



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR –EL-OUED

FACULTE DE LA TECHNOLOGIE

Mémoire de Fin d'Étude

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de:

MASTER ACADEMIQUE

Domaine: Technologie

Filière: Génie des procédés

Spécialité: Génie chimique

Présenté par:

BELLOUL Karima & CHOUIREF Messaouda

THEME

Etude de l'activité antioxydante d'une plante
médicinale (le romarin)

Soutenue le: 25 Mai 2016

M ^{me} MENACEUR Souhaila	Présidente	MAA	U. EL OUED
M ^r LAOUINI Salah Eddine	Examineur	MCB	U. EL OUED
M ^{me} BOUBEKRI Chérifa	Encadreur	MCA	U. EL OUED

2015/2016

REMERCIEMENS



Remerciements

*Avant tout, nous remercions le **BON DIEU** Tout Puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail.*

*Ce travail à été réalisé au sein du Laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes de l'université d'El-Oued, sous la direction de Monsieur **LANEZ Touhami**, Professeur à l'université d'El-Oued et directeur du laboratoire que nous tenons à le remercier profondément.*

*Nos vifs remerciements et notre profonde gratitude s'adressent à notre enseignante et encadreur **M^{me} BOUBEKRI Chérifa** pour sa disponibilité, son sérieux et ses conseils judicieux,*

*Nos remerciements vont également aux membres de jury **Mr LAOUINI Salah Eddine** et **Mme MENACEUR Souhaila** pour avoir accepté d'examiner ces travaux de recherche.*

*Nous voudrions exprimer nos sincères reconnaissances à **Mr REBLAI Abdelkerim** pour son aide et ses conseils.*

*Nos vifs remerciements et notre profonde gratitude s'adressent à **M^{lle} BERRA Djamila** et **M^{lle} HEMMAMI Hadia** qui nous ont accompagné au début de cette recherche, pour leur attention de tout instant sur nos travaux, pour leurs conseils avisés et leur écoute qui étaient prépondérants pour la bonne réussite de ce travail.*

Sans oublier tous les ingénieurs du Laboratoire pédagogique.

Enfin, nous remercions toute personne qui a participé de près ou de loin, de façon directe ou indirecte, à la réussite de ce travail pour lequel nous avons tant consacré en y mettant aussi tout notre cœur

Karima & Messaouda



RÉSUMÉ ملخص



Résumé:

Notre travail porte sur l'étude de l'activité antioxydante d'une plante médicinale qui est le romarin, étudiée dans les deux états frais et séché, nous avons étudié deux échantillons l'une de la région de Guemar et l'autre cultivé dans notre université d'El-Oued.

Nous avons tout d'abord procédé aux dosages colorimétriques, le test de Folin-Ciocalteu pour quantifier les polyphénols totaux, la quantification a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis, Le screening a mis en évidence la présence de polyphénols. La quantification des flavonoïdes totaux a été effectuée par une méthode adaptée avec le trichlorure d'aluminium et la soude. Une analyse qualitative par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), a révélé la présence l'acide gallique, acide ascorbique, vanilline, acide chlorogénique ...dans la majorité des extraits testés.

Les résultats de ces travaux nous ont permis d'affirmer que les extraits des échantillons séchés ont été les plus actifs et montrent une activité antioxydante intéressante par rapport aux échantillons frais.

Mots clés: Romarin, polyphénols totaux, flavonoïdes totaux, activité antioxydante.

ملخص:

يرتكز هذا العمل حول دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لنبته طبية و هي الاكليل . قمنا بدراسة الحالتين الحالة الطازجة و الحالة الجافة. تمت الدراسة لعينتين بمنطقة الوادي أحدها مغروسة بمنطقة قمار و الأخرى جامعة الوادي.

قمنا اولاً بإجراء تقدير كمي بواسطة اختبار فولين- سيوكالتو بالاستعانة بجهاز المطيافية للأشعة فوق البنفسجية و المرئية وكشفت النتائج عن وجود عن وجود البوليفينولات. التقدير الكمي للفلافونويدات الكلية تم بطريقة استعمل فيها ثلاثي كلور الألمنيوم و الصودا. دراسة تحليلية بواسطة كروماتوغرافيا عالية الاداء HPLC كشفت عن وجود حمض الغاليك ,حمض الاسكوربيك ,الفانيلين وحمض الكلوروجينيك ...في معظم المستخلصات المختبرة .

أكدت لنا نتائج هذه الأبحاث بأن مستخلصات الاكليل المجفف هي المستخلصات الأكثر فعالية و هي تمثل الفعالية المضادة للأكسدة الأهم مقارنة بالعينة الطازجة.

الكلمات الدالة : إكليل الجبل، البوليفينولات الكلية، الفلافونيدات الكلية، الفعالية المضادة للأكسدة.

Liste des abreviations

Abréviation	Désignation
BHA	Tertiobutyl hydroxyanisole
BHT	Tertiobutyl hydrox toluène
CAT	Capacité anioxydante totale
DPPH	1,1- diphenyl-2-pierylhydrazyl
GAE	Acide gallique équivalente
HPLC	Chromatographie liquide de haute performance
RE	Rutine équivalente
UV- visible	Spectrophotométrie ultra violet
RGF	Romarin Guemar Frais
RUF	Romarin universite el-oued Frais
RUS	Romarin universite el-oued sec
RGS	Romarin Guemar sec
IC₅₀	Concentration équivalente à 50% de DPPH perdu.

Liste des figures

Chapitre I : Généralités

Figure (I.1): Rosmarinus officinalis L..... 7

Figure (II. 2): La fleur de Rosmarinus officinalis L..... 8

Chapitre II : Les polyphénols et l'activité antioxydante

Figure (II. 1) : Les dérivés de l'acide p-hydroxybenzoïque..... 16

Figure (II.2): Les acides hydroxycinnamiques..... 16

Figure (II.3) : Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes..... 17

Figure (II.4): Principaux types de coumarines..... 18

Figure (II.5): Structure de base des flavonoïde..... 18

Figure(II.6): Structures des différentes classes des flavonoïdes..... 19

Figure (II.7): Exemple de Structure de Tanins hydrolysables..... 20

Figure (II.8): Exemple de Structure de Tanins condensés..... 21

Figure (II.9): Formes mésomères du Phénol..... 21

Figure (II.10): Quelques antioxydants de synthèse..... 26

Chapitre III : Matériels et Méthodes

Figure(III.1):les photos des des parties aériennes de Romarin..... 34

Figure (III.2): Protocole de préparation des extraits..... 35

Figure (III.3): La spectrophotométrie UV-visible..... 36

Figure (III.4): Chromatographie en phase liquide à haute performance..... 39

Figure (III.5): Réduction du radical libre DPPH..... 40

Chapitre IV : Résultats et discussion

Figure (IV.1): Courbe d'étalonnage de l'acide Gallique (polyphénols)..... 46

Figure (IV.2): Courbe d'étalonnage de rutine (flavonoïde)..... 47

Figure (IV.3): Composition en composés phénoliques des différents extraits... 48

Figure (IV. 4): chromatogramme du mélange des etalons..... 49

Figure (IV. 5): chromatogramme d'extraits du RGF..... 51

Figure (IV. 6): chromatogramme d'extraits du RUF..... 51

Figure (IV. 7): chromatogramme d'extraits du RGS..... 53

Figure (IV. 8): Chromatogramme d'extrait du RUS..... 53

Figure (IV.9): Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique..... 55

Figure (IV. 10): comparaison entre CAT de différentes extrais..... 56

Figure (IV.11):comparaison entre IC₅₀ de différentes extrais..... 57

Liste des Tableaux

Chapitre I : Généralités

Tableau (I.1): La classification Systématique.....	6
Tableau (I.2): La classification Systématique de genre Rosmarinus	7
Tableau(I.3): Variations de la composition chimique (composé majoritaire) de l'huile essentielle de Romarin.....	10

Chapitre III : Matériels et Méthodes

Tableau(III.1): Codification des échantillons.....	34
---	-----------

Chapitre IV : Résultats et discussion

Tableau (IV .1): Les rendements des extraits bruts.....	45
Tableau (IV.2): Teneurs des polyphénols totaux des extraits.....	47
Tableau (IV.3): Teneurs des flavonoïdes totaux des extraits.....	48
Tableau (IV.4): Composés phénoliques identifiés dans les étalons.....	50
Tableau (IV. 5): Composés phénoliques identifiés dans les extraits de romarin frais.....	52
Tableau (IV. 6): Composés phénoliques identifiés dans les extraits de romarin sec.....	54
Tableau (IV.7) : Les valeurs des capacités anioxydantes totales des extraits....	55
Tableau (IV.8): Valeurs des IC50 du DPPH pour les extraits.....	56

TABLE DES MATIÈRES



Sommaire

	Page
Introduction.....	2
Références bibliographiques	4
1^{ère} partie : bibliographique	
Chapitre I : Généralités	
I. Famille des Lamiacées.....	6
I.1. Généralités.....	6
I.2. systématique.....	6
I.3. Genre Rosmarinus.....	6
I.3.1. Origine du nom Rosmarinus officinalis L.....	7
I.3.2. systématique.....	7
I.3.3. Présentation géographique.....	8
I.3.4. Caractéristiques botaniques.....	8
I.3.5. Récolte.....	9
I.3.6. Répartition géographique.....	9
I.3.7. Composition chimique.....	9
a) Huile essentielle.....	9
b) Acides phénoliques.....	10
c) Flavonoïdes.....	10
I.3.8. Domaines d'application et intérêt en phytothérapie.....	10
❖ Médicinal.....	10
❖ Alimentation.....	11
Références bibliographiques.....	12
Chapitre II : polyphénols et activité antioxydante	
II.1 Composés phénoliques.....	15
II.1.1. Introduction.....	15
II.1.2. Localisation.....	15
II.1.3. Classification des polyphénols.....	15
II.1.3.1. Non flavonoïdes.....	15
II.1.3.1.1. Acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3).....	15
II.1.3.1.2. Stilbènes C6-C2-C6.....	17
II.1.3.1.3. Coumarines.....	17

II.1.3.2. Les flavonoïdes.....	18
II.1.3.2.1. Classification des flavonoïdes.....	19
II.1.3.3. Les tanins	20
II.1.3.3.1. Les tanins hydrolysables	20
II.1.3.3.2. Tanins condensés.....	20
II.1.4. Propriétés chimiques des polyphénols.....	21
II.1.5. Rôle des polyphénols dans les plantes	22
II.1.6. Importance nutritionnelle des polyphénols	22
II.1.7. Activité antioxydante des polyphénols.....	22
II.1.8 Définition d'un radical libre.....	23
II.2. Les antioxydants.....	24
II.2.1. Définition d'un antioxydant	24
II.2.2. Classification des antioxydants	25
II.2.2.1. Les antioxydants synthétiques.....	25
❖ Le Butylhydroxyanisole (BHA)	25
❖ Le Butylhydroxytoluène (BHT)	25
II.2.2.2. Les antioxydants naturels.....	26
a) <i>Les vitamines</i>	27
❖ la vitamine C ou l'acide ascorbique	27
❖ La vitamine E ou tocophérol.....	27
b) <i>Les éléments minéraux</i>	27
❖ Le Fer.....	27
❖ Le zinc.....	27
Références bibliographiques.....	28

2^{ème} partie : Partie expérimentale

Chapitre III : Matériel et méthodes

III- Matériels et méthodes.....	32
III.1. Matériel.....	32
III.1.1. Matériels du laboratoire.....	32
a) Appareillage.....	32
b) les logiciels.....	33
c) Réactifs chimiques	33
III.1.2. Matériel végétal.....	34

III.1.3. Extraction du matériel végétal.....	34
III.2. Méthodes.....	36
III.2.1. Les méthodes spectrophotométrique	36
✚ <i>Definition</i>	36
III.2.2. Dosage des composés phénoliques.....	36
III.2.2.1. Analyse qualitative.....	36
✓ Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	36
✓ Dosage des flavonoïdes totaux (FVT).....	37
III.2.2.2. Analyse quantitative.....	37
III.2.2.2.1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	37
III.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extrais.....	39
III.2.4.1. Test du 2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH')	39
III.2.4.2. Test d'évaluation de l'activité antioxydante totale (CAT).....	41
Références bibliographiques.....	42
Chapitre IV: Résultats et discussion	
IV. Résultats et discussion.....	45
IV.1. Rendement d'extraction.....	45
IV.2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)....	45
IV.2.1. Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	45
IV.2.2 Teneur en polyphénols totaux.....	46
IV.2.3. Dosage des flavonoïde totaux (FVT)	47
IV.2.4. Composition chimique des différents extraits (polyphénols totaux, flavonoïdes totaux).....	48
IV.3. Technique d'analyse chromatographique HPLC.....	49
IV.3.1. Chromatogrammes des étalons.....	49
IV.3.2. Chromatogrammes HPLC des extraits.....	50
✓ Extraits frais.....	50
✓ Extraits séché.....	52
IV.4. Evaluation de l'activité antioxydante.....	54
IV.4.1. Méthode de la capacité anioxydante totale (CAT).....	54
IV.4. 2. Test du 2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH').....	56
Références bibliographiques.....	58
Conclusion	60

INTRODUCTION GÉNÉRALE



Introduction générale

Depuis des milliers d'années, l'homme a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies [1].

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments [2].

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vivo* et *in vitro* des tissus végétaux. Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique [3]. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives [4].

Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les lignanes, les terpènes et les flavonoïdes .

En Algérie pays très riche de sa biodiversité florale, la médecine traditionnelle y a sa place mais on ne voit pas cette complémentarité de la phytothérapie à la médecine. Botanistes, phytochimistes, pharmacologues et médecins sont appelés à conjuguer leurs connaissances scientifiques pour que la phytothérapie soit une discipline thérapeutique officielle comme c'est le cas dans plusieurs pays (Chine, Turquie, etc...) [5].

Le romarin (*Rosmarinus Officinalis* L.) a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires. C'est une herbe aromatique de la famille des *Labiées*, appréciée pour ses propriétés aromatiques, antioxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques et anti-tumorales, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle... [6]

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était de mettre en évidence l'activité antioxydante du *Rosmarinus officinalis* de deux échantillons (celle de la région de Guemar et l'autre cultivée dans notre université).

