecart type
Chloroforme	37,51± 0,16
Acétate d'éthyle	9,85 ± 0,95
n-butanol	1,26 ± 0,028
Extrait brut	2,19 ± 0,055
Référence	IC ₅₀ (µg/ml) ± Ecart type
Acide ascorbique	0,8 ± 0,025



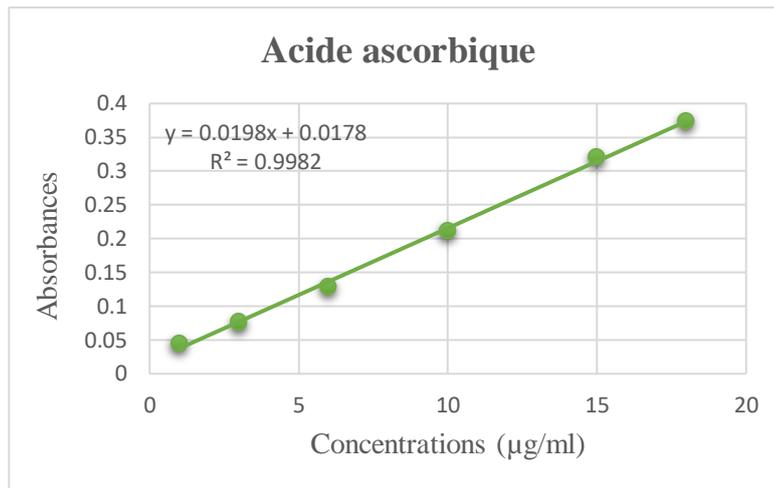
FigureV.16 : Histogramme représente l'activité antioxydante exprimée en IC₅₀ des extraits vis-à-vis le H₂O₂.

Tous les extraits phénoliques de *Rosmarinus officinalis* ont un pouvoir anti-radicalaire envers le peroxyde d'hydrogène, plus la valeur de l'IC₅₀ est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant. Les résultats enregistrés dans la (FigureV.16) montrent que l'extrait butanolique présente la meilleure activité en terme d'inhibition du peroxyde d'hydrogène qui est de l'ordre de (1,26 ± 0,028) g/ml assez proche de celle de l'extrait brut qui est de (2,19 ± 0,055) µg/ml, suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle montre une bonne activité antiradicalaire de l'ordre de (9,85 ± 0,95) µg/ml, tandis que l'extrait chloroformique montre la plus petite activité avec une valeur d'IC₅₀ égale (37,51 ± 0,16) µg/ml.

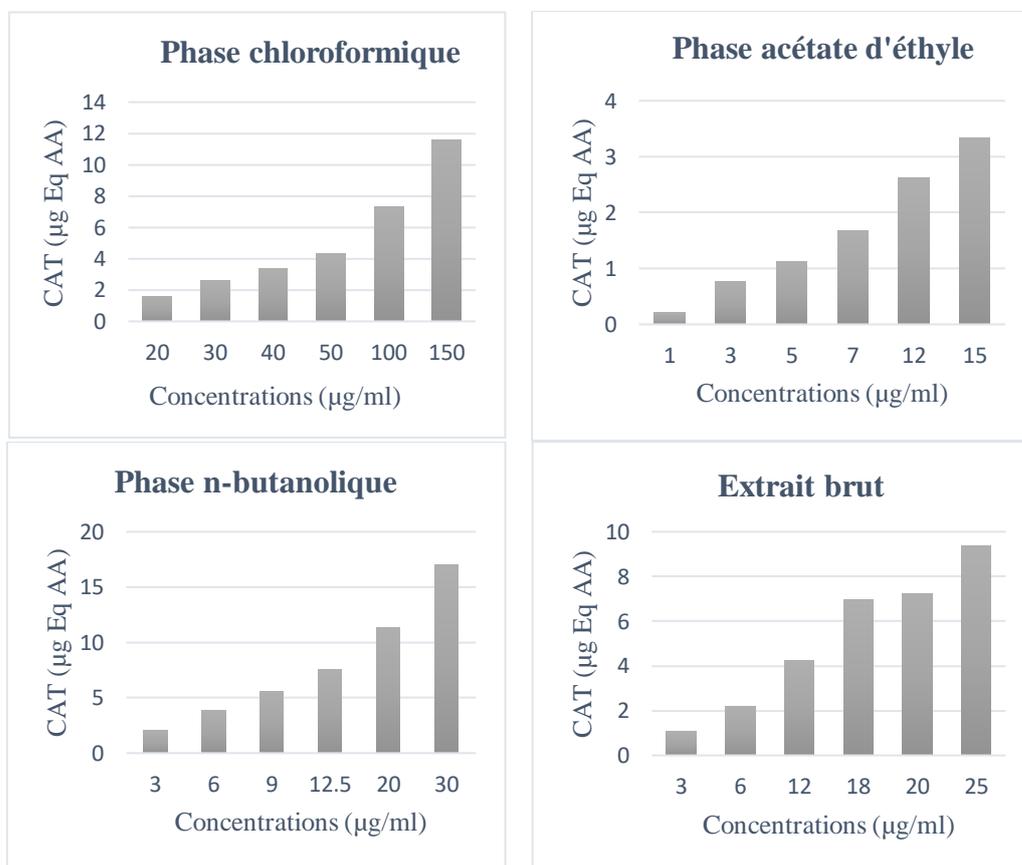
En comparant ces extraits avec le témoin positif antioxydant, l'acide ascorbique (IC₅₀ égale 0,8 ± 0,025), les quatre extraits présentent une activité inférieure à celle du l'acide ascorbique. Nous constatons que l'extrait butanolique et l'extrait brut ont une activité considérable très proche de celle du l'acide ascorbique.

