

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ ABDELHAMID IBN BADIS -MOSTAGANEM

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la  
Vie  
Département d'Agronomie

## MÉMOIRE

Pour l'obtention du Diplôme de

## MAGISTER EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Option: Biotechnologie végétale.

Présentée Par : M<sup>me</sup> Yahiaoui Hassiba épouse Bentata

## THÈME

### **Caractéristiques Biochimiques des Antioxydants du Romarin (*Rosmarinus officinalis*) de l'Ouest Algérien et leurs Effets sur la Conservation des Viandes**

*Devant le jury d'examen :*

M. SELSELET- ATTOU Ghenam	Président	Pr ; Université de Mostaganem
M. BOUDEROUA Kaddour	Rapporteur	MC ; Université de Mostaganem
M. BEKADA Ahmed	Examineur	MC ; Université d'Oran
M. CHERIGUENE Abderrahmane	Examineur	MC ; Université de Mostaganem

Année universitaire : 2009-2010

## ***Remerciements***

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience de mener à terme ce modeste travail.

J'adresse mes vifs remerciements à mon directeur de mémoire, Monsieur BOUDEROUA K., maître de conférences à la faculté des sciences de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem ; son encadrement, la disponibilité qu'il m'a accordée et sa bonne humeur ont été d'un concours inestimable dans la réalisation de ce travail.

Je remercie Monsieur le professeur SELSELET ATTO G. de l'université de Mostaganem d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury de ce mémoire de Magister.

Je remercie Mr BENKADA A. et Mr CHIRIGUENE A., membres de jury, d'avoir bien voulu accepter de juger ce mémoire.

J'exprime ma plus vive gratitude à Mr BENDERDOUCHE N. maître de conférences à l'université de Mostaganem, pour l'aide précieuse et chaleureuse qu'il m'a apporté au sein du laboratoire de chimie de l'environnement durant toute la période de stage.

Ma reconnaissance va également à MM Ouali M., Andaloussi H., Aziz A., Bekhti A., Bentata S., dont la collaboration a été déterminante pour la réalisation de certaines étapes de ce travail.

Je ne remercierai jamais assez MM et Mmes Gourine, Chahed, Khelafi, Nadia, Tarik, Amine, Yamina, Soumia, Amel, Karima, Meriem, Mohamed, Faiza, Samira, Wahiba, Abdelkader, Mme et Mr Ait Saada, Mme et Mr Belmehdi pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce mémoire.

## ***Dédicace***

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail à mes chers parents en guise de reconnaissance pour leur tendre affection, leurs sacrifices et leur aide inestimable ; que Dieu le tout puissant les préserve et les protège.

Ma pensée va également vers mon très cher époux BENTATA Kaddour ainsi qu'à mes deux petits garçons Yahia Imad Eddine et Mohamed Abdel Illah aux quels, je formule tous mes vœux de santé de bonheur et de réussite.

Je ne saurai oublier ma petite sœur Asmaa qui m'a encouragé à reprendre mes études ainsi que mes frères Mourad et Kamel sans oublier mes belles sœurs Samira et Narimane.

A toute ma famille, ma belle famille et mes amies je dis Merci !!

**Hassiba**

## Résumé

Le travail expérimental a porté sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* préparés à partir de feuilles séchées de romarin prélevées dans trois sites différents dans la région de Sebdou (station de Sidi El Djilali) dans la wilaya de Tlemcen et dans un seul site dans la région de Messerghine (forêt de Madagh) dans la wilaya d'Oran. Des échantillons de sol pour analyse ont été également prélevés aléatoirement sur les lieux de récolte de l'espèce étudiée.

L'analyse des extraits végétaux par CCM a révélée la richesse de *Rosmarinus officinalis* en flavonoïdes notamment des flavones de type lutéoline et ses dérivés glucosides, ce qui confirme les résultats du dosage des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu et ceux des flavonoïdes par la méthode de Lamaison et Carnat.

L'évaluation quantitative des polyphénols totaux ainsi que des flavonoïdes montre que les quatre extraits végétaux sont assez riches en polyphénols avec des valeurs qui varient entre 36 et 40 mg EAG/g d'extrait et en flavonoïdes avec des valeurs allant de 7 jusqu'à 11 mg EQ/g d'extrait. L'estimation du pouvoir antiradicalaire des quatre différents extraits végétaux vis-à-vis du radical DPPH confirme que ces extraits sont très actifs avec des valeurs  $IC_{50(DPPH)}$  qui fluctuent entre 0,03 et 0,04 mg/ml. Cette activité antioxydante à été également déterminée par le test du pouvoir réducteur des extraits méthanoliques par la méthode de Oyaizu qui a pu démontrer également que le *Rosmarinus officinalis* a la capacité de réduire les radicaux libres en les transformant en molécules stables et inactives.

Enfin, la mesure de l'indice TBA appelé aussi indice de peroxydation lipidique dans la viande hachée de bœuf adjuvée d'une unique dose de 1000 ppm d'extrait de *Rosmarinus officinalis* et conservé pendant une semaine à 2°C a donné au bout du huitième jour, des résultats significatifs de 0,52 mg de MDA /kg de viande hachée traitée à l'extrait de romarin contre 0,79 mg de MDA /kg dans l'échantillon contrôle.

D'après les résultats obtenus dans ce travail, on peut dire que l'espèce *Rosmarinus officinalis* est réellement dotée d'un puissant pouvoir antioxydant et qu'elle peut se substituer efficacement aux antioxydants de synthèse ; les résultats du test sensoriel n'ont fait que confirmer ces mêmes données.

**Mots clés :** Pouvoir antiradicalaire, Pouvoir réducteur, Composés phénoliques, TBA, *Rosmarinus officinalis*.

## Abstract

The experimental work has focused on evaluating the antioxidant activity of methanol extracts of *Rosmarinus officinalis* prepared from dried rosemary leaves collected from three different sites in the region of Sebdou station (Sidi el Djilali) in the wilaya of Tlemcen and one site in the region Messerghine (forest of Madagh) in the wilaya of Oran. Soil samples for analysis were also randomly taken from the place of harvest of the species studied.

Analysis of plant extracts by thin layer chromatography (TLC) revealed a wealth of *Rosmarinus officinalis* in flavonoids including flavones luteolin-type and glucosides derivatives, confirming the results of the determination of polyphenols by the Folin Ciocalteu method and those of the flavonoids by method of Lamaison and Carnat.

Quantitative evaluation of total polyphenols and flavonoids that shows that the four plant extracts are relatively rich in polyphenols with values ranging between 36 and 40 mg GAE / g of extract and flavonoids with values ranging from 7 to 11 mg QE/ g of extract. The antiradical power estimate of four different plants extracts vis-à-vis the radical DPPH confirm that the extracts are very active with  $IC_{50}$  (DPPH) values that fluctuate between 0.03 and 0.04 mg / ml. The antioxidant activity was also determined by the test of reducing power of méthanolics extracts by the method of Oyaizu who could demonstrate that the *Rosmarinus officinalis* also has the ability to reduce free radicals by converting them into stable and inactive molecule.

Finally, measurement of the TBA index also called index of lipid peroxidation in minced beef incorporated a single dose of 1000 ppm extract of *Rosmarinus officinalis* and kept for one week at 2 ° C was given after the eighth Updated significant results of 0.52 mg MDA / kg meat treated with rosemary extract against 0.79 mg MDA / kg in the control sample. From the results obtained in this work, we can say that the species *Rosmarinus officinalis* is really with a powerful antioxidant and can effectively substitute for synthetic antioxidants, the results of sensory test were done confirm these data.

Keywords: Antioxidant power, Reducing power, phenolics compounds, TBA, *Rosmarinus officinalis*.

# Sommaire

Introduction .....	01
--------------------	----

## Revue bibliographique

### *Chapitre I : Caractéristiques botaniques et composition chimique de Rosmarinus officinalis*

1- Historique .....	03
2- Généralités .....	04
3- Caractères morphologiques du <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	05
4- Ecologie .....	06
5- Composition chimique de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	07
5-1- L'huile essentielle .....	07
5-2- Les diterpènes phénoliques .....	08
5-3- Les acides phénoliques .....	10
5-4- Les Flavonoïdes .....	13
5-5- Les Sels minéraux.....	14
6- Actions pharmacologique de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	14
6-1- Activité antioxydante.....	15
6-2- Activité antimicrobienne .....	16
6-3- Activité antivirale .....	17
6-4- Activité antitumorale .....	18
6-5- Activité anti-inflammatoire .....	18
6-6- Activité anti- hyperglycémique.....	19
6-7- Activité anti-hépatotoxique .....	19
6-8- Activité anti-neurodégénérative .....	19
7- Les applications du romarin en médecine traditionnelle .....	19
8- Les applications du romarin dans le domaine alimentaire .....	20

Montant HT

### *Chapitre II : Radicaux libres et stress oxydatif.*

1- Les espèces réactives oxygénées (ERO) ou radicaux libres .....	22
2- Origines et différents types de radicaux libres .....	22
2-1- Le radical anion superoxyde .....	23
2-2- Le peroxyde d'hydrogène.....	24
2-3- Le radical hydroxyle (HO·) .....	24
2-4- L'oxygène singulet .....	25
2-5- L'oxyde nitrique .....	25
2-6- Le peroxyde nitrite .....	25

2-7- L'anion hypochlorite .....	26
3- Stress oxydatif et conséquences .....	26
4- Mécanismes naturels de défense contre le stress oxydatif .....	28

### ***Chapitre III : Les antioxydants et leurs utilisations en diététiques***

1- Généralités .....	31
2- Classification des antioxydants.....	31
2-1- Antioxydants phénoliques de synthèse.....	31
2-2- Les antioxydants naturels.....	32
2- 2-2-1- Les polyphénols .....	32
2-2-2-2- Les caroténoïdes .....	34
2- 2-2-3- L'acide ascorbique .....	35
2- 2-2-4- La vitamine E .....	37

### ***Chapitre IV : Viandes et problèmes liés à l'oxydation***

1- Introduction.....	41
2- Problèmes liés à l'oxydation des viandes.....	41
2-1- Les lipides et l'oxydation42	
2-1-1- L'initiation 42	
2-1-2- La propagation43	
2-1-3- La terminaison43	
2-2- Les pigments de la viande : la Myoglobine et l'oxydation48	
2-3 Les protéines et l'oxydation49	
3- Les stratégies de lutte contre l'oxydation des viandes50	

## **Partie expérimentale**

1- But.....	51
2- Analyses du sol .....	52
2-1- Matière organique .....	52
2-2- Potentiel d'hydrogène.....	52
2-3- Granulométrie.....	52
2-4- Conductivité .....	53
2-5- Dosage de l'azote total .....	53
2-6- Calcaire total .....	53
2-7- Phosphore assimilable .....	53
3- Etude phytochimique du matériel végétal.....	54
3-1- Cueillette des échantillons .....	54
3-2- Séchage et conservation des plantes .....	55

3-3- Détermination du taux de matière sèche.....	56
3-4- Dosage des cendres brutes.....	56
3-5- Dosage de la matière organique.....	57
3-6- Préparation de l'extrait végétale .....	57
3-7- Détermination du rendement à l'extraction.....	57
3-8- Dosage des poly phénols totaux de l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	61
3-9- Mise en évidence et dosage des flavonoïdes.....	62
3-9-1- Mise en évidence des flavonoïdes.....	62
3-9-2- Dosage des flavonoïdes.....	62
3-10- Chromatographie sur couche mince .....	62
4- Estimation de l'activité antioxydante des différents extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	64
4-1- Estimation de l'activité antiradicalaire des différents extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> vis-à-vis du radical DPPH .....	64
4-2- Estimation du pouvoir réducteur des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	67
5- Etude de l'effet de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur la peroxydation des viandes .....	69
5-1- Introduction .....	69
5-2- Estimation du degré d'oxydation de la viande (TBARS) .....	69
5-3- Détermination du PH de la viande .....	71
5-4- Détermination de la teneur en eau de la viande.....	72
5-5- Test sensoriel.....	72
6- Analyses statistiques.....	72

## Résultats et discussion

1-Analyses du sol .....	73
2 - Etude phytochimique de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	77
1- Matière sèche.....	77
2- Matière minérale.....	77
3- Matière organique .....	77
4- Calcul du rendement à l'extraction.....	80
5- Dosage des polyphénols totaux.....	80
6 -Mise en évidence et dosage des flavonoïdes.....	85
6-1- Mise en évidence des flavonoïdes .....	85
6-2- Dosage des flavonoïdes.....	87
7. Chromatographie sur couche mince .....	88

3- Estimation de l'activité antioxydante des différents extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	92
3-1- Estimation de l'activité antiradicalaire des différents extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> vis-à-vis du radical DPPH.....	92
3-2- Estimation du pouvoir réducteur des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	100
4- Etude de l'effet de l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur l'oxydation des viandes....	105
4-1- Indice de peroxydation lipidique (TBA).....	105
4-2- pH de la viande .....	110
4-3- Teneur en eau de la viande.....	113
4-4- Résultats du test sensoriel.....	116
<b>Conclusion</b> .....	119
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Principaux composés identifiés dans l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	13
<b>Tableau 2.</b> Le contenu en éléments minéraux des feuilles fraîches ou séchées de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	14
<b>Tableau 3.</b> Caractéristiques géographiques et bioclimatiques des placettes de la wilaya de Tlemcen et d'Oran.....	54
<b>Tableau 4.</b> Résultats de l'analyse granulométrique.....	75
<b>Tableau 5.</b> Caractérisation chimique du sol des quatre Régions étudiées.....	76
<b>Tableau 6.</b> Taux de matière sèche, minérale et organiques des feuilles de <i>Rosmarinus officinalis</i> des quatre régions de l'étude .....	79
<b>Tableau 7.</b> Aspect, couleur, et rendement à l'extraction des différents extraits méthanoliques des régions étudiées .....	80
<b>Tableau 8.</b> Taux de polyphénols et de Flavonoïdes des feuilles de <i>Rosmarinus officinalis</i> des quatre régions de l'étude.....	84
<b>Tableau 9.</b> Chromatographie sur couche mince des quatre extraits de feuilles de romarin....	90
<b>Tableau 10.</b> Activité antiradicalaire des quatre extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> étudiés et de la Quercétine .....	94
<b>Tableau 11.</b> Pouvoir réducteur des quatre extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> et de la Quercétine .....	100
<b>Tableau 12.</b> Indice TBA dans les viandes traitées et non traitées avec l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	109
<b>Tableau 13.</b> Variations du PH dans les viandes traitées et non traitées avec l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	112
<b>Tableau 14.</b> Variations de l'humidité dans les viandes traitées et non traitées avec l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	115
<b>Tableau 15.</b> Effet de l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur la couleur de la viande hachée de bœuf .....	116
<b>Tableau 16.</b> Effet de l'extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur l'odeur de la viande hachée de bœuf .....	117