Notre travail a été divisé en quatre chapitres, dans le premier chapitre nous avons effectué une présentation botanique de la famille des lamiacées et l'espèce *Rosmarinus officinalis*, sa localisation géographique dans le monde, et son utilisation.

Le deuxième chapitre était consacré aux Polyphénols à l'activité antioxydante.

Dans la troisième chapitre, on a cité la méthode d'extraction des échantillons du romarin étudiés, leurs rendements d'extraction, leurs teneurs en polyphénols totaux, ainsi que l'évaluation des activités antioxydantes totales, par la méthode du test DPPH et la méthode CAT.

Enfin, dans le quatrième chapitre, nous avons rapporté les résultats obtenus entre autre les Rendements, les teneurs des composés phénoliques et l'étude de l'activité antioxydante des extraits des différentes échantillons.

Références bibliographique

- [1] Lhuillier, A. (2007),"Contribution a 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. Toulouse
- [2] Maurice, N. (1997)," L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle".Ed. Lavoisier, Paris, p. 12-14.
- [3] Boizot, N., Charpentier, J.P. (2006)," Méthode rapide d'évaluation du contenu en Composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour D'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques." *INRA*, 79-82.
- [4] BERRA, D. (2015), "Etude de l'effet du milieu d'extraction sur la composition des feuilles de *Matricaria Pubescens*". Thèse de masters, UNIVERSITÉ ECHAHID HAMMA LAKHDAR EL OUED, p1.
- [5] KABOUCHE, A. (2005)," Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae". Thèse Doctorat, UNIVERSITE MENTOURI-Constantine, p2.
- [6] Madjour, S. (2014)" Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée *rosmarinus officinalis*". these de Master Université Med Khider Biskra, p1.

BIBLIOGRAPHIE



I. GÉNÉRALITÉS



I. Famille des Lamiacées

I.1. Généralités

La famille des lamiacées connue également sous le nom des labiées, comporte environ 258 genres pour 6900 espèces plus ou moins cosmopolites; mais dont la plupart se concentrent dans le bassin méditerranéen tel que le thym, la lavande et le romarin Elle est divisée en deux principales sous-familles: les Stachyoideae et les Ocimoideae.

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. Entre autres, un grand nombre de genres de la famille des Lamiaceae sont des sources de terpénoïdes, flavonoïdes et iridiodes glycosylés [1] .

I.2 .Systématique

Tableau (I.1): Classification systématique [2].

Règne	Plantae
Sous règne	Cormophytes
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Série	super ovaire : Tétracyclique
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées

I.3. Genre Rosmarinus

Le genre Rosmarinus regroupe deux espèces de plantes de la famille des Lamiacées originaires du bassin méditerranéen: le Rosmarinus eriocalyx Jordan & Fourn. et le Rosmarinus officinalis L [3].

I.3.1. Origine du nom *Rosmarinus officinalis* L.

Le nom latin *rosmarinus* est habituellement interprété, comme dérivé "ros" de la rosée et "marinus" d'appartenir à la mer, bien qu'elle se développe habituellement loin de la mer. On a affirmé que cette interprétation est un produit d'étymologie traditionnelle, mais probablement le nom original est dérivé du grec "rhops" arbuste et "myron" baume [4].

Nom vernaculaire: La dénomination se diffère d'une région à l'autre: par exemple l'espèce Romarin est appelé en Maroc yazir (يزير) [5] et *iklil al jabal* (اكليل الجبل) ou lazir (لزير) en Algérie [6].

I.3.2. Systématique

Tableau (I.2): Classification systématique du genre *Rosmarinus* [7].

Règne	Plantae
Division	Magnoliopta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i>
Nom Arabe	<i>Ikilil Al Jabal</i>
Nom Français	Romarin
Nom Anglais	Rosmary



Figure (I .1): *Rosmarinus officinalis* L [1].

I.3.3. Présentation géographique

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*), appelé encensier, est une herbe aux couronnes ou romarin des troubadours, propre aux régions méditerranéennes. Il habite les garrigues sur sol calcaire où il forme de grands massifs. Il est aussi cultivé en tant qu'herbe condimentaire, plante mellifère, plante phytothérapeutique ainsi que pour la parfumerie.

Comme de nombreuses labiées, le romarin est originaire du bassin méditerranéen où il est cultivé dès l'antiquité, plus pour son odeur que pour ses vertus médicinales. Les régions de la méditerranée représentent une zone principale d'existence des différents types de romarin; cette plante occupe de vastes superficies du nord de l'Afrique et du sud de l'Europe en plus de la Russie et la Roumanie.

Les pays producteurs de cette catégorie de plante sont: l'Espagne, la France, l'Algérie, la Tunisie, le Maroc, l'Amérique du Nord, le Portugal, la Yougoslavie et l'Egypte.

Cette plante peut supporter les températures basses quand il neige et dure pour longtemps, elle résiste aux hauts degrés de salinité surtout quand elle passe près des régions littorales [3].

I.3.4. Caractéristiques botaniques:

Cette plante appartient à la famille des Lamiaceae ou Labiées. Elle se présente sous forme d'arbuste, sous arbrisseau ou herbacée [8], mesurant environ de 0.8 à 2m de hauteur. Les feuilles sont étroitement lancéolées linéaires, friables et coriaces, les fleurs d'un bleu pâle, maculées intérieurement de violet sont disposées en courtes grappes denses s'épanouissent presque tout au long de l'année [9].



Figure (I .2): La fleur de *Rosmarinus officinalis* L [5].

I.3.5. Récolte:

Le romarin fleurit de janvier jusqu'à l'automne, c'est presque toute l'année que l'on peut en faire la cueillette, toutefois la meilleure époque en vue de la distillation s'étend de mai à septembre, la parfumerie demande toute la plante fleurie, coupée par un temps chaud et sec [10].

I.3.6. Répartition géographique:

Originnaire des régions méditerranéennes, le romarin pousse spontanément dans le sud de l'Europe. On le cultive dans le monde entier à partir de semi ou de boutures au printemps. Il apprécie les climats chauds ou modérément secs [11].

En Algérie cette plante est bien apparente en différente région. En Oranie elle est souvent cultivée comme plante d'ornement, cette plante est retrouvée dans la steppe a Sid Djilali dans la région de Sid El Makhfi, ainsi on peut la voir dans le littoral à Béni Saf dans la zone de Sid Safi [12].

I.3.7. Composition chimique

a) Huile essentielle:

Le composé majoritaire de l'huile essentielle du Romarin varie d'une région à l'autre (**tableau I.3**). On trouve le 1, 8-cinéole, le camphre, le pinène, le linalool, le limonène.

Tableau (I.3): Variation de la composition chimique (composé majoritaire) d'huile essentielle du romarin [13].

Composé majoritaire	%	Origine
α -pinène	23,1	Algérie (Tlemcen)
Camphre	14,5	
β -pinène	12,2	
α -pinène	14,9	Iran (Tehran)
Linalool	14,9	
Pipéritone	23,7	
α -pinène	10,2	Turquie (Izmir)
1,8-cinéole	61,4	
α -pinène	11,4	Maroc
1,8-cinéole	50,2	
Camphre	9,1	
α -pinène	13,5	Serbie (Vojvodina)
Limonène	21,7	
Camphre	21,6	

b) Acides phénoliques:

Le romarin contient les acides phénoliques dont les plus importants sont : acide rosmarinique [14], acide vanillique, acide caféique et acide p-coumarique [15].

c) Flavonoïdes:

Les flavonoïdes qui ont été identifiés dans cette plante sont: genkwanine, cirsimarine ériocitrine, hespéridine, diosmine et lutéoline [15].

I.3.8. Domaines d'application et intérêt en phytothérapie:

❖ **Médicinal**

Le romarin est une plante aromatique et médicinale largement répandue. elle est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter différentes maladies comme: le cancer, le diabète, les problèmes respiratoires, problèmes de l'estomac et les maladies inflammatoires.

Comme beaucoup de Lamiaceae, le romarin est censé agir sur le système nerveux comme stimulant: il semblerait même qu'il affermisse la mémoire défaillante et qu'il remonte le moral des déprimés [16].

La drogue est utilisée en compresse pour la cicatrisation de l'eczéma, d'une façon générale, elle est utilisée comme insecticide. On utilise largement les vertus du romarin que ce soit en usage externe (antiseptique, cicatrisant) ou interne (tonique, cholérique et cholagogue).

❖ **Alimentation**

L'utilisation du romarin en tant qu'aromate se fait sous plusieurs formes et plusieurs conditions:

Séché: les feuilles sont utilisées pour accompagner la viande et les poissons grillés; et les bouquets garnis aromatisent les sauces tomates ou les ragouts.

Frais: le romarin entre dans la composition des vinaigres, sa forte teneur en bornéol lui confère de puissantes propriétés antiseptiques qui font de lui un bactéricide.

En conserverie et aussi en agroalimentaire, il est utilisé comme conservateur pour les viandes et les graisses. L'huile essentielle du romarin possède plusieurs activités, antimicrobiennes [11].

Références bibliographiques

- [1] Guinochet, T. (1973), *Phytosociologie*, Ed. Masson, France, p227.
- [2] Ouibrahim, A. (2015), "Evaluation 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 (LMD), p5.
- [4] Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M. (2006), "Ethnobotany and Ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences". *J Ethnopharmacol.* **107**: 157-160.
- [5] Riyaha, H. (2013), "Valorisation des plantes aromatiques et médicinales: étude du potentiel chimique et antibactérien des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* (sauvage et domestiqué)." These master UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH, p14.
- [6] Belkhiri, F. Z. (2015), "Etude de l'activité antibactérienne des huiles Essentielles de *Rosmarinus officinalis* L." these de Master Université Mohamed Khider – Biskra, p21.
- [7] Zeghad, N. (2009), "Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne." THÈSE de magister, Université Mentouri Constantine, p9.
- [8] Atik, B., Bousmaha, F., Taleb bendiab, L., Boti, S.A., J.B., Casanova J. (2007), "Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen." *Biologie & Santé.* **7**: 6-11.
- [9] Athamina, S. (2009), "Etude quantitative des flavonoides des graines de *cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique", THÈSE de magister, Université EL-hadj lakhdar-batna, p7.
- [10] Rached, W. (2009), "évaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique "These de majister Université' Oran Es-Sénia, p22.
- [11] Iserin, P., Masson, M., et Restellini J P, (2007). "Larousse des plantes médicinales". Identification, préparation, Soins .Ed Larousse, p14.
- [12] Mostefai, A. (2012), "Contribution à une étude morphométrique de *Rosmarinus Officinalis* L (Lamiacées) dans la région de Tlemcen" .These de Master UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID – TLEMCEN
- [13] MAKHLOUFI, A, "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 L'UNIVERSITE ABOUBAKER BELKAID, p11.

[15] Madjour, S. (2014)," Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée rosmarinus officinalis". These de Master Université Med Khider Biskra, p2.

[16]BENAMR, H. (2008),"Screening de plantes pour leur activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et analyse phytochimique, p28.

Les références arabes

[3] د. قبيني حسان. (1995)، معجم النباتات الطبية والأعشاب الطبية، ص120.

[14] حوة ابراهيم. (2013)، "دراسة الفعالية البيولوجية لبعض النباتات الشفوية والفعالية ضد الأكسدة". مذكرة ماجستير جامعة قاصدي مرباح ورقلة، ص 39.

***II. POLYPHENOLS ET
ACTIVITÉ
ANTIOXYDANTE***



II.1. Composés phénoliques

II.1.1.Introduction

De nombreuses études ont été effectuées sur les métabolites secondaires, notamment le cas des polyphénols qui sont largement utilisés en thérapeutique comme anti-inflammatoires, antioxydants, inhibiteurs enzymatiques, antimicrobiens, ...

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal. Les polyphénols sont des groupes de molécules de structures variées, l'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié des groupements hydroxyles, ces molécules représentent une famille de plus de 8000 composés, parmi les composés phénoliques les plus séparés et identifiés dans les plantes, on trouve les flavonoïdes et les tanins [1].

II.1.2.Localisation

Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois).....etc [2].

II.1.3.Classification des polyphénols

On peut distinguer les catégories suivantes: les non flavonoïdes (qui regroupent les acides phénoliques, les stilbènes, les lignines, les lignanes, les coumarines...) et les flavonoïdes (qui regroupent: les flavones, les flavonols, les flavanols, les isoflavones...) sans oublier les tannins qui sont des polyphénols complexes.

II.1.3.1. Non flavonoïdes

On peut citer les familles de composés les plus importants:

II.1.3.1.1. Acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3)

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Ils possèdent au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique [3].

Les dérivées de l'acide benzoïque sont composées d'un squelette de base de sept atomes de carbone (**Figure II.1**).

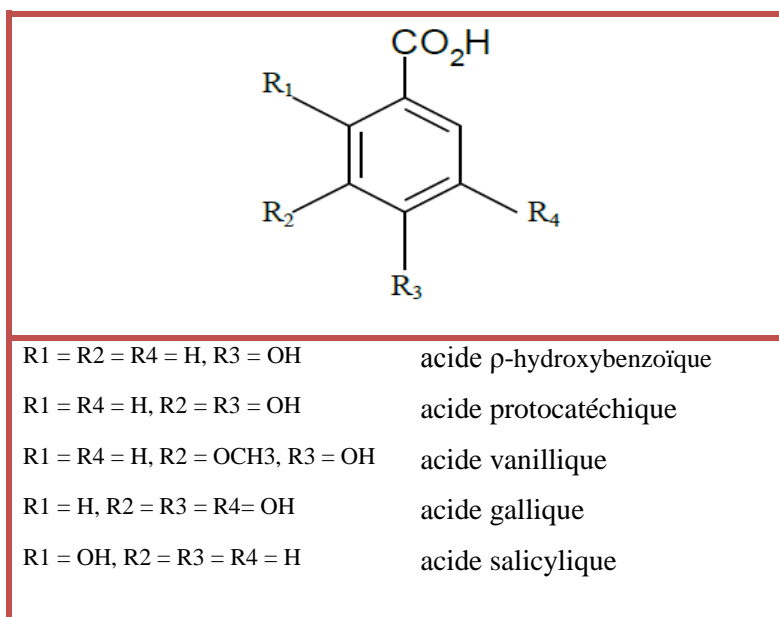


Figure (II.1) : Les dérivés de l'acide p-hydroxybenzoïque.

