



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi- B.B.A

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences biologiques



## Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

## Intitulé

Évaluation de l'activité antioxydante de *Rosmarinus officinalis*

### Présenté par :

M<sup>r</sup> Benaniba Imad Eddine & M<sup>elle</sup> Rahal Narimene

### Devant le jury :

**Président :** M<sup>me</sup> Meziti Asma MCB (Université de Bordj Bou Arreridj)

**Encadrant :** M<sup>elle</sup> Benbouguerra Nawel MAB (Université de Bordj Bou Arreridj)

**Examineur :** M<sup>me</sup> Guergour Hassina MCA (Université de Bordj Bou Arreridj)

Année universitaire : 2021/2022

# Remerciements

الحمد لله رب العالمين، والصلاة والسلام على سيدنا محمد الصادق الوعد الأمين، اللهم لا علم لنا إلا ما علمتنا إنك أنت العليم الحكيم، اللهم علمنا ما ينفعنا وانفعنا بما علمتنا وزدنا علماً.

*Au terme de ce travail, nous tenons à remercier Dieu le tout-puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail*

*Nous exprimons nos profonds remerciements et notre vive connaissance à notre promotrice, Dr **BENBOUQUERRA NAUEL** pour avoir encadré et dirigé ce travail, pour sa disponibilité, sa générosité, sa gentillesse, son encouragement, son soutien, pour le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et pour ces directives et conseils judicieux et pour son suivi régulier à l'élaboration de ce modeste travail, qu'elle trouve ici toutes nos gratitude et nos sympathies*

*Nos remerciements vont aussi aux membres de jury : madame **Meziti Asma** et madame **Guergour Hassina** d'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail*

*Nous tenons à remercier tous nos enseignants*

*Nos remerciements vont également à toute l'équipe du Laboratoire de Biochimie de l'université Mohamed El Bachir El Ibrahimi*

*Enfin nous remercions tous ceux et toutes celles qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail*

*À tous les étudiants de la promotion 2021|2022*

**MAD ET NARMENE**

# Dédicaces

*À ceux qui nous ont donnés sans rien en retour,*

*À ceux qui nous ont encouragés et soutenus dans nos moments les plus difficiles, et  
ceux à qui on doit tant*

*Mes chers parents Nacira et Djamel (Allah yarhmou), aucune dédicace ne  
saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les  
sacrifices que vous avez consentis pour me permettre de suivre mes études dans les  
meilleures conditions possibles sans avoir cessé de m'encourager tout au long de  
mes années d'études*

*À ma chère sœur Ikhlal, ainsi mes frères Aymen et Rami.*

*À mes chers oncles : Zehar Atef, Mquedmi Tamim.*

*À mes chères tantes : Gara Nabila, Zehar Assia, Yakout, Nour Houda*

*À ma chère binôme Narimene et sa famille*

*À tous mes amis : Zerougui Imad eddine, Benmayouf Ilyes, Boukhlifa  
Zine dine, Herem Rayane.*

*Imad. B*

# Dédicaces

*Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère :*

*À l'homme, mon précieux offre du Dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père Kamel*

*À 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 : mon adorable mère Rachida*

*À mes grands - mères Rebeh (Rabi yarhmeha) et Laadj*

*À ma chère sœur Nour El Houda*

*À mon adorable petite sœur Soundous qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille*

*À mes frères Ala Eldine et Abd Elrahmane*

*À mon cher binôme Imad et sa famille*

*À ma chère amie Chaima*

*À toutes mes amies : Ibtissem, Amira, Imène, Dounia Fatima, Jouri et Ismahane*

**NARMENE. R**

---

**Table des matières****Liste des abréviations****Liste des figures****Liste des tableaux****Introduction générale..... 1****Partie I : Bibliographie**1. *Rosmarinus officinalis* ..... 2

2. Métabolites secondaires..... 5

3. Stress oxydatif, radicaux libres et antioxydants ..... 7

**Partie II : Matériel et méthodes**

1. Récolte et préparation des échantillons..... 8

1.1. Récolte ..... 8

1.2. Préparation des échantillons ..... 8

1.2.1. Nettoyage..... 8

1.2.2. Séchage..... 8

2. Analyses physico-chimiques ..... 9

2.1. Taux d'humidité ..... 9

2.2. Taux de cendres ..... 9

3. Préparation des extraits..... 10

3.1. Extraction par macération..... 10

3.3. Extraction par l'infusion..... 10

4. Rendement d'extractions ..... 11

5. Screening phytochimique ..... 11

5.1. Test des phénols..... 11

5.2. Test des terpénoïdes..... 11

5.3. Test des tannins ..... 11

6. Dosage des composés phytochimiques .....	12
6.1. Dosage des polyphénols totaux .....	12
6.2. Dosage des flavonoïdes .....	12
7. Détermination de l'activité antioxydante .....	13
7.1. Effet scavenger (DPPH) .....	13
7.2. Pouvoir réducteur (FRAP) .....	13
8. Analyse statistique des données .....	14

### **Partie III : Résultats et discussion**

<b>1. Résultats.....</b>	<b>15</b>
1.1. Analyses physicochimiques.....	15
1.1.1. Taux d'humidité .....	15
1.1.2. Taux de cendres .....	15
1.2. Rendement d'extraction.....	16
1.3. Criblage phytochimique.....	16
1.4. Dosage des composés phytochimiques.....	19
1.4.1. Teneur en polyphénols totaux.....	19
1.4.2. Teneur en flavonoïdes .....	20
1.5. Détermination de l'activité antioxydante.....	21
1.5.1. Réduction du radical libre (DPPH).....	21
1.5.2. Réduction du fer (FRAP).....	22
<b>2. Discussion .....</b>	<b>23</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>25</b>

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

**Liste des abréviations**

**DPPH**: 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle

**EAA** : Équivalent acide ascorbique

**EAG** : Équivalent acide gallique

**MVS** : Matière végétale sèche de *Rosmarinus officinalis*

**ED** : Extrait de décoction

**EQ** : Équivalent quercétine

**EI** : Extrait d'infusion

**EM** : Extrait de macération

**ERN** : Espèces réactives de l'azote

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène

**FRAP** : Ferric reducing antioxidant power

**ES** : Extrait sec

**MSs** : Métabolites secondaires

**PPT** : Polyphénols totaux

**UV** : Ultra-Violet

Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Photographie originale ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ).....	02
<b>Figure 02</b> : Taux d'humidité de MVS.....	15
<b>Figure 03</b> : Taux de cendres de MVS.....	15
<b>Figure 04</b> : Rendement d'extraction.....	16
<b>Figure 05</b> : Teneurs en polyphénols totaux .....	19
<b>Figure 06</b> : Teneurs en flavonoïdes .....	20
<b>Figure 07</b> : Capacité antioxydantes par DPPH .....	21
<b>Figure 08</b> : Teneurs en pouvoir réducteur (FRAP).....	22

**Liste des tableaux**

**Tableau I** : Teneur en macronutriments et en micronutriments du romarin.....3

**Tableau II** : Teneur en composés volatils, terpénoïdes et polyphénols du romarin.....4

**Tableau III** : Criblage phytochimique des extraits.....17

### Introduction générale

Les plantes médicinales sont devenues l'une des sources les plus accessibles pour améliorer la santé humaine (**Hamedi et al., 2022**), car elles sont très riches en composés bioactifs, également connus sous le nom de phytochimiques. Ces composés sont des précurseurs pour la synthèse de médicaments naturels et synthétiques, de cosmétiques et de compléments alimentaires (**Getachew et al., 2022; da Silva et al., 2022**). Les médicaments issus des plantes sont facilement disponibles, moins chers, efficaces et ont rarement des effets secondaires. Les plantes qui ont été sélectionnées pour un usage médicinal depuis des milliers d'années constituent le choix le plus évident pour examiner la recherche actuelle de nouveaux médicaments thérapeutiquement efficaces (**Getachew et al., 2022**).

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) appartient à la famille des Lamiacées, est un arbuste vivace à feuilles persistantes, caractérisé par une odeur aromatique unique, largement cultivée à l'échelle mondiale en raison de ses propriétés médicinales et aromatiques (**Mwithiga et al., 2022**).

*Rosmarinus officinalis* fait partie des plantes qui sont en usage depuis l'antiquité et qui, au travers des siècles, a su garder une place dans l'inventaire des remèdes des tradipraticiens de tout le bassin méditerranéen (**González-Minero et al., 2020**). Le romarin contient de nombreux composés phytochimiques qui sont des sources potentielles d'antioxydants naturels ; les terpènes, les flavonoïdes, les tanins et les acides phénoliques (**Erkan et al., 2008**).

Le choix de de cette plante pour faire cette étude est venu du fait de son abondance en Algérie, de sa large utilisation et de ses diverses propriétés thérapeutiques.

**L'objectif principal** de notre travail est l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits de *Rosmarinus officinalis*.

Le manuscrit est devisé en trois parties :

- ✓ La première partie aborde les connaissances bibliographiques relative au romarin, les métabolites secondaires et le stress oxydatif
- ✓ La deuxième partie est la partie expérimentale qui présente le matériel et les méthodes utilisés durant cette étude
- ✓ La troisième partie décrit les résultats obtenus ainsi que leur discussion La rédaction de ce manuscrit se terminera par une conclusion générale et des perspectives de travail

**Partie I**  
**Bibliographie**

## 1. Le romarin

*Rosmarinus officinalis* est une plante aromatique de la famille des Lamiaceae (Mwithiga *et al.*, 2022) (Figure 01). Aux États-Unis et en Europe, le romarin est une épice disponible dans le commerce pour son utilisation comme antioxydant (Basaga *et al.*, 1997; Zeroual *et al.*, 2021). Les extraits de romarin ont été utilisés dans le traitement de maladies, en raison de leur potentiel hépatoprotecteur, de leur potentiel thérapeutique pour la maladie d'alzheimer et de leur effet antitumorale (Ribeiro-Santos *et al.*, 2015; Gurbuz *et al.*, 2016; Zeroual *et al.*, 2021). D'autre part, ils ont été utilisés dans la conservation des aliments, car ils empêchent l'oxydation et la contamination microbienne (Ribeiro-Santos *et al.*, 2015). Par conséquent, l'extrait de romarin pourrait être utile pour remplacer ou même diminuer les antioxydants synthétiques dans les aliments (Almela *et al.*, 2006). En tant que conservateurs, les extraits de romarin offrent plusieurs avantages technologiques et des bénéfices aux consommateurs (Ribeiro-Santos *et al.*, 2015; Nieto *et al.*, 2018).