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Photo de <i>Rosmarinus officinalis</i> de la région de Tinkia.....	105
<b>Figure 2.</b> Schéma représentatif d'une fleur de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	06
<b>Figure 3.</b> Structures chimiques des différents composés antioxydants identifiés dans l'extrait de romarin .....	10
<b>Figure 4.</b> Voie de biosynthèse de l'acide rosmarinique observée dans une culture en suspension de <i>Coleus blumei</i> .....	12
<b>Figure 5.</b> Origine extra et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène .....	26
<b>Figure 6.</b> Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants .....	30
<b>Figure 7.</b> Réaction des flavonoïdes avec les ERO .....	33
<b>Figure 8.</b> Transformation du radical aroxyle en quinone.....	34
<b>Figure 9.</b> Structure chimique des carotènes.....	35
<b>Figure 10.</b> Structure chimique des Xanthophylles.....	35
<b>Figure 11.</b> Structure chimique de l'acide ascorbique.....	36
<b>Figure 12.</b> Structure chimique de l' $\alpha$ - tocophérol .....	38
<b>Figure 13.</b> Les étapes de synthèse de $\alpha$ -tocophérol dans la plante .....	39
<b>Figure 14.</b> Les trois étapes de la peroxydation lipidique.....	44
<b>Figure 15.</b> Schématisation de la cinétique d'oxydation des acides gras insaturés.....	45
<b>Figure 16.</b> Régions des prélèvements des échantillons étudiés.....	55
<b>Figure 17.</b> Diagramme d'extraction des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	59
<b>Figure 18.</b> Evaporation à sec et sous pression réduite des extraits méthanoliques de <i>Rosmarinus officinalis</i> à l'aide d'un rotavapor.....	60
<b>Figure 19.</b> Forme libre et réduite du radical DPPH .....	64
<b>Figure 20.</b> Structure chimique du radical DPPH .....	65
<b>Figure 21.</b> Mécanisme possible de la réaction du malonaldehyde avec l'acide 2- thiobarbiturique .....	70
<b>Figure 22.</b> Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	81
<b>Figure 23.</b> Mise en évidence des flavonoïdes dans les quatre extraits étudiés.....	86
<b>Figure 24.</b> Droite d'étalonnage de la Quercétine .....	87

<b>Figure 25.</b> <i>Chromatographie sur couches minces des quatre extraits de feuilles de Rosmarinus officinalis</i> .....	91
<b>Figure 26.</b> <i>Spectre UV-visible du radical DPPH et l'extrait méthanolique de Rosmarinus officinalis</i> .....	92
<b>Figure 27.</b> <i>Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH</i> .....	93
<b>Figure 28.</b> <i>Activité antiradicalaire de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région de Madagh</i> .....	97
<b>Figure 29.</b> <i>Activité antiradicalaire de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région d'El Bouihi</i> .....	97
<b>Figure 30.</b> <i>Activité antiradicalaire de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région de Khelil</i> .....	98
<b>Figure 31.</b> <i>Activité antiradicalaire de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région de Tinkial</i> .....	98
<b>Figure 32.</b> <i>Activité antiradicalaire de la Quercétine</i> .....	99
<b>Figure 33.</b> <i>Pouvoir réducteur de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région de Madagh</i> .....	102
<b>Figure 34.</b> <i>Pouvoir réducteur de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région d'El Bouihi</i> .....	102
<b>Figure 35.</b> <i>Pouvoir réducteur de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région de Khelil</i> ....	103
<b>Figure 36.</b> <i>Pouvoir réducteur de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région de Tinkial</i> ..	103
<b>Figure 37.</b> <i>Pouvoir réducteur de la Quercétine</i> .....	104
<b>Figure 38.</b> <i>Formation du complexe MDA-TBA</i> .....	105

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abs	: Absorbance
AGPI	: Acide gras polyinsaturé
ANOVA	: Analysis of variance
PAR	: Pouvoir antiradicalaire
BHT	: Butylhydroxytoluène
BHA	: Butylhydroxyanisole
CE	: Conductivité électrique
°C	: Degré Celsius
CG	: Chromatographie en phase gazeuse
CG/MS	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CCM	: Chromatographie sur couche mince
DO	: Densité optique
DPPH	: 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl
DMBA	: 7,12-diméthylbenzo - $\alpha$ -anthracène
EC <sub>50</sub>	: Concentration effective à 50%
EAG	: Equivalents d'acide gallique
EQ	: Equivalents de Quercétine
EOR	: Espèces oxygénées réactives
F <sub>1</sub> et F <sub>2</sub>	: Facteurs étudiés
F <sub>1</sub> x F <sub>2</sub>	: Interaction des facteurs étudiés
HPLC	: High performance liquid chromatography
IC <sub>50</sub>	: Concentration inhibitrice à 50%
LD <sub>50</sub>	: Lethal Dose, 50%
MDA	: Malondialdéhyde
$\mu$ g	: Microgramme
MF	: Matière fraîche
MO	: Matière organique
MS	: Matière sèche
nm	: Nanomètre.
NF	: Norme française
n	: Nombre des répétitions

NS	: Effet non significatif du facteur étudié.
ISO	: Norme internationale.
pH	: Potentiel d'hydrogène.
P<0,01	: Probabilité au seuil de 1%.
P<0,05	: Probabilité au seuil de 5%.
ppm	: Partie par million.
p/p	: poids sur poids.
*	: Effet significatif du facteur étudié.
**	: Effet hautement significatif du facteur étudié.
t <sub>1/2</sub>	: Temps de demi vie.
TBHQ	: tert-butyl hydroquinone.
UV	: Ultra violet.
SOD	: Superoxyde dismutase
Rf	: Rapport frontal
RMN	: Résonance magnétique nucléaire

## INTRODUCTION

Tous les aliments, spécialement ceux qui sont riches en acides gras poly insaturés, sont exposés à l'attaque des radicaux libres et à la peroxydation lipidique. Les produits alimentaires même avec des teneurs en lipides moins de 1% sont affectés par les réactions de dégradations, principalement l'oxydation (**Miller et Krochta, 1997**).

Il est maintenant établi que les lipides oxydés pourraient avoir des conséquences néfastes sur la santé, le développement des maladies coronariennes, la carcinogenèse et même le vieillissement. En plus, l'oxydation subie par les lipides au cours de la conservation est l'une des causes majeures de la détérioration de la qualité ; celle-ci provoque des dégradations aussi bien au niveau de la flaveur, de la couleur et de la texture, que celui de la valeur nutritionnelle.

Plusieurs moyens sont employés pour maîtriser cette oxydation, tels que l'alimentation de l'animal, les conditions de transformation des viandes, l'utilisation d'antioxydants, l'optimisation de l'emballage et des conditions de conservation. Quant à l'utilisation des antioxydants, des molécules synthétiques ont été pendant très longtemps utilisés pour empêcher ou retarder la détérioration oxydative et la prolifération microbienne. Toutefois ces molécules sont sujettes à plusieurs critiques et d'interdictions par la suite pour des raisons de santé publique. Ainsi, les intérêts se sont orientés vers des sources naturelles.

Parmi ceux-ci le romarin (*Rosmarinus officinalis*), occupant 100,000 ha du territoire Algérien (**Bensebia et al., 2009**), est largement utilisé dans les régimes alimentaires de des populations des régions méditerranéennes ; il préserve les qualités nutritionnelles des produits alimentaires et leur durée de conservation en retardant la dégradation oxydative des lipides. Il est décrit comme étant une source potentielle d'antioxydant car il contient une variété de composés actifs incluant les terpènes, les polyphénols, les fibres, les protéines, les sucres, les cations, les pigments et les huiles essentielles qui peuvent jouer plus qu'une fonction dans n'importe quel aliment au quel ils sont ajoutés.

Le présent travail apporte donc une contribution à la connaissance de cette espèce à travers l'identification et le dosage des principaux composés à activité antioxydante qu'elle puisse renfermer, ainsi que l'étude de son activité antioxydante.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude expérimentale portée sur la caractérisation des principaux antioxydants du *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'effet inhibiteur ou retardateur d'un extrait méthanolique sur la peroxydation lipidique de la viande hachée de bœuf. Par ce travail nous avons fixé les objectifs suivants :

- ◆ Préparation des extraits végétaux à partir de feuilles séchées de *Rosmarinus officinalis* et le calcul des rendements à l'extraction.
- ◆ Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits végétaux.
- ◆ La mise en évidence et le dosage des flavonoïdes dans ces extraits.
- ◆ La Caractérisation biochimique par CCM (chromatographie sur couche mince) des principaux flavonoïdes présents dans les extraits de romarin.
- ◆ L'évaluation de l'activité antioxydante de ces extraits par la méthode au DPPH et celle d'Oyaizu, pour mieux évaluer la relation entre les propriétés antioxydantes observées et le contenu phénolique des différents extraits.
- ◆ Mesure de l'indice TBA afin d'évaluer l'activité antiradicalaire d'un extrait végétal sur la peroxydation lipidique de la viande de bœuf, en même temps que la mesure du pH et du taux de l'humidité de la viande.
- ◆ En fin un modeste test sensoriel concernant l'odeur et la décoloration, à été établi afin d'observer l'effet de ce même extrait sur les qualités sensorielles du produit étudié.

# **Revue bibliographique**

# ***Chapitre I :***

***Caractéristiques botaniques et  
composition chimique de  
Rosmarinus officinalis***



## 1. Historique.

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. La Chine, berceau de la phytothérapie, l'Inde, le Moyen Orient notamment au cours de l'ère arabo-musulmane, l'Égypte, la Grèce, constituent des civilisations phares pendant lesquelles les plantes aromatiques et médicinales ont pris une place de premier plan.

Depuis l'antiquité, le romarin était considéré comme une herbe sacrée. Elle était déjà connue à l'époque romaine pour ses vertus, ce qui a permis son introduction progressive vers le centre de l'Europe (**Scartezzini, 2001**). Les anthropologistes et les archéologues ont mis en évidence son utilisation en médecine, en art culinaire et en cosmétique dans l'ancienne Égypte, en Mésopotamie, en Chine et en Inde (**Stefanovits-Bányai et al., 2003**).

De longue date, le romarin est employé pour améliorer et stimuler la mémoire. Les étudiants grecs portaient des branches et des couronnes de romarin au moment des examens, alors que les étudiants romains massaient leurs tempes et leurs fronts avec de l'huile de romarin juste avant les épreuves (**Kennedy et Scholey, 2006**). Encore aujourd'hui, en Grèce, les étudiants en font brûler dans leurs chambres en cette même période (**Barnes et al., 2007**).

Cette plante est un symbole de l'amour ; elle a été utilisée dans les cérémonies de mariage et dans le culte de la déesse de l'amour, appelée Aphrodite ou Vénus (**Heinrich et al., 2006**). Le romarin avait également un lien avec la mort ; il jouait vraisemblablement un rôle dans les cultes mortuaires dans l'ancienne Égypte, où l'on trouvait des branches de romarin dans les momies. Par ailleurs, dans l'ancienne Rome, les branches de romarin et d'oliviers étaient brûlées sur les lieux d'incinération des corps (**Heinrich et al., 2006**). Aujourd'hui encore, le romarin est planté sur les tombes dans de nombreux pays (**Dafni et Lev, comm. pers. 2005**).

Le romarin était utilisé comme un type d'encens, et le nom indiqué par Dioscoride: *libanotis coronaria* ou 'crown incense', provient probablement de cette utilisation (De Cleene et Lejeune, 2003).

Plus tard, lorsque la plante a été christianisée on l'a associé à la vierge Marie ; la similitude phonétique entre «Mary» et «Marin» et ses dérivés, renforce cette hypothèse (Heinrich et al., 2006).

## 2. Généralités.

Le romarin, *Rosmarinus officinalis* communément appelé « El-Halhal » est l'une des plantes les plus populaires en Algérie, puisque on la trouve dans tous les jardins et les parcs en bordure odorante. C'est une herbe épice appartenant à la famille des labiacées, originaire du bassin Méditerranéen.

*Rosmarinus* signifie « rosée de mer » en référence à son effet rafraîchissant pour l'esprit (Kircher et Britton, 2002), mais selon Katzer (1998) le nom d'origine grecque est *rhops* qui veut dire "arbuste" et *Myron* qui signifie "baume".

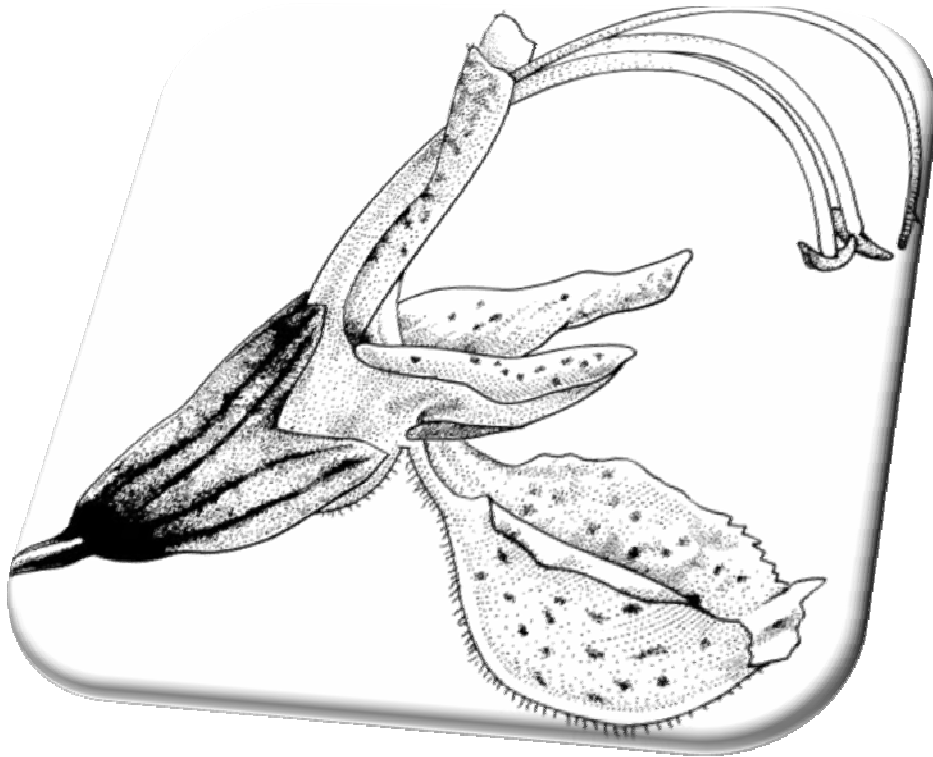
Le mot *Officinalis* vient du fait que la plante possède des propriétés officinales multiples (Jacamon, 1992).



**Figure 1** .Photo de *Rosmarinus officinalis* de la région de Tinkial (Sebdou).

## 2. Caractères morphologiques.

Le *Rosmarinus officinalis* est un arbuste semper virens, plante pérenne caractérisée par une ramification importante de type prostrée ascendante ; il peut ainsi atteindre une hauteur de 2 m et une largeur de 1 à 4 m selon la variété botanique et les conditions climatiques (**Bown et Hawthorne, 1997 ; Roccabruna, 2003**). Les feuilles sont persistantes, opposées, très étroites, très nombreuses, sessiles, entières, linéaires, à dessus vert sombre brillant et dessous blanchâtre (**Somon, 1987**). La floraison s'étend de mars à mai, les fleurs mellifères, de couleur violette, se présentent sous forme de très courtes grappes axillaires et terminales, verticillées et pourvues de petites hampes, chaque fleur est d'environ 1 cm de long (**Herrera, 2005**) (**Figure 2**).