V.5.1.5. Test de PPM

La capacité antioxydante totale obtenus à partir des extraits de la plante a été estimée grâce à une courbe, réalisée avec une référence de l'acide ascorbique à différentes concentrations, qui a une équation de type : $y = 0,0198 x - 0,0178$ sachant que le coefficient de corrélation est : $R^2 = 0,9982$ (FigureV.17). Les résultats sont exprimés en µg équivalent de l'acide ascorbique en fonction de la concentration.



FigureV.17 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le test PPM.



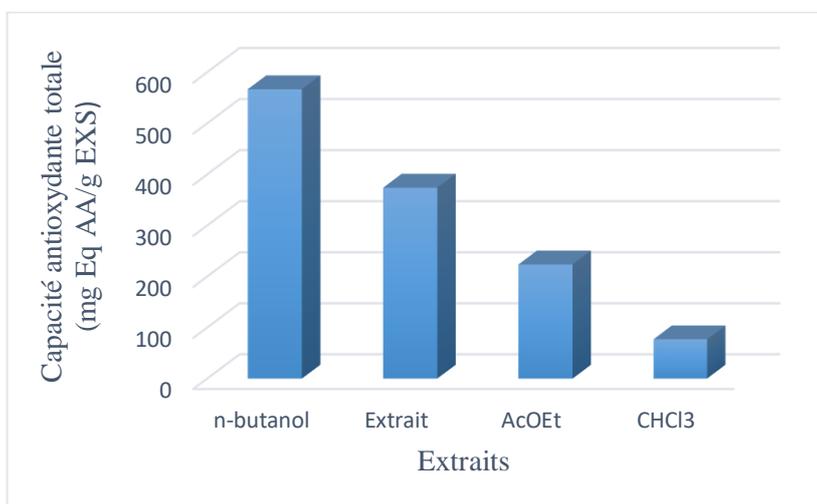
FigureV.18 : Variation de la capacité antioxydante totale des extraits en fonction de la concentration.

D'après les résultats représenté dans la (FigureV.18), la capacité antioxydante totale est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos extraits (concentration dépendante).

Pour comparer la capacité antioxydante totale des extraits les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de l'acide ascorbique par gramme de l'extrait sec mg EAA/g EXS. Les résultats obtenus sont présentés dans le (Tableau V.11) et reformulés en histogramme (FigureV.19).

Tableau V.11 : La capacité antioxydante totale des différents extraits testés.

Phase	La capacité antioxydante totale (mg EqAA/g EXS) \pm Ecart type
Chloroforme	$77 \pm 0,9$
Acétate d'éthyle	$223,6 \pm 8,02$
n-butanol	$566,66 \pm 3,78$
Extrait brut	374 ± 2



FigureV.19 : La capacité antioxydante totale des différents extraits.

Les résultats obtenus ont montré une variabilité de la capacité antioxydante totale en fonction de la nature du solvant (chloroformique, acétate d'éthyle, n-butanolique et extrait brut) utilisé pour l'extraction.

La fraction n-butanolique a la capacité antioxydante totale la plus élevée ($566,66 \pm 3,78$ mg EqAA/g EXS), suivi par l'extrait brut qui a une valeur de (374 ± 2 mg EqAA/g EXS) qui est beaucoup plus importante que celles de la phase acétate d'éthyle et de la phase chloroformique ($223,6 \pm 8,02$ mg EqAA/g EXS et $77 \pm 0,9$ mg EqAA/g EXS respectivement).