Les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure de type C₆-C₃ présentés par la **figure (II.2)** sont très répandus dans les plantes supérieures, l'acide p-coumarique étant le plus important.

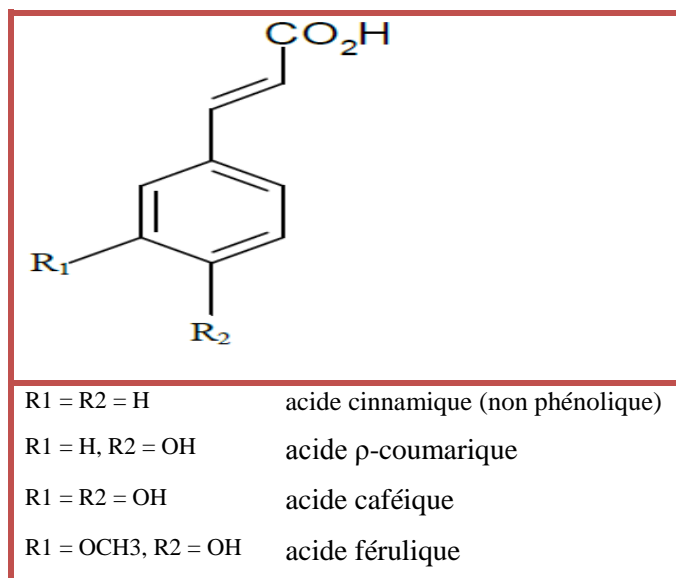


Figure (II.2): Les acides hydroxycinnamiques

Parmi les acides hydroxycinnamiques, on trouve l'acide chlorogénique, ester quinique de l'acide caféique, il est très répandu dans les fruits. Ce composé est impliqué dans les

mécanismes de brunissement enzymatique. Sa quinone est très réactive et susceptible de réagir par voie d'oxydation couplée [4].

Les acides hydroxybenzoïques (squelette C₆-C₁) sont rarement trouvés dans les fruits mais peuvent être détectés après dégradation des flavonoïdes, et notamment après déglycosylation. Ces composés sont fréquemment présents sous forme liée et peuvent entrer dans la constitution de structures complexes, telles que les tanins hydrolysables. Les esters de l'acide gallique sont retrouvés dans certains fruits notamment le galatte d'épicatéchine qui entre dans la composition des tanins condensés du raisin [5].

II.1.3.1.2. Stilbènes C6-C2-C6

Les stilbènes présentent une structure en C₆-C₂-C₆, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para (**figure II.3**). Les deux noyaux aromatiques sont reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la délocalisation des électrons π sur la totalité de la molécule. Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine [6].

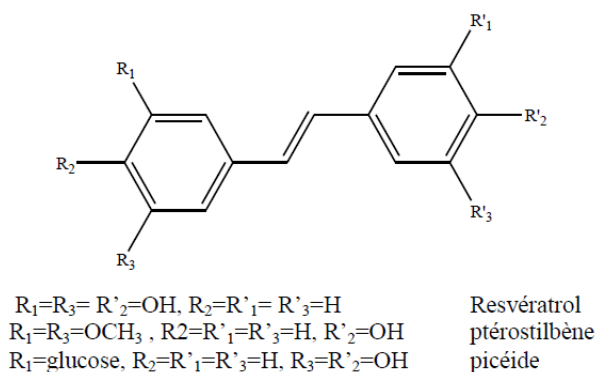


Figure (II.3): Quelques exemples des structures chimiques des stilbènes.

II.1.3.1.3. Coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne écologique ou biologique (**figure II.4**).

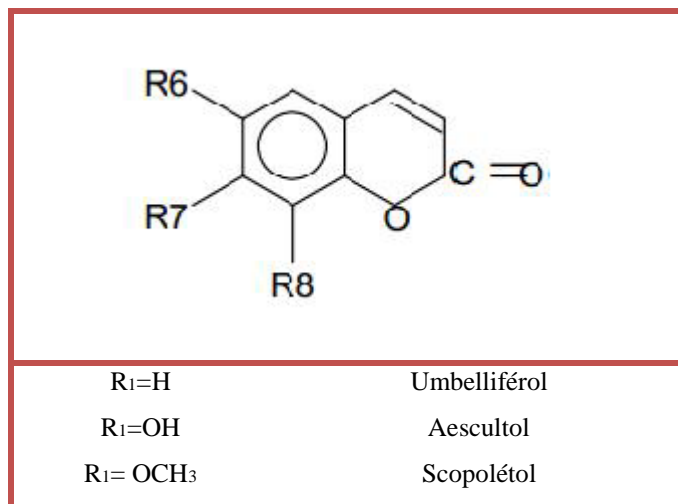


Figure (II.4): Principaux types de coumarines [7].

II.1.3.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette de base constitué de quinze atomes de carbone (C₆-C₃-C₆) comportant deux cycles benzénique A et B reliés entre eux par une chaîne à trois atomes de carbone qui correspond (**figure II.5**). La numérotation notée sera appliquée pour les différentes sous-classes de flavonoïdes. Ces dernières sont différenciées par le niveau d'oxydation du cycle pyrane: on peut aussi distinguer les anthocyanes, les flavonols, les flavanols et d'autres classes, telles que les flavones, les flavanones et les dihydrochalcones [8].

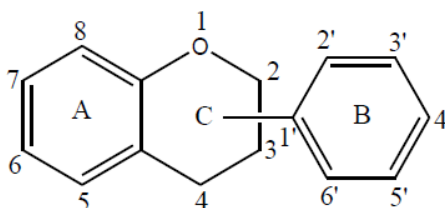
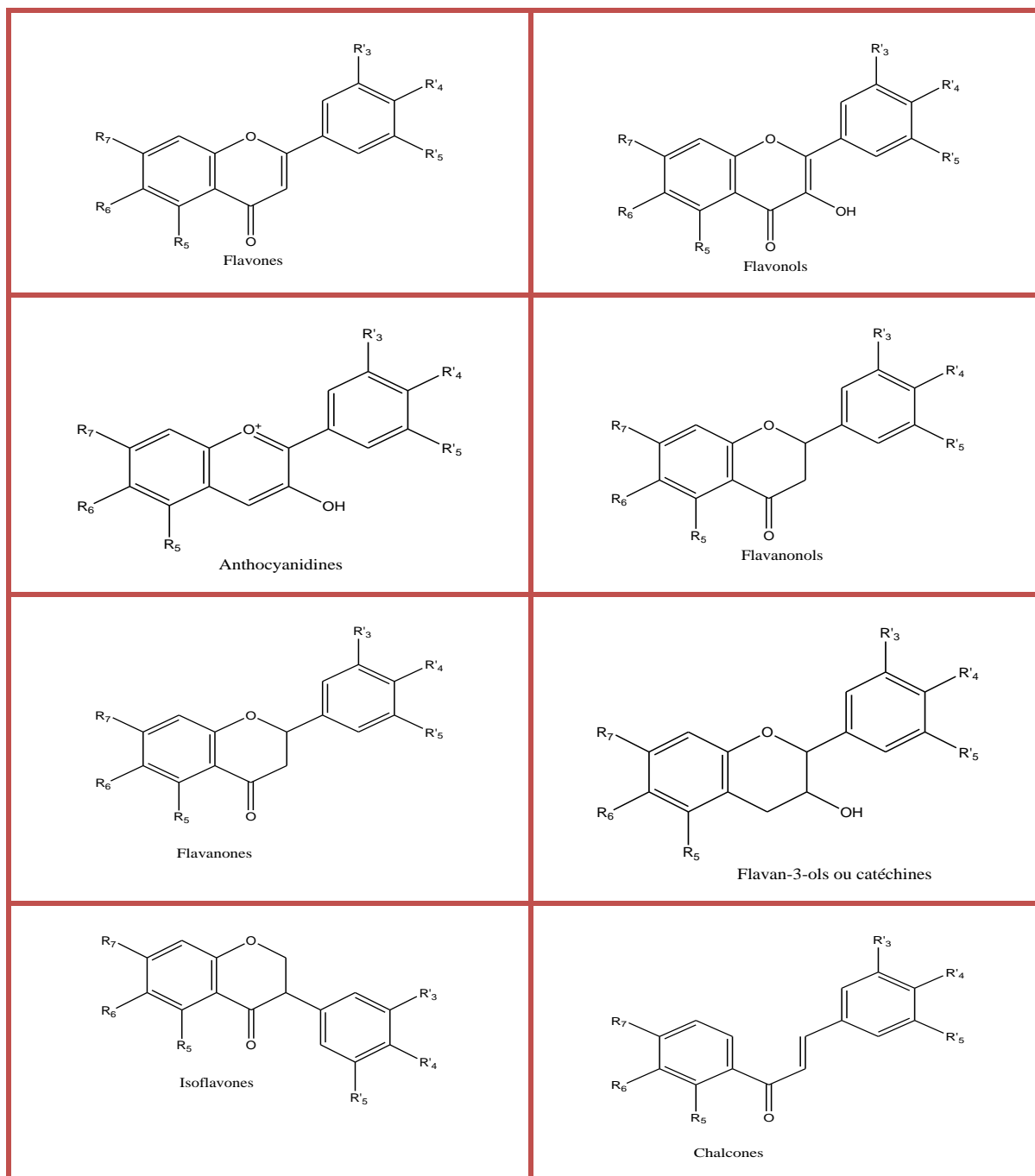


Figure (II.5): Structure de base des flavonoïde.

Le terme 'flavonoïde', utilisé pour la première fois par Geissman et Hinreiner [9] regroupe tous les composés dont la structure est basée sur celle de la flavone : phényl-2 benzopyrone Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2, 4, 6-tétrahydroxychalcone [10]. Par action enzymatique, cette chalcone se métabolise en différentes classes de flavonoïdes la structure varie selon le degré d'oxydation du squelette de base et la position des substituants sur le noyau central [11].

II.1.3.2.1. Classification des flavonoïdes:

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C. Les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes (**figure II.6**) : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones et aurones [12].



Figure(II.6): Structures des différentes classes des flavonoïdes [11].

II.1.3.3. Les tanins :

Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale, ce sont un groupe de polyphénols à haut poids moléculaire. Ils sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux [13].

On distingue: les tanins hydrolysables et condensés.

II.1.3.3.1. Les tanins hydrolysables :

Ces tanins sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycosyle, ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère (**figure II.7**), l'acide hexahydroxydiphénique (1,2). Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude [14].

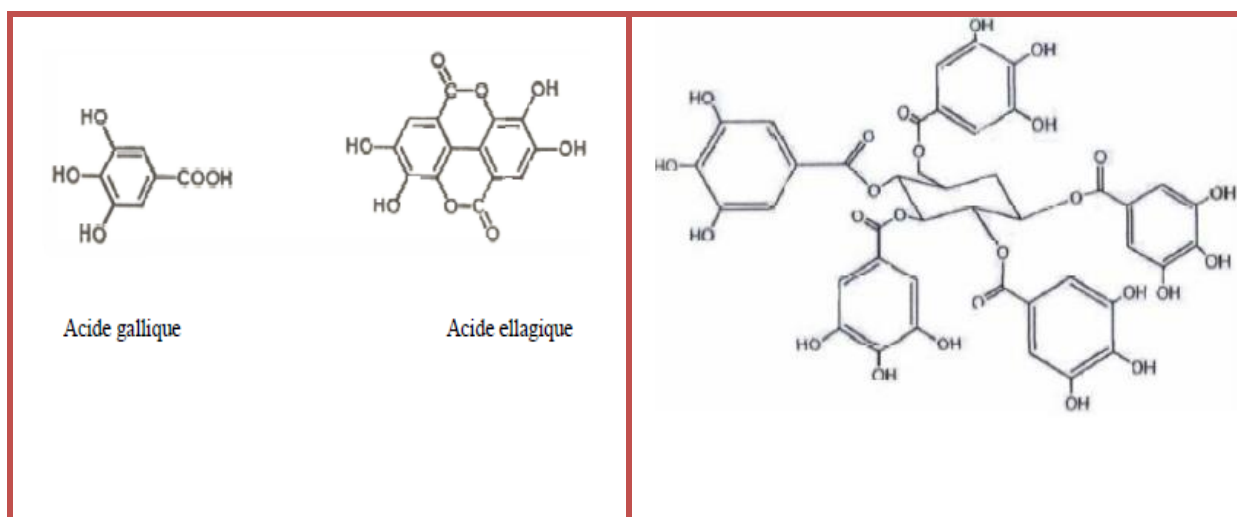


Figure (II.7): Exemple de Structure de Tanins hydrolysables.

II.1.3.3.2. Tanins condensés:

Les tanins condensés ou proanthocyanidols sont des polymères flavaniques. Ils sont constitués des unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone le plus souvent 4→8 ou 4→6, résultante du couplage entre le C-4 électrophile d'un flavanyle issu d'un flavan-4-ol ou d'un flavan-3,4-diol et une position nucléophile (C-8, plus rarement C-6) d'une autre unité, généralement un flavan-3-ol (**figure II.8**) [14].