**Figure 2.** Schéma représentatif d'une fleur de *Rosmarinus officinalis* (Herrera, 2005).

#### 4. Ecologie.

Originnaire du bassin Méditerranéen, le romarin pousse à l'état sauvage dans les îles et les régions côtières : le sud et le centre de l'Italie, le sud de la France, en Dalmatie, dans le sud et l'est de l'Espagne, au Portugal, au nord du Maroc, de la Tunisie et de l'Algérie, et en Grèce, constituant l'une des essences typiques des garrigues (Akhtar, 1994 ; Scartezzini, 2001).

Cette plante se trouve à différentes altitudes suivant les étages bioclimatiques où il est possible pour le profane de la confondre avec *Rosmarinus tournefortii* de Noé. Elle est présente dans le semi-aride tempéré à Chetouane (550m d'altitude), aux alentours de Tlemcen (600 m), au grand Bassin à (750 m) et à Lalla Setti (1025m)(Damerdji et al., 2005).

Contrairement à la quasi totalité des plantes Méditerranéenne, le romarin supporte très bien le stress des fortes lumières et résiste assez bien à la sécheresse sans que son mécanisme photosynthétique n'en soit affecté (**Munné-Bosch et al., 1998**).

## 5. Composition chimique.

D'après **Xiao et al (2008)** le métabolisme de *Rosmarinus officinalis* est dominé par 33 métabolites incluant les sucres, les acide aminés, les acides organiques, les acides et les diterpènes phénoliques, parmi eux le Quinate, l'acide *cis*-4-Glucosyloxycinnamique, le 3,4,5-Trimethoxyphenylmethanol, le 6-Hydroxyluteolin-7-glycoside et l'acide Syringique. En comparant avec l'extrait aqueux, ces auteurs ont remarqué que l'extrait méthanolique contenait un taux élevé en Sucrose, Succinate, Fumarate, Malonate, Shikimate, et en acides phénoliques, mais un niveau bas en Fructose, Glucose, Citrate, et Quinate. Récemment l'existence d'une quantité significative (2883 µg/g tissus) d' $\alpha$ -tocophérol dans les feuilles de romarin à été rapportée par plusieurs chercheurs (**Horvath et al., 2006**).

### 5.1. L'huile essentielle.

Les feuilles de *Rosmarinus officinalis* contiennent environ 50% d'une essence spéciale à odeur aromatique, composée de pinène, de camphène, de bornéol, d'acétate, de valérianate de bornyle, de cinéole et de camphre ordinaire. (**Beloued, 2001**). D'après **Salido et al (2003)** la période des récoltes est très importante pour le rendement et la qualité des huiles. Ceux, les plus élevés ont été enregistrés pendant la période de fructification (été). Sur le plan géographique, le lieu où pousse la plante, peut également contribuer à la qualité de l'huile essentielle.

Dans la région de Murcia (Espagne), **Viuda-Martos et al (2007)**, ont pu identifier trente neuf composés distincts dans l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* à raison de 89.5% : les composés majeurs sont le  $\alpha$ - pinène (36.42%), le camphore (15.65%), le 1,8-cineole (12.02%) et le camphene (11.08%). **Tomei et al (1999)** ont investi dans l'huile essentielle des fleurs et des feuilles de *Rosmarinus officinalis* collectées dans le sud de

l'Espagne ; les composés prépondérants sont le camphore (32.33%), le 1,8-cineole (14.41%) et  $\alpha$ -pinène (11.56%).

**Dellacassa et al (1999)** ont investi dans la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles d'un cultivar de *Rosmarinus officinalis* ayant poussé dans différentes régions de l'Uruguay et dans le sud du Brésil, où ils ont trouvé que l'huile d'Uruguay était riche en  $\alpha$ -pinène (37.8–46.2%) et le 1,8-cineole (13.4–13.8%), alors que celui cultivé au Brésil contenait 32.2% d' $\alpha$ -pinène et 14.7% de 1,8-cineole.

**Soliman et al (1994)** ont pu identifier au moyen de la GCMS, 43 et 37 composés dans l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des feuilles fraîches de *Rosmarinus officinalis* collectées dans les régions de Sinâï et Guiza (Égypte). La nuance entre ces deux régions, réside dans le fait que dans la première, l'huile comprend, le verberone (12.3%), le camphore (11.3%), l'acétate de bornyl (7.6%) et le limonène (7.1%). Tandis que dans la deuxième, l'huile est constituée de camphore (14.9%), d' $\alpha$ -pinène (9.3%) et de 1,8-cineole (9.0%).

**Boutekdjiret et al (1998)** ont analysé l'huile essentielle obtenue à partir des fleurs de romarin d'Algérie, dans laquelle plus de 90% des composants ont été identifiés, dont 52,4% de 1,8-cinéole et 12,6% de camphore.

## 5.2. Les diterpènes phénoliques.

Les principaux antioxydants dans *Rosmarinus officinalis* sont les diterpènes phénoliques : l'acide Carnosique et le Carnosol dont 90% de l'activité antioxydante leur est attribuée (**Lo et al., 2002**). L'extrait du romarin d'Espagne par exemple contient entre 20 et 30 % d'acide Carnosique et seulement 1 % d'acide Rosmarinique et 0,5 à 1,5% de Rosmanol (**Frutos et Hernandez –Herrero, 2005**).

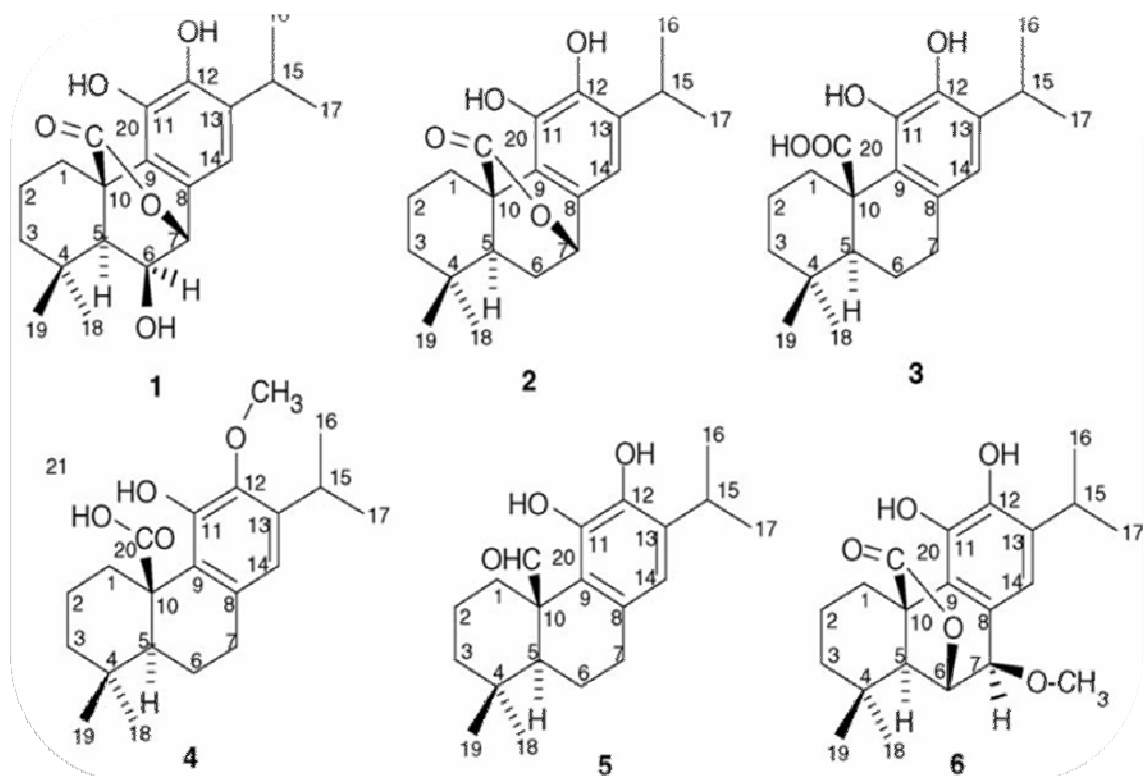
Ces molécules sont synthétisées au niveau des chloroplastes par la voie du non-mevalonate isopentenyl diphosphate, mais elles ne le sont jamais, dans les tissus non photosynthétiques (**McGarvey et Croteau, 1995**).

L'acide Carnosique provient de l'Isopenténylpyrophosphate (IPP) via le Méthyle erythritolphosphate (MEP) (Almela et al., 2006). C'est un antioxydant lipophile qui piège l'oxygène singulet, le radical hydroxyle et le radical peroxyde protégeant ainsi les membranes biologiques du phénomène de peroxydation lipidique (Haraguchi et al., 1995). Son activité antiradicalaire est due surtout à la présence, dans sa molécule, de deux groupements hydroxyles au niveau du carbone C 11 et C 12 (Richheimer et al., 1999). Il joue un rôle important dans des conditions de sécheresse et de forte luminosité qui favorisent la formation d'oxygène actif (Munné-Bosch et al., 1999).

Selon plusieurs auteurs, le Carnosol provient de la dégradation oxydative de l'acide Carnosique (Schwarz et al., 1992; Chan et al., 1995). En effet, des recherches ont démontré l'instabilité de l'acide Carnosique en présence de l'oxygène, par identification des produits découlant de sa décomposition (Inatani et al., 1983 ; Schwarz et al., 1992 ; Almela et al., 2006). Plusieurs travaux de recherches ont d'ailleurs montré que les feuilles de romarin fraîchement coupées ne contenaient pas le Carnosol ; ce n'est que lorsque ces feuilles sont soumises à des opérations d'extraction aux solvants ou que les extraits eux-mêmes sont soumis aux opérations classiques de fractionnement, d'enrichissement et de purification qu'elles en contiennent (Wenkert, 1965).

Le Carnosol se dégrade par la suite pour donner naissance à d'autres diterpènes phénoliques possédant la structure  $\delta$ -lactone ou  $\gamma$ -lactone comme le Rosmanol, l'Epirosmanol, l'Epiisorosmanol, le Rosmadial et le Methyl carnosate mais présentant toujours une activité antioxydante (Schwarz et al., 1992 ; Almela et al., 2006 ; Doolaege et al., 2007)(Figure3). Selon Ibanez (2005) le type et le nombre des produits de décomposition dépendent de l'origine, de la méthode d'extraction et des techniques d'analyses utilisées pour l'identification. Cependant les conditions d'extraction comme le solvant, la température, la verrerie influencent également la stabilité de l'acide Carnosique et celle des produits de décomposition (Thorsen et Hildebrandt, 2003).

En raison de leur caractère hydrophobe et lipophile, les Abietanes diterpènes de la famille de l'acide Carnosique sont des inhibiteurs particulièrement adaptés à la peroxydation des graisses et des huiles (Sanjust et al., 2008).



**Figure 3** .Structures chimiques des différents composés antioxydants identifiés dans l'extrait de romarin (Almela et al., 2006) 1-Epiisorosmanol, 2- Carnosol, 3- Acide Carnosique, 4- Acide 1, 2-Methoxy-Carnosique, 5-Carnosaldehyde, 6- Méthyle Ether Epirosmanol .

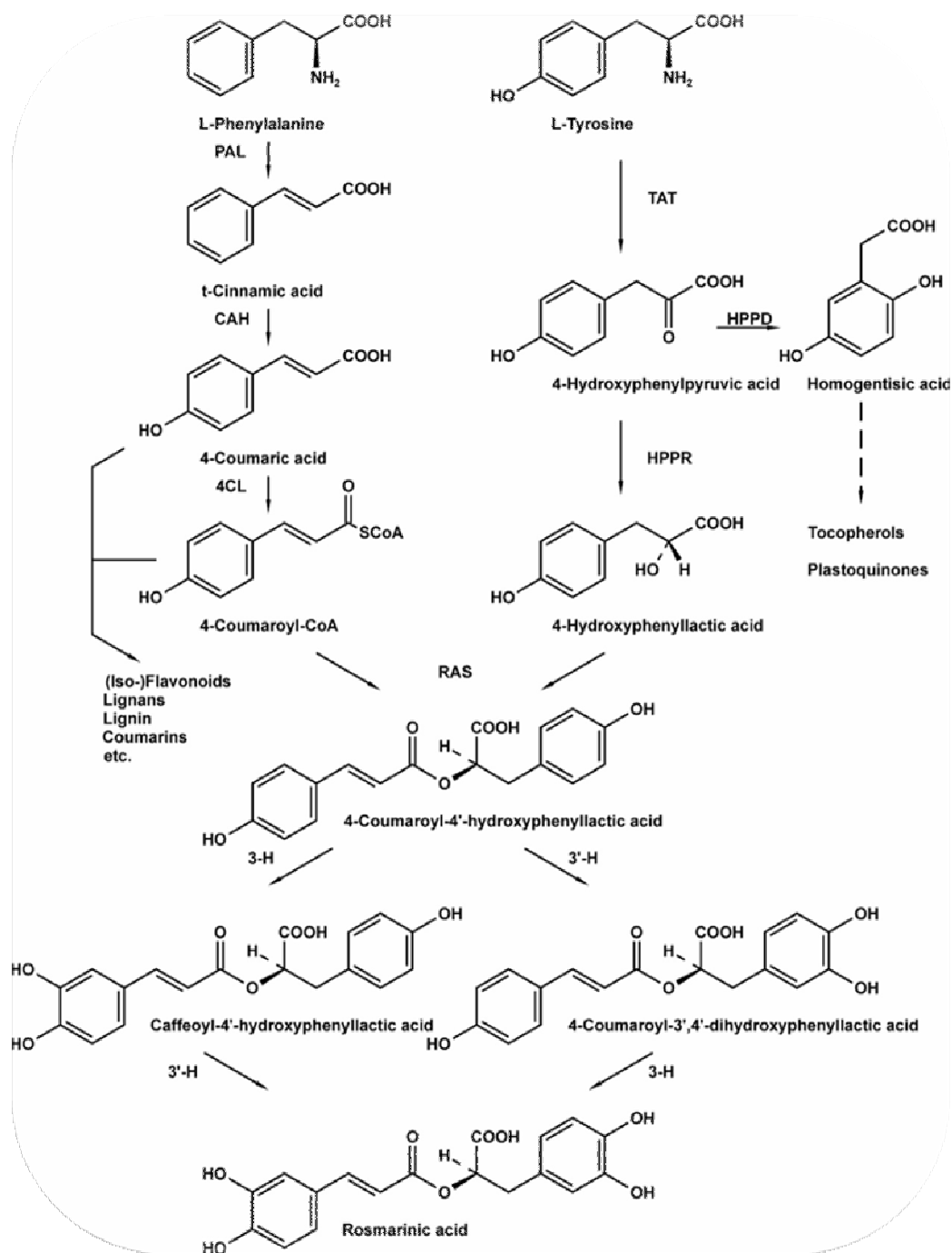
### 5.3. Les acides phénoliques.