V.5.1.6. Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux

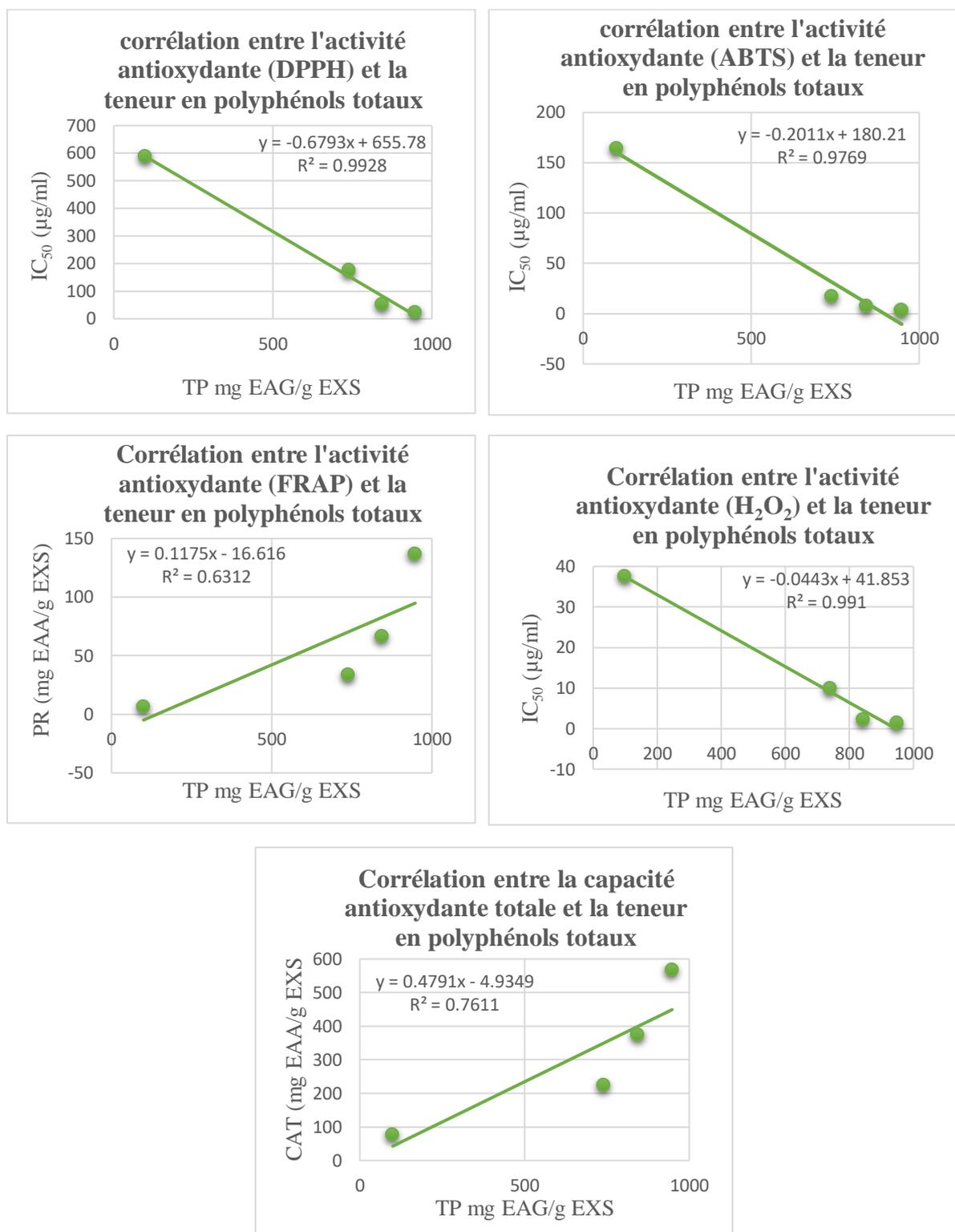


Figure V.20 : Corrélation entre l'activité antiradicalaire et les teneurs en polyphénols totaux des extraits de *Rosmarinus officinalis*.

Quel que soit la méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Rosmarinus officinalis*, Il est bien établi qu'il ya une corrélation entre cette activité

et la structure des polyphénols. Cette corrélation est fortement significative pour les tests DPPH, l'ABTS et H₂O₂ avec des coefficients de corrélations de ($R^2 = 0,9928$), ($R^2 = 0,9769$), ($R^2 = 0,991$) respectivement. 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 [14] [15] [16].

Par ailleurs, le coefficient de corrélation est de ($R^2 = 0,6312$) pour le FRAP et de ($R^2 = 0,7611$) pour le PPM. Cela s'explique que l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant [17]. Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité antioxydante la plus élevée due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres [18].

V.5.2. L'activité antimicrobienne

L'activité de l'HE et des extraits de *Rosmarinus officinalis* a été déterminée *in vitro* par la méthode d'aromatogramme [19] qui permet de tester l'action de l'HE et des différents extraits vis-à-vis de quelques souches bactériennes et mycéliennes prélevées de différentes personnes. L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par Ponce A.G et al [20]. Ils ont classé le diamètre des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne comme suit :

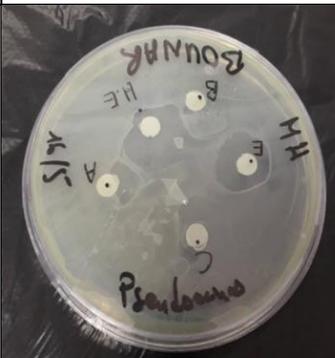
- Non sensible (-) : $D \leq 8$ mm ;
- Sensible (+) : $9 \leq D \leq 14$ mm ;
- Très sensible (++) : $15 \leq D \leq 19$ mm ;
- Extrêmement sensible (+++) : $D \geq 20$ mm.

V.5.2.1. L'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de HE et des extraits a été estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les échantillons à tester vis-à-vis de trois (3) germes pathogènes gram (-) (*Escherichia coli*, *proteus mirabilis*, *pseudomonas aeruginosa*). Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition observées autour des disques imprégnés de l'HE et des différents extraits.

Les résultats trouvés sont représentés dans le tableau ci- dessous.

Tableau V.12 : Résultats du test antibactérien des quatre extraits et de l'HE.

La souche	Extraits / HE	La concentration (µl/disque)	Zone inhibition (mm)	Aromatogramme
<i>Proteus mirabilis</i>	Chloroforme	2000	Résistante	
	Acétate d'éthyle	2000	Résistante	
	n-butanol	2000	Résistante	
	Extrait	2000	Résistante	
	HE	2000	Résistante	
<i>Escherichia coli</i>	Chloroforme	2000	15	
	Acétate d'éthyle	2000	17	
	n-butanol	2000	23	
	Extrait	2000	23	
	HE	2000	28	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Chloroforme	2000	Résistante	
	Acétate d'éthyle	2000	Résistante	
	n-butanol	2000	Résistante	
	Extrait	2000	17	
	HE	2000	17	

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent que :

La souche *Escherichia coli* apparaît très sensible vis-à-vis des extraits : Chloroforme et acétate d'éthyle dont les diamètres des zones d'inhibition varient entre 15 et 17 respectivement, et extrêmement sensible vis-à-vis d'HE et des extraits : n-butanol et extrait brut, dont les diamètres des zones d'inhibition varient entre 28, 23 et 23 respectivement, en effet cette sensibilité d'*Escherichia coli* traduit l'action antibactérienne d'HE et des extraits

qui est en relation avec le nombre des hydroxyles libres. L'activité anti bactérienne d'HE et les extraits du *Rosmarinus officinalis* peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts d'hydrogène avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation des ions métallique, inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substance nécessaire à la croissance des bactéries [21].