Figure 01 : Photographie originale (*Rosmarinus officinalis*)

## 1.1. La composition chimique du romarin

### 1.1.1. La composition nutritionnelle (macro et micronutriments)

Le **tableau I** indique la teneur en macronutriments et en micronutriments du romarin. La variation de la teneur peut être attribuée en grande partie aux différences d'espèces, de variétés, de conditions de croissance, de temps de récolte, d'origine du sol et de paramètres géographiques (*Aziz et al., 2021*).

**Tableau I** : Teneur en macronutriments et en micronutriments du romarin (*Aziz et al., 2021*)

Composés	Teneurs
<b>Macronutriments (g/100g)</b>	
Protéines	3,31
Lipides	5,86
Glucides	20,76
Fibres	14,10
<b>Micronutriments (mg/100g)</b>	
Acide ascorbique	21,8
Calcium	779
Potassium	1491,6
Magnésium	163,4
Sodium	271,2
Phosphore	107,5
Fer	33

### 1.1.2. Les composés volatils, terpénoïdes et les polyphénols du romarin

Les plantes aromatiques sont riches en huiles volatiles, qui donnent des arômes agréables (*Ribeiro-Santos et al., 2015; Mwithiga et al., 2022*). Les composés aromatiques importants dans le romarin sont les hydrocarbures monoterpènes, les monoterpènes oxygénés, les hydrocarbures sesquiterpènes, les sesquiterpènes oxygénés, les esters, les cétones, le phénol, l'alcool et autres (**Tableau II**). La composition du romarin peut être influencée par l'espèce, la partie végétale utilisée, l'origine géographique, le moment de la récolte, l'âge de la plante, le type d'entreposage (frais, séché ou congelé) ainsi la méthode de séchage et le type de solvant utilisé pour l'extraction (*Ribeiro-Santos et al., 2015; Aziz et al., 2021*).

**Tableau II** : Teneur en composés volatils, terpénoïdes et les polyphénols du romarin (**Aziz et al., 2021**).

<b>Composés</b>	<b>Teneurs</b>
<b>Composés volatils (%)</b>	
Camphre	27,9 (%)
Alpha-pinène	7,5 (%)
Verbénone	5,7 (%)
Camphène	4,4 (%)
1,8- cinéol	29 (%)
<b>Terpénoïdes (mg/100g)</b>	
Carnosol	387
Acide carnosique	4205
<b>Composés phénoliques (mg/100g)</b>	
Acide rosmarinique	700
Acide vanillique	1,73
Acide férulique	916
Quercétine	5,1
Rutine	3,07

## 2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires (MSs) sont des dérivés des métabolites primaires produits par les plantes en raison de divers changements physiologiques (Ashraf *et al.*, 2018; Seca et Pinto, 2018; Liu *et al.*, 2022). Ils améliorent considérablement la croissance et la survie des plantes sous différentes conditions (changement de climat, attaque des champignons...) (Quideau, 2013).

Environ 100 000 métabolites secondaires sont présents dans le règne végétal, classés en trois grands groupes en fonction de leur structure et leur voie de biosynthèse (Da Silva *et al.*, 2022). Ces groupes comprennent ; les composés phénoliques (flavonoïdes et non flavonoïdes), les terpènes (isoprénoïdes) et les composés azotés (les alcaloïdes) (Ashraf *et al.*, 2018; Seca et Pinto, 2018).

### 2.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des substances organiques trouvés dans presque tous les tissus végétaux, y compris les composants comestibles comme les fruits, les graines, les feuilles, les tiges et les racines (Quideau *et al.*, 2011; Quideau, 2013). Dans leur structure, tous ces composés ont au moins un cycle aromatique avec un ou plusieurs groupes hydroxyle (Da Silva *et al.*, 2022).

Il existe environ 8000 composés phénoliques avec un large éventail de variations structurelles résultant de deux voies synthétiques principales sont la voie shikimate et la voie acétate (Pandey et Rizvi, 2009). Ces composés sont connus pour leur rôle antioxydant, anti-inflammatoire, ainsi, ils jouent un rôle très important dans la prévention des maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, le diabète.... etc (Vauzour, 2014; Ghitescu *et al.*, 2015; Chedea et Pop, 2019).

### 2.2. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes, également appelés isoprénoïdes, sont les produits naturels les plus nombreux et les plus variés sur le plan structurel (Huang *et al.*, 2012). Ils sont classés en fonction du nombre et de l'organisation structurelle des carbones formés par l'arrangement linéaire des unités d'isoprène, suivi par la cyclisation et les réarrangements du squelette carboné, selon une caractéristique empirique connue sous le nom de règle de l'isoprène (Ludwiczuk *et al.*, 2017). L'isoprène; le "bloc de construction" des terpénoïdes, est le 2-méthylbuta-1,3-diène (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) (Paduch *et al.*, 2007).

Il existe différentes classes de terpènes basées sur l'unité isoprène, y compris les monoterpènes (deux unités C<sub>5</sub>), les sesquiterpènes (trois unités C<sub>5</sub>), les diterpènes (quatre unités C<sub>5</sub>), les triterpènes (six unités C<sub>5</sub>), les tétraterpènes (huit unités C<sub>5</sub>) et les polyterpénoïdes ([C<sub>5</sub>]<sub>n</sub>) (Huang *et al.*, 2012; Amirzakariya et Shakeri, 2022).

Les terpénoïdes, en particulier les caroténoïdes, ont une activité antioxydante, le  $\beta$ -carotène, ainsi que le  $\gamma$ -carotène, le lycopène et la lutéine possèdent une activité protectrice contre les cancers du poumon, du colorectal, du sein, de l'utérus et de la prostate. Les effets protecteurs globaux sont donc plus importants lorsque tous les carotènes sont pris ensemble (**Paduch *et al.*, 2007; Hamedi *et al.*, 2022**).

### 2.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique (**Herbert, 2003**). Environ 12 000 alcaloïdes déjà isolés à partir de sources végétales, animales ou de micro-organismes (**Ziegler et Facchini, 2008**). La classification des alcaloïdes est basée sur leur précurseur biosynthétique tels que le tryptophane, la tyrosine et la lysine (**Amjad, 2017**).

Les alcaloïdes protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière UV. Ils constituent aussi une réserve de substances capables de fournir l'azote ou d'autres fragments nécessaires au développement de la plante. Parfois, ils n'ont pas de rôle précis et sont simplement des sous-produits du métabolisme végétal. Au niveau de l'organisme, les alcaloïdes ont un effet anticancéreux (La vinblastine), analgésique (morphine et codéine) et relaxant musculaire (la papavérine) (**Ashraf *et al.*, 2018**).

### **3. Stress oxydatif, radicaux libres et antioxydants**

#### **3.1. Le stress oxydatif**

État de dommage oxydatif qui résulte d'un déséquilibre critique entre la production des radicaux libres et les défenses antioxydantes (**Lobo *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2018**). Il cause des dommages au niveau des lipides, des protéines et des acides nucléiques (**Lobo *et al.*, 2010; Liguori *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018**).

Le stress oxydatif contribue aux maladies inflammatoires, les maladies cardiovasculaires, le cancer, les troubles neurologiques, le diabète, l'ischémie/reperfusion, l'hypertension, les troubles neurologiques et le vieillissement (**Kunwar et Priyadarsini, 2011; Rani *et al.*, 2016**).

#### **3.2. Les radicaux libres**

Atomes ou molécules hautement réactifs possédant un ou plusieurs électrons non appariés dans leur enveloppe externe et peuvent être formés lorsque l'oxygène interagit avec certaines molécules (**Lushchak, 2014**). Les termes espèces réactives de l'oxygène (ERO) et espèces réactives de l'azote (ERN) font référence aux dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote, respectivement. Les deux espèces sont produites par toutes les cellules aérobies et jouent un rôle important dans l'organisme (**Liguori *et al.*, 2018**).

#### **3.3. Les antioxydants**

Un antioxydant est une molécule suffisamment stable pour donner un électron à un radical libre et le neutraliser, réduisant ainsi sa capacité à causer des dommages (**Kunwar et Priyadarsini, 2011**). Les antioxydants peuvent interagir en toute sécurité avec les radicaux libres et mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées (**Rizzo *et al.*, 2010**). Certains de ces antioxydants, dont le glutathion, l'ubiquinol et l'acide urique, sont produits au cours du métabolisme normal de l'organisme (**Lobo *et al.*, 2010**) et d'autres comme les polyphénols se trouvent dans l'alimentation (**Rizzo *et al.*, 2010**).

## **Partie II**

### ***Matériel et méthodes***

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de Biochimie de l'université de Mohamed El Bachir El Ibrahimi

Cette partie comporte différents volets ;

- Récolte et préparation des échantillons du romarin
- Analyses physico-chimiques (humidité de la matière végétale sèche et les cendres) du romarin
- Extraction des polyphénols totaux par 3 méthodes ; décoction, macération et infusion et calcul du rendement
- Criblage phytochimique (Mettre en évidence la présence des phénols, des tanins et des terpènes)
- Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des extraits
- Détermination de l'activité antioxydante totale des extraits (DPPH et FRAP)
- Traitement statistique des données (Anova)

## **1. Récolte et préparation des échantillons**

### **1.1. Récolte**

La partie aérienne de *Rosmarinus Officinalis* a été récoltée le 11 février 2022 dans la forêt d'Ain-Loulou, commune El-Rabta, wilaya de Bordj Bou Arreridj.