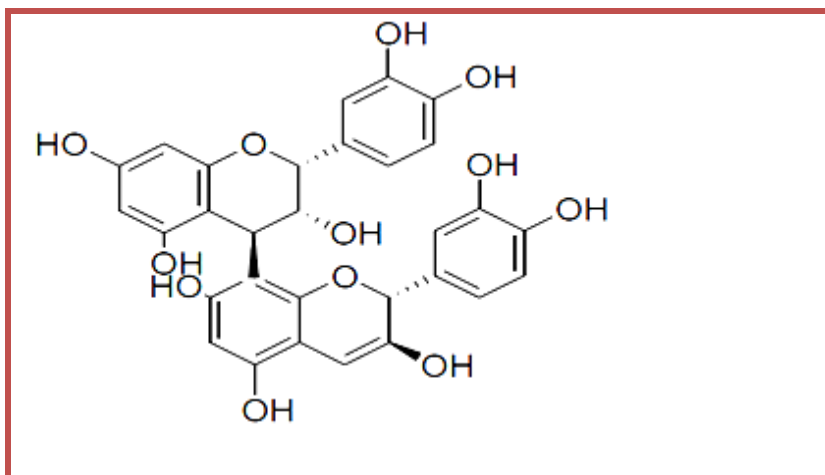


Figure (II.8). Exemple de Structure de Tanins condensés

II.1.4. Propriétés chimiques des polyphénols

Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement liées à celles des noyaux phénoliques, particulièrement des substituants à effet mésomère attracteur d'électrons (-M) et substituants à effet mésomère donneur (+M). La conjugaison d'une des deux paires libres de l'atome O avec le cycle traduit l'effet (+M) du groupe OH. Ce phénomène augmente la délocalisation électronique et produit une charge négative partielle sur les atomes C2, C4, C6.

L'effet (+M) peut être représenté par quatre formes mésomères (figure II.9).

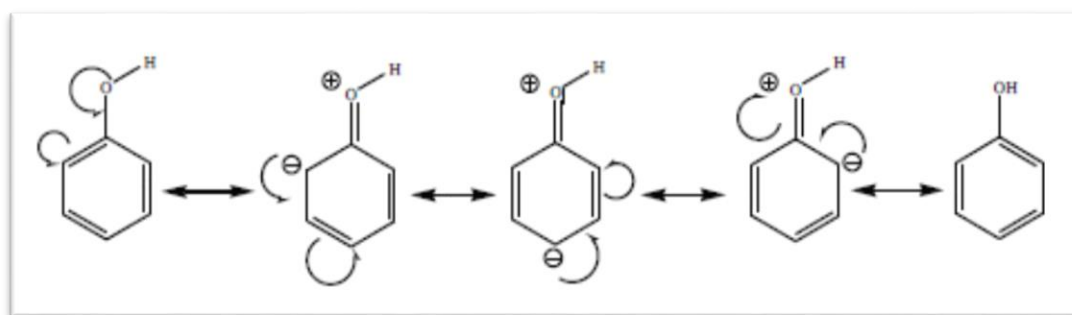


Figure (II.9): Formes mésomères du Phénol [15].

De ces caractères de base découlent les différentes propriétés chimiques suivantes : (nucléophilie, propriétés réductrices, polarisabilité, Liaison hydrogèneetc.)

II.1.5. Rôle des polyphénols dans les plantes

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ces derniers que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Les flavonoïdes montrent d'autres fonctions intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. D'autre part, les composés phénoliques possèdent souvent une activité antimicrobienne [16]. Ainsi, il a été montré que les catéchines des feuilles du thé inhibent la croissance des micro-organismes en altérant les fonctions membranaires des pathogènes [17].

II.1.6. Importance nutritionnelle des polyphénols

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans la qualité organoleptique des fruits et légumes, utilisés frais ou après transformation industrielle.

L'intérêt thérapeutique des polyphénols date depuis la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (Prix Nobel 1937), chercheur à l'Université Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou du jus de citron, riche en vitamine C et en flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre de mot perméabilité). Malgré ces premiers résultats encourageants, les recherches ne permirent pas par ensuite d'attribuer le rôle essentiel aux divers polyphénols d'origine végétale. A partir des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt des polyphénols dont les propriétés antioxydantes sont les plus remarquables.

II.1.7. Activité antioxydante des polyphénols

Les polyphénols possèdent surtout une forte activité antioxydante [18]. L'activité du piégeage des radicaux libres est l'un des mécanismes importants de l'activité antioxydante,

pour les flavonoïdes, ce mécanisme est lié à leur structure et à l'arrangement des groupements hydroxyles [19].

Des études effectuées sur la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres ont montrées que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- La structure ortho dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- La double liaison C₂-C₃ en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C₂-C₃.

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes [20].

La propriété antiradicalaire des flavonoïdes est dirigée principalement vers HO· et O₂· aussi les radicaux peroxy et alkoxy. En plus, comme ces composants présentent une forte affinité pour les ions du fer (catalysent plusieurs processus conduisant à l'apparition des radicaux libres), leur activité antiperoxydative peut être aussi attribuée à une capacité concomitante de chélation du fer [18].

Par ailleurs, l'inhibition des enzymes présente un autre mécanisme de l'activité antioxydante, les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent faire régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celle du radical superoxyde dans les tissus humains.

Une étude réalisée a montré que les flavonoïdes sont aussi des bons inhibiteurs d'autres enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase [20].

II.1.8 Définition d'un radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées

deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique [21].

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène.

Les autres radicaux libres, dits radicaux libres secondaires (radical peroxyde ROO• et radical alkoxyde RO•), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule [22].

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit: radical superoxyde O₂•, radical hydroxyl OH•, monoxyde d'azote NO•, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante: l'oxygène singulet, peroxyde d'hydrogène H₂O₂, peroxynitrite ONOO⁻ [23].

II.2. Les antioxydants:

La production de radicaux libres est contrebalancée par des systèmes antioxydants assurant le maintien de l'état biologique. De nombreuses situations peuvent cependant entraîner l'apparition en excès de ces espèces chimiques. Les agents anti-radicalaires sont des capteurs de radicaux qui agissent avec eux plus vite que ne ferait le substrat à protéger ou interrompre les chaînes de réaction radicalaires [24].

II.2.1. Définition d'un antioxydant :

Le terme antioxydant désigne une substance qui, ajoutée à faible dose à une substance, il est capable d'empêcher l'action d'oxygène, si la réaction se fait spontanément à l'air. Elle interfère sur le processus normal d'oxydation en augmentant le temps au bout duquel cette oxydation aura produit des odeurs indésirables et une détérioration décelable [25].

Toutefois, pour être efficace, les antioxydants doivent être additionnés le plus tôt possible dans le processus de fabrication. Ils ne peuvent en effet inverser la réaction d'oxydation, mais Seulement la ralentir ou la stopper [26, 27].

II.2.2. Classification des antioxydants :

II.2.2.1. Les antioxydants synthétiques:

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture [28]. Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques [29]. En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomaux du foie et des organes extra-hépatiques [30].

❖ Le Butylhydroxyanisole (BHA) :

C'est un produit qui n'existe pas dans la nature mais on le synthétise avec la méthode de butylation du paraméthoxyphénol.

BHA ayant deux formules (**figure II.10**), parmi les importantes caractéristiques de ces produits est la possibilité de résister même à la chaleur, par exemple le cas des frites, c'est pour cette cause, certains pays permettent son ajout avec une concentration ne dépassant pas 200 ppm [31].

❖ Le Butylhydroxytoluène (BHT) :

Ce produit n'existe pas dans la nature, on le fabrique pour ses utilisations dans les produits pétroliers comme l'élastique et aussi son utilisation dans les produits alimentaires.

BHT est un produit net de couleur blanche (**figure II.10**), il est sous forme d'une matière cristallisée qui n'a pas d'odeur, il ne se dissout pas dans l'eau, il se dissout dans d'autres solvants organiques [32].

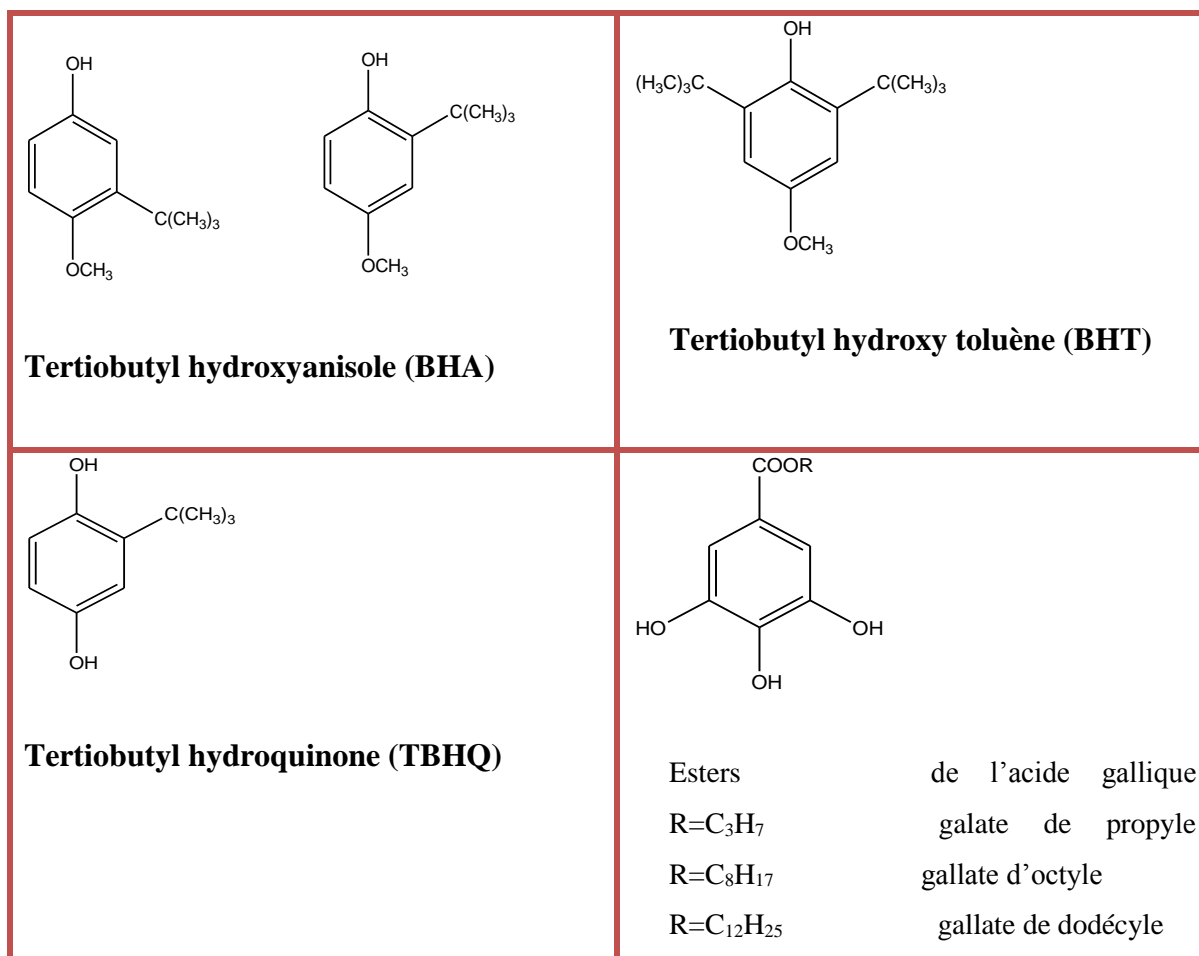


Figure (II.10): Quelques antioxydants de synthèse.

II.2.2.2. Les antioxydants naturels:

L'utilisation empirique d'antioxydants naturels est une pratique très ancienne. La recherche de nouveaux antioxydants naturels, reconnaît depuis ces dernières années une très grande importance, car les antioxydants synthétiques actuellement utilisés, notamment le BHT et le BHA ne seraient pas dépourvus de toxicité.

les multiples atouts santé des fruits et légumes sont liés à leur faible teneur calorifique, à leur richesse en fibres, minéraux, vitamines et autres micronutriments. certains de ces micronutriments, apparaissent de plus en plus clairement comme essentiels en participant à la protection de notre organisme contre les cancers, les maladies cardio-vasculaires et les autres maladies dégénératives. C'est le cas des antioxydants dont les fruits et légumes constituent l'une des principales sources alimentaires. L'homme ingère avec ses aliments environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine cet 100

fois plus que caroténoïdes ou vitamine et l'on estime que les fruits et légumes contribuent pour la moitié à ces apports [33].

a) Les vitamines:

❖ **la vitamine C ou l'acide ascorbique :**

C'est un puissant réducteur. Elle joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E.

❖ **La vitamine E ou tocophérol :**

Prévient de la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes [34].

b) Les éléments minéraux :

Plusieurs éléments minéraux ont été reportés dans les baies et les graines d'argousier, parmi lesquels au moins vingt-quatre sont présents dans le jus tels que l'azote, le phosphore, l'aluminium, le calcium, le fer, le bore, le manganèse...

❖ **Le Fer :**

Est un anti-oxydant puissant qui joue un rôle protecteur au niveau des systèmes cardio-vasculaires et il est indispensable au cerveau. Il agit également sur le foie, les muscles et même sur la production des spermatozoïdes. Cet oligo-élément est votre allié contre le stress, le cancer, les maladies cardio-vasculaires et il stimule le système immunitaire et protège les yeux de la cataracte. Il prévient le vieillissement général de l'organisme et neutralise les toxines et les radicaux libres.

❖ **Le zinc:**

C'est un minéral qui a un rôle très important pour notre système immunitaire, le système nerveux, la sexualité, l'état général, la fertilité. Aliments riches en zinc : Foie, soja, crustacés, coquillages, viandes, germe de blé, pain complet, jaune d'œuf, amandes, noix, noisettes [4].