La souche *Pseudomonas aeruginosa* apparaît très sensible vis-à-vis d'HE et d'extrait brut avec de diamètre de zone d'inhibition de 17, Par contre aucune sensibilité n'a été observée contre les extraits chloroformique, acétate d'éthyle et n-butanolique.

La souche *Proteus mirabilis* ne montrent aucune sensibilité contre l'HE et les extraits, donc la résistance de *Proteus mirabilis* est largement observée, Cela pourrait être expliqué par la présence de l'enzyme qui hydrolyse les polyphénols.

Il en ressort de cette analyse que l'HE et les extraits agissent différemment sur les microorganismes. C'est-à-dire, que l'HE et les extraits peuvent avoir une action très importante sur un germe (la sensibilité d'*Escherichia coli*) ou une action moindre sur un autre (*pseudomonas aeruginosa*), ou une action nulle sur un autre (la résistance de *proteus mirabilis*).

La tolérance des bactéries aux polyphénols dépend essentiellement de l'espèce bactérienne et de la structure des polyphénols [22]. Les bactéries à Gram négatif sont généralement résistantes aux agents antimicrobiens. La réduction de la perméabilité de la membrane externe, entourant la paroi cellulaire, aux agents antibactériens hydrophobes par la structure lipopolysaccharidique peut favoriser la résistance à ces agents [23] [24] [25]. De plus l'hypothèse de la dégradation des polyphénols par certains microorganismes n'est pas à écarter [25] [22].

V.5.2.2. L'activité antifongique

L'activité antifongique d'HE et des extraits étudiés a été déterminée par la méthode de diffusion sur disques, basée sur l'inhibition de la croissance mycélienne des disques des champignons (*candida albicans*) déposés au centre des deux milieux gélosés (sabouraud) et Mueller-Hinton) vis-à-vis les échantillons à tester. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les zones d'inhibition observées autour des disques imprégnés de l'HE et des différents extraits. Les résultats trouvés sont représentés dans le tableau ci- dessous.

Tableau V.13 : Résultats du test antifongique des quatre extraits et de l'HE.

Le milieu	Extraits/ HE	La concentration (μ l/disque)	Zone inhibition (mm)	Aromatogramme
<i>Mueller Hinton</i>	Chloroforme	2000	16	
	Acétate d'éthyle	2000	Résistant	
	n-butanol	2000	Résistant	
	Extrait	2000	21	
	HE	2000	18	
<i>Sabaurand</i>	Chloroforme	2000	Résistant	
	Acétate d'éthyle	2000	Résistant	
	n-butanol	2000	Résistant	
	Extrait	2000	Résistant	
	HE	2000	Résistant	

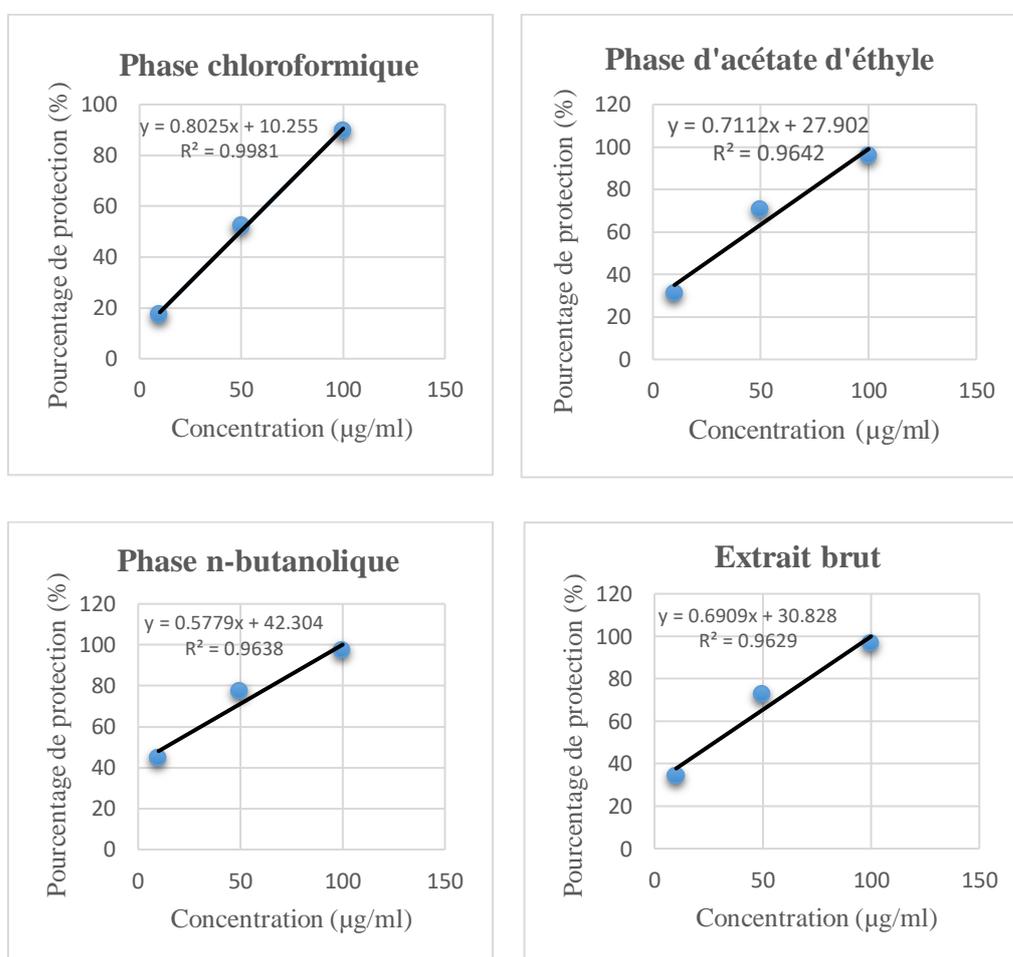
Les diamètres des zones d'inhibition révèlent que la souche *candida albicans* dans le milieu Mueller Hinton apparaît extrêmement sensible vis-à-vis de l'extrait brut avec un diamètre de zone d'inhibition de 21, et très sensible vis-à-vis de l'HE et l'extrait chloroformique avec des diamètres de 16 et 18 respectivement, par contre aucune sensibilité n'a été observée contre les extraits n-butanolique et acétate d'éthyle.