Les principaux acides phénoliques trouvés dans les extraits de *Rosmarinus officinalis* sont l'acide Vanillique, l'acide Caféique, l'acide Chlorogénique, l'acide Rosmarinique, l'acide Quinique et l'acide Syringique (Xiao et al., 2008).

L'un des principaux acides phénoliques du romarin est l'acide Rosmarinique ; d'ailleurs Regnault-Roger et al (2004) avaient enregistré 5.67 mg d'acide Rosmarinique /g de matière sèche (43,6%) et seulement 0.87mg d'acide Caféique et ses dérivés /g de matière sèche (6,7%) dans les feuilles séchées de romarin.

**Scarpati et Oriente (1958)**, isolait pour la première fois l'acide Rosmarinique pur à partir de *Rosmarinus officinalis* d'où sont appellation ; ils ont défini sa structure comme étant un ester de l'acide Caféique et du 3,4 acide Dihydroxyphenyllactique. Actuellement il est défini comme étant un Phenylpropanoïde provenant de la Phénylalanine et de la Tyrosine (**Figure 4**) (**Petersen et Simmond, 2003**). Communément trouvé chez les Borraginacées et dans la sous famille Nepetoideae des Lamiacées (**Litvinenko et al., 1975**) et plus particulièrement dans le romarin, la mélisse, la prunelle, la sauge, la sarriette et l'origan (**Petersen et Simmond, 2003**).

Une multitude de fonctions biologiques sont attribuées à ce composé ; son principal rôle biologique chez les plantes est un rôle de défense contre les herbivores (**Bult et al., 1995**). C'est aussi un anti-inflammatoire et un antithrombotique (**Zou et al., 1993**), un antimutagène et antioxydant(**Parnham et Kesselring, 1985**). Il est efficace contre le dommage peroxydatif dans les biomembranes (**Liu et al., 1992**) et peut inhiber l'activité de la Xanthine Oxydase (**Cao et al., 2005**). Paradoxalement et d'après **Hur et al (2004)** ce composé induit l'apoptose en générant les espèces réactives à l'oxygène d'où son effet antimicrobien et antiviral (**Hooker, 2001; Mazumder et al., 1997 ; Parnham et Kesselring., 1985**). L'acide Rosmarinique est éliminé rapidement de la circulation sanguine après administration par voie intraveineuse ( $t_{1/2} = 9$  min) et montre une très faible toxicité chez les souris, avec une  $LD_{50}$  de 561 mg kg<sup>-1</sup> (**Parnham et Kesselring, 1985**).



**Figure 4.** Voie de biosynthèse de l'acide rosmarinique observée dans une culture en suspension de *Coleus blumei*. (Petersen et Simmond, 2003).

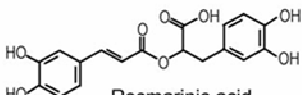
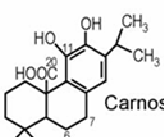
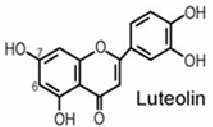
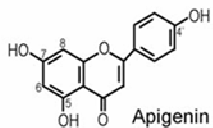
PAL=phénylalanine ammonia-lyase, CAH= cinnamic acid 4-hydroxylase, 4CL=hydroxycinnamate :coenzymeA ligase, TAT=tyrosine aminotransferase, HPPR=hydroxyphenylpyruvate reductase, HPPD=hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, RAS=hydroxycinnamoyl-CoA:hydroxyphenyllactate hydroxycinnamoyl transferase, 3-H, 3'-H=hydroxycinnamoyl-hydroxyphenyllactate 3-et 3'-hydroxylases.

## 5.4. Les Flavonoïdes.

Les lamiacées sont des dicotylédones produisant surtout des Flavones et des acides cinnamiques mais produisant moins de Flavonols ou d'Anthocyanidines, hautement synthétisées par les plantes inférieures (Harborne, 1967).

Frutos et Hernandez –Herrero (2005) et Almela et al (2006) avaient trouvé que les Flavonoïdes sont présents naturellement dans le *Rosmarinus officinalis*, principalement des Flavones de type Apégénine comme la Genkoanine et ses dérivés et le Cirsimariten. Le type Lutéoline et ses dérivés, ont été également trouvés en abondance dans cette espèce (Tableau 1). En plus de leur activité antioxydante, ces Flavonoïdes, possèdent plusieurs fonctions biologiques ; anti-mutagenèse, anti-carcinogénèse, anti-vieillessement (Choi et al., 2001).

**Tableau 1** .Principaux composés identifiés dans l'extrait de *Rosmarinus officinalis* (Almela et al., 2006).

Type of compound	Chemical structure	Related compounds (common name)
Phenolic acids	 Rosmarinic acid	
Diterpenes	 Carnosic acid	<ul style="list-style-type: none"> <li>Methyl carnosate (C<sub>20</sub>: COOCH<sub>3</sub>)</li> <li>Carnosol (δ-lactone bridge: C<sub>20</sub>-C<sub>7</sub>)</li> <li>Epirosmanol (δ-lactone bridge C<sub>20</sub>-C<sub>7</sub>; C<sub>6</sub>: -OH)</li> <li>Rosmanol (γ-lactone bridge C<sub>20</sub>-C<sub>6</sub>; C<sub>7</sub>: -OH)</li> <li>Epirosmanol (γ-lactone bridge C<sub>20</sub>-C<sub>6</sub>; C<sub>7</sub>: -OH)</li> <li>Epirosmanol-methylether (γ-lactone bridge C<sub>20</sub>-C<sub>6</sub>; C<sub>7</sub>: -OCH<sub>3</sub>)</li> <li>Rosmadial (lactone bridge C<sub>20</sub>-C<sub>11</sub>; C<sub>6</sub>=C<sub>7</sub>=CHO)</li> </ul>
Flavones	 Luteolin	6-Hydroxyluteolin 7-glucoside
	 Apigenin	<ul style="list-style-type: none"> <li>Genkwanin (7-methyl ether)</li> <li>4'-Methoxytecto-chrysin (4',7-dimethyl ether)</li> <li>Homoplantagin (6-methyl ether,7-glucoside)</li> <li>Scutellarein (6-hydroxy)</li> <li>4',5,7,8-Tetrahydroxyflavone (8-hydroxyapigenin)</li> <li>Cirsimaritin (6,7-dimethyl ether)</li> </ul>

### 5.5. Les sels minéraux.

Cette espèce s'avère être très riche en minéraux, notamment le Zn, le Mn, le Cu, et le Ca. **Ozcan (2004)** rapporte que le contenu en éléments minéraux en (mg/kg) dans le romarin se présente comme suit : Al 486, B 37.78, Ba 95.5, Ca 10899, Cr 8.93, Cu 6.66, Fe 547, K 9356, Li 0.69, Mg 3868, Mn 41.2, Ni 9.45, P 418, Sr 39.6, V 3.88 et le Zn 15.6. Alors qu'une autre étude révélait un contenu en Ca (7791.80), Fe(330.16), K(14916.23), Mg(1634.55), Na(2711.87), P(1074.60) et Zn(22.65) (**Arslan et Musa Ozcan, 2008**) (Tableau 2).

**Tableau 2.** Le contenu en éléments minéraux des feuilles fraîches ou séchées de *Rosmarinus officinalis* (mg/kg) (**Arslan et Musa Ozcan, 2008**).

Minerals	Fresh	Oven dried	Sun dried	Microwave oven dried
Al	146.48 ± 25.08 <sup>a</sup>	240.01 ± 3.03	230.60 ± 12.27	225.51 ± 9.28
B	29.58 ± 3.03	31.25 ± 5.47	46.40 ± 3.54	30.59 ± 4.99
Ba	24.05 ± 2.85	33.50 ± 2.92	40.59 ± 2019.28	39.28 ± 8.50
Ca	7791.80 ± 486.98 <sup>b</sup>	13587.76 ± 981.14 <sup>a</sup>	12343.27 ± 794.15 <sup>a</sup>	13600.26 ± 509.81 <sup>a</sup>
Co	1.06 ± 0.25 <sup>ab</sup>	2.12 ± 0.15 <sup>a</sup>	2.07 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.38 ± 0.26 <sup>b</sup>
Cr	97.36 ± 6.31 <sup>b</sup>	175.34 ± 5.55 <sup>a</sup>	153.22 ± 4.91 <sup>a</sup>	118.90 ± 1.29 <sup>b</sup>
Cu	4.07 ± 0.20	4.68 ± 0.08	4.79 ± 0.072	4.93 ± 0.19
Fe	330.16 ± 4.77	760.39 ± 71.91	534.70 ± 29.14	506.98 ± 47.86
K	14916.23 ± 510.01 <sup>c</sup>	21104.49 ± 1082.78 <sup>a</sup>	19612.54 ± 1002.55 <sup>ab</sup>	16149.88 ± 1046.51 <sup>bc</sup>
Li	4.13 ± 0.28 <sup>b</sup>	6.57 ± 0.24 <sup>a</sup>	5.92 ± 0.24 <sup>a</sup>	4.94 ± 0.28 <sup>b</sup>
Mg	1634.55 ± 36.48 <sup>b</sup>	2807.44 ± 38.52 <sup>a</sup>	2617.90 ± 25.08 <sup>a</sup>	1698.03 ± 16.25 <sup>b</sup>
Mn	14.89 ± 1.02 <sup>b</sup>	31.60 ± 1.32 <sup>a</sup>	29.00 ± 1.81 <sup>a</sup>	20.99 ± 1.02 <sup>b</sup>
Na	2711.87 ± 370.52 <sup>c</sup>	4447.87 ± 456.09 <sup>a</sup>	4377.31 ± 151.16 <sup>ab</sup>	2977.38 ± 169.75 <sup>bc</sup>
Ni	19.36 ± 0.26 <sup>c</sup>	60.35 ± 3.23 <sup>a</sup>	47.17 ± 2.32 <sup>ab</sup>	41.65 ± 1.27 <sup>b</sup>
P	1074.60 ± 144.45	4122.42 ± 191.15	2105.74 ± 129.11	2894.62 ± 183.67
Sr	74.65 ± 2.58 <sup>b</sup>	115.11 ± 7.60 <sup>a</sup>	104.02 ± 4.76 <sup>a</sup>	88.39 ± 5.58 <sup>ab</sup>
V	0.45 ± 0.02 <sup>c</sup>	1.07 ± 0.058 <sup>a</sup>	0.89 ± 0.14 <sup>ab</sup>	0.71 ± 0.06 <sup>b</sup>
Zn	22.65 ± 2.93 <sup>b</sup>	49.66 ± 1.25 <sup>a</sup>	42.44 ± 1.85 <sup>a</sup>	27.70 ± 2.64 <sup>b</sup>

### 6. Actions pharmacologiques de *Rosmarinus officinalis*.

*Rosmarinus officinalis* possède plusieurs fonctions thérapeutiques : cholagogue antispasmodique, emménagogue, anti-tumorale (**Lai et Roy, 2004**), anti-inflammatoire (**Al-Sereiti et al., 1999**), antioxydante (**Zheng et Wang, 2001**), anti-allergique (**Ito et al., 1998**), anti-dépressive (**Takeda et al., 2002**), Analgésique et antimicrobienne (**Io et al., 2002**).

### 6.1. Activité antioxydante.

L'extrait de *Rosmarinus officinalis* est un alternatif naturel aux antioxydants de synthèse tels que la BHT et la BHA car il a une activité similaire et parfois même supérieure à ces derniers (Chen et al., 1992; Cuvelier et al., 1994; Hall et Cuppett, 1997). L'étude dirigée par le Dr Estvez (2006) a permis de comparer tous les 30 jours du foie traité à l'huile essentielle de romarin avec du foie traité au butylhydroxytoluène (BHT), stockés à 4°C pendant 90 jours ; les résultats révèlent qu'à l'issue de cette période, il n'y avait aucune différence notable quant au niveau des acides gras polyinsaturés entre les deux échantillons. Toutefois, les huiles essentielles avaient un effet plus efficace sur l'oxydation des lipides : soit 52,5 % d'inhibition pour le romarin, contre seulement 28 % pour le BHT.

Les propriétés antioxydantes de l'acide Rosmarinique peuvent être mises à profit pour prévenir l'oxydation des aliments : il peut prévenir l'oxydation des stérols contenus dans l'huile d'olive vierge lors des phases de chauffage (D'Evoli et al., 2006). Son activité antioxydante a été également démontrée *in vivo*, lors du traitement des lapins avec une dose de 200 mg / kg de d'extrait de romarin pendant une semaine, qui a montré que ce dernier pouvait inhiber la peroxydation des lipides et activer les enzymes antioxydantes (Bakirel et al., 2008). Il possède par ailleurs une activité antioxydante largement supérieure à celle de la vitamine E (Lin et al., 2002). Il inhibe aussi la production d'oxyde nitrique (NO) ainsi que d'autres espèces réactives de l'oxygène et de l'azote dans les macrophages, évitant ainsi des dommages importants causés par le stress oxydant ou le vieillissement cellulaire (Sroka et al., 2005; Qiao et al., 2005).

Le Carnosol, l'acide Carnosique et le Rosmanol à des concentrations de 3 à 30 m mol/L inhibent totalement la peroxydation lipidique induite par le NADPH dans les mitochondries et les microsomes ainsi que la production de l'anion superoxyde par le système xanthine/xanthine oxydase (Barnes et al., 2007). Le Carnosol montre une

puissante activité antioxydante avec le  $\alpha, \alpha$ -diphényle- $\beta$  picrylhydrazyl (DPPH) (Lo et al., 2002). Il protège l'ADN de la réaction de Fenton (lo et al., 2002).

## 6.2. Activité antimicrobienne.

Plusieurs chercheurs manifestent de l'intérêt pour les composés biologiquement actifs, isolés des plantes et des épices pour l'élimination des micro-organismes pathogènes, en raison de la résistance développée par ces derniers aux antibiotiques.

Il a été rapporté que certains composés de l'extrait de romarin ont des propriétés antimicrobiennes (Cuvelier et al., 1996 ; Del Campo et al., 2000 ; Djenane et al., 2002; FernándeZ-Lopez, et al ., 2005). Les composés responsables de cette activité sont des diterpènes phénoliques : le Carnosol et l'acide Carnosique, l' $\alpha$ -pinène, l'acétate de bornyl, le camphore et le 1,8-cineole (Daferera et al., 2003). Le mécanisme par lequel ces molécules inhibent les bactéries, consiste à affecter le fonctionnement et la composition de la membrane cellulaire, la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des protéines, des lipides, et la fonction de la mitochondrie bactérienne (Raccach, 1984).

Les activités antimicrobiennes et antifongiques de l'huile et de l'extrait de romarin ont été mises en évidence in vitro, contre le germe pathogène *Staphylococcus aureus* dans les viandes et contre un large spectre de d'autres bactéries Gram négatif et positif tels que *Staphylococcus albus*, *vibrio cholerae*, *Escherichia coli* et *corynebacteria* (Barnes et al ., 2007).