### **1.2. Préparation des échantillons**

#### **1.2.1. Nettoyage**

La quantité de la plante fraîchement récoltée a été débarrassée des déchets et lavée par l'eau de robinet.

#### **1.2.2. Séchage**

La matière végétale a été déposée sur un papier absorbant et séchée à l'ombre dans une pièce aérée pendant 7 jours puis dans l'étuve à 40° C pendant 72 heures pour assurer le séchage complet de la plante (**Annexe 01**).

#### **1.2.3. Broyage et tamisage**

La matière végétale séchée a été broyée à l'aide d'un moulin électrique en poudre fine puis tamisée à l'aide d'un tamis (2000 µm), la poudre obtenue est conservée dans des flacons fermés hermétiquement, à l'abri de la lumière (**Annexe 02**).

## 2. Analyses physico-chimiques

### 2.1. Taux d'humidité

Le taux d'humidité est obtenu par la dessiccation d'une prise d'essai du romarin à l'étuve à 105 °C pendant 24 heures jusqu'à l'obtention d'un poids constant (**Doymaz et al., 2004**).

#### Mode opératoire

Une quantité de 2g la matière végétale sèche de *Rosmarinus officinalis* (MVS) est placée dans des boites de pétri en verre préalablement séchées et tarées. Les boites sont ensuite placées dans une étuve type Memmert à 105 °C pendant 24h. Après refroidissement dans un dessiccateur renfermant un desséchant (gel de silice), les boites sont pesées (**Annexe 03**). L'expérience a été répétée 3 fois.

#### Expression des résultats

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

$m_1$  : masse de l'échantillon + la masse de la boîte de Petri (avant dessiccation) (g)

$m_2$  : masse de l'échantillon + la masse de la boîte de Petri (après dessiccation) (g)

$p$  : masse de l'échantillon (g)

### 2.2. Le taux de cendres

Les cendres sont déterminées par incinération de l'échantillon dans un four à moufle jusqu'à l'obtention d'un résidu blanchâtre (**Boussaid et al., 2020**).

#### Mode Opératoire

Une quantité de 2g de MVS a été placée dans des creusets préalablement pesés. Le creuset et son contenu sont ensuite placés dans un four à moufle à 550 °C pendant 6 h, jusqu'à destruction de toutes les matières organiques contenues dans l'échantillon. Après refroidissement le creuset est pesé avec les cendres. L'expérience a été répétée 3 fois.

#### Expression des résultats

$$Cendres \% = \left( \frac{m_2 - m_0}{m_1} \right) \times 100$$

$m_0$  : masse du creuset vide (g)

$m_1$  : masse de l'échantillon (g)

$m_2$  : masse de l'échantillon incinéré + la masse du creuset (g)

### 3. Préparation des extraits

#### 3.1. Extraction par macération

##### Principe

La macération est un procédé qui consiste à laisser séjourner un solide dans un liquide froid pour en extraire les composés solubles.

L'extraction a été exécutée conformément au protocole décrit par **Hamia *et al.* (2014)**, avec certaines modifications.

##### Mode opératoire

Une quantité de 10 g de MVS préalablement nettoyée et broyée est mise à macérer dans un mélange de 100 ml méthanol/eau (80/20 : V/V) sous agitation douce pendant 16h à une température ambiante. Les extraits sont filtrés à l'aide d'un papier filtre 1,25 mm, et le filtrat est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression à 40 °C. La phase aqueuse est récupérée dans une boîte de Pétri et séchée à l'étuve à 40 °C. La poudre sèche est conservée au réfrigérateur à 4°C.

#### 3.2. Extraction par décoction

##### Principe

La décoction est un procédé qui consiste à faire bouillir dans l'eau une substance pour en extraire les substances solubles.

La décoction a été effectuée conformément au protocole décrit par **Lezoul *et al.* (2020)**, avec quelques modifications.

##### Mode opératoire

Une quantité de 10 g de la poudre du romarin est mélangée avec un volume de 100 ml méthanol/eau (20/80 : V/V) dans une casserole bien fermée avec son couvercle, mise sur une plaque chauffante à température de 100° C, pendant 7 minutes après l'ébullition. Les extraits sont filtrés à l'aide d'un papier filtre 1,25 mm, et le filtrat est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression à 40 °C. La phase aqueuse est récupérée dans une boîte de Pétri et séchée à l'étuve à 40 °C. La poudre sèche est conservée au réfrigérateur à 4°C.

#### 3.3. Extraction par l'infusion

L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir.

L'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par **Abubakar *et al.* (2020)** avec quelques modifications.

### Mode opératoire

Une quantité de 10 g de MVS est plongée dans un volume de 100 ml du solvant hydro-méthanolique (20/80 : V/V) préalablement bouilli dans une casserole fermée avec son couvercle. L'extrait est filtré à l'aide d'un papier filtre 1,25 mm, et le filtrat récupéré est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression à 40 °C. La phase aqueuse est récupérée dans une boîte de Pétri et séchée à l'étuve à 40 °C. La poudre sèche est conservée au réfrigérateur à 4°C.

### 4. Rendement d'extractions

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

$$\text{Red (\%)} = \frac{m_1 - m_0}{p} \times 100$$

$m_1$  : masse de la boîte de Pétri + la masse de l'extrait

$m_0$ : masse de la boîte de Pétri vide

p: prise d'essai

### 5. Screening phytochimique

Les tests de mise en présence des terpénoïdes, des phénols et des tannins ont été réalisés selon la méthode de *Ayoola et al. (2008)* ;

#### 5.1. Test des phénols

Une quantité d'environ 2 mg de chaque extrait a été dissoute dans 2 ml d'eau distillée et puis quelques gouttes d'une solution aqueuse de chlorure ferrique à 10% a été ajoutée. L'apparition d'une couleur bleue ou verte indique la présence de phénols.

#### 5.2. Test des terpénoïdes

Un volume de 2 ml de chloroforme a été ajouté à une quantité de 0,5 g de chacun des extraits ensuite 3 ml d'acide sulfurique concentré a été additionné soigneusement. La formation d'un précipité de couleur brun rougeâtre indique la présence des terpénoïdes.

#### 5.3. Test des tannins

Une quantité de 0,5 g de chaque extrait a été bouilli dans 10 ml d'eau distillée puis filtré. Ensuite, quelques gouttes de chlorure ferrique à 0,1% ont été ajoutées. L'apparition d'une couleur vert brunâtre ou bleu-noir indique la présence de tanins.

## 6. Dosage des composés phytochimiques

### 6.1. Dosage des polyphénols totaux

#### Principe

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif du Folin-Ciocalteu selon la méthode de **Lister et Wilson. (2001)**. Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) qui est réduit, lors de l'oxydation des substances phénoliques, en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'échantillon.

#### Mode opératoire

Un volume de 200  $\mu$ l de chaque extrait est mélangé à 1 ml du réactif de Folin-ciocalteu (dilué 10 fois avec de l'eau distillée) et 800  $\mu$ l d'une solution aqueuse de 7,5 % (m/V) de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ). Après 2 heures d'incubation à une température ambiante, l'absorbance est lue par spectrophotométrie UV-Vis à une longueur d'onde de 765 nm. Une courbe d'étalonnage est effectuée dans les mêmes conditions en utilisant une gamme de concentrations (0 - 0,3 mg/L) d'une solution hydroalcoolique d'acide gallique à la place de l'échantillon. La teneur en polyphénols totaux a été exprimée en équivalent d'acide gallique (mg EAG/g ES) (**Dudonné et al., 2009**). L'expérience a été répétée 3 fois.

### 6.2. Dosage des flavonoïdes

#### Principe

La teneur en flavonoïdes dans les extraits a été déterminée en utilisant une méthode basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium, de couleur jaune dont l'absorbance maximale se situe à 430 nm (**Quettier-Deleu et al., 2000**).

#### Mode opératoire

Un volume de 1ml de chaque solution est introduit dans des tubes à essai, suivi par l'addition de 1ml de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). Les tubes sont secoués immédiatement et bien mélangés. Après 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue par spectrophotométrie UV-Vis à une longueur d'onde de 430 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant une gamme de concentrations de 0 à 30  $\mu$ g/l d'une solution hydroalcoolique de la quercétine (**Annexe 04**). La teneur en flavonoïdes a été exprimée en équivalent quercétine (mg E quercétine/g ES). L'expérience a été répétée 3 fois.

## 7. Détermination de l'activité antioxydante

### 7.1. Effet scavenger (DPPH)

#### Principe

Le DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) est un radical stable qui a été largement utilisé pour déterminer la capacité antioxydante, il est soluble dans les solvants organiques, et présente une bande d'absorption typique à 515 nm (**Pulido *et al.*, 2000 ; Boylan *et al.*, 2015**). Habituellement, la diminution de l'intensité d'absorption en présence d'échantillons contenant des antioxydants est enregistrée après un temps d'incubation fixe (environ 30min) (**Chedea et Pop, 2019**).

Quand une solution de DPPH est mélangée avec celle d'une substance qui peut donner un atome d'hydrogène, ceci donne lieu à la forme réduite de DPPH avec la perte de la couleur violette, bien qu'elle conserve une couleur jaune pâle résiduelle du groupe picryl restant (**López-Alarcón et Denicola, 2013; Chedea et Pop, 2019**).

#### Mode opératoire

Un volume de 500 µl de chaque extrait a été mélangé avec 1,95 ml de la solution de DPPH (absorbance de  $0,68 \pm 0,03$  à 515 nm). Le mélange réactionnel est agité vigoureusement et incubé pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance est lue par spectrophotométrie UV-Vis à une longueur d'onde de 515 nm (**Popovici *et al.*, 2009**). Une courbe d'étalonnage est obtenue dans les mêmes conditions en utilisant une gamme de concentrations (0 - 20 µg/ml) d'une solution d'acide ascorbique (**Annexe 05**). La capacité antioxydante a été exprimée en équivalent acide ascorbique (mg EAA/g ES). L'expérience a été répétée 3 fois.

### 7.2. Pouvoir réducteur (FRAP)

#### Principe

La détermination du pouvoir réducteur est basée sur la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) du complexe ferricyanure- $\text{Fe}^{3+}$  en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en présence d'antioxydants réducteurs. La forme réduite donne une couleur bleu verdâtre qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (**Gülçin *et al.*, 2003**).

#### Mode opératoire

Le pouvoir réducteur est estimé selon la méthode de **Gulçin *et al.* (2003)**. Un volume de 2,5 ml d'extrait est additionné à 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium (1%). Après incubation à 50° C pendant 20 min, un volume de 2,5 ml d'acide trichloracétique (10%), 1ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique (0,1%) sont ajoutés au mélange. Après 10 min, l'absorbance est mesurée à 700nm. Les résultats sont

exprimés à partir d'une droite d'étalonnage en équivalent acide gallique (mg EAG/g ES) (**Annexe 06**). L'expérience a été répétée 3 fois.

#### **8. Analyse statistique des données**

Tous les essais ont été répétés trois fois (triplicat technique) et les résultats ont été exprimés par la moyenne  $\pm$  l'écartype. Une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée en utilisant le logiciel XLSTAT version 2022, un test de Tukey a été utilisé où  $p < 0,05$  a été considéré comme significatif.

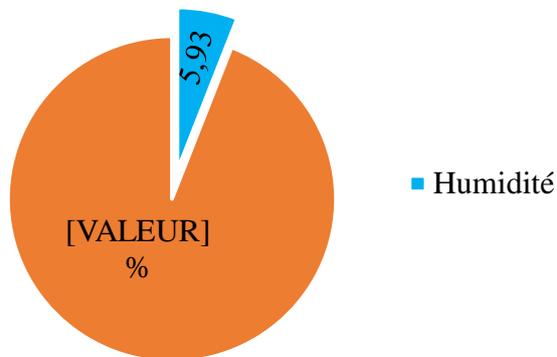
# *Résultats et discussion*

## 1. Résultats

### 1.1. Analyses physicochimiques

#### 1.1.1. Taux d'humidité

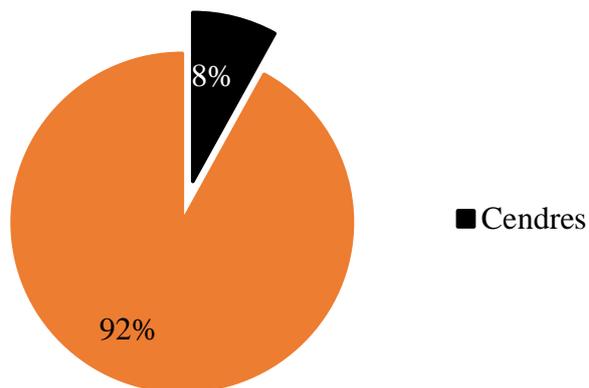
Les résultats obtenus montrent que la matière végétale sèche utilisée dans cette étude a un taux d'humidité de  $5,93 \pm 0,32\%$  (**Figure 02**). Ces résultats sont conformes aux normes de la pharmacopée européenne (Humidité inférieur à 10%).



**Figure 02** : Taux d'humidité de la MVS

#### 1.1.2. Taux de cendres

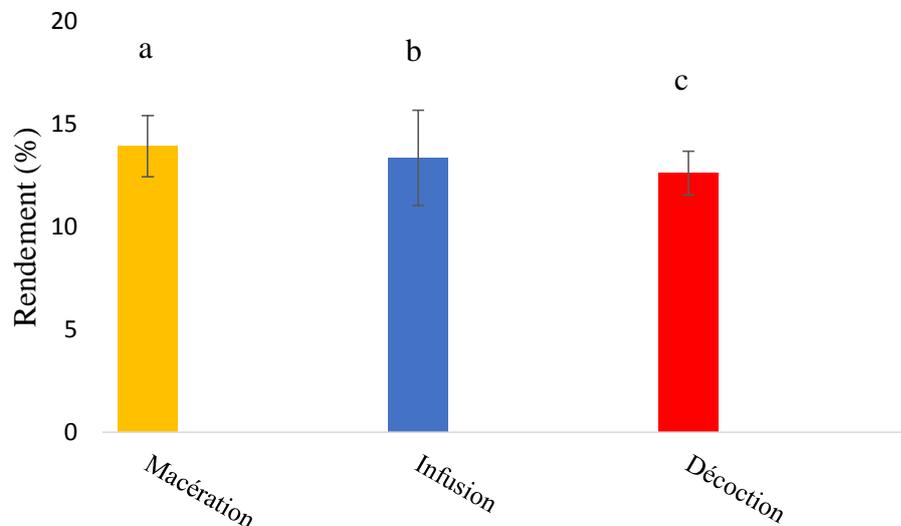
Les résultats montrent que la matière végétale sèche utilisée dans cette étude a un taux de cendres de  $8 \pm 0,05\%$  (**Figure 03**). Ces résultats sont conformes aux normes de la pharmacopée européenne (Taux de cendres inférieur à 14%).



**Figure 03** : Taux de cendres de la MVS

## 1.2. Rendement d'extraction

Trois méthodes d'extraction ont été utilisées pour extraire les composés actifs de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis*. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **figure 04**.



**Figure 04** : Rendement d'extraction (Les différences significatives entre les moyennes à  $p < 0,05$  sont notées avec des lettres (a–c), déterminées par le test de Tukey)

Les résultats obtenus montrent que le rendement d'extraction diffère statistiquement d'une méthode à l'autre. Le rendement le plus élevé est celui obtenu par macération (13,92% ± 1,48) suivi par l'extrait réalisé par infusion (13,34% ± 2,31) et la valeur le plus faible revient à l'extrait obtenu par décoction (12,62% ± 1,05). Cette différence peut être expliquée par certains facteurs : la température et la durée d'extraction.

## 1.3. Criblage phytochimique

Les tests phytochimiques réalisés ont révélé la présence des phénols, des tannins et des terpènes dans les différents extraits avec des intensités de couleur variables (**Tableau III**).

Tableau III : Criblage phytochimique des extraits

Composées	Observations	MVS	EM	EI	ED	Photo
Phénols	Apparition d'une couleur bleue	+	+++	+++	+++	
Terpènes	Formation d'une couche brun-rougeâtre	+	+++	+++	+++	

Tannins	Apparition d'une couleur bleu-noir	+	+++	+++	+++	
---------	------------------------------------	---	-----	-----	-----	---

(+++) Coloration plus intense, (+) Coloration moins intense.

Nous avons observé une couleur bleue qui indique la présence des phénols dans les quatre échantillons étudiés ce qui explique la richesse de nos extraits en composés phénoliques. La couleur est plus intense dans les trois extraits (macération, décoction, infusion) par rapport à MVS due à la concentration élevée de ces derniers dans les extraits.

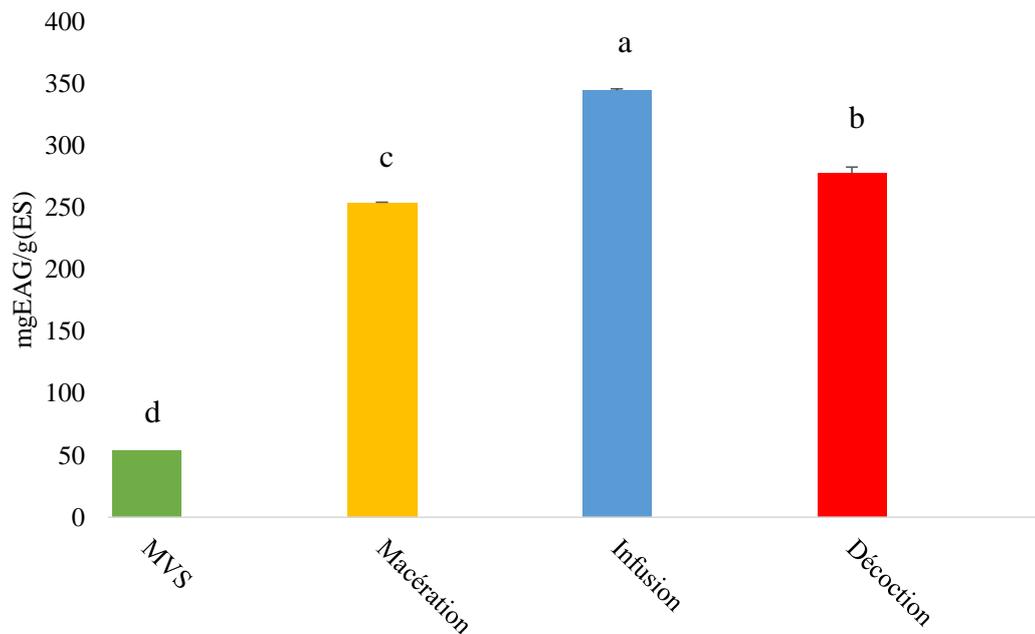
La formation d'une couche brun-rougeâtre dans les extraits montre la présence des terpènes.

L'apparition d'une couleur bleu-noir indique la présence des tanins qui sont des composés phénoliques.