Cependant dans le milieu Sabaurand aucune sensibilité n'a été montrée pour l'HE et les extraits, donc la résistance de *candida albicans* dans ce milieu est largement observée, cela pourrait être expliqué par le fait que ce milieu de culture est favorable de pousser des champignons.

V.5.3. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire par la méthode de la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC)

C'est un test descriptif de l'activité anti-inflammatoire pour exclure la possibilité de cytotoxicité associée de l'HE et des extraits de *Rosmarinus officinalis*, ce test est basé sur

l'activité stabilisante de la membrane plasmique des globules rouges humaines est évaluée en utilisant la technique d'hémolyse (la lyse érythrocytaire) induite par un milieu hypotonique, qui provoque une rupture de sa membrane cytoplasmique provoquant ainsi la libération de l'hémoglobine qui sera alors dosée par spectrophotométrie d'absorbance visible à 540 nm [26]. En effet, il y a plusieurs avantages à choisir les érythrocytes pour étudier le mécanisme de la stabilisation membranaire. Les globules rouges humains constituent un outil pratique pour les études de toxicité des composés, car ils sont facilement disponibles, leurs propriétés membranaires sont bien connues et leur lyse est facilement contrôlée en mesurant la libération d'hémoglobine [27]. Le pourcentage de protection de la membrane HRBC est en fonction de la concentration des différents extraits, de l'HE et du témoin positif anti-hémolyse (Aspirine) (Figure V.21).



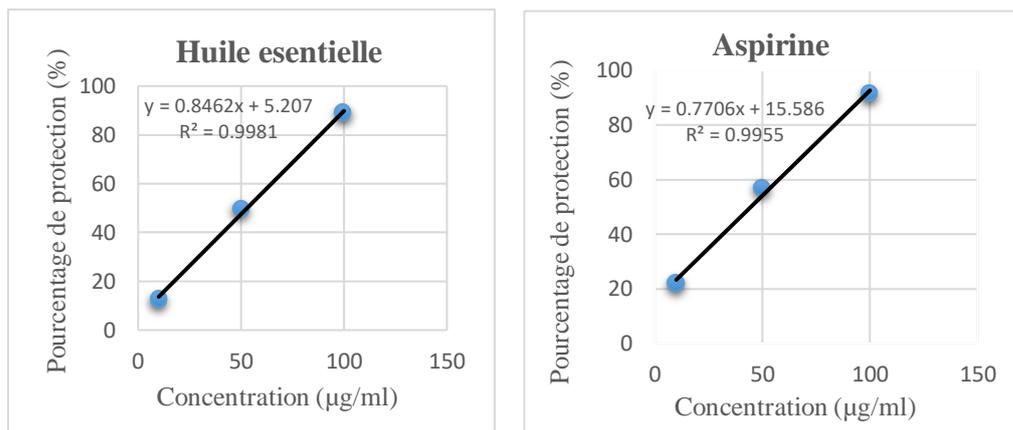


Figure V.21 : Représentation graphique des pourcentages de protection de la membrane HRBC en présence des extraits, d'HE et de l'Aspirine.

D'après la (Figure V.21) il est clair que le pourcentage de protection est directement proportionnelle à la concentration et varie selon la capacité anti-hémolytique de chaque extrait.

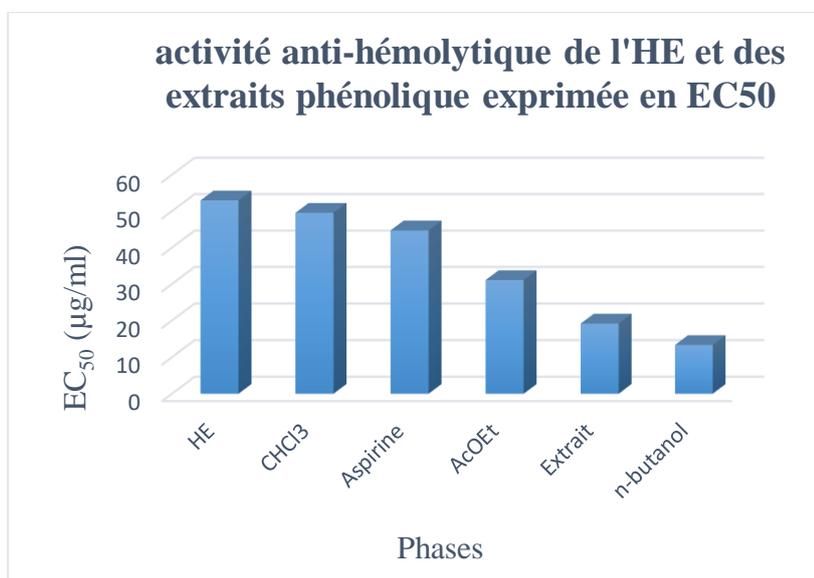
L'activité anti-hémolytique de l'HE, des extraits et de contrôle positif est exprimée en EC_{50} , ce paramètre définit la concentration efficace du substrat qui cause la protection de 50% de la membrane HRB. Ces EC_{50} sont déterminées à partir des graphes (Figure V.21).