Toutefois, Shelef et al (1980) ont constaté que le romarin inhibait davantage la croissance microbienne des organismes à gram-positif que celle à Gram négatif en expliquant ce phénomène par le fait que les bactéries à gram positif étaient plus sensibles aux changements des conditions de l'environnement externe (le pH, la température, et les extraits végétaux) car elles ne possèdent pas de membrane externe dans son enveloppe cellulaire.

Des recherches menées par FernándeZ-Lo'pez et al (2005) avaient abouti par essai de diffusion sur gélose à la conclusion que l'extrait aqueux (0.15% p/p) de romarin possédait une activité inhibitrice contre *Listeria* et les bactéries lactiques, mais

pas sur *Brochothrix thermosphacta*, alors que son huile (0,10 % p/p) montrait une importante inhibition contre un large spectre de bactéries.

Le *Rosmarinus officinalis* agit également sur la flore aérobie psychrotrophe. **Djenane et al (2002)** ont démontré que la viande de bœuf traitée à l'extrait de romarin (1000 ppm) et à la vitamine C (500 ppm) recelait un faible nombre (3 à 4 log<sub>10</sub> cfu cm<sup>-2</sup>) de bactéries contre (5 à 6 log<sub>10</sub> cfu cm<sup>-2</sup>) pour l'échantillon témoin durant toute la période d'entreposage.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de romarin contre *Propionibacterium acnes* a été observée par microscopie à force atomique (AFM). Le MIC (la concentration minimale inhibitrice) de cette huile contre cette bactérie était de 0,56 mg / mL. Des changements importants dans la morphologie et la taille de cette bactérie ont été observés en réponse à ce traitement. L'huile essentielle s'ancre d'abord sur la surface des microorganismes ; ces derniers perdent leurs formes natives, la paroi cellulaire est desquamée, le cytoplasme est largué du corps bactérien, conduisant finalement à la mort des bactéries. (**Fu et al., 2007**)

**Rasooli et al (2008)** ont révélé que 450 ppm de l'huile de romarin est suffisante pour inhiber la production d'Aflatoxine B1 (AFB1) qui est un métabolite très toxique et carcinogène généré par l'espèce *Aspergillus* dans les aliments et les cultures maraîchères. Cette huile ayant été analysée par CG et GC/MS, les composés majeurs retrouvés sont le Piperitone (23.65%), l' $\alpha$ -pinene (14.94%), le Limonene (14.89%), le 1,8-Cineole (7.43%), le Thymol (37.2%), le P-Cymene (32.3%), et le  $\gamma$ -Terpinene (27.3%).

### 6.3. Activité antivirale.

Selon **Parnham et Kesselring (1985)** l'acide rosmarinique et l'acide Carnosique possèdent des propriétés antivirales incluant le virus type 1 (HIV-1) ; par ailleurs, l'extrait de romarin (2-100 mg/ml) inhibe in vitro la formation du virus de l'Herpes simplex type 2.

#### 6.4. Activité anti-tumorale.

Il est bien prouvé que les antioxydants présentent des activités anticancéreuses non seulement en piégeant des ERO, mais aussi en augmentant la réponse immunitaire, en diminuant l'expression d'oncogènes ou en inhibant l'angio-genèse des tumeurs (Shklar, 1998).

**Singletary et Nelshoppen (1991)** rapportent que l'administration de 1% d'extrait de romarin à des femelles rats (Sporague-Dawley) pendant 3 semaines avant l'ingestion de l'unique dose de DMBA, réduit l'incidence des tumeurs des glandes mammaires de 47% après 16 semaines de la date de l'inoculation du produit. Ils avancent également que l'application locale de l'extrait de romarin, le Carnosol et l'acide Ursolique sur des peaux de souris inhibe la formation de liaison covalente entre le Benzo - $\alpha$  -pyrène et l'ADN épidermique, une tumeur engendrée par le 7,12-Dimethylbenzo - $\alpha$  -anthracène (DMBA). Parallèlement **Barnes et al (2007)** affirment que l'extrait de romarin à une concentration de 50  $\mu$  g/ml inhibe jusqu'à 87% les cellules cancéreuses KB, et que ses huiles volatiles (1.2-300 mg/ml) sont toxiques vis à vis des cellules leucémiques L-1210.

#### 6.5. Activité anti-inflammatoire.

Les concentrations élevées en oxyde nitrique (NO) sont produites par induction de la NO synthase (iNOS) en cas d'inflammation et de certains stades de la carcinogenèse; le traitement des macrophages des souris au Carnosol, réduit remarquablement le taux des lipopolysaccharides, stimulatrices de la production du NO (Lo et al., 2002). L'application locale de l'extrait méthanolique du romarin (3,6 mg/ml) sur des souris deux fois par jour pendant quatre jours, inhibe l'inflammation de la peau et l'hyperplasie causée par le 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acétate (TPA) (Barnes et al., 2007).

### **6.6. Activité anti- hyperglycémique.**

Le *Rosmarinus officinalis* est utilisé en médecine traditionnelle populaire turque pour le traitement de l'hyperglycémie ; Une étude portant sur l'effet des différentes doses d'extrait de romarin (50, 100, 200 mg/kg) administrées a deux lots de lapin, l'un hyperglycémique et l'autre normal, à révélé que la dose de 200 mg/kg a un effet hypoglycémique optimal chez tous les lapins et que cette activité est indépendante de l'effet de l'insuline (**Bakirel et al ., 2008**).

### **6.7. Activité anti-hépatotoxique.**

**Setelo-Felix et al (2002)** ont pu vérifier les résultats de **Hoefler et al (1987)** et **Joyeux et al (1990)** mentionnant que l'extrait de romarin apaise les intoxications hépatiques chez les rats, induites par le tétrachlorure de carbone.

### **6.8. anti-neurodégénérative.**

**Fawcett et al (2002)** ont pu vérifier que l'extrait de romarin agit, en empêchant les dommages oxydatifs causés par les radicaux libres au niveau des récepteurs neuronaux mAChR (muscarinic acetylcholine receptor), responsables de la mémoire et de la lecture. **Diego et al (1998)** ont évalué grâce à l'EEG les effets du romarin pendant une durée de 3 minutes d'aromathérapie sur 40 participants et ont noté une augmentation de la vigilance, une réduction de l'anxiété. Il a été remarqué également que les candidats effectuaient les calculs mathématiques plus rapidement.

## **7. Les applications du romarin en médecine traditionnelle.**

Selon l'organisation mondiale de la Santé, environ 70-80% de la population mondiale dépendent pour les premiers soins de la médecine non conventionnelle (**Souza et al ., 2008**). Ainsi, les plantes médicinales sont devenues, en peu de temps, le secteur de l'industrie pharmaceutique connaissant la plus forte croissance annuelle (15 à 20 %) (**Small et Catling, 2000**).

En médecine traditionnelle, le romarin était utilisé comme cholérétique et diurétique. Ses huiles essentielles ont été utilisées pour la préparation des produits

cosmétiques de haute qualité, insectifuges et pour le traitement des troubles gastro-intestinaux mineurs (Kovar et al., 1987).

La coopérative scientifique européenne de la phytothérapie a recommandé l'usage interne de feuilles de romarin, pour l'amélioration des fonctions hépatiques et biliaires, et le traitement des problèmes de dyspepsie. Elle a recommandé son usage externe comme traitement adjuvant pour les douleurs rhumatismales, les troubles circulatoires périphériques, la cicatrisation des plaies ainsi que comme un antiseptique doux (European Scientific Cooperative on Phytotherapy. 1997; British Herbal Medicine Association. 1996).

Le *Rosmarinus officinalis* entre dans la composition d'extraits et de lotions pour fortifier le cuir chevelu ; ainsi l'huile de romarin en combinaison avec les huiles, de thym, de lavande et de cèdre de bois, améliorent la croissance des cheveux jusqu'à 44%, 7 mois après le traitement de l'alopecie areata (Natural Medicines Comprehensive Database).

## 8. Les applications du romarin dans le domaine alimentaire.

Le traitement de la viande par le romarin et les conservateurs (nitrate, nitrite, sucre et sel) était connu depuis le milieu des années 1920 (Tompkins, 1986). Actuellement, il est considéré comme un agent aromatique, et classé par le conseil de l'Europe comme une source naturelle d'arômes alimentaires, catégorie N 2, ce qui indique qu'il peut être ajouté aux aliments à des petites quantités limitées en principe actif, encore indéterminé dans le produit final (Barnes et al., 2007) ; et ce, bien qu'auparavant, le romarin était inscrit comme GRAS ("Generally Recognized As Safe") (Pokorny', 1991).

Suite à une étude portant évaluation du potentiel de toxicité d'un extrait de romarin sur des rats (Wistars), soumis à un gavage oral en dose unique de 2 mg / kg de poids corporel, l'extrait de romarin a été bien toléré sans mortalité ni effets indésirables observés au cours de la période d'essai de 2 semaines : Pas de signes anormaux, pas de troubles de comportement, ni modification du poids corporel, ni de changement dans les habitudes alimentaires ou la consommation d'eau. Il n'y avait également aucune

variation dans la composition chimique du sérum et du sang, dans le poids des organes et les caractéristiques histologiques. L'extrait de romarin semble avoir une faible toxicité, les doses orales létales (DL<sub>50</sub>) pour les rats mâles et femelles étant supérieures à 2 mg / kg de poids corporel (**Anadón et al., 2008**).

Ces antioxydants naturels peuvent faire éviter aux consommateurs les problèmes de santé engendrés par les antioxydants de synthèse tels que la BHT et la BHA qui peuvent s'avérer parfois toxiques (**Aruoma et al., 1992**). D'ailleurs, au Brésil, l'utilisation de ces derniers est formellement interdite par la législation de la nutrition, le romarin étant ajouté aux produits à base de viande comme simple épice (**Nassu et al., 2003**). En fait, il est la seule plante commercialement disponible, utilisée comme un alternatif naturel aux antioxydants synthétiques en Europe et aux États-Unis (**Bozin et al., 2007**).

Ces additifs sont facilement tolérés par les consommateurs ; ils sont considérés comme naturels et inoffensifs, mais présentent l'inconvénient d'être souvent chers à l'état pur ; modifient la couleur et donne souvent un arrière goût aux produits (**Brookman, 1991 ; Pokorny' 1991**).

Plusieurs chercheurs ont étudié l'effet antioxydant de l'extrait de romarin dans les produits à base de viandes : dans les saucisses de dinde (**Barbut et al., 1985**), dans la viande de bœuf (**St. Angelo et al., 1990**), les produits restructurés (**Pizzocaro et al 1994**), les produits à base de poisson (**Wada et Fang, 1992**), les gelées de bœuf à faible teneur en gras (**Butler et Larick, 1993**).

Par ailleurs d'autres recherches se sont focalisées sur l'ajout direct de romarin aux aliments de bétail. **O'Grady et al (2006)** affirment que l'addition directe de 1000 ppm de romarin et de 1000 ppm de catéchines de thé, au régime alimentaire de bétail, améliore significativement la stabilité de la couleur et celle des lipides dans les pâtés à base de viande de bœuf.

Les feuilles de romarin sont utilisées aussi en pâtisserie, en confiserie, et pour la préparation de certaines boissons non alcoolisées (**Arslan et Musa Ozcan, 2008**). De nos

jours, l'extrait de romarin purifié se vend sous forme liquide ou en poudre (**Mielnik et al., 2003**).

# ***Chapitre II :***

***Radicaux libres et stress oxydatif.***



## 1. Les espèces réactives oxygénées (ERO) ou radicaux libres.

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, molécules, morceaux de molécules ou simples atomes, capables d'avoir une existence indépendante, contenant un ou plusieurs électrons célibataires (**Halliwell, 1996**). Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente, pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction d'oxydoréduction avec perte ou gain d'un électron à partir d'un composé non radical (**Kocchilin-Ramonatxo, 2006**).

Ce sont des espèces chimiques instables très réactives possédant un temps de demie vie extrêmement court ( $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  S) (**Tessier et Marconnet, 1995**). L'instabilité des ERO rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques. Leurs constantes de vitesse réactionnelle varient selon leurs natures, étant très élevées et pouvant aller de 105 à  $10^{10}$  mol<sup>-1</sup>L s<sup>-1</sup> (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).

In vitro, des modèles de culture mettent en évidence leur rôle dans la croissance cellulaire et, à plus fortes concentrations, dans le déclenchement de l'apoptose (**Halliwell, 1996**) ; ils jouent également un rôle physiologique important dans la phagocytose des bactéries par les cellules polynucléaires (**Swain et al., 2002**), ainsi que dans la signalisation intracellulaire ; l'expression de cytokines, le contrôle du volume cellulaire, la chémo-attraction, et la régulation de la synthèse protéique (**Berger et Chioléro, 2001**).

## 2. Origines et différents types de radicaux libres.

Les radicaux libres oxygénés (RLO) sont le résultat normal des processus métaboliques et immunitaires de notre organisme : Les allergies, la détoxification, l'activité physique intense, les mécanismes de défense du système immunitaire, l'inflammation, la production d'énergie, le stress, les blessures et le vieillissement sont tous des facteurs d'oxydation des cellules. D'autres facteurs extérieurs comme une alimentation dénaturée, les eaux chlorées, les drogues, l'alcool, la fumée de cigarette, les gras rances, les médicaments, les métaux lourds et les polluants environnementaux sont aussi des sources de radicaux libres (**Rouillard, 2003 ; Afonso et al., 2007**) (**figure 5**).

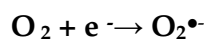
L'oxygène, indispensable à la vie, est un radical libre ; il possède deux électrons non appariés, ce qui explique sa grande réactivité. Cependant, la plupart des réactions oxydatives qu'il est susceptible de provoquer spontanément dans un organisme humain sont extrêmement lentes, d'où sa faible toxicité (Novelli, 1997 ; Cohen, 2002).

Les autres radicaux libres sont le produit biologique de la réduction de cette même molécule d'oxygène (Williams et Jeffrey, 2000). Au cours du processus respiratoire l'oxygène moléculaire se transforme en molécule d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale ; sa réduction en eau n'est toutefois pas parfaite car 2 à 3 % de ce dernier sont transformés en espèces réactives particulièrement réactionnelles (Koppenol, 2001).

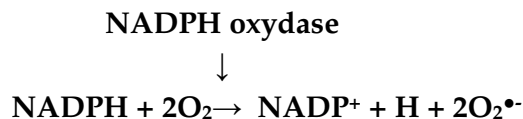
L'appellation dérivée réactives de l'oxygène ou espèces réactives à l'oxygène n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hydroxyl ( $OH^{\bullet}$ ), monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le peroxyde d'azote ( $ONOO^{\bullet-}$ ) (Novelli, 1997).

### 2.1. Le radical anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ).

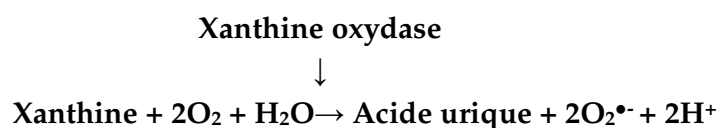
Est issu de la réaction de l'oxygène avec un électron, souvent au niveau de sa chaîne de transport dans la membrane mitochondriale. Parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l' $O_2^{\bullet-}$  constitue la première forme radicalaire capable d'agresser les composantes cellulaires et matricielles (Afonso et al., 2007).