## 1.4. Dosage des composés phytochimiques

### 1.4.1. Teneur en polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénol totaux des extraits de romarin sont présentées dans la **figure 05**

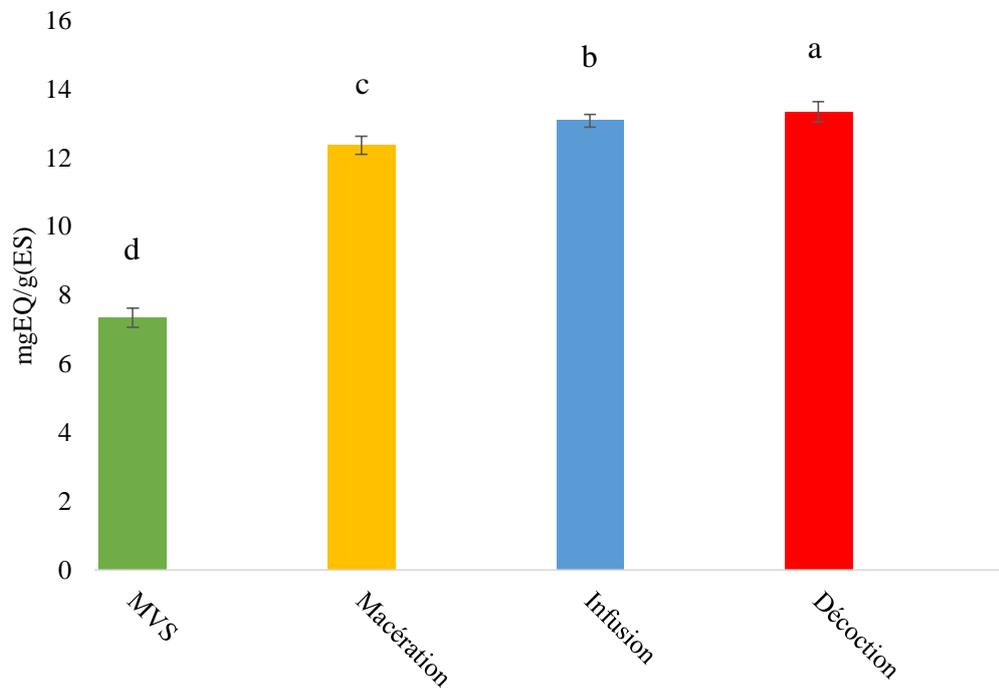


**Figure 05** : Teneurs en polyphénols totaux (Les différences significatives entre les moyennes à  $p < 0,05$  sont notées avec des lettres (a–d), déterminées par le test de Tukey)

Les teneurs varient de  $59,51 \pm 1,55$  mg EAG/g ES pour la MVS à  $344,31 \pm 1,28$  mg EAG/g ES pour l'extrait obtenu par infusion ce qui explique la richesse du romarin en composés phénoliques.

### 1.4.2. Teneur en flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes de différents extraits du romarin sont présentées dans la **figure 06**



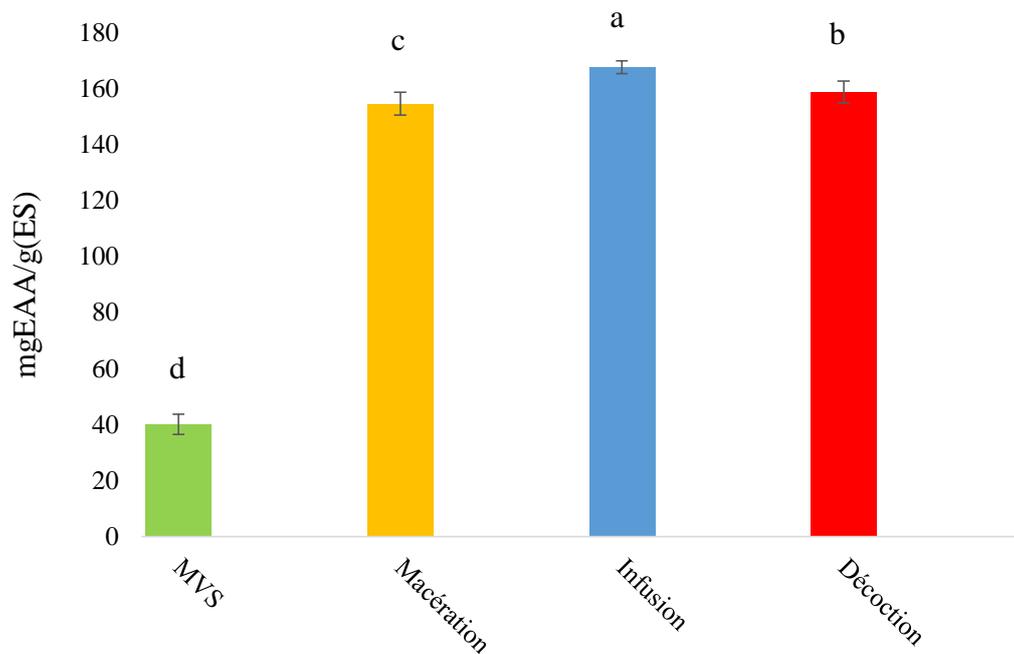
**Figure 06** : Teneurs en flavonoïdes (Les différences significatives entre les moyennes à  $p < 0,05$  sont notées avec des lettres (a–d), déterminées par le test de Tukey)

Les teneurs en flavonoïdes de la MVS et les extraits obtenus varient entre 7,33 et 13,33 mg EQ/g ES. La teneur la plus élevée des flavonoïdes a été obtenue par décoction  $13,33 \pm 0,29$  mg EQ/g Es et par infusion  $13,07 \pm 0,18$  mg EQ/g ES. La teneur en flavonoïdes la plus faible est celle de MVS  $7,33 \pm 0,28$  mg EQ/g ES.

## 1.5. Détermination de l'activité antioxydante

### 1.5.1. Réduction du radical libre (DPPH)

Les résultats de la réduction du radical libre DPPH sont illustrés dans **la figure 07**

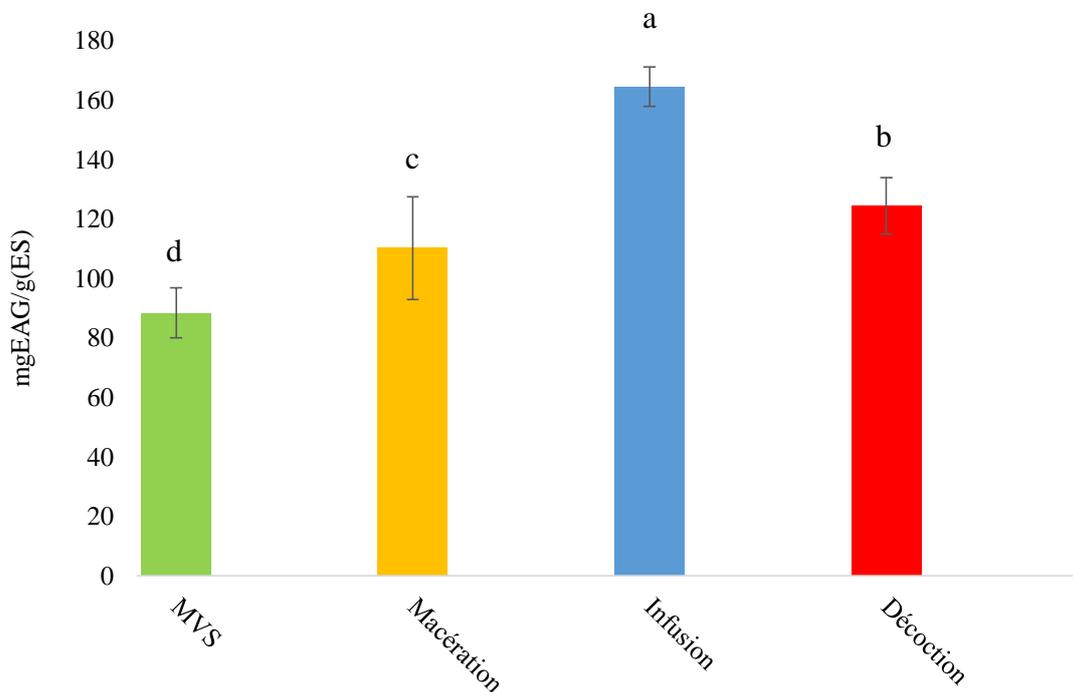


**Figure 07** : Capacité antioxydantes par DPPH (Les différences significatives entre les moyennes à  $p < 0,05$  sont notées avec des lettres (a–d), déterminées par le test de Tukey)

Les teneurs varient de 40,08 à 167,53 mg EAA/g ES, les extraits obtenus par infusion, décoction et macération présentent une capacité antioxydante de  $167,53 \pm 2,23$ ,  $158,73 \pm 3,85$  et  $154,50 \pm 4,03$  mg EAA/g ES respectivement, alors qu'une faible activité a été mesurée dans la MVS  $40,08 \pm 3,62$  mg EAA/g ES.

### 1.5.2. Réduction du fer (FRAP)

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits de nos échantillons sont illustrés dans la **figure 08**



**Figure 08** : Pouvoir réducteur des extraits de *Rosmarinus officinalis* (Les différences significatives entre les moyennes à  $p < 0,05$  sont notées avec des lettres (a–d), déterminées par le test de Tukey)

Les résultats du pouvoir réducteur présentent une différence significative varie de 88,40 à 164,48 mg EAG/g ES. Le pouvoir réducteur de l'extrait obtenu par infusion est le plus fort (164,48 ± 6,56 mg EAG/g ES), les extraits de décoction et macération présente un pouvoir réducteur moyen de 124,36 ± 6,65 et 110,15 ± 17,34 mg EAG/g ES, le plus faible pouvoir réducteur est celui de la MVS (88,40 ± 8,38 mg EAG/g ES).

## 2. Discussion

Dans cette étude, l'analyse des paramètres physicochimiques de *Rosmarinus officinalis* a montré un taux d'humidité de  $5,93 \pm 0,32\%$ , ce résultat est en accordance avec celui de **Albu et al. (2004)** qui ont trouvé un taux d'humidité de 5% dans MVS du romarin.

Le taux d'humidité obtenu est expliqué par le bon séchage (à l'air libre et à l'étuve) et ça confère une meilleure conservation de la poudre à long terme.

Le taux de cendres représente la quantité totale en sels minéraux présente dans un échantillon, une teneur en sel minéraux faible explique une teneur élevée en matière organique. D'après les résultats élaborés par **Arslan et al. (2007)**, le romarin possède une quantité importante d'éléments minéraux.

Le choix de la méthode d'extraction des composés phytochimique pour avoir un bon rendement est une étape cruciale dans l'étude des phytonutriments. En comparant nos résultats à ceux des travaux précédents, nous avons en accord avec ceux de **Santos et al. (2021)** et de **Lehout et Laib. (2015)** que l'extraction par macération donne le meilleur rendement (environ 13,7%), contrairement aux **Bohui et al. (2018)**, qui ont pu avoir des rendements supérieurs d'environ 16,30 %, 15,10 % et 14,30 % par décoction, macération et infusion respectivement.

Le romarin contient des différents composés phytochimiques tels que les flavonoïdes, les phénols, les huiles volatiles, les terpénoïdes, etc (**Johar et al., 2015**). Les résultats de cette étude ont montré la présence des phénols, terpénoïdes et tannins dans tous les extraits de romarin, ces résultats sont en accordance avec ceux de **Gonzalez-Trujano et al. (2007)**, **Johar et al. (2015)**, **Boucheloukh et kadj, (2019)**, **Ezziane et Senouci. (2019)**, **Sissaoui et al. (2021)**, et sont en contradiction avec les résultats de **Johar et al. (2015)** qui n'ont pas trouvé les tanins dans les extraits de romarin.

En ce qui concerne les polyphénols totaux, plusieurs recherches ont été focalisées sur la teneur en PPT des extraits de romarin, parmi ceux-ci on cite ; **Erkan et al. (2008)** qui ont trouvé une teneur en PPT de 162 mg EAG/g ES, **Kahouli. (2010)** qui a trouvé une teneur de 225 mg EAG/g ES, ces valeurs sont inférieures aux résultats de la présente étude. Par contre, ces teneurs sont supérieures à ceux obtenus par **Sissaoui et al. (2021)** en utilisant les mêmes méthodes d'extraction, ils ont trouvé des teneurs de 12, 13,71 et 11,84 mg EAG/g ES par macération, infusion et décoction respectivement. La teneur en PPT de MVS est de  $59,51 \pm 1,55$  mg EAG/g ES, ce résultat est très proche à celui de **Tsai et al. (2007)** qui ont trouvé une teneur de  $58,1 \pm 0,9$  mg EAG/g ES.

Les résultats de cette étude montrent que notre plante est très riche en flavonoïdes, ces données sont assez proches à ceux rapportés par **Megateli et Krea. (2018)** qui ont trouvé une teneur de  $14,48 \pm 1,5$  mg EQ/g et aux résultats de **Nagy et al. (2014)** qui ont trouvé une teneur de 13,25 mg EQ/g ES. Par contre, une faible teneur (4,32 mg EQ/g) a été obtenue par **Aljabri. (2020)**.

La variation de la teneur en composés phytochimiques peut être attribuée en grande partie aux différences d'espèces, de variétés, de conditions de croissance, de temps de récolte, de propriétés du sol, de climat, d'origine et de paramètres géographiques (**Ribeiro-Santos et al., 2015**).

Nos extraits sont des puissants antioxydants, les résultats obtenus dans cette étude confirme ceux obtenus par (**Hraš et al., 2000; Klančnik et al., 2009; Bubonja-Sonje et al., 2011; Bendif et al., 2017**). Ainsi, l'extrait obtenu par infusion semble le plus actif, contrairement aux résultats de **Haida et al. (2014)** où celui obtenu par décoction et le plus actif.

Le mécanisme d'action des antioxydants a été largement étudié, par exemple **Francisco José et al. (2020)** ont montré que les propriétés antioxydantes du romarin sont dues à sa richesse en huiles essentielles, qui agissent comme piègeuses des radicaux libres, et comme chélateurs des espèces réactives de l'oxygène (ROS). De plus, **Erkan et al. (2008)** ont indiqué que les composés phénoliques présents dans les extraits purs de romarin agissent comme antioxydants lorsqu'ils réagissent avec les radicaux libres pour les transformer en produits stables.

### Conclusion et perspectives

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant dans l'extraction et l'utilisation des antioxydants naturels. Nombreuses recherches ont été focalisés sur l'étude des composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes.

Notre travail repose sur le criblage phytochimique, le dosage des polyphénols totaux et les flavonoïdes ainsi que la détermination de l'activité antioxydante des extraits de *Rosmarinus officinalis* obtenus par 3 méthodes d'extraction : la macération, la décoction et l'infusion en comparaison avec MVS de la partie aérienne de cette plante.

D'après les résultats du criblage phytochimique, il s'est avéré que les extraits de *Rosmarinus officinalis* sont très riches en métabolites secondaires ; tanins, terpènes et phénols. L'analyse quantitative des extraits étudiés révèle l'abondance des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits.

La détermination de l'activité antioxydante effectué par les deux méthodes ; DPPH et FRAP a montré que les extraits possèdent un pouvoir antioxydant très important, toutefois, l'extrait obtenu par infusion a donné les meilleurs résultats dans la plupart des paramètres étudiés

En perspective ; dans le cadre de valoriser ces résultats, il est intéressant de :

- Mener une étude plus approfondie pour isoler, purifier, et identifier les molécules responsables de l'activité antioxydante.
- Étudier les mécanismes d'action des composés phénoliques impliqués dans l'activité antioxydante *in vivo*.
- Évaluer d'autre activités biologiques ; anti tumorale, anti cancéreuse, anti inflammatoire, antidiabétique, anticoagulante et autres.

## Références bibliographiques

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020).** Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12, 1.
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, & Mason, T.J. (2004)** Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*. 11: 261-265.
- Almela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J. A., Roca, M. J., & Rabe, V. (2006).** Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120, 221-229.
- Amjad, K. (2017).** « Role of Biotechnology in Alkaloids Production ». In *Catharanthus Roseus*, Cham: Springer International Publishing 5, 59-70.
- Amirzakariya, B. Z., & Shakeri, A. (2022).** Bioactive terpenoids derived from plant endophytic fungi: An updated review (2011–2020). *Phytochemistry* 113-130.
- Aljabri M. (2020).** Composition and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract. *Eurasian Journal of Biosciences* 14: 2179-2185.
- Arslan, D. & ozcan, M. (2007).** Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and colour characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management* 49, 1258-1264.
- Ashraf, M. A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., & Arif, M. S. (2018).** Environmental stress and secondary metabolites in plants: an overview. *Plant metabolites and regulation under environmental stress* 153-167.
- Ayoola G., Coker H., Adesegun S., Adepoju-Bello A., Obaweya K., Ezennia E., et & al (2008).** Phytochemical screening and anti-oxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in south-western Nigeria. *Trop J Pharm Res* 7,1019-1024.
- Aziz, E., Batool, R., Akhtar, W., Shahzad, T., Malik, A., Shah, M. A., ... & Thiruvengadam, M. (2021).** Rosemary species: A review of phytochemicals, bioactivities and industrial applications. *South African Journal of Botany* 18,21.
- Basaga, H., Tekkaya, C., & Acikel, F. (1997).** Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. *LWT-Food Science and Technology* 30, 105-108.

**Bendif, Hamdi, Boudjeniba, M. Miara, M. Biqiku, L. Bohui, G. S. P., Adima, A. A., Niamké, F. B., & N'Guessan, J. D. (2018).** Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales : *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie* 46, 50-58.

**Boucheloukh N & Kadja T. (2019).** Etude botanique et phytochimique de la plante médicinale *Rosmarinus officinalis L.* Mémoire de master en biotechnologie végétale, *Abdelhafid Boussouf University centre-Mila*, 114.

**Boussaid L, Aguedal H., Iddou A., & Bouras N. (2020).** « Aperçu sur les caractéristiques physicochimiques et biochimiques de trois sirops de dattes (Rob) élaborés traditionnellement dans la région d'Adrar (Algérie) ». *International Journal of Natural Resources and Environment* 2 ,8.

**Boylan, F., Menezes, S. & Leita, G. (2015).** Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*. 130, 127–130.

**Bramucci, M. Caprioli, G. Lupidi, G. (2017).** « *Rosmarinus Eriocalyx*: An Alternative to *Rosmarinus Officinalis* as a Source of Antioxidant Compounds ». *Food Chemistry* 218, 78-88.

**Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., & Abram, M. (2011).** Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry* 127, 1821-1827.

**Chedea, Veronica Sanda, & Raluca Maria Pop. (2019).** « Total Polyphenols Content and Antioxidant DPPH Assays on Biological Samples ». In *Polyphenols in Plants* 169- 83.

**Da Silva, Rodrigo F. da, Candice N. Carneiro, Cheila B. do C. de Sousa, Federico J. V. Gomez, Magdalena Espino, Joana Boiteux, María de los Á. Fernández, Maria F. Silva, et Fabio de S. Dias. (2022).** « Sustainable Extraction Bioactive Compounds Procedures in Medicinal Plants Based on the Principles of Green Analytical Chemistry: A Review ». *Microchemical Journal* 175 ,107-184.

**Doymaz I., Gorel O., Akgun N.A. (2004).** Drying characteristics of the solid by product of olive oil extraction. *Biosynthèse Engine* 88, 213-219.

**Dudonné, Stéphanie, Xavier V., Coutière P., Woillez M., & Mérillon. J. (2009).** « Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 1768-74.

**Erkan N., Ayranci G., & Ayranci E., (2008).** Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis L.*) extract, blackseed (*Nigella sativa L.*) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food chemistry* 110, 76-82.

**Ezziane,I et Senouci , F. (2019).** Etude des certaines activités biologiques de l'extrait de *Rosmarinus officinalis L.* Mémoire de master en Physiologie Cellulaire et Physiopathologie. Université Djilali BOUNAAMA de Khemis-Miliana 67.

**Getachew, S., Medhin, G., Asres, A., Abebe, G., & Ameni, G. (2022).** Traditional medicinal plants used in the treatment of tuberculosis in Ethiopia: *A systematic review.* *Heliyon*, e09478.

**Ghitescu, Roxana-Elena, Volf, I. Carausu, C. Bühlmann, A. Andrei Gilca, I & Valentin I. Popa. (2015).** « Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols from Spruce Wood Bark ». *Ultrasonics Sonochemistry* 22, 535- 41.

**González-Minero, F. J., Bravo-Díaz, L., & Ayala-Gómez, A. s. d. (2020).** « *Rosmarinus officinalis L.* (Rosemary): An Ancient Plant with Uses in Personal Healthcare and Cosmetics », *Cosmetics*, 7, 77.

**Gülçin I., Oktay M., Kireççi E., & Küfrevioğlu I. (2003).** Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinellaanisum L*) seed extracts. *Food chemistry* 83, 371-382.

**Gurbuz, B. Bahtiyarca Bagdat, R. Uyanik, M. & Kiarash Afshar, P. (2016).** « Rosemary (*Rosmarinus Officinalis L.*) Cultivation Studies under Ankara Ecological Conditions ». *Industrial Crops and Products* 88, 12- 16.

**Haida, S. Kribii, A. Habsaouin,A. Ounine, K. & Kribii, A. (2014).** « Evaluation du pouvoir antioxydant et antibactérien des extraits du romarin du Gharb » 18.

**Hamed, Azadeh, Bayat, M., Asemani, Y., & Amirghofran, Z. (2022).** « A Review of Potential Anti-Cancer Properties of Some Selected Medicinal Plants Grown in Iran ». *Journal of Herbal Medicine* 33, 100557.

**Hamia, C., Guergab A., Rennane N., Birache M., Haddad M., Saidi. M, e& Yousfi M. (2014).** « Influence des Solvants sur le Contenu en Composés Phénoliques et l'Activité Antioxydante des Extraits du *Rhanterium Adpressium* » 1, 39-33.

**Herbert, Richard B. (2003).** « The Biosynthesis of Plant Alkaloids and Nitrogenous Microbial Metabolites This Review and Those That Preceded It Are Dedicated to My Three Teachers Who Were Each a Marvellous Scientific Inspiration: F. G. Holliman, A. R. Battersby and G. Stork. They Were the Giants onto Whose Shoulders I Was Privileged to Climb. » *Natural Product Reports* 20, 494.

**Hraš, A. R., Hadolin, M., Knez, Ž., & Bauman, D. (2000).** Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food chemistry* 71, 229-233.

**Huang, M., Lu, J. J., Huang, M. Q., Bao, J. L., Chen, X. P., & Wang, Y. T. (2012).** Terpenoids: natural products for cancer therapy. *Expert opinion on investigational drugs* 21, 1801-1818.

**Kahouli, I. (2010).** Effet antioxydant d'extraits de plantes (*Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, *Oléa Europea* L.) dans l'huile de canola chauffée. *Mémoire de master, Université Laval, Québec Canada* 111.

**Klančnik, A., Guzej, B., Kolar, M. H., Abramovič, H., & MOŽINA, S. S. (2009).** In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection* 72, 1744-1752.

**Kunwar, A., & Priyadarsini, K. I. (2011).** Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical & Allied Sciences, 1.*

**Lehout, R & LAIB, M. (2015).** Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes à partir de la plante médicinale : *Artemisia herba alba* sso. Mémoire de master en *Biochimie moléculaire et santé. Algérie : Université de Frère Menturi Constantine* 71..

**Lezoul, N. E. H., Belkadi, M., Habibi, F., & Guillén, F. (2020).** Extraction processes with several solvents on total bioactive compounds in different organs of three medicinal plants. *Molecules*, 25, 4672.

**Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Abete, P. (2018).** Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 13, 757.

**Lister, E., & Wilson, P. (2001).** Measurement of total phenolics and ABTS assay for antioxidant activity (personal communication). *Lincoln, New Zealand : Crop Research Institute.* 7, 235-239.

**Liu, J., Wang, X., Dai, G., Zhang, Y., & Bian, X. (2022).** Microbial chassis engineering drives heterologous production of complex secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 107966.

**Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C. C., Kandaswamy, E., Zhou, T., & Zuo, L. (2018).** Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Frontiers in physiology*, 9, 477.

**Lobo, V, A Patil, A Phatak, et N Chandra. (2010).** « Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health ». *Pharmacognosy Reviews* 4, 118.

- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013).** Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10.
- Ludwiczuk, A., K. Skalicka-Woźniak, et M.I. Georgiev. (2017).** « Terpenoids ». In *Pharmacognosy*, 233- 66.
- Lushchak, Volodymyr I. (2014).** « Free Radicals, Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress and Its Classification ». *Chemico-Biological Interactions* 224 (décembre): 164- 75.
- Megateli, S., & Krea, M. (2018).** Enhancement of total phenolic and flavonoids extraction from *Rosmarinus officinalis* L using electromagnetic induction heating (EMIH) process. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 24, 889-897.
- Mwithiga, G., Maina, S., Gitari, J., & Muturi, P. (2022).** Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) growth rate, oil yield and oil quality under differing soil amendments. *Heliyon*, 8(4), e09277.
- Nagy, M., Tofana, M. A., Socaci, S., Pop, A. V., Bors, M. D., Farcas, A., & Moldovan, O. (2014).** Total phenolic, flavonoids and antioxidant capacity of some medicinal and aromatic plants. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 71, 209-210
- Nieto, G., Ros, G., & Castillo, J. (2018).** Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A review. *Medicines*, 5, 98.
- Paduch, R., Kandefers-Szerszeń, M., Trytek, M., & Fiedurek, J. (2007).** Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 55, 315-327.
- Pandey. Bhooshan, K. & Rizvi, S. (2009).** « Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2, 270- 78.
- Popovici, Cristina, Ilonka S, et Bartek T. (2009).** « Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH », *Revue de génie industriel*, 4.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000).** Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 3396– 3402
- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M. & Trotin, F. (2000).** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology*, 72(1-2), 35-42.
- Quideau, Stéphane. (2013).** « Plant Polyphenols ». In *ELS*, édité par John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

**Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011).** Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 586-621.

**Ranjbar Nedamani, E., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., & Kashaninejad, M. (2015).** Evaluation of antioxidant interactions in combined extracts of green tea (*Camellia sinensis*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and oak fruit (*Quercus branti*). *Journal of food science and technology*, 52,4565-4571.

**Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K., & Yadav, U. C. (2016).** Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life sciences*, 148, 183-193.

**Ribeiro-Santos, R., Carvalho-Costa, D., Cavaleiro, C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Castilho, M. C., ... & Sanches-Silva, A. (2015).** A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science & Technology*, 45, 355-368.

**Rili, C & korichi, N. (2017).** Propriétés antioxydantes des extraits d'une plante médicinale (*Rosmarinus officinalis*). *Mémoire de master en biochimie appliqué. Université A. MIRA – Bejaia*. 32.

**Rizzo, A. M., Berselli, P., Zava, S., Montorfano, G., Negroni, M., Corsetto, P., & Berra, B. (2010).** Endogenous antioxidants and radical scavengers. *In Bio-farms for nutraceuticals*. 52-67.

**Springer, Boston, MA.Santos, R. D., Shetty, K., Cecchini, A. L., & da Silva Miglioranza, L. H. (2012).** Phenolic compounds and total antioxidant activity determination in rosemary and oregano extracts and its use in cheese spread. *Semina: Ciências Agrárias*, 33, 655-666.

**Seca, A. & Diana. (2018).** « Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 : 263.

**Sissaoui R, Bounab, A & Chebbah, M,(2021).** Etude phytochimique et l'activité biologique de quatre plantes algériennes. 2021. Mémoire de master en chimie pharmaceutique, Université de Larbi Ben M'hidi-Oum Oum El Bouaghi, : 113.

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

**Vauzour, D. (2014).** « Polyphénols et neuroprotection : où en sommes-nous aujourd'hui ? » *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 49 , 181- 87.

**Zeroual A, El Hassan S, Mahjoubi F, Chaouch M, Chaqroune A, & Taleb M. (2021).** « Effects of Extraction Technique and Solvent on Phytochemicals, Antioxidant, and

Antimicrobial Activities of Cultivated and Wild Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) from Taounate Region (Northern Morocco) ». *Biointerface Research in Applied Chemistry* 12, 8441- 52.

**Ziegler, Jörg, et Peter J. Facchini. (2008).** « Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking ». *Annual Review of Plant Biology* 59, 735- 69.



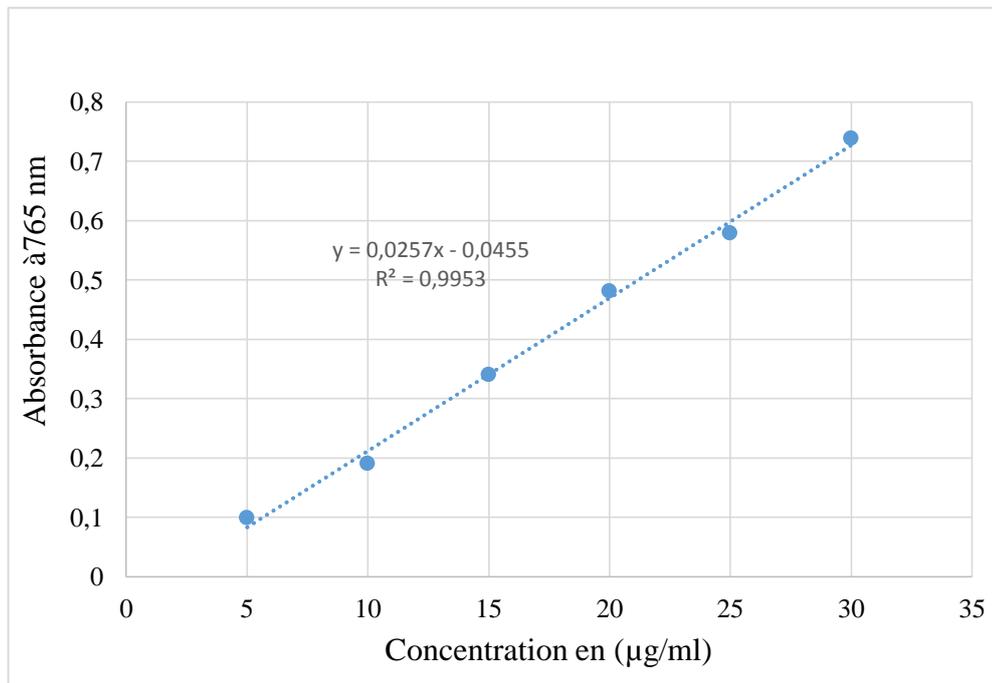
**Annexe 01** : Séchage de *Rosmarinus Officinalis*



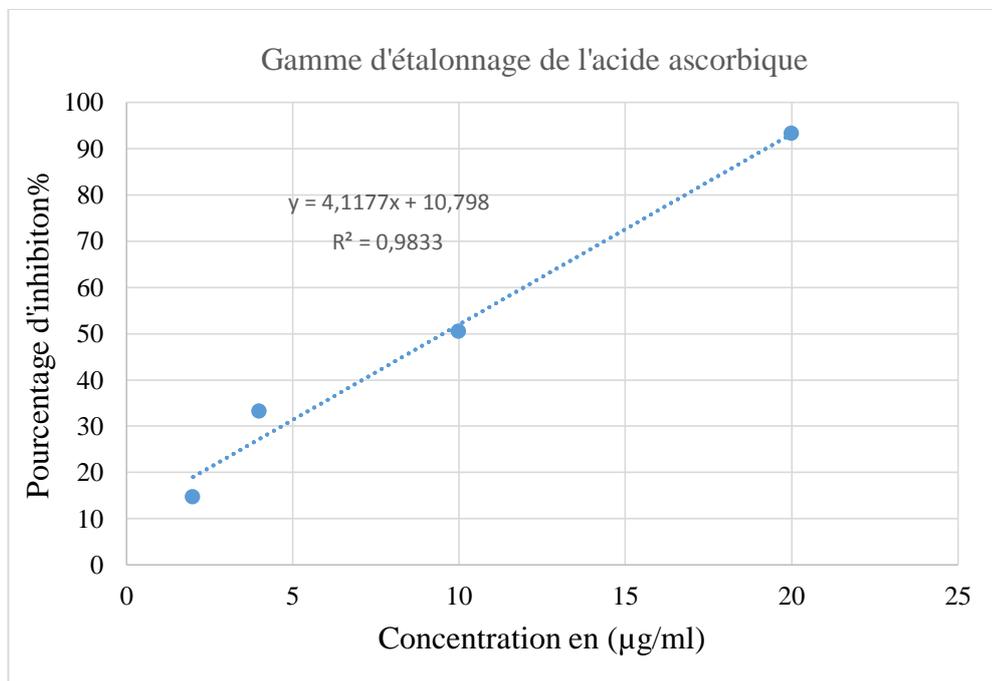
**Annexe 02** : Broyage et tamisage de *Rosmarinus Officinalis*



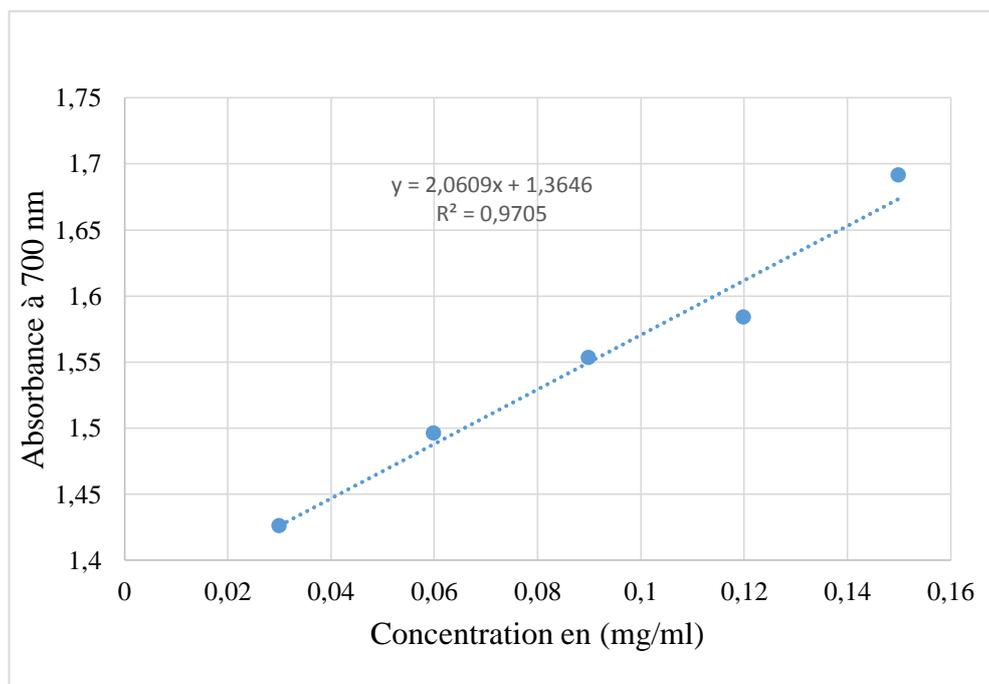
**Annexe 03** : Détermination des cendres



**Annexe 04** : Courbe d'étalonnage de la quercétine



**Annexe 05** : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique



**Annexe 06** : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

## ملخص

إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) هو نبتة تنتمي لعائلة الشفويات جد منتشرة في مناطق البحر الأبيض المتوسط ويعتبر من أشهر النباتات في الجزائر. الهدف من هذه الدراسة هو تسليط الضوء من خلال الفحص الكيميائي النباتي لوجود التانينات والفينولات والتريبينات، لتحديد إجمالي البوليفينول والفلافونويدات الموجودة في الجزء الهوائي من هذا النبات، وبالتالي، لتحديد نشاط مضادات الأكسدة بواسطة (DPPH) و (FRAP) من المادة النباتية المجففة من إكليل الجبل والمستخلصات الهيدروكحولية التي تم الحصول عليها من خلال ثلاث طرق استخلاص (النقع، التسريب، المغلي) من نفس النبات. أفضل مردود تم الحصول عليه عن طريق النقع. أظهر الفحص الكيميائي النباتي الذي تم إجراؤه على مستخلصات النبات وجود المواد الكيميائية النباتية. تم الحصول على أعلى محتوى من مجموع البوليفينول والفلافونويد في المستخلصات الهيدروكحولية مقارنة بالمادة النباتية المجففة من إكليل الجبل. أظهرت دراسة القدرة المضادة للأكسدة لمستخلصات (*Rosmarinus officinalis*) المختلفة أن جميع المستخلصات الهيدروكحولية لها خصائص مضادة للأكسدة كبيرة مقارنة بالمادة النباتية المجففة من إكليل الجبل. **الكلمات المفتاحية:** إكليل الجبل، طرق الاستخلاص، الفلافونويد، البوليفينول، DPPH، FRAP، القدرة المضادة للأكسدة.

## Résumé

Le Romarin, (*Rosmarinus officinalis*) c'est une plante qui appartient à la famille des Lamiacée, très répandu dans les régions méditerranéennes et considérée parmi les plantes les plus populaires en Algérie.

L'objectif de cette étude est de mise en évidence à partir d'un criblage phytochimique la présence des tanins, des phénols et des terpènes, de quantifier les polyphénols totaux et les flavonoïdes contenus dans la partie aérienne de cette plante, ainsi, de déterminer l'activité antioxydante par DPPH et FRAP de la matière végétale sèche de *Rosmarinus officinalis* (MVS) et les extraits hydroalcooliques obtenus par trois méthodes d'extraction (macération, infusion et décoction) de la même plante.

Le meilleur rendement d'extraction est obtenu par macération. Le criblage phytochimique réalisé sur les extraits de *Rosmarinus officinalis* a montré la présence des phytonutriments. La teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes la plus élevée a été obtenue dans les extraits hydroalcooliques par rapport à MVS. L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits de *Rosmarinus officinalis* a montré que tous les extraits hydroalcooliques présentent d'importantes propriétés antioxydantes par rapport à MVS.

**Mots clés :** *Rosmarinus officinalis*, méthodes d'extraction, DPPH, FRAP, activité antioxydante, flavonoïdes, polyphénols.

## Abstract

Rosemary, *Rosmarinus officinalis* is a plant belongs to the Lamiaceae family, widespread in the Mediterranean regions and considered among the most popular plants in Algeria.

The objective of this study is to highlight from a phytochemical screening the presence of tannins, phenols and terpenes, to quantify the total polyphenols and flavonoids contained in the aerial part of this plant, as well as to determine the antioxidant activity by DPPH and FRAP of dried plant material of rosemary and the hydroalcoholic extracts obtained by three extraction methods (maceration, infusion and decoction) of the same plant.

The best extraction yield was obtained by maceration. Phytochemical screening performed on *Rosmarinus officinalis* extracts showed the presence of phytonutrients. The highest content of total polyphenols and flavonoids was obtained in the hydroalcoholic extracts compared to dried plant material of rosemary. The study of the antioxidant activity of the different *Rosmarinus* extracts showed that all the hydroalcoholic extracts showed significant antioxidant properties compared to the dried plant material of rosemary.

**Keywords:** *Rosmarinus officinalis*, extraction methods, DPPH, FRAP, total polyphenols, Flavonoids, antioxidant activity