Tableau V.14 : Activité anti-hémolytique exprimée en EC_{50} des extraits, d'HE et de l'aspirine.

Phase	EC_{50} (µg/ml)
Chloroforme	49,56
Acétate d'éthyle	31,08
n-butanol	13,34
Extrait brut	19,18
HE	52,94
Référence	EC_{50} (µg/ml)
Aspirine	44,7

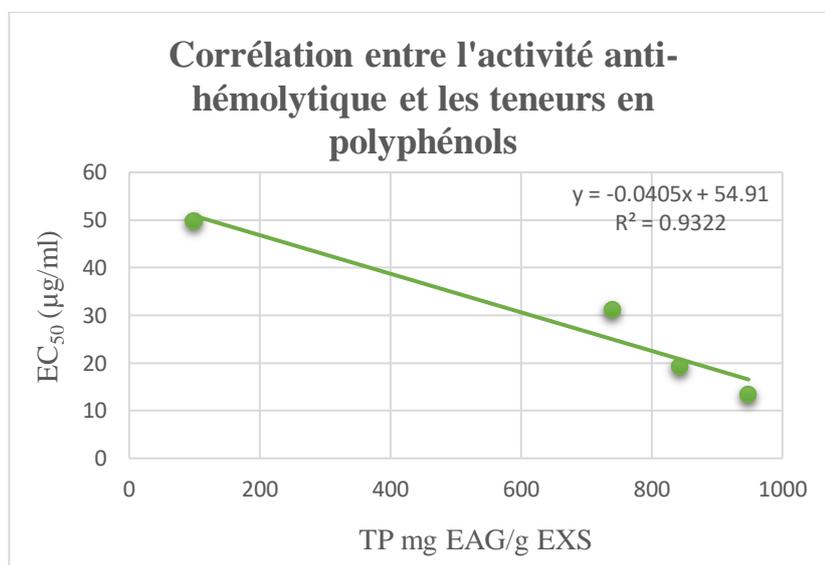
Les résultats montrent que l'extrait butanolique présente la meilleure activité en terme de protection de la membrane HRBC qui est de l'ordre de 13,34 µg/ml assez proche à celle de l'extrait brut qui est de 19,18 µg/ml, suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle qui montre une bonne activité anti-hémolytique de l'ordre de 31,08 µg/ml, tandis que l'extrait chloroformique et l'huile essentielle montrent une activité faible avec des valeurs d' EC_{50} égale 49,56 µg/ml et 52,94 µg/ml respectivement.

En comparant ces extraits avec le témoin positif anti-hémolyse, l'aspirine (EC_{50} égale $44,7 \mu\text{g/ml}$), tous les extraits présentent une activité supérieure à celle de l'aspirine sauf l'extrait chloroformique et l'huile essentielle. Nous constatons que l'extrait n-butanolique est plus que 3 fois plus actif, En outre l'extrait brut est plus que 2 fois plus actif que l'aspirine.



FigureV.22 : Activité anti-hémolytique des extraits phénoliques, d'HE et de l'aspirine.

★ **Corrélation entre anti-hémolytique et contenu en polyphénols**



FigureV.23 : corrélation d'activité anti-hémolytique et contenu en polyphénols.

La présence des composés phénolique dans nos extraits nous a incités à étudier leur activité anti-hémolytique.

Une bonne corrélation ($R^2 = 0,9322$) a été observée entre les teneurs en polyphénols et les activités anti-hémolytiques des extraits dont l'extrait avec la teneur en polyphénols la plus élevée, a montré l'activité anti-hémolytique la plus forte. Ces résultats montrent que les polyphénols sont responsables de l'activité anti-hémolytique de *Rosmarinus officinalis*.

Références bibliographiques

- [1] Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I., & Skaltsa, H. D. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(4), 487-490.
- [2] Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food chemistry*, 114(1), 355-362.
- [3] Jamshidi, R., Afzali, Z., & Afzali, D. (2009). Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 5(1), 78-81.
- [4] Ojeda-Sana, A. M., van Baren, C. M., Elechosa, M. A., Juárez, M. A., & Moreno, S. (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food control*, 31(1), 189-195.
- [5] Johar, S., Irfan, S., Ahmed, S. S., & Jabeen, R. (2015). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. against *Escherichia coli*. local isolates. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(4), 413.
- [6] Fadili, K., Amalich, S., N'dedianhoua, S. K., Bouachrine, M., Mahjoubi, M., El Hilali, F., & Zair, T. (2015). Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc: *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides*. *Int J Innov Sci Res ISSN*, 17, 2351-8014.
- [7] Makhloufi, A. (2010). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru (Thèse de doctorat, Université Aboubaker Belkaid-Telemcen).
- [8] Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220-1234.
- [9] Cao, G., & Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical chemistry*, 44(6), 1309-1315.
- [10] Bortolomeazzi, R., Sebastianutto, N., Toniolo, R., & Pizzariello, A. (2007). Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching

- inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chemistry*, 100(4), 1481-1489.
- [11] Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- [12] Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F., & Chou, S. T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(8), 2454-2458.
- [13] Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*, 613(1), 1-19.
- [14] Yang, J., Meyers, K. J., van der Heide, J., & Liu, R. H. (2004). Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(22), 6787-6793.
- [15] Karou, D., Dicko, M. H., Simporé, J., & Traore, A. S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African journal of biotechnology*, 4(8), 823-828.
- [16] Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource technology*, 98(15), 2963-2967.
- [17] Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- [18] De Pinedo, A. T., Peñalver, P., & Morales, J. C. (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure–activity relationship. *Food Chemistry*, 103(1), 55-61.
- [19] Wilkinson, J. M. (2006). Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. *Modern phytomedicine: turning medicinal plants into drugs*, 157-171.
- [20] Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.
- [21] Karou, D., Dicko, M. H., Simporé, J., Yameogo, S., Sanon, S., & Traoré, A. S. (2005). Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes

médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. *Maitrise des procédés en vue d'améliorer la qualité et la sécurité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire*. Ouagadougou, 8-11.

- [22] Almajano, M. P., Carbo, R., Jiménez, J. A. L., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food chemistry*, 108(1), 55-63.
- [23] Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological reviews*, 56(3), 395-411.
- [24] Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., ... & Sokmen, A. (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food chemistry*, 84(4), 519-525.
- [25] Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of food microbiology*, 117(1), 112-119.
- [26] Louerrad, Y., Haddi, R., & Kaid, H. M. (2016). Etude de la peroxydation lipidique chez une plante médicinale *Haloxylon scoparium* Pomel. *J. Biores. Val*, 1, 28-33.
- [27] Marya, C. M., Satija, G., Nagpal, R., Kapoor, R., & Ahmad, A. (2012). In vitro inhibitory effect of clove essential oil and its two active principles on tooth decalcification by apple juice. *International journal of dentistry*, 2012.

Conclusion et Perspectives

Conclusion générale et perspectives

La large utilisation de *Rosmarinus officinalis* en médecine traditionnelle nous a incité à réaliser une enquête phytochimique et biologique selon différents protocoles afin de mettre en cohérence les prescriptions et les activités potentielles des constituants chimiques de cette plante.

L'évaluation phytochimique effectuée sur les extraits de *Rosmarinus officinalis* montre leur richesse en flavonoïdes, tanins, terpénoïdes, coumarines et quinones, et d'autre coté l'absence des alcaloïdes. Quantitativement le dosage des polyphénols totaux à l'aide de réactif de Folin-ciocalteu et le dosage des flavonoïdes totaux par la méthode de AlCl_3 montrent que l'extrait *n*-butanolique a une teneur maximale en polyphénols et flavonoïdes.

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par plusieurs méthodes (Piégeage du radical libre DPPH[•], réduction du radical cation ABTS^{•+}, piégeage du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , réduction du Fer FRAP et la méthode phosphomolybdate PPM). Les résultats montrent un potentiel antioxydant remarquable des extraits testés, dont l'extrait *n*-butanolique est le plus élevé.

L'activité antimicrobienne a été déterminée *in vitro* par la méthode d'aromatogramme vis-à-vis de trois souches bactériennes gram (-) *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis* déposés au centre d'un milieu gélosé : Mueller-Hinton et une souche mycélienne : *Candida albicans* déposés au centre des deux milieux gélosés : Sabouraud et Mueller-Hinton, Les résultats obtenus révèlent que les huiles essentielles et les extraits sont sensibles vis-à-vis d'*Escherichia coli*, leurs sensibilité traduit l'action antibactérienne de celles-ci.

L'activité anti-inflammatoire a été effectuée *in vitro* par la méthode de stabilisation de la membrane plasmatisque des globules rouges humaines (HRBC) sur les extraits et les huiles essentielles, les résultats obtenus montrent une excellente activité pour tous les extraits sauf l'extrait chloroformique et l'HE qui ont une bonne activité.

Ces résultats sont promoteurs, ceux qui ouvre le chemin d'une étude approfondie pour isoler et déterminer la structure des principaux composants responsables de ces activités et de compléter les études par les tests *in vivo* et de les tester vis-à-vis d'autres activités biologiques tels que le diabète, les maladies cardiovasculaires...

Annexes

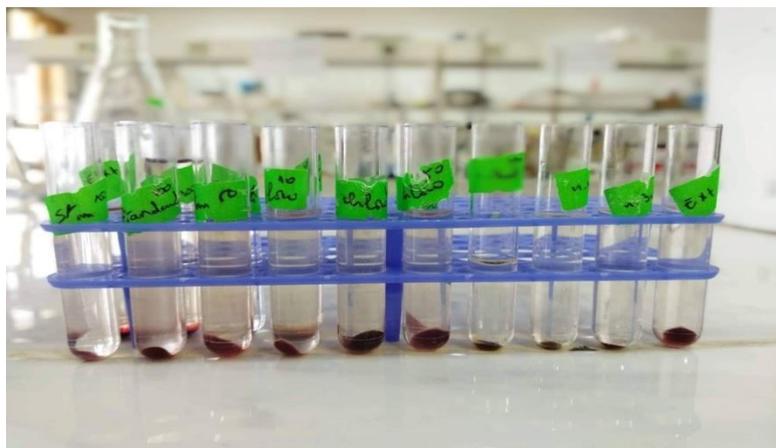
Préparation de la solution DPPH :

Pour préparer la solution de DPPH de concentration de 60 μ M, 0.00236g de DPPH est dissout dans 100 ml de méthanol dans une fiole couvert d'aluminium. Cette fiole est mise dans un bain de glace sous agitation pendant une heure.