Il est produit éventuellement au cours de la lutte des leucocytes contre les bactéries et les virus lors de la phagocytose grâce à la NADPH oxydase présente dans la membrane plasmique des phagocytes. Cette enzyme normalement dormante est activée lorsque la cellule phagocytaire est stimulée pour produire l' $O_2^{\bullet-}$ . Cette production est à l'origine de la synthèse de molécules comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou l'hypochlorite ( $ClO^{\bullet-}$ ), indispensables à la digestion du matériel phagocyté (Berger, 1997)

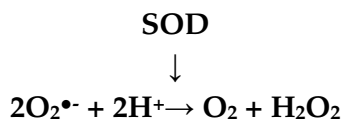


Le système enzymatique xanthine / xanthine oxydase est également considéré comme une source biologique importante des radicaux superoxydes. En effet, en présence d'oxygène la xanthine oxydase catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi le radical superoxyde (Hennebelle, 2006).



## 2.2. Le peroxyde d'hydrogène.

Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se forme par la dismutation spontanée ou enzymatique du radical superoxyde. La dismutation enzymatique est catalysée principalement par la superoxyde dismutase (SOD), évitant ainsi la formation de dérivés plus toxiques comme la peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) ou le radical hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ) (Afonso et al., 2007).



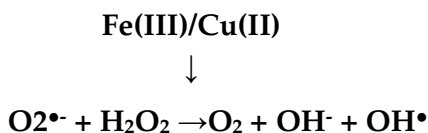
Aussi l'anion radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) avec l'apport d'un autre électron, devient un ion peroxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$  qui, à son tour, additionné de deux ions d'hydrogène ( $2\text{H}^+$ ), produit le  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## 2.3. Le radical hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ).

C'est l'espèce chimique la plus réactive, car elle joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique ; elle est le produit de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec des ions métalliques comme par exemple  $\text{Fe}^{2+}$  (réaction de fenton).



Le peroxyde d'hydrogène peut également réagir avec le radical superoxyde aboutissant, là encore, à la production du radical hydroxyle. Ce mécanisme réactionnel porte le nom de réaction d'Haber Weiss.



En situation physiologique, la concentration libre du fer ou du cuivre est particulièrement basse, ces métaux étant séquestrés par des protéines spécialisées, de sorte que cette réaction ne peut avoir lieu. En revanche, les destructions cellulaires : l'hémolyse, la rhabdomyolyse, la cytolysse hépatique... etc., entraînent une libération de ces métaux pouvant engendrer un stress oxydatif (**Fontaine, 2007**).

#### 2.4. L'oxygène singulet ( $1\text{O}_2$ ).

Il est produit en présence du rayonnement UV. Il est à l'origine du vieillissement cutané, de la cataracte, de la dégénérescence maculaire liée à l'âge et de certains cancers de la peau (**Hennebelle, 2006**).

#### 2.5. L'oxyde nitrique ( $\text{NO}^\bullet$ ).

Produit par la NO synthétase, est un vasodilatateur physiologique, et joue aussi le rôle de messenger inter neuronal (**Hennebelle, 2006**).

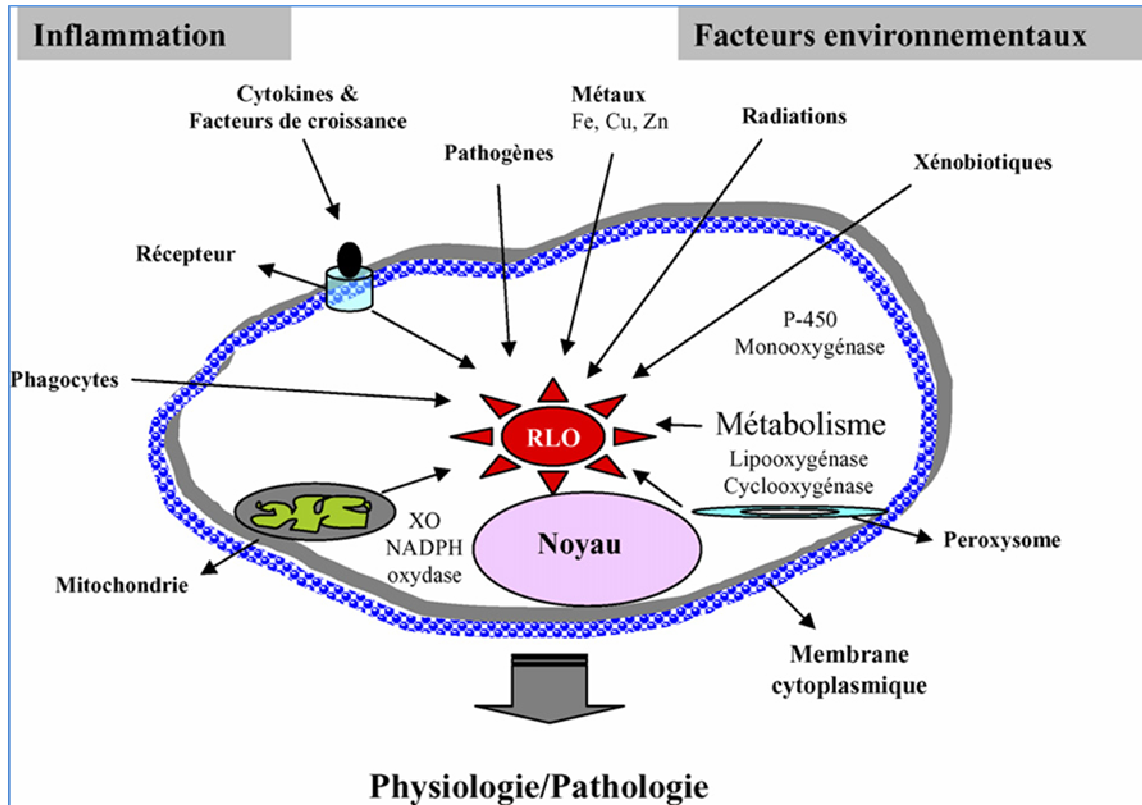
#### 2.6. Le peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ).

Est issu de la réaction entre  $\text{O}_2^{\bullet-}$  et  $\text{NO}^\bullet$ . Il est très néfaste pour les protéines et les gènes comme il est impliqué dans beaucoup de maladies comme : l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, la polyarthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires chroniques (la maladie de crohn) (**Hennebelle, 2006**).

#### 2.7. L'anion hypochlorite ( $\text{ClO}^-$ ).

Est produit à partir de peroxyde d'hydrogène par la myéloperoxydase (MPO). Il n'est présent que lors d'une infection et peut participer au stress oxydatif lié à celle-ci (**Hennebelle, 2006**).

Il existe d'autres radicaux libres tels que le radical peroxy ( $\text{ROO}^\cdot$ ). Les hydroperoxydes organiques ( $\text{ROOH}$ ) et les radicaux alcoyles ( $\text{RO}^\cdot$ ).



**Figure 5.** Origine extra et intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène. XO : xanthine oxydase ; P-450 : cytochrome P-450 (Afonso et al., 2007).

### 3. Stress oxydatif et conséquences.

En situation physiologique, il y a un équilibre parfait entre la production d'ERO et les systèmes de défenses antioxydantes. Un stress oxydant se définira lorsqu'il y aura un déséquilibre profond entre antioxydants et prooxydants (Pincemail et al., 2002).

Plusieurs cas peuvent engendrer des déséquilibres; soit dans des conditions de stress (la fumée du tabac, la pollution, le soleil, un effort physique intense, etc.) auquel cas, l'oxydation augmente au point de ne pas pouvoir être régulée, Soit dans des conditions de mauvaise alimentation lors desquelles, les quantités d'antioxydants apportés ne sont pas suffisantes pour rétablir l'équilibre (Rouillard, 2003).

Cette situation peut résulter aussi d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (ischémie-reperfusion, vieillissement), d'une activation de systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines, ...) (**Pincemail et al., 2002**).

En effet, pour se stabiliser les radicaux libres cherchent à arracher un électron à d'autres molécules. Or, lorsqu'une substance perd un électron, elle est endommagée et cherche à son tour à remplacer l'électron manquant. La réaction en chaîne ainsi créée affecte l'intégrité des cellules du corps humain (**Goudable et Favier, 1997**).

Lorsque les radicaux libres sont présents dans le corps de façon raisonnable, l'organisme peut contrer leur effet, mais s'ils sont trop nombreux ils causent un vieillissement précoce et plusieurs maux comme l'arthrite, l'asthme, les AVC (**Berger, 1997**), la stérilité, les maladies cardiovasculaires et le cancer (**Rouillard, 2003**). Selon **Passwater (1995)** dans son livre « Lipoic Acid, the Metabolic Antioxydant », les radicaux libres peuvent entraîner environ 80 maladies reliées au vieillissement.

Certains radicaux libres comme les peroxydes ( $\text{ROO}^-$ ) ou les hydroxydes ( $\text{HO}^-$ ) sont extrêmement agressifs, car ils sont impliqués dans les modifications oxydatives des protéines, ce qui peut entraîner leur fragmentation chimique, ou à leur susceptibilité accrue à l'attaque protéolytique (**Stadtman, 1986**). Cette oxydation est un agent causal possible de plusieurs maladies liées au vieillissement telles que la maladie d'Alzheimer (**Inoue et al., 2006**), la dégénérescence maculaire liée à l'âge (**Gritz et al., 2006**), la cataracte (**Vinson, 2006**) et la maladie de parkinson (**Ahmed et al., 2006**).

Dans le cas des enzymes, l'oxydation entraîne une modification ou perte de l'activité biologique de la molécule, ce qui provoque des désorganisations cellulaires parfois irréversibles entraînant la mort de la cellule (**Rolland, 2004**).

Les ADN sont particulièrement sensibles à l'action des radicaux hydroxyles ; il a été calculé que l'ADN d'une seule cellule subit par jour plus de 10.000 attaques radicalaires (**Pincemail et al., 1998**). En réagissant avec les acides nucléiques, les radicaux libres induisent des erreurs dans le génome de la cellule; par conséquent la lecture génétique du noyau est faussée et peut être une cause d'aberrations (**Palmer et Paulson, 1997**), ce qui peut expliquer le processus cancérigène des différents organes (**Pryor, 1987**).

Sous l'action des radicaux libres, les membranes cellulaires composées de phospholipides sensibles vont donc se désorganiser et permettre la libération de certaines molécules type pentane et aldéhyde qui y sont normalement imbriquées. Ces molécules en grandes quantités, sont extrêmement toxiques pour la cellule et peuvent entraîner sa mort ; c'est particulièrement le cas des cellules neuronales riches en composés lipidiques tels que la myéline.

Cette réaction provoque aussi la dissociation des lipoprotéines à faible densité dans le sang et génère un dépôt de lipides oxydés dans les vaisseaux sanguins, pouvant ainsi donner naissance à des composés carcinogènes très néfastes pour l'organisme (**Favier, 2003**). Parallèlement, l'attaque des phospholipides membranaires modifie leur fluidité et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs (**Favier, 2003**).

#### **4. Mécanismes naturels de défense contre le stress oxydatif.**

Tout au long de leur évolution, les mammifères ont acquis des mécanismes de défense contre l'oxydation, la plupart étant génétiquement programmés. Malheureusement environ 1% des ERO produites échappent au contrôle cellulaire (**Berger, 1997**). Ces systèmes de défense sont composés d'enzymes, de molécules antioxydantes et de protéines.

La superoxyde dismutase (SOD) convertit le radical anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical libre très dangereux, en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), moins toxique. Ce dernier est soit dismuté en oxygène et eau grâce à la catalase, soit transformé en eau lors d'une réaction couplée à l'oxydation du glutathion GSH (**Cuendet, 1999**).

La glutathion peroxydase (GPx) détruit le peroxyde d'hydrogène mais aussi tous les peroxydes lipidiques ROOH. Il s'agit d'une sélénoenzyme (Se-GPx) utilisant le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur, localisé dans le cytosol et les mitochondries cellulaires (**Pincemail et al., 1998**).

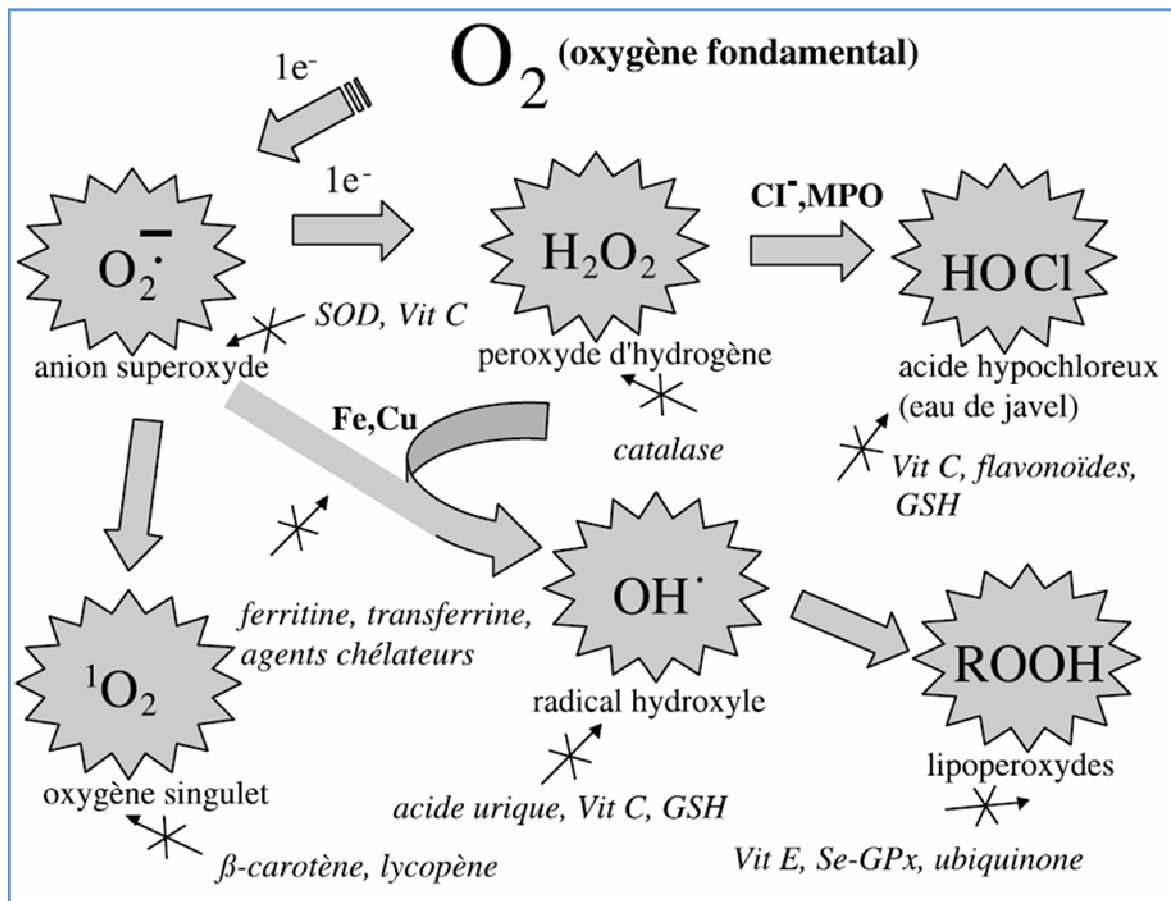
Différentes protéines de stockage et de transport (myoglobine, transferrine, ferritine, céruléoplasmine, carnosine, ansérine), peuvent séquestrer une grande partie des métaux de transition comme le fer, lui-même fortement impliqué dans les phénomènes de stress oxydatif. En effet l'organisme dispose d'un système de régulation génétique nommé « iron switch », qui active les gènes responsables de la production de la ferritine, et inhibe les gènes codant pour le récepteur de la transferrine, évitant ainsi l'entrée du fer dans la cellule (**Renerre, 2000**).

Il existe aussi dans l'organisme et à l'état naturel des antioxydants « casseurs de chaîne » comme les vitamines A, C et E, les caroténoïdes, les flavonoïdes, les folates, les ubiquinones, les thiols, les amines, les polyamines et les nucléotides (**Michiels et al., 1994 ; Pincemail et al., 2002**) (figure 6).

Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases, empêche l'accumulation respective dans la cellule, de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (**Pincemail et al., 2002**)

Paradoxalement, par réaction avec les radicaux libres, certains antioxydants deviennent à leur tour des entités radicalaires théoriquement inoffensives. C'est le cas de la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) lorsqu'elle réagit avec les radicaux d'origine lipidique pour empêcher le processus de peroxydation lipidique de se développer. Si le flux de

radicaux libres formé est trop important, le radical tocophéryl peut toutefois devenir prooxydant et contribuer ainsi à augmenter la peroxydation lipidique et jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose (Thomas et Stocker, 2000).



**Figure 6.** Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Pincemail et al., 2002).

# ***Chapitre III :***

***Les antioxydants et leurs utilisations en diététiques***

## 1. Généralités.

Les antioxydants sont des composés qui, lorsqu'ils sont présents dans les aliments en petites concentrations, comparés à celle du substrat oxydable, retardent ou préviennent d'une façon marquée l'oxydation du substrat (**Ibanez ,2005**).

Les antioxydants, renferment typiquement dans leurs structures moléculaires des cycles aromatiques, afin de délocaliser les électrons libres du radical et plus d'un groupement hydroxyle pour fournir des atomes d'hydrogène labiles (**Wei et Ho, 2006**).

Les antioxydants entravent l'autooxydation en modifiant sa cinétique. L'ampleur de ce changement dépend du type d'antioxydant, des molécules cibles, et des conditions environnantes (**Terpinc et al., 2009**), ces molécules, ne pouvant en aucun cas inverser ce même processus (**Mielnik et al .,2003**).

L'antioxydant exogène idéal, doit être efficace et facilement incorporable à faible dose, en plus d'être non toxique, n'entraînant ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirable ; il doit être par ailleurs, résistant aux processus technologiques et stable dans le produit fini (**Marc et al., 2004**).

## 2. Classification des antioxydants.

Les antioxydants peuvent être classés selon leur nature en :

### 2.1. Antioxydants de synthèse.

Ils sont considérés comme des piègeurs de radicaux libres (**Lee et al., 2005**). Il s'agit du butylhydroxytoluène (BHT ou E 321), du butylhydroxyanisole (BHA ou E 320), du t-butylhydroquinone (TBHQ) et des esters de l'acide gallique ; gallate de propyle (E 310), gallate doctyle (E 311), et de dodécyle (E 312).

Le BHT est un solide blanc, soluble dans les graisses mais pas dans l'eau. C'est un antioxydant de rupture de chaîne, très efficace et peu coûteux. Il retarde l'oxydation des lipides et la décoloration dans la viande jusqu'à 0,01% (**Madhavi et al., 1995**). Le BHA est un mélange de deux isomères de position, le 2-tertiobutyl 4-hydroxyanisole et le 3-

tertiobutyl 4- hydroxyanisole, dont l'efficacité est un peu inférieure à celle du BHT. L'association du BHT et du BHA serait synergique (Madhavi et al., 1995).

Bien que ces antioxydants synthétiques sont reconnus en tant qu'additifs alimentaires, considérés comme GRAS (generally recognized as safe), les réglementations internationales ont tendance à établir de plus en plus de restrictions quant à leur utilisation. De nos jours, ils sont limités à environ 200 mg /kg d'aliment par Codex Alimentarius (FAO/WHO Food Standards, 2005), par la réglementation européenne (Directive 2006/52/EC, 2006) et par le FDA « Food Additive Status List » (US Food & Drug Administration, 2006).

L'USDA (USDA, 2000) permet jusqu'à 0,01 % de BHA et de BHT dans les saucisses fraîches mais jusqu'à 0,003% dans les saucisses séchées. Aux états unis, l'addition de ces molécules est limitée seulement à certains produits (saucisses séchées, viande hachée de porc : à 0,01% lorsque qu'ils sont utilisés individuellement et à 0,02% lorsque qu'ils sont combinés (Lee et al., 2005).

## 2.2. Les antioxydants naturels.

D'après Scalbert et Williamson (2000) les quatre principaux types d'antioxydants végétaux sont :

### 1. Les polyphénols.

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, divisé en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun: la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (Hennebelle et al., 2004).

Ils sont particulièrement abondants dans les fruits, leurs teneurs pouvant atteindre 500 mg / 100 g dans certains fruits comme la pomme, le raisin ou les cerises. Les légumes en contiennent de plus faibles quantités, de l'ordre de 25 à 100 mg / 100 g (Scalbert et Williamson, 2000) ; Ils suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison des

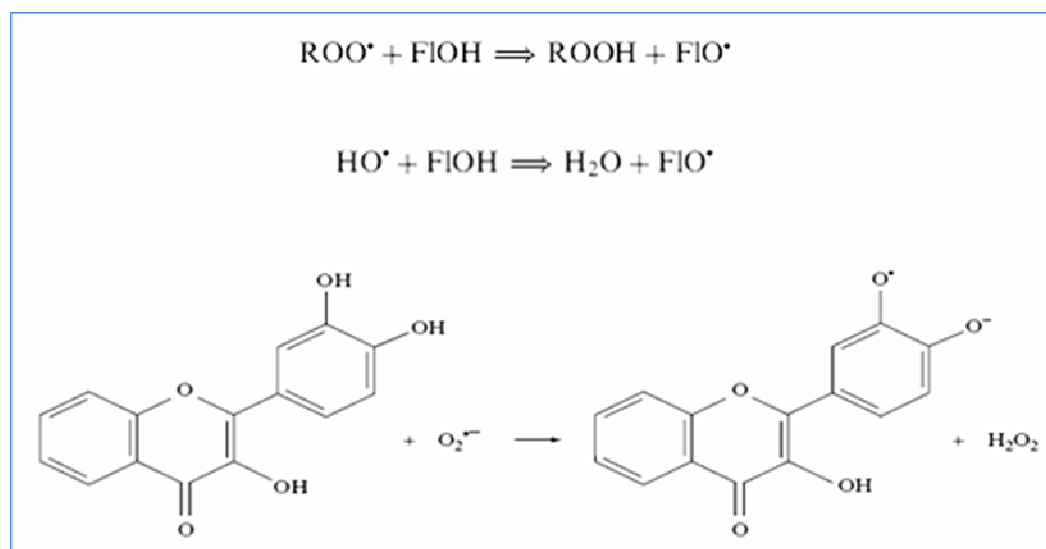
bienfaits qu'ils pourraient apporter en termes de prévention des maladies liées au vieillissement (**Hennebelle et al., 2004**).

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation, leur consommation quotidienne moyenne en ces substances est d'environ 1 g, soit un apport de presque 10 fois la vitamine C, 100 fois la vitamine E, et 500 fois celui des caroténoïdes (**Scalbert et Williamson, 2000**).

L'intérêt pour ces substances est loin d'être récent, puisqu'elles sont depuis longtemps exploitées dans l'industrie agroalimentaire en tant que conservateurs pour éviter notamment le rancissement des matières grasses (**Hennebelle et al., 2004**).

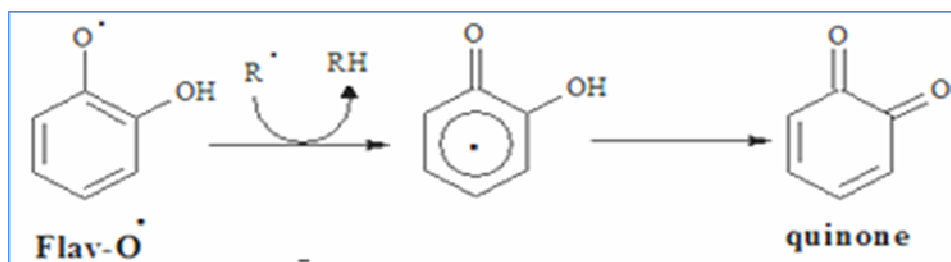
D'après **Rice-Evans (1995)** l'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement due à leurs propriétés d'oxydoréduction, qui leur permettent d'agir en tant qu'agents réducteurs, donateurs d'hydrogène, capteurs d'oxygène singulet en dehors de leur potentiel de chélation des métaux de transition.

Les représentants les plus nombreux et les plus connus sont les « flavonoïdes » (**Kris-Etherton et al., 2002**) ; ce sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique. À cause de leur faible potentiel redox, ils sont thermo dynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants par transfert d'hydrogène (**Figure 7**) (**Javanovic et al., 1994**). Les multiples groupements hydroxyles, spécialement ceux présents sur le cycle B, accentuent cette activité antioxydante (**Javanovic et al., 1994**).



**Figure 7.** Réaction des Flavonoïdes avec les ERO (Densiov et Afanas'ev, 2005).

Le radical aroxyde résultant ( $\text{Fl-O}^\bullet$ ) peut réagir avec un autre radical libre formant une structure quinone stable (Figure 8).



**Figure 8.** Transformation du radical aroxyde en quinone (Densiov et Afanas'ev, 2005).

Les Flavonoïdes sont utilisés d'une part pour la lutte contre la sénescence cérébrale et ses conséquences (altération de la mémoire, confusion...), et d'autre part dans le traitement des troubles liés à la fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire); en outre, on attribue aux Flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, anti-inflammatoires et diurétiques (Hennebelle et al., 2004).

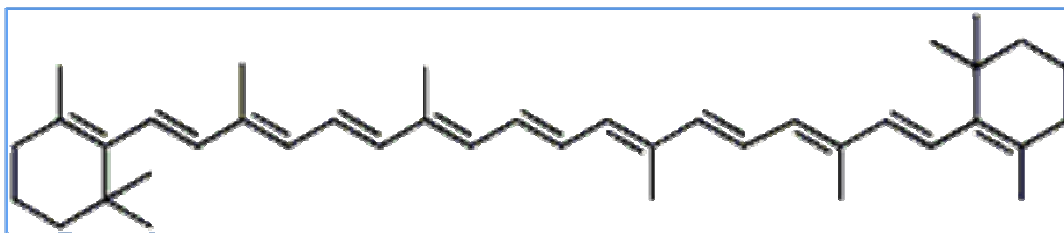
## 2. Les caroténoïdes.

Sont de longues molécules très hydrophobes et colorées, possédant un système de liaisons doubles conjuguées. Parmi les caroténoïdes, on distingue deux types : les carotènes et les xanthophylles. Les carotènes sont constitués uniquement de carbone et

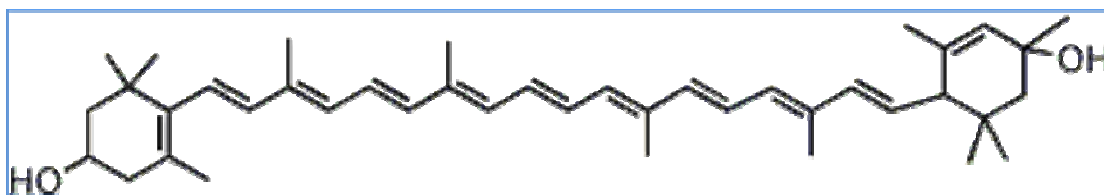
d'hydrogène ; les xanthophylles contiennent en plus des atomes d'oxygène (**Figure 9 et 10**) (Scalbert et Williamson 2000).

Les carotènes sont des antioxydants, efficaces à des faibles pressions partielles d'oxygène, qui perdent leur activité antioxydante au profit d'un effet pro-oxydant autocatalytique, à pressions partielles d'oxygène élevées (**Tessier et Marconnet, 1995**). Selon ces mêmes auteurs, cette vitamine liposoluble, complète efficacement le rôle de la vitamine E. Sa structure polyène lui permet d'absorber la lumière et de neutraliser l'oxygène singulet ; cette molécule, par mécanisme d'addition, permet l'incorporation des espèces réactives à l'oxygène et de ce fait, ralentir leur propagation (**Hale, 2003**). Elles sont stables vis à vis des traitements technologiques comme la cuisson (**Rennerre, 2000**).

Leur activité est fonction de d'autres facteurs physico-chimiques (potentiel d'oxydoréduction, pH) auxquels s'ajoutent des problèmes de biodisponibilité et de stabilité (lumière) ainsi que ceux liés à leur pouvoir colorant. Presque tous les légumes en contiennent tels que le brocoli, les courges et les algues mais surtout les carottes (**Rouillard, 2003**).



**Figure 9.** Structure chimique des carotènes (Scalbert et Williamson 2000).



**Figure 10.** Structure chimique des Xanthophylles (Scalbert et Williamson 2000).

### 3. L'acide ascorbique.

En 1928, **Albert Szent-Gyorgyi** a isolé la vitamine C à partir de divers aliments, qu'il a nommé « antiscorbutique ». En 1938, elle fut la première vitamine produite au laboratoire à des fins commerciales (**Figure11**) (**Scalbert et Williamson, 2000**). Elle est synthétisée en partie dans le cytosol et dans les mitochondries, comme on la trouve également dans les apoplastes, les vacuoles, les peroxysomes et les chloroplastes (**Smirnoff et Wheeler, 2000**). Elle fonctionne comme un antioxydant dans les chloroplastes (**Polle, 2001**) ; elle détouxe  $H_2O_2$  et  $HO_2^-$ , et fonctionne en coordination avec le glutathion et d'autres enzymes antioxydantes afin de contracter  $O_2^{\cdot-}$  (**NoctoretFoyer, 1998**).

Dans l'industrie des viandes, l'acide ascorbique était largement utilisé pour prolonger la durée de leur conservation et protéger la couleur rouge vive, et ce, même à des températures supérieures à  $9\text{ }^\circ\text{C}$  (**Wheeler et al., 1996**).

C'est l'un des agents réducteurs capable d'inhiber la peroxydation lipidique par inactivation des radicaux libres (**Decker et Mei, 1996**). Son ajout à la viande fraîche peut maintenir la myoglobine dans son état réduit, l'incorporation de 200 à 1000 ppm d'acide ascorbique permettant d'inhiber la décoloration dans la viande hachée de porc (**Watts et Lehmann, 1952**), et de la viande de bœuf (**Shivas et al., 1984**).

Cependant, en fonction de sa concentration, de la présence des ions métalliques et du tocophérol, l'acide ascorbique, peut inhiber ou au contraire initier l'oxydation lipidique dans la viande. (**Yen et al., 2002**). D'après **Decker et Xu (1998)** l'acide ascorbique a une activité antioxydante à des concentrations supérieures à 0,5 %, mais par contre, il possède un effet pro oxydant à faible concentration (0,02-0,03 %). Aussi, lorsque la vitamine C est utilisée en combinaison avec d'autres antioxydants, elle fonctionne de façon synchrone afin de promouvoir leurs effets. **Mitsumoto et al (1991)** certifie que 6 ppm de vitamine E additionnées à 500 ppm de vitamine C, diminuent nettement mieux l'oxydation des lipides et celle des pigments qu'ajoutées séparément.

La vitamine C possède entre autres, d'autres fonctions : elle agit comme un coenzyme, un précurseur de l'oxalate et du tartrate ; elle participe à une variété de

processus tels que la photosynthèse, la photoprotection, le cycle et la croissance cellulaire (Noctor et Foyer, 1998 ; Smirnoff et Wheeler, 2000).

Même si la plupart des mammifères peuvent synthétiser cette vitamine, l'organisme humain en a perdu la capacité au cours de l'évolution ; il doit donc la puiser chaque jour dans les aliments tels que les fruits et légumes (Scalbert et Williamson, 2000).

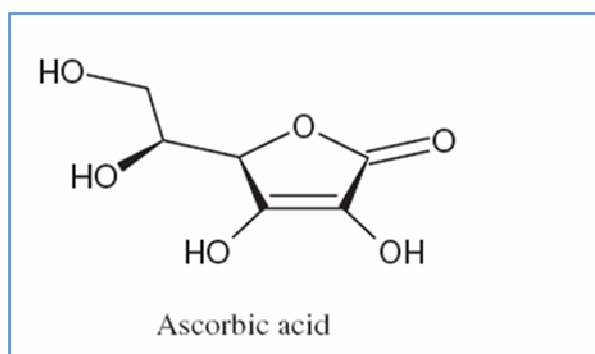


Figure 11. Structure chimique de l'acide ascorbique (Sanjust et al., 2008).

#### 4. La vitamine E.

Les Tocophérols représentent une famille très homogène de produits, constitués d'un reste d'hydroquinone substitué par un ou plusieurs groupes méthyles, et d'une chaîne polyisoprénique plus ou moins saturée (Figure 12) (Sanjust et al., 2008); il se trouve dans les plastides à des concentrations qui varient entre 1 µ g/g jusqu'à 1 mg/g de poids sec (Munne-Bosch et Alegre, 2002) , où il est synthétisé dans la membrane interne à partir d'acide homogentisique et isopenténylpyrophosphate (figure13) (Munne-Bosch, 2007).

En 1968, aux Etats-Unis, le « Food and Nutrition Board » reconnaissait la vitamine E comme étant une molécule essentielle en vertu de ses propriétés antioxydantes, très souvent utilisée en tant qu'alternatif de la BHA et la BHT (Pincemail et al., 2002) .

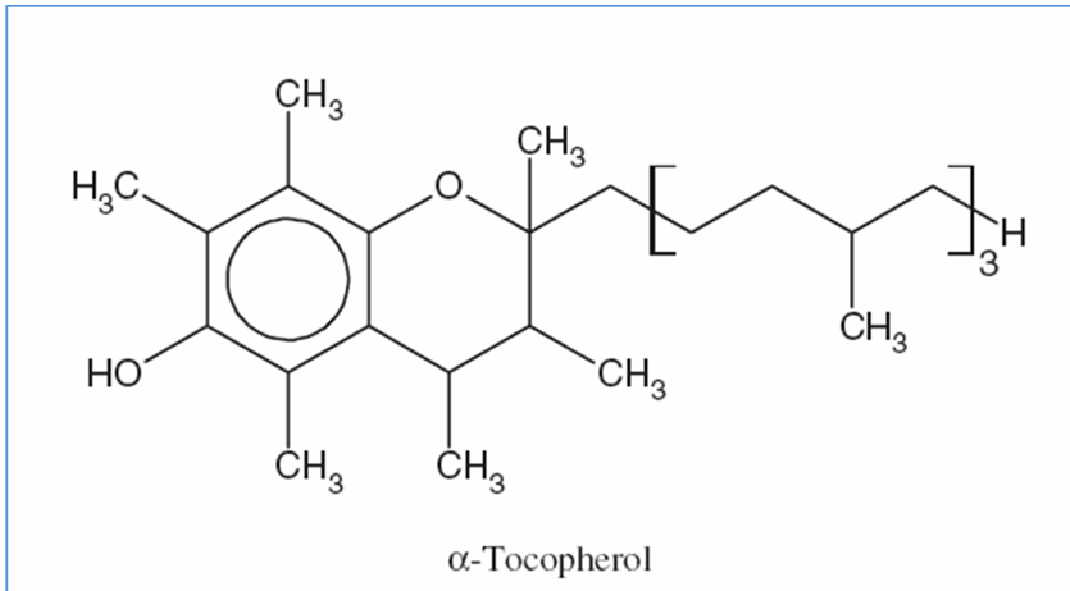
C'est le premier anti-oxydant liposoluble dans les systèmes biologiques, son rôle physiologique majeur dans la plante est de prévenir la peroxydation des lipides au cours de la dormance des semences, la germination et le développement de jeunes semis (Sattler et al., 2004); Il est essentiel pour le maintien de l'intégrité des

membranes photosynthétiques (**Munne'-Bosch, 2007**), car il les protège des photoinhibitions et d'autres stress photooxydatifs (**Havaux, 2005**).

Il agit en tant que casseur de chaîne, car en effet, en donnant un électron, la vitamine E entre en compétition avec le substrat et perturbe la chaîne d'oxydation des lipides dans la membrane cellulaire, ce qui empêche la formation d'hydroperoxydes lipidiques (**Buckley et al., 1995**) et retarde leur décomposition (**Frankel, 1998**).

Il est généralement admis que la stabilité oxydative des lipides musculaires dépend de la concentration du tocophérol présent dans les tissus, qui à son tour, dépend de celle de l'acétate  $\alpha$ -tocophéryl présent dans l'alimentation (**Sheldon et al., 1997**). Effectivement, lorsque ce dernier est intégré aux aliments du bétail, il prolonge efficacement la durée de leur conservation (**Faustman et al., 1989**).

La vitamine E joue un rôle important dans la prévention du cancer et des maladies cardiovasculaires ; elle réduit l'agrégation plaquettaire dans les vaisseaux sanguins et permet une plus grande fluidité du sang, Il est d'ailleurs recommandé de la prendre lors de la consommation d'une grande quantité d'aliments gras. Les huiles végétales pressées à froid, le germe de blé, les œufs, les noix, les graines et le poisson frais en constituent de bonnes sources. (**Rouillard, 2003**).



**Figure 12.** Structure chimique de l' $\alpha$ -tocophérol (Sanjust et al., 2008).

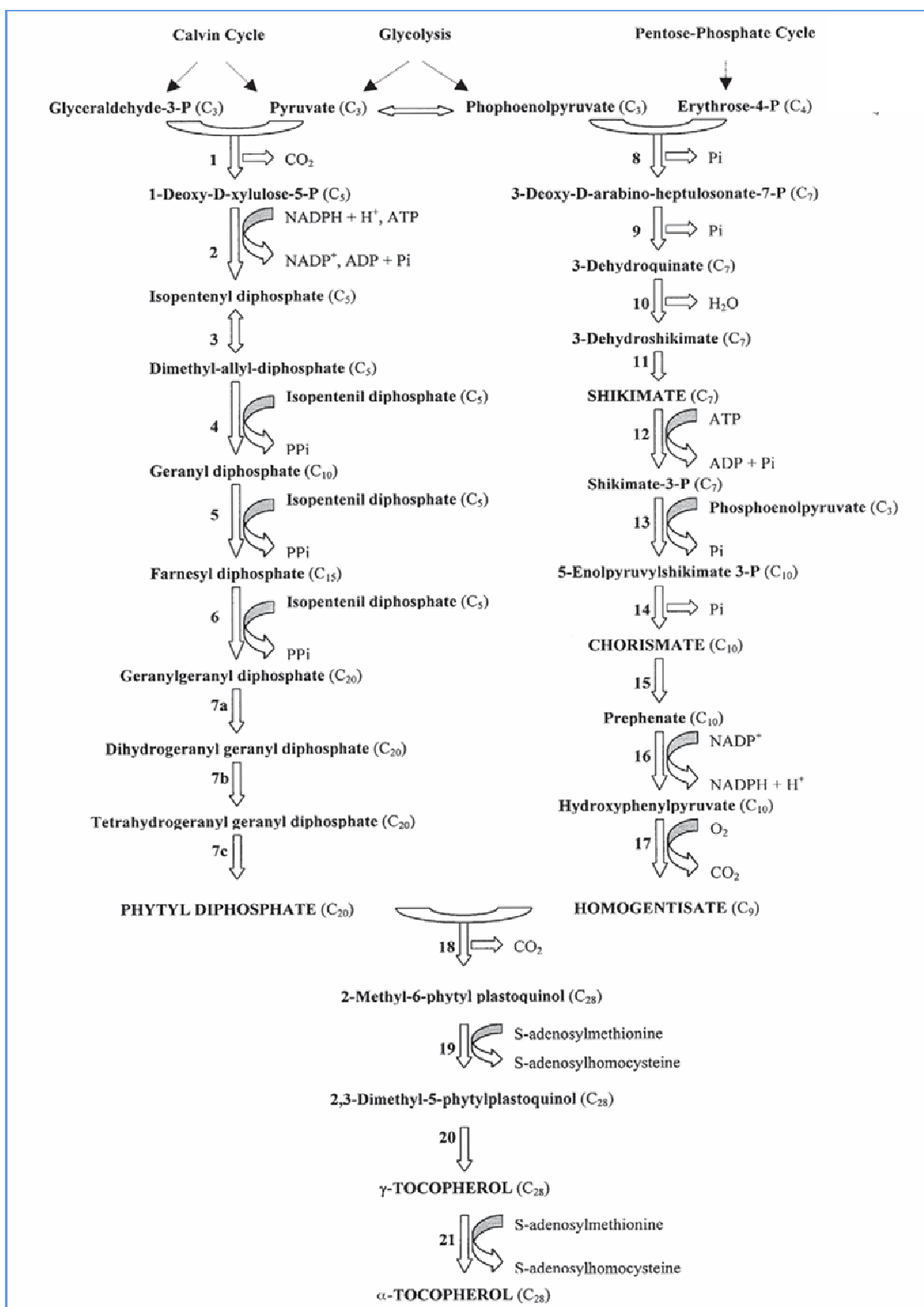


Figure 13. Les étapes de synthèse de  $\alpha$ -tocophérol dans la plante (Munné-Bosch et Alegre, 2002)

*Enzymes intervenants* : **1**, 1-Deoxy-D-xylulose-5-P synthase; **2**, réductases, déhydratases, et kinase; **3**, Isomérase; **4-6**, addition Consécutive d'unité C5 (isopentenyl diphosphate) pour former le geranylgeranyl diphosphate; **7a-c**, Geranylgeranyl réductase; **8**, 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-P synthase; **9**, 3-Dehydroquinate synthase; **10-11**, 3-Dehydroquinate déhydratase- shikimate dehydrogenase; **12**, Shikimate kinase; **13**, 5-Enolpyruvylshikimate-3-P synthase; **14**, Chorismate synthase; **15**, Chorismate mutase; **16**, Prephenate dehydrogenase; **17**, 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; **18**, Tocophérol prenyl transférase; **19**, Methyl transférase 1; **20**, Tocophérol cyclase; **21**, Tocophérol methyl transférase.

# ***Chapitre IV :***

***Viandes et problèmes liés à  
l'oxydation***



## 1. Introduction.

La chair des animaux des espèces autorisées constitue depuis toujours une des bases de l'alimentation humaine. La viande est considérée comme un aliment de choix en raison de sa valeur nutritive ; sa richesse en protéines et la nature de celles-ci en font un aliment difficilement remplaçable.

Cependant, en raison même de ses qualités nutritionnelles, la viande constitue un terrain très favorable à la plupart des contaminations microbiennes et aux différents processus dégénératifs ; d'ailleurs, un pourcentage élevé de maladies d'origine alimentaire est lié à la consommation de produits carnés (**Bean et al., 1990**). Il s'agit donc d'un aliment difficile à conserver.

## 2. Problèmes liés à l'oxydation des viandes.

L'oxydation des muscles et des tissus adipeux affecte la durée de conservation de la viande et ses dérivés (**Smet et al., 2008**) ; c'est, d'ailleurs, l'un des principaux mécanismes de détérioration de leurs qualités, car elle cause une perte de saveur, de couleur et de la valeur nutritive (**Kanner, 1994**).

Les viandes sont non seulement riches en lipides sensibles à l'oxydation mais en plus elles contiennent des substances prooxydantes en quantités importantes ; ces dernières recouvrent les métaux de transition, les protéines héminiques et les enzymes (lipoxygénases, cyclo-oxygénases) (**Rhee et Ziprin, 1987**) ; elles sont ainsi prédisposées à l'oxydation, donc, à la dégradation en phase post-mortem.

Certains moyens ont déjà été employés pour maîtriser cette oxydation; ils consistent par exemple, en l'alimentation de l'animal, les conditions de transformation des viandes, l'utilisation d'antioxydants, l'amélioration de l'emballage et l'optimisation des critères de conservation (**Skibsted et al., 1998**).

## 2.1. Les lipides et l'oxydation.

La susceptibilité des lipides à la peroxydation dans les tissus dépend de trois facteurs : la proportion des acides gras polyinsaturés, la quantité des ERO produites et le niveau d'antioxydants endogènes et d'origine nutritionnelle (**Gladine et al., 2007**).

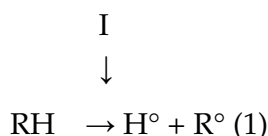
En présence d'oxygène moléculaire, l'autooxydation des lipides est initiée principalement dans la fraction phospholipidique insaturée des membranes cellulaires, car les acides gras poly-insaturés sont plus sensibles à l'oxydation que ceux saturés, l'énergie nécessaire pour causer la rupture homolytique des doubles liaisons CH (~ 60 kcal / mol) étant inférieure à celle demandée, pour provoquer le même effet sur les liaisons simples CH(~ 100 kcal / mol), présentes sur les chaînes saturées (**Trindade et al., 2008**).

Parmi les radicaux libres responsables de la peroxydation, le radical hydroxyle est le plus cytotoxique, son temps de demi-vie étant estimé à environ  $10^{-9}$  s (**Diplock et al., 1998**) ; la forte réactivité de ce dernier implique une réaction immédiate à l'endroit où il est généré. Lorsque la production des radicaux hydroxyles est massive, l'effet cytotoxique est non seulement local, mais peut se propager au niveau intra et extra cellulaire (**Benavente-Garcia et al., 1997**).

Cette réaction radicalaire est initiée par des oxydants perpétuellement