Références bibliographiques

- [1] Abadio, F., F. D., B. D., Kammerer, R., Carle, R., Tseng, W. H., Böser, S., et Graeve, L. (2012), "Antioxidant activity and characterization of phenolic compounds from bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) Fruit by HPLC-DAD-MS n." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(31): 7665-7673.
- [2] Berra, D. (2015), "Etude de l'effet du milieu d'extraction sur la composition des feuilles de *Matricaria Pubescens*". Thèse de masters, Université Echahide Hamma Lakhdar EL-Oued, p23.
- [3] Thompson, J. C., et Mottola, H. (1984), "Kinetics of the complexation of iron (II) with Ferrozine." *Analytical Chemistry*. 56(4): 755-757.
- [4] Kang, J., C. Xie, Z. Li, S. Nagarajan, A. G. Schauss, T. Wu et X. Wu. (2011), "Flavonoïde from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities." *Food Chemistry* 128(1): 152-157.
- [5] Riberau Gayon, P. (1968), "Les Composés Phénoliques des Végétaux." Dunod, Paris, 254.
- [6] Belkheiri, N. (2010), "Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes". Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.
- [7] Harrar, A.N. (2012), "Activités antioxydante et antimicrobiennes d'extraits de *Rhamnus alaternus* L." Thèse de magister, Université Ferhat Abbas-Setif, p 14.
- [8] Heller, W. et Geiger, H. (1988), "The Flavonoids Advances in Research Since 1980, Harborne." J.B.(Eds), Chapman and Hall, London.
- [9] Swain, T. (1976), "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments", Goodwin, T.W. (Ed), 2eme Edition, Academic Press, London, V.1, p 425.
- [10] Gentiana, Des plantes pour mieux vieillir: Vieillir oui, mais en santé, 16-4-2002, Construire No 16
- [11] Alkurd, A., Hamed, T. R., Al-Sayyed, H. (2008), "Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan." *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4: 265 – 274.
- [12] Boukr, N.H. (2014), "Contribution à l'étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout" Thèse de master, Université Kasdi merbah Ouargla, p19.

- [13] Conrad, J., Vogler, B., Klaiber, I., Roos, G., Walter, U., Kraus, W. (1998), "Two triterpene esters from Terminalia macroptera bark." *Phytochemistry* 48: 647 - 650.
- [14] Cuendet, M. (1999), "Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie: "Fagraea blumei" (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude: "Bartsia alpina" (Scrophulariaceae), "Loiseleuria procumbens" (Ericaceae) et "Camp." Thèse de doctorat.
- [15] Boubekri, Ch. (2014), " Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques". Thèse de Doctorat, Université Mohamed Khider – Biskra, p41.
- [16] 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.
- [17] Winkelhausen, E., Posplech, R., Laufenberg, G.(2005) ,"Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace." *Bulletin of the chemists and Technologists of Macedonia*, 24(1), 41-46.
- [18] Saija, A ., Scalese, M ., Lanza, M ., Marzullo ,D ., Bonina, F ., Castelli ,F.(1995), "Flavonoids as antioxidant agents importance of their interaction with biomembranes ." *Free radical biology & medicine*, 19:481-486.
- [19] Sokol-Letowska, A., Oszmianski, J., Wojdylo, A. (2007),"Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap." *Food chemistry*, 103:853-859
- [20] Marfak, A. (2003)," Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools: Formation de depsides." Thèse de doctorat, Université de LIMOGES, p187.
- [21] Dacosta, Y. (2003),"Les phytonutriments bioactifs"669 réféérences bibliographiques. Ed.Yves Dacosta, Paris, p317.
- [22] Novelli, G. P., (1997), "Role of free radicals in septic shock. J." *Physiol. Pharmacol*, 48: 517-527.
- [23] Favier, A., (2003), "Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la Compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique." *L'Actualité Chimique*; 108-117.

- [24] Diplok, A.T. (1991), "Antioxydant nutriments and disease prevention: an Overview." Am J Clin Nutr: 53 (suppl): 189S-93S.
- [25] Knox, J.P et Dodge, A.D., (1985), "Singlet Oxygen and Plant", Phytochemistry, V.24, 889-96.
- [26] Morelle, J.(1988), "Peroxydes Lipidiques, Radicaux Libres, Vieillessement et Lipoaminoacide", Parf. Cosm. Arômes, V.80, 91-904.
- [27] Murase, H., Nagao, A. et Terao, J. (1993), "Antioxidant and Antiemulsifying Activity of N-(Long Chain Acyl)-Histidine and N-(Long Chain Acyl)-Carnosine." Journal of Agriculture and Food Chemistry, V.41, 1601-04.
- [28] Lisu, W., Jui-Hung, Y., Hsiao-Ling, L., Ming-Jiuan, W. (2003), "Antioxydant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn)." Journal of food and drug analysis, 11(1): 60-66.
- [29] Yu, R, Mandlekar, S., Tony Kong, A.N. (2000), "Molecular mechanisms of butylated hydroxylanisoleinduced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c." Molecular Pharmacology, 58.
- [30] Barlow, S.M. (1990), " Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. "Ed. Hudson, B.J.F, Food Antioxidants.
- [31] Gunckel, S. Santander, P.G., Cordano, J., Ferreira, S., Munoz, L.J., Vergara, N., Squella, J.A. (1998) ,"Chemico-Biological Interactions." 114; 45–59
- [32] Hammerich, O., Svensmark, B. (1990), "Anodic oxidation of oxygen-containing compounds." in: H. Lund, M. Baizer (Eds.), Organic Electrochemistry, Marcel Dekker, New York, p 615.
- [33] Cuendet .M.(2000)," recherche de nouveaux composés capturs de radicaux libres et antioxydants à partir d'un plant d'indonésie". Thèse de doctorat.
- [34] Athmania, S. (2009), " Etude Quantitative Des Flavonoides Des Graines De *Cuminum cyminum* et Les Feuilles De *Rosmarinus officinalis* Et L'évaluation De L'activité Biologique. "These de Magiste ,Université EL-Hadj Lakhdar-Batna, p36.

PARTIE

EXPÉRIMENTALE



III. MATÉRIELS ET MÉTHODES



III. Matériels et méthodes:

Notre travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes (VTRS) de l'université *Echahid Hamma Lakhdar El-Oued*.

- **Objectif général :**

- ✓ Etudier les parties aériennes de la plante médicinale romarin, qui est cultivée à l'université d'El-oued.

- **Objectifs spécifiques :**

- ✓ Identifier les recettes utilisées par la thérapie traditionnelle.

- ✓ Déterminer les groupes chimiques (polyphénols, flavonoïdes) présents dans l'extrait brut de l'état frais des parties aériennes et de l'état séché.

- ✓ Déterminer les activités antioxydantes des extraits obtenus.

- ✓ L'objectif principal de ces travaux c'est l'étude qualitative et quantitative des extraits.

III.1. Matériel :

III.1.1. Matériels du laboratoire :

a) Appareillage:

Appareillage
✓ Spectrophotomètre (UV-1800 SHIMADZU)
✓ Chromatographie liquide à haute performance HPLC (SHIMADZU type HPLC-RP-C18)
✓ Evaporateur rotatif (Rotavapor BUCHI Heating bath R-210)
✓ Etuve (Mommert, Beschickung-Loadig Modell 100-800)
✓ Balance analytique (Shanghai Sunrise Instrument précision 0.001g)
✓ Verrerie : béchers, pipettes, ballons, éprouvettes graduées, tubes à essais, pipette et micro pipette.

b) les logiciels :

les logiciels
✓ Logiciel Origin Pro 8, pour dessiner les voltamogrammes, aussi que pour l'élaboration des courbes d'étalonnages et facteur de corrélations.
✓ Logiciel Microsoft office Excel 2007, pour le calcul des concentrations à partir des courbes d'étalonnage et pour la présentation des résultats.
✓ Logiciel LC Solution, pour obtenu des chromatogrammes HPLC.

c) Réactifs chimiques :

Produits	Fournisseur
• Trichlorure d'aluminium $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Production par (BIOCHEM Chemopharma)
• DPPH ($\text{C}_{18} \text{H}_{12} \text{N}_5 \text{O}_6$)	ALFA AESAR
• Réactif Folin Fioalceu ($3\text{H}_2\text{O}, \text{P}_2\text{O}_5, 13\text{WO}_3, 5\text{MoO}_3, 10\text{H}_2\text{O}$)	PROLABO
• Eau Ultra pure (Bi distillé)	
• $\text{H}_2\text{Na}_2\text{PO}_4$	
• Ethanol 95% ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$)	Sigma ALDRICH
• Carbonate de sodium Na_2CO_3 .	BIOCHEM Chemopharma
• méthanol 95% ($\text{CH}_3\text{-OH}$)	Sigma ALDRICH
• acide sulfurique H_2SO_4	
• Phosphate de sodium	
• Acide ascorbique $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6$ (99%)	ALFA AESAR
• acide gallique $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}$ (99%)	PROLABO
• Rutine ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$) (97%)	ALFA AESAR

III.1.2. Matériel végétal :

Le matériel végétal est constitué de deux échantillons : les parties aériennes du romarin. Les feuilles et les sommités fleuries du romarin ont été récoltées en mois de décembre 2015 de l'université d'El-oued et l'autre échantillon est constitué des parties aériennes d'une variété du romarin cultivée à Guemar. Après séchage à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, le matériel végétal de chacune des deux espèces est broyé grossièrement dans un moulin électrique.

Le tableau (III.1) regroupe l'origine, L'état d'étude et la codification des échantillons.

Tableau (III.1): Codification des échantillons.

Variété des feuilles	Origine	Code de cultivars
Romarin frais	Univ El-Oued	RFU
Romarin séché	Univ El-Oued	RSU
Romarin frais	Guemar	RFG
Romarin séché	Guemar	RSG

La figure(III.1) suivante représente les photos des parties aériennes du romarin étudiés:



Figure (III.1):les photos des parties aériennes du romarin

III.1.3. Extraction du matériel végétal:

Les parties aériennes du romarin préalablement nettoyées et broyées sont mise à macérer dans un mélange éthanol/eau (7:3 V/V) à un rapport de 1/5 (P/V), sous agitation douce pendant une nuit à une température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange sur verre fritté (entonnoir N°03), le solvant est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur

(BÜCHI). Permettant ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur brune foncée, qui est considéré comme étant l'extrait brut. [1]

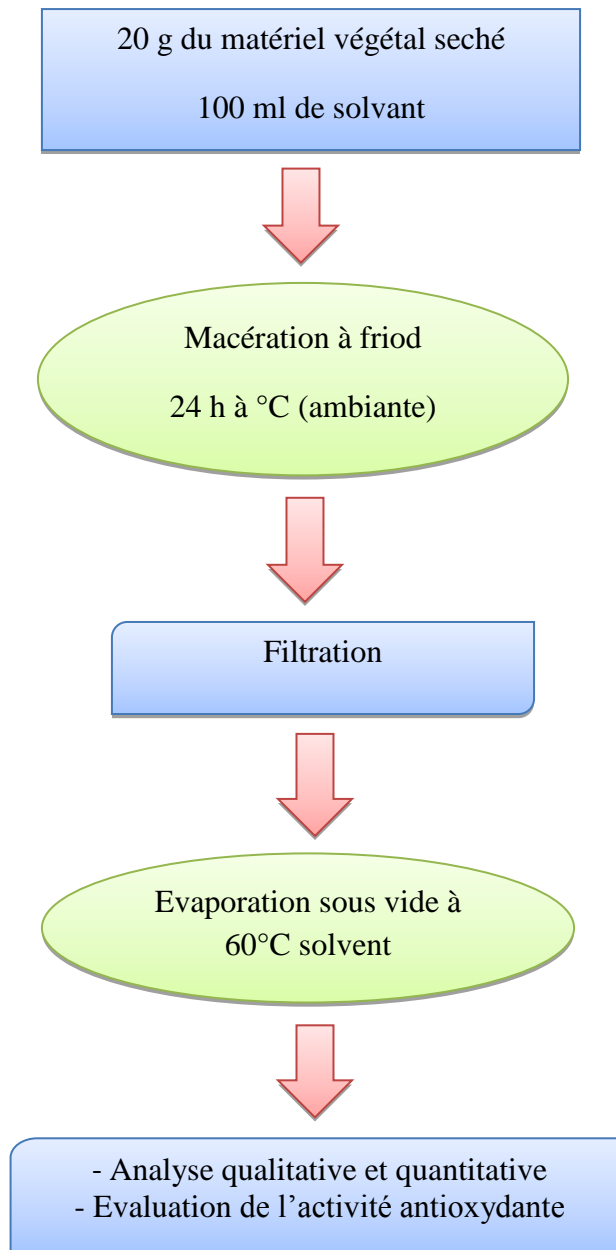


Figure (III.2): Protocole de préparation des extraits

III.2. Méthodes:

Notre étude a été basée spécifiquement sur le :

- 1- Dosage des polyphénols totaux et dosage de quelques familles.
- 2- Evaluation de l'activité antioxydante des différents extraits.

III.2.1. Les méthodes spectrophotométrique :

➤ *Definition :*

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert [2]. La figure (III.3) montre un spectrophotomètre Uv-visible.



Figure (III.3): Spectrophotomètre UV-visible.

III.2.2. Dosage des composés phénoliques

III.2.2.1. Analyse qualitative:

✓ **Dosage des polyphénols totaux (PPT):**

Les polyphénols sont estimés par la méthode de Folin Ciocalteu. Le réactif de Folin Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxyde

bleu de tungstène et de molybdène. l'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés [3].

- **Mode opératoire:**

Les composés phénoliques totaux sont dosés de la manière suivante: 1 ml des solutions d'acide gallique de concentration de 0.01 jusqu'à 0.04 mg/mL, ensuite 1 ml d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois dans l'eau distillée est ajouté puis immédiatement après il est ajouté 0.8ml d'une solution de Na₂CO₃ (7.5%). Le mélange obtenu est incubé à la température ambiante pendant environ 30 minutes à l'abri de la lumière. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 765 nm contre un blanc. Les lectures de la densité optique à 765nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

- ✓ **Dosage des flavonoïdes totaux (FVT):**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée avec le trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium AlCl₃ forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 420 nm.

Pour quantifier la teneur en flavonoïdes, il faut utilisée une courbe standard.

- **Mode opératoire:**

La courbe d'étalonnage a été obtenue par des solutions de **rutine** de concentration qui varie entre 0.01 jusqu'à 0.06 mg/ml. 1ml de chaque solution a été introduite à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 1ml de trichlorure d'aluminium (AlCl₃), Les solutions ont été secouées immédiatement et bien mélangées, puis ils sont maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 420 nm contre un blanc et en fin on trace la courbe d'étalonnage de la **rutine** en fonction de la concentration : **A= f(C)** [4].

III.2.2.2.Analyse quantitative:

III.2.2.2.1.Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La HPLC est un moyen très flexible et simple qui permet d'identifier les différents composés d'un mélange.

La HPLC peut être assez largement décrite par de théorie commune. Dans ce cas, un fluide appelé phase mobile traverse une colonne qui contient une phase solide (silices, silices fondues, silice greffées).

A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il est entraîné par la phase mobile. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange ayant des temps de rétentions différents sont séparés par élution.

Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme.

Le chromatographe utilisé est de type Perkin Elmer série 200 muni d'une pompe quaternaire, d'un injecteur automatique, d'un four à effet pelletier et d'un détecteur UV.

Les différents composés à analyser ont été identifiés par comparaison des temps de rétention avec ceux des étalons [5].

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe **HPLC-RP-C18**, équipé d'éléments suivants :

Pompe:	LC 20AL, LC20AL
Caractéristiques de la colonne	longueur × d'un diamètre = 125 mm × 4,6 mm Diamètre des pores = 5µm
Four	CTO 20A
Détecteur	UV SPD-20A
Température	27°C
Éluant A	H ₂ O acide acétique, (0.2%)
Éluant B	acéto-nitrile
Volume injecté	20 µl

Les analyses ont été réalisées sous les conditions suivantes :

- Débit: 1 ml/min;
- Volume d'injection: 20 µl;
- Longueur d'onde: 300 nm;

- Temps d'analyse: 50 min;
- Concentration des échantillons: 10 mg /ml;

La phase mobile est constituée d'un mélange de solutions: (H₂O acide acétique (0.2%), acétonitrile)



Figure (III.4): Chromatographie en phase liquide à haute performance [2].

III.2.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits:

L'évaluation de l'activité antioxydante d'un composé (extrait) consiste à mesurer sa capacité à piéger les radicaux libres.

Les tests proposés pour la mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos extraits sont:

- ✓ Test d'évaluation CAT.
- ✓ Test d'évaluation DPPH.

III.2.4.1. Test du 2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) :

Afin d'étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons utilisé la méthode basée sur le DPPH (diphényl picryl hydrazyl) comme un radical relativement stable. Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl hydrazine, dont l'intensité de la couleur

est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu a donné des protons [6].

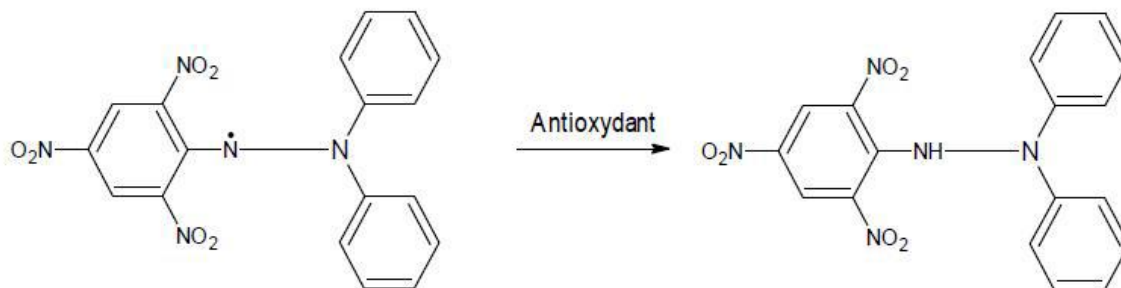


Figure (III. 5): Réduction du radical libre DPPH [7].

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 3,9 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol .1ml des solutions des extraits ou du standard (**rutine**) sont ajoutés à 2 ml de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min, et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 515 nm.

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = \frac{[\text{Abs}_{515} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{515} \text{ échantillon}]}{\text{Abs}_{515} \text{ contrôle}} \times 100$$

Avec:

Abs₅₁₅ contrôle : absorbance du control (ne contenant aucun antioxydant).

Abs₅₁₅ échantillon : absorbance des échantillons.

Les mesures des densités optiques de chaque solution d'extrait à différentes dilutions nous ont permis de calculer le paramètre IC₅₀ qui indique le pouvoir antioxydant d'un composé ou d'un extrait et qui est défini comme étant la concentration de l'extrait exprimée en mg/ml nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH.

La valeur d'IC₅₀ de chaque extrait peut être obtenue à partir des équations des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait. Il faut rappeler que plus la valeur de IC₅₀ est petite plus l'activité antioxydante des extraits est grande [8].

III.2.4.2. Test d'évaluation de l'activité antioxydante totale (CAT):

Le test du PPM (PhosPhoMolybdate) est une variante du test DPPH. Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (CAT).

Le test est basé sur la réduction du molybdène de l'état d'oxydation (VI) à l'état d'oxydation (V). Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V)) à un pH acide. On mesure la diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant.

A la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E...) [9].

La courbe du standard :

L'analyse de molybdate phosphate est réalisée en utilisant le protocole décrite comme suit :

On prépare 100 ml d'un mélange des trois solutions suivantes :

- 0,6 M d'acide sulfurique
- 28 mM phosphate de sodium
- 4 mM molybdate d'ammonium

200 µl de l'acide gallique dilué sont ajoutés à 2ml de la solution précédente. le mélange est placé dans un bain marie à une température de 95°C pendant 90 min, après refroidissement l'absorbance a été mesurée à 695 nm.

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits est comparée par rapport à l'acide gallique qui est utilisé comme antioxydant dans l'industrie agroalimentaire [10].

Références bibliographiques

- [1] Biesaga, M. (2011), "Influence of extraction methods on stability of flavonoids." *Journal of Chromatography A* 1218(18): 2505-2512.
- [2] Berra, D.(2015), "Etude de l'effet du milieu d'extraction sur la composition des feuilles de *Matricaria Pubescens*." Thèse de master, Université Echahide Hamma Lakhdar EL-Oued,p37.
- [3] Karabegovi, I., Nikolova, M, and Lazi ,M. (2011), "comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *artemisia* sp. recovered by different extraction techniques, biotechnology and bioengineering Chinese." *journal of chemical engineering*, 19(3) 504-511.
- [4] Dziri, S., Hassen, I., Fatnassi, S., Mrabet, Y., Casabianca, H., Hanchi, B., Hosni, K., (2012),"Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*)." *sciverse science direct*, 1-10.
- [5] Giardi, M.T., Rea, G., Berra, B. (2010), "Bio Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors." *Landes Bioscience and Springer Science+Business Media*.
- [6] Hatano ,T., Takagi, M., Ito, H., Yoshida, T. Phenolic constituents of liquorice. VII. A new chalcone with a potent radical scavenging activity and accompanying phenolics from liquorice. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1997; 45(9): 1485-1492.
- [7] Tang, S.Z., Kerry, J.P., Sheehan, D., Buckley, D.J., (2002),"Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems". *Food Chem.*, 76(1): 45-51.
- [8] Read, G.,Randat, R. (1988). "Structure and properties of thiobarbituric acid malonaldehyde chromogen", *J. Chem. Soc*, 1103-1105.
- [9] Xin-Hua Chen,le -Xian Xia,Hong-Bo Zhou, and Guan Zhou Qiu,Chemical composition and antioxidant activities of *Russula griseocarnosa* sp .nov,agricultural and food chemistry 58,6966-6971 ,2010

[10] MIdoun, T.(2010)," extraction des composes phenoliques et etude leurs activites antioxydantes par la voltametrie cyclique." mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de master , Universite Kasdi Merbah Ouargla.

IV.RESULTATS ET DISCUSSION



IV. Résultats et discussion

IV.1. Rendement d'extraction

Les rendements des extractions des composés phénoliques sont calculés suivant la formule ci-dessous [1] :

$$R(\%) = \frac{\text{Masse du Résidu Extrait}}{\text{Masse Initial du Végétal}} \times 100$$

Les rendements qui ont été déterminés par rapport à 20 g du matériel végétale sec ou frais sont exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau (IV.1).

Tableau (IV .1): rendements des extraction.

	Extrait frais		Extrait sèche	
L'échantillon	RGF	RUF	RGS	RUS
Rendement %	2.7125	2.781	1.483	3.665

Les résultats obtenus pour les extraits bruts, montrent que le rendement le plus élevé est celui de l'extrait de l'échantillon frais du romarin de l'université d'El-Oued **RUF** (3.665%) et le rendement le plus faible revient à l'échantillon du romarin sec de Guemar **RGS** (1.483%).

IV.2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)

IV.2.1. Droite d'étalonnage de l'acide gallique:

L'étude quantitative des extraits bruts des échantillons frais et séchés du romarin au moyen des dosages spectrophotométriques avaient pour objectif la détermination de la

teneur en composés phénoliques. La droite d'étalonnage a été tracée pour cet objectif [2]. L'équation obtenue est de type:

$$Y = 18,95 X + 0,442$$

Avec:

Y: la valeur d'adsorbance.

X: la concentration de l'extrait en mg/ml.

Le coefficient de corrélation $R^2 = 0,981$.

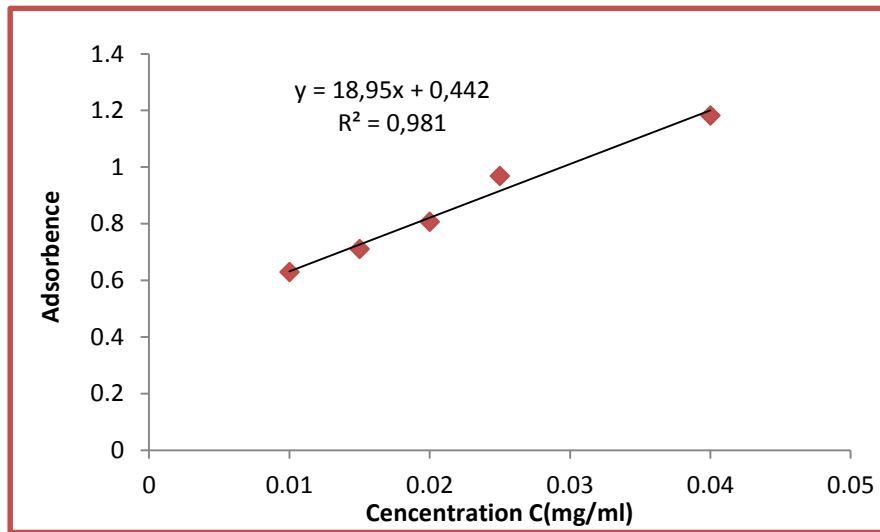


Figure (IV.1): Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

IV.2.2. Teneur en polyphénols totaux

Les concentrations des polyphénols totaux sont calculées à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique ($Y = 18,95 X + 0,442$). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par un gramme de l'extrait (mg EAG/g d'extrait). Ces résultats ont permis de donner des estimations sur les quantités des polyphénols totaux contenus dans les échantillons du romarin.

Le tableau (IV.2) résume les résultats obtenus des teneurs en polyphénols totaux des extraits bruts des échantillons.

Tableau (IV.2): Teneurs des polyphénols totaux des extraits.

Equation $y = 18.95x + 0.442$	Extrait	Teneur en polyphénols totaux (mgGAE/g) des extraits du romarin	
		Gummar	Université El-Oued
$R^2 = 0.981$	Frais	12	55
	Seché	37	97.8

D'après ces résultats, nous avons remarqué une variabilité des teneurs en polyphenols totaux, La teneur la plus élevée est enregistré pour l'échantillon séché du romarin récolté de l'université d'El-Oued 97, 8 mg/g.

Il est très clair que la plus faible valeur revient à l'échantillon du romarin frais récolté de la région de Guemar 12mg/g...

Il est très clair que la teneur en polyphénols totaux augmente de l'état frais vers l'état séché [3].

IV.2.3. Dosage des flavonoïde totaux (FVT):

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et l'étalon a été la rutine, pour la détermination de la teneur en flavonoïde totaux, une droite d'étalonnage (figure IV.2) à été tracée pour cette objectif qui a été réalisé avec des solutions d'étalons à des concentrations différentes.

La quantité de flavonoïdes exprimée en mg par g de la matière végétale sèche d'équivalent de rutine.

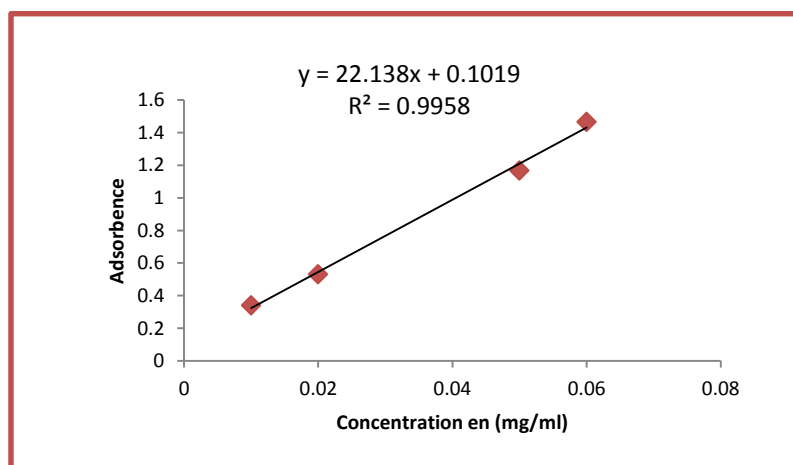


Figure (IV.2): Courbe d'étalonnage de la rutine.

Le tableau (IV.3) résume les résultats obtenus des teneurs en flavonoïdes totaux des extraits bruts des plantes.

Tableau (IV.3): Teneurs des flavonoïdes totaux des extraits.

Equation $y=22.13x+0.101$	Extrait	Teneur en de flavonoïde totaux (mg ER/g)	
		Guemar	Université El-Oued
$R^2 = 0.995$	Frais	6.8 ± 0.070	16.23 ± 0.047
	Sec	$.17833 \pm 0.235$	15.72 ± 0.046

Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes totaux rassemblés dans le tableau (IV.3) montrent la plus grande valeur revient à l'extrait séché de la region de Geumar (17,833 mg/g) suivi par l'extrait frais de l'université d'Ei-Oued (16, 23 mg/g).

IV.2.4. Composition chimique des différents extraits (polyphénols totaux, flavonoïdes totaux):

La figure (IV.5) représente la comparaison en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des différents extraits.

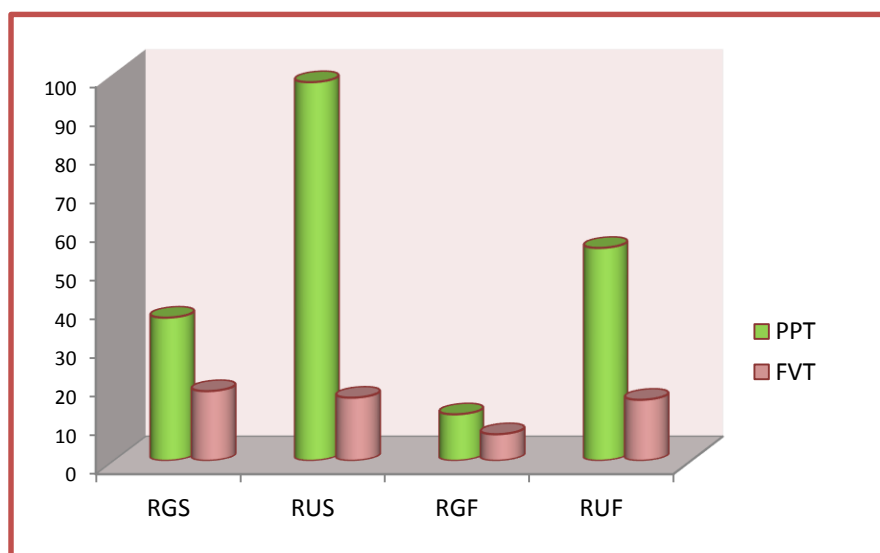


Figure (IV.3): comparaison en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux des différents extraits.

PPT: polyphénols totaux; FVT: flavonoïdes totaux.

Les études expérimentales des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal montrent la présence des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux dans tous les échantillons.

L'apparition de la coloration bleue a confirmé la présence des polyphénols et l'apparition d'une couleur rose intense a confirmé la présence des flavonoïdes, dans les tests chimiques [4].

IV.3. Technique d'analyse chromatographique HPLC:

Les différents extraits ont été analysés afin de comparer leurs profils chromatographiques et d'obtenir une information sur la composition de ces extraits en polyphénols en comparaison avec les différents standards.

IV.3.1. Chromatogrammes des étalons:

La quantité des ces composés a été rapportée en microgramme par un milligramme de la matière végétale équivalente en solution standard.

Les chromatogrammes d'HPLC des standards et des différents extraits sont représentés ci-dessous:

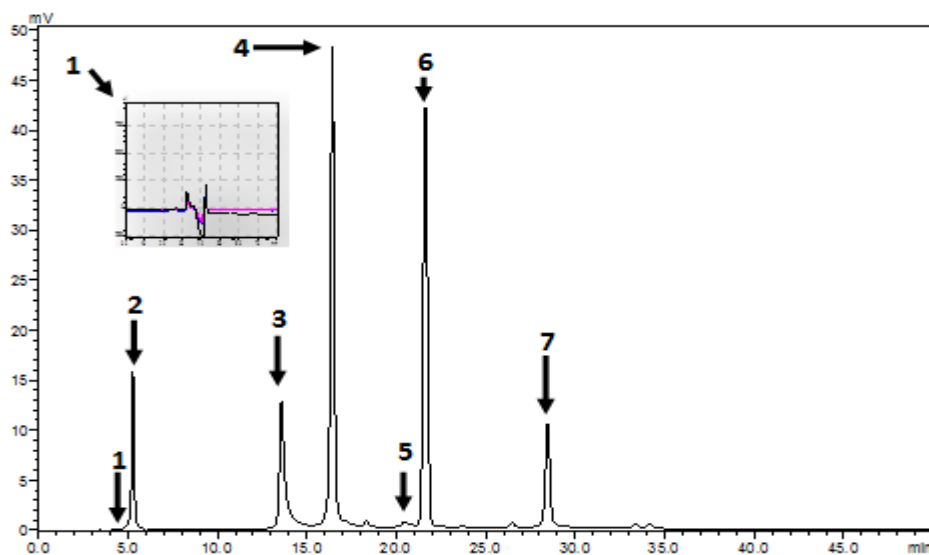


Figure (IV. 4): chromatogramme du mélange des étalons.

1: Acide Ascorbique; 2: Acide Gallique; 3: Acide chlorogénique; 4: Acide caféique; 5: Quercétine; 6: Vanilline; 7: Rutine.

Tableau (IV.4): Composés phénoliques identifiés dans les étalons.

Composés	Temps de rétention (min)	Equation de la courbe d'étalonnage	coefficient de corrélation
Acide ascorbique	4.21	$Y=211.7x+1098$	$R^2=0.9614$
Acide gallique	5.23	$Y=23616x-7232$	$R^2=0.99864$
Acide chlorogénique	13.62	$Y=39775x-1881$	$R^2=0.9983$
Acide caféique	16.3	$Y=72328x$	$R^2=0.9986$
Vanilline	21.46	$Y=82773x-1423$	$R^2=0.9984$
Quercétine	20.37	$548x-2832$	$R^2=0.996$
Rutine	28.22	$Y=24112x-1060$	$R^2=0.995$

IV.3.2. Chromatogrammes HPLC des extraits:

✓ Extraits frais :

Les chromatogrammes des différents extraits de romarin frais analysés sont représentés par les figures (IV.5 et IV.6) tandis que les résultats des analyses qualitatives et quantitatives sont rassemblés dans le tableau (IV.5).

L'analyse de ces résultats montre que dans les extraits frais, on a remarqué que les composés majoritaires identifiés dans l'extrait RGF sont: l'acide ascorbique (29.031 µg /mg), l'acide gallique (1.571 µg /mg), l'acide caféique (1.191µg /mg), l'acide chlorogénique (0.3067 µg /mg), et la Vanilline. tandis que dans l'extrait RUF contient les composés suivant: acide ascorbique (27.241 µg/mg), acide caféique (2.1937 µg/mg), acide chlorogénique (1.623 µg/mg), acide gallique (1.3619 µg/mg) et la Vanilline (0.2368 µg/mg).

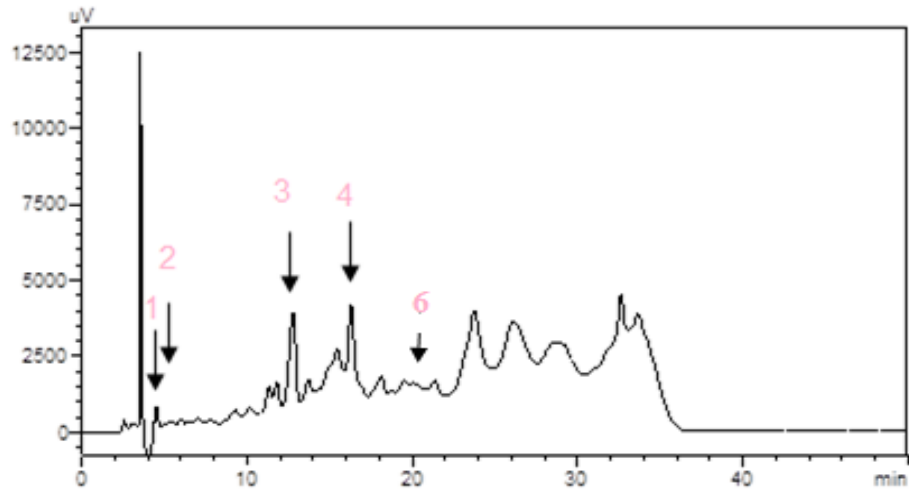


Figure (IV. 5): chromatogramme d'extraits du RGF

1: Acide Ascorbique; 2: Acide Gallique; 3: Acide chlorogénique; 4: Acide caféique; 6: vanilline.

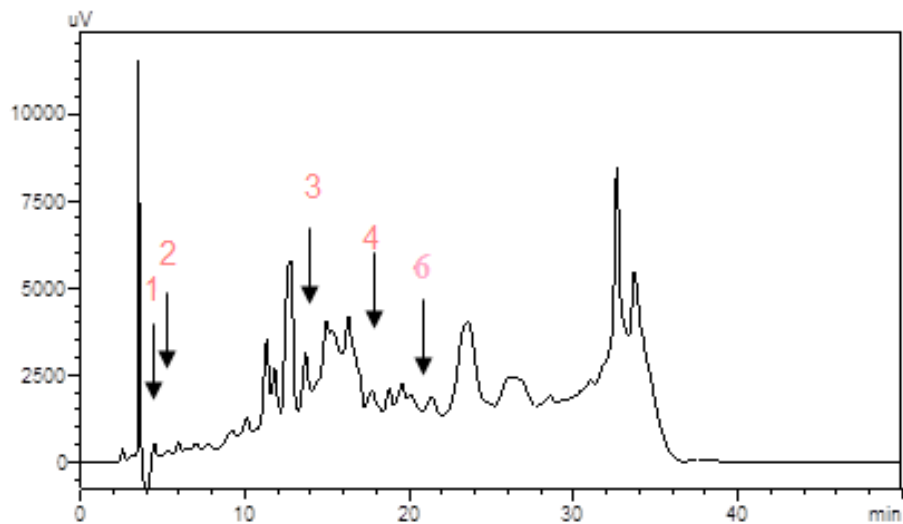


Figure (IV. 6): chromatogramme d'extraits du RUF.

1: Acide Ascorbique; 2: Acide Gallique; 3: Acide chlorogénique; 4: Acide caféique; 6: vanilline.

Tableau (IV. 5): Composés phénoliques identifiés dans les extraits du romarin frais.

Composés	Concentration (µg/mg)	
	RFU	RFG
Acide ascorbique	27.241	29.031
Acide gallique	1.3619	1.5711
Acide chlorogénique	1.624	0.3067
Acide caféique	2.1937	1.1915
Vanilline	0.2368	0.1200
Rutine	non détecté	non détecté
Quercétine	non détecté	non détecté

✓ Extraits séché :

Les chromatogrammes des différents extraits de romarin séchés sont représentés par la figure figure (IV.7):

Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés sont représentés dans le tableau (IV.6). L'analyse de ces résultats montre que dans l'extrait de RGS on a : acide ascorbique (352.550 µg/mg), acide gallique (3.069 µg /mg), acide chlorogénique (1.3903 µg /mg) et la rutine (0.300 µg/mg) tandis que dans le extrait RUS, on a les composés suivants : acide ascorbique (110.20 µg/mg), acide gallique (0.575 µg/mg), acide chlorogénique (5.892 µg/mg), acide cafeique (2.415 µg/mg) et la rutine (3.292 µg/mg).

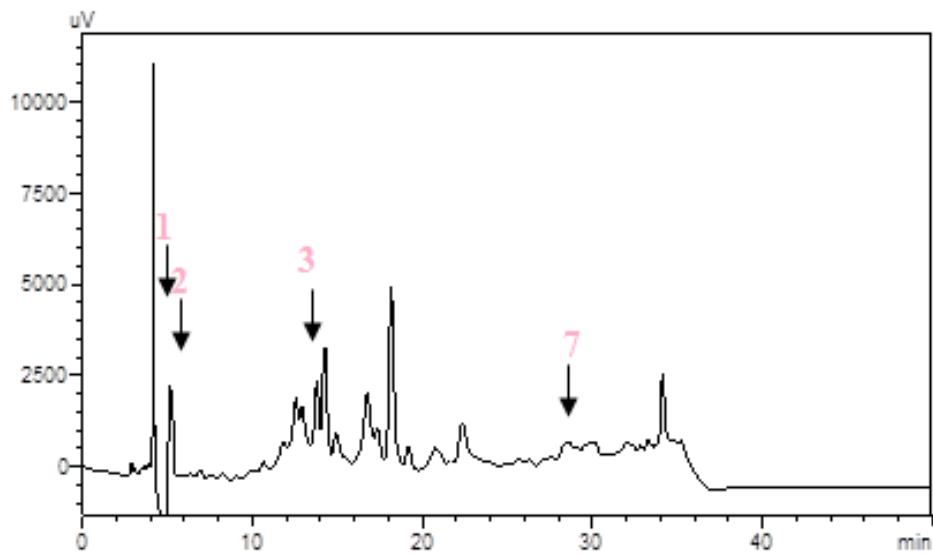


Figure (IV. 7): chromatogramme d'extraits du RGS.

1: Acide Ascorbique; 2: Acide Gallique; 3: Acide chlorogénique; 7: Rutine.

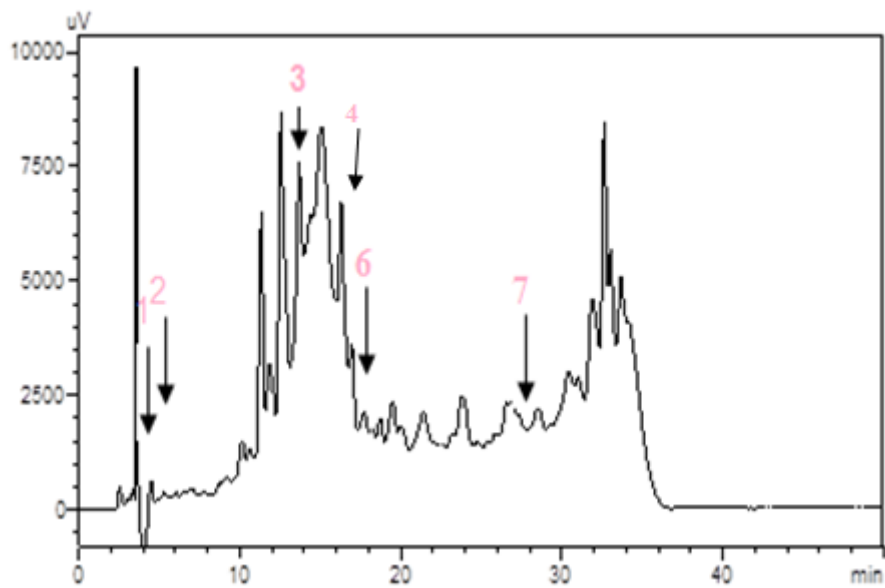


Figure (IV. 8): Chromatogramme d'extrait du RUS.

1: Acide Ascorbique; 2: Acide Gallique; 3: Acide chlorogénique; 4 :Acide caféique; 6: Vanilline; 7: Rutine.

Tableau (IV. 6): Composés phénoliques identifiés dans les extraits de romarin sec.

Composés	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
	RUS	RGS
Acide ascorbique	110.20	352.55
Acide gallique	0.575	3.069
Acide chlorogénie	5.892	1.3903
Acide caféique	2.415	non détecté
Vanilline	non détecté	non détecté
Rutine	3.292	0.300
Quercétine	non détecté	non détecté

IV.4. Evaluation de l'activité antioxydante:

Les extraits sont des mélanges de plusieurs composés, avec différents groupements fonctionnels, polarités et comportements chimiques. Cette complexité chimique des extraits pourrait mener à des résultats différents selon l'essai utilisé. Par conséquent, des analyses pourraient être effectuées pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits [5].

L'activité antioxydante est évaluée en utilisant deux méthodes: capacité antioxydante totale (CAT) et le piégeage du radical libre DPPH.

IV.4.1.Méthode de la capacité antioxydante totale (CAT):

La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg ER/g d'extrait). La courbe d'étalonnage obtenue et l'équation de la régression linéaire est représentée par la figure (IV.9).

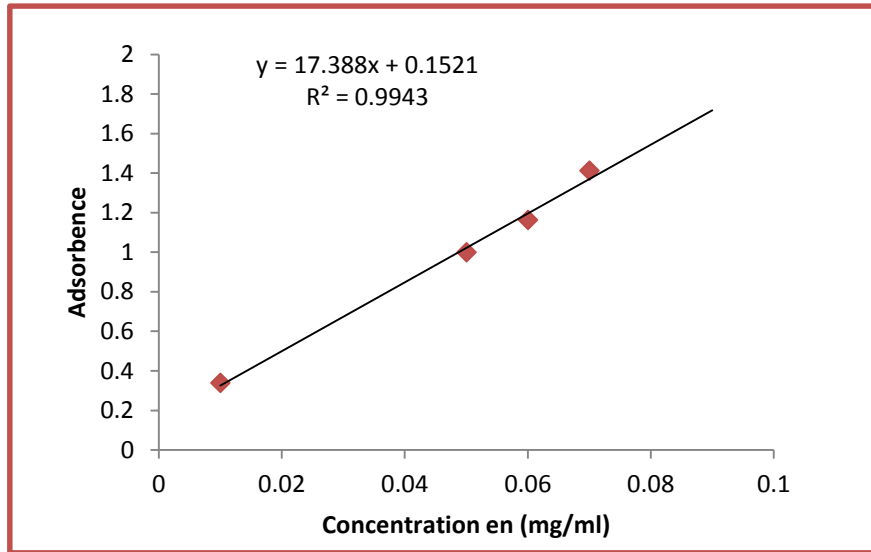


Figure (IV.9): Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique.

Le tableau (IV.7) résume les résultats obtenus des valeurs des capacités antioxydantes totales des extraits étudiés.

Tableau (IV.7): Les valeurs des capacités antioxydantes totales des extraits.

Equation $y = 17.38x + 0.152$	Extrait	La capacité d'activité antioxydante totale (mg/g) du romarin	
		Romarin Guemar	Romarin Université d'el-Oued
$R^2 = 0.994$	Frais	74.111±0.1569	13.0137±0.2020
	Seché	153.5306±0.1913	55.6584±29.1592

Les résultats montrent que tous les extraits possèdent des activités antioxydantes. Qui sont classées dans l'ordre suivant:

L'extrait RFG (74.111±0.1569 mg/g) puis l'extrait RFU (13.0137±0.2020 mg/g). pour les extraits des échantillons séchés: extrait RSG (153.5306±0.1913 mg/g) et puis RSU (55.6584±29.1592 mg/g).

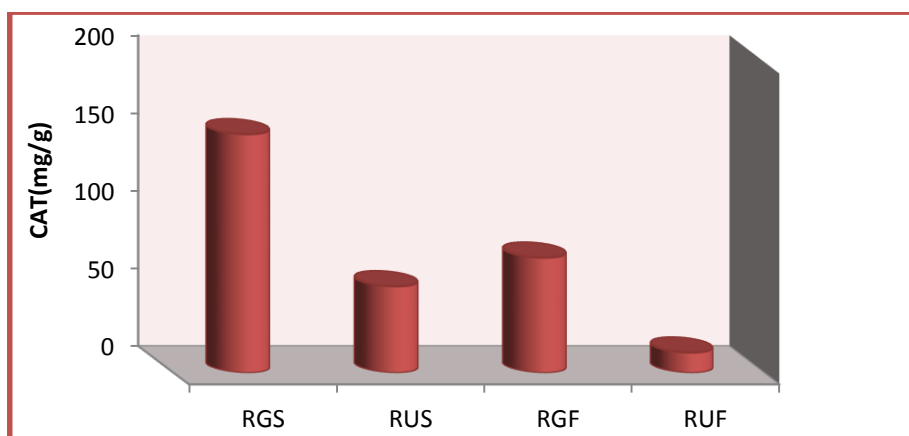


Figure (IV.10): comparaison entre CAT de différents extraits.

IV.4. 2. Test du 2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]):

L'activité anti radicalaire 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. L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés. [6]

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC₅₀, il définit comme étant la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. Les résultats sont résumés dans le Tableau (IV.8).

Tableau (IV.8): Valeurs des IC₅₀ du DPPH pour les extraits.

Extrait		Equation	R ²	IC ₅₀ (mg/ml)
Frais	RFU	y=3845x-105.8	R ² =1	0.0405
	RFG	y=3275x-16.41	R ² =0.972	0.0202
Séché	RSU	y=724.1x+45.38	R ² =0.977	6.380.10 ⁻³
	RSG	y=1130x+49.45	R ² =0.982	4.867.10 ⁻⁴

A la lumière de ces résultats, on remarque que l'extrait phénoliques de RSG possède une activité antioxydante très importante (4.867.10⁻² mg/ml) par rapport aux autres extraits,

suivi par l'extrait RSU ($6.380.10^{-3}$ mg/ml). Les deux extraits frais RFG et RFU ont des pouvoirs antioxydants convergent.

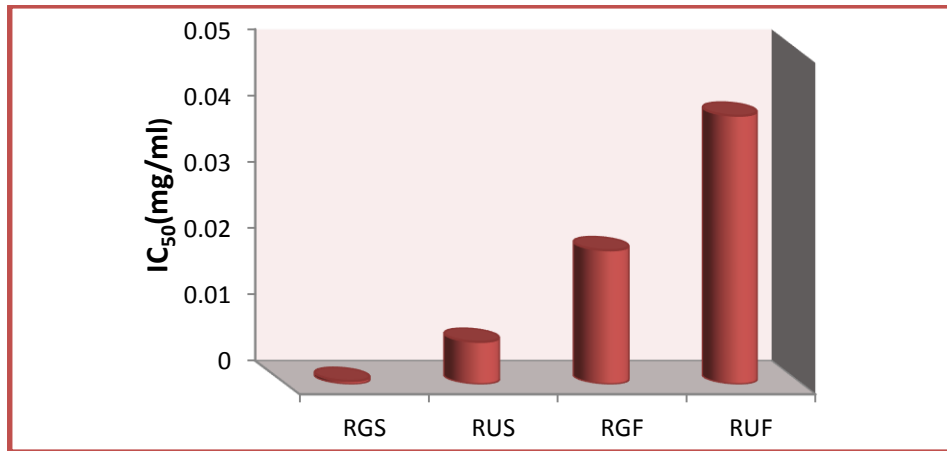


Figure (IV.11): comparaison entre IC₅₀ de différents extrais.

Les droites d'étalonnage des échantillons:

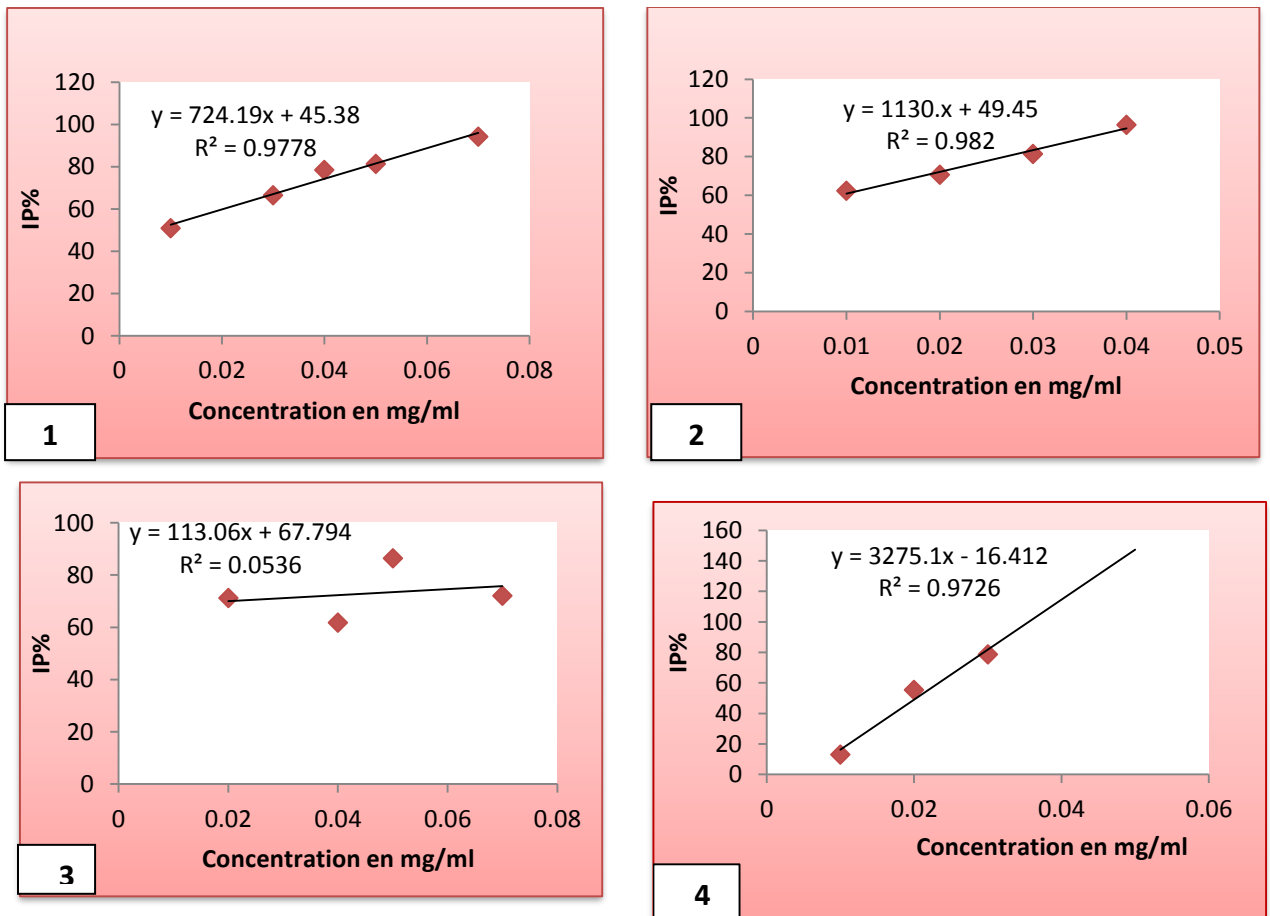


Figure (IV. 12): Les droites d'étalonnage des échantillons.

1: extrait RSU, 2: extrait RSG, 3: extrait RFU, 4: extrait RFG.

Références bibliographiques

- [1] Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A.A. (2001), "Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4083-4089.
- [2] Yakhlef, Gh. (2011), "Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *thymus vulgaris* L. et *laurus nobilis* L". Mémoire de magister, Université El-Hadj Lakhdar-Batna.
- [3] Giusti, M. M. et Wrolstad, R. E. (2001), "Anthocyanins: characterization and measurement with UV visible spectroscopy." *Current protocols in food analytical chemistry* New York: John Wiley & Sons: Unit. F1.2.1-13.
- [4] Yan, J; Guo, J; Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin, *LWT*, 41: 1060-1066.
- [5] Athamena, S. (2009) "étude quantitative des flavonoïdes des graines de *cuminum Cuminum* et les feuilles de *rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique" Thèse de magister, Université El-Hadj Lakhdar-Batna, p68
- [6] Berra, D. (2015), "Etude de l'effet du milieu d'extraction sur la composition des feuilles de *Matricaria Pubescens*". Thèse de master, Université Echahid Hamma Lakhdar EL Oued, p68.

***CONCLUSION
GÉNÉRALE***



CONCLUSION GENERALE

L'objet de notre travail était l'étude de l'activité antioxydante d'une plante médicinale qui est le romarin, on a étudié deux échantillons, l'une de la région de Gummar et l'autre cultivé à l'université d'El-Oued, on a étudié les deux cas frais et séché.

Nous avons fait l'estimation des polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux par la spectrophotométrie Uv-visible, ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante par deux méthodes. Les résultats obtenus pour l'analyse quantitative de la composition phénolique et flavonoïdes des différents extraits, confirment que ces derniers sont riches en polyphénols et en flavonoïdes. Le dosage quantitatif des polyphénols totaux, par le réactif de Folin-Ciocalteu a révélé que le romarin séché est plus riche en polyphénols par rapport au romarin frais. Le dosage quantitatif des flavonoïdes par la méthode d'AlCl₃ a révélé aussi que le romarin séché est le plus riche en flavonoïdes Par rapport à le romarin frais.

L'analyse quantitative par HPLC a montré la présence de plusieurs composés phénoliques: acide ascorbique, acide gallique, acide chlorogénique, acide caféique, vanilline, et la rutine dans la plupart des échantillons.

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante totale, on a utilisé le test de la capacité antioxydante totale (CAT) et le test du radical libre DPPH, les résultats ont été très significatifs et ont montré que l'activité antioxydante la plus élevée revient à l'extrait du romarin séché.