Préparation de la solution Asevers stérilisée

La solution d'Asevers est utilisée comme suspension et stabilisateur pour les globules rouges (érythrocytes) et contient les solutions aqueuses suivantes : dextrose à 2%, citrate de sodium à 0,8 %, chlorure de sodium à 0,42 % et l'acide citrique à 0,05 %. Nous avons d'abord mélangé la solution de dextrose, la solution de citrate de sodium et la solution de chlorure de sodium, puis ajusté le pH en utilisant la solution d'acide citrique jusqu'à l'obtention du pH = 6,1.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire par la méthode de la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC)



Résumé : Dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques et médicinales, nous nous sommes intéressés à la plante *Rosmarinus officinalis L.* L'objectif de cette étude était de quantifier les polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux, et d'évaluer les activités biologiques (antioxydante, anti-microbienne et anti-inflammatoire) des extraits de notre plante et d'HE. La teneur en phénols totaux a été effectuée par la méthode de Folin-Ciocalteu et la teneur des flavonoïdes a été évaluée par la méthode de $AlCl_3$. L'activité antioxydante a été testée par la méthode de piégeage du DPPH, d'ABTS, FRAP, H_2O_2 et PPM. L'activité anti-microbienne a été estimée par la méthode d'aromatogramme. Et l'activité anti-inflammatoire a été étudiée par la méthode de la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC). L'extrait n-butanolique a montré la plus grande teneur en polyphénols et en flavonoïdes et la meilleure activité antioxydante par tous les tests. Les résultats de l'activité anti-microbienne obtenus ont montré que cette plante n'a pas d'activité contre *Proteus mirabilis*, seulement l'HE et l'extrait brut ont une activité modérée contre *Pseudomonas Aeruginosa* mais une bonne sensibilité contre *Escherichiacoli*. L'extrait chloroformique, l'extrait brut et l'HE ont une activité anti-fongique contre *candida albicans* dans le milieu MH. Les résultats de l'activité anti-hémolytique montrent que l'extrait n-butanolique présente la meilleure activité en terme de protection de la membrane. Cette plante pourrait donc être considérée comme une source d'antioxydant naturel à des fins médicinales.

Mots clés : Poly-phénols, *Rosmarinus*, activité antioxydante, activité antimicrobienne, activité anti-inflammatoire.

المخلص: في إطار تشمين النباتات العطرية والطبية، قمنا بدراسة نبات إكليل الجبل. الهدف من هذه الدراسة هو تحديد كمية البوليفينول والفلافونويد، وتقييم الأنشطة البيولوجية (النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط المضاد للالتهابات) لمستخلصات هذا النبات وزيوته الأساسية. تم تقدير محتوى البوليفينول بطريقة Folin-ciocalteu و محتوى الفلافونويد بطريقة $AlCl_3$. تم اختبار النشاط المضاد للأكسدة بطريقة DPPH, ABTS, FRAP, H_2O_2 و PPM. تم تقدير نشاط مضادات الميكروبات بواسطة طريقة الأروماتوغرام. تم دراسة النشاط المضاد للالتهابات بطريقة تثبيت أغشية خلايا الدم الحمراء (HRBC). أظهر مستخلص البوتانول أعلى محتوى من البوليفينول والفلافونويد وأفضل نشاط مضاد للأكسدة بجميع الطرق. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن هذا النبات ليس له نشاط ضد *Proteus mirabilis*، فقط الزيت الأساسي والمستخلص الخام لهما نشاط معتدل ضد *Pseudomonas Aeruginosa* ولكن حساسية جيدة ضد *Escherichia coli* المستخلص الكلوروفورمي. المستخلص الخام و الزيت الأساسي لهما نشاط مضاد للفطريات ضد *Candida albicans* في وسط MH تظهر نتائج النشاط المضاد لانحلال الدم أن مستخلص البوتانول له أفضل نشاط من حيث حماية الغشاء. يمكن اعتبار هذا النبات مصدرا لمضادات الأكسدة الطبيعية للأغراض الطبية.

الكلمات الرئيسية: بوليفينول، إكليل الجبل، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، نشاط مضاد للالتهابات.

Abstract : As part of the development of aromatic and medicinal plants, we were interested in the plant *Rosmarinus officinalis L.* The objective of this study was to quantify total polyphenols and total flavonoids, and to evaluate biological activities (antioxidant, anti-microbial and anti-inflammatory) of extracts of our plant and HE. The total phenol content was determined by the Folin-Ciocalteu method and the flavonoid content was determined by the $AlCl_3$ method. The antioxidant activity was tested by the method of DPPH, ABTS, FRAP, H_2O_2 and PPM. The anti-microbial activity was estimated by the aromatogram method. And the anti-inflammatory activity was studied by the method of the stabilization of membranes of red blood cell (HRBC). The n-butanolic extract showed the highest content of polyphenols and flavonoids and the best antioxidant activity for all tests. The results of the anti-microbial activity obtained showed that this plant has no activity against *Proteus mirabilis*, only HE and the crude extract have a moderate activity against *Pseudomonas Aeruginosa* but a good sensibility against *Escherichiacoli*. Chloroformic extract, crude extract and HE have anti-fungal activity against *candida albicans* in the MH. The results of the anti-hemolytic activity show that the n-butanolic extract has the best activity in terms of membrane protection. This plant could therefore be considered as a source of natural antioxidant for medicinal purposes.

Keywords: Polyphenols, *Rosmarinus*, antioxidant activity, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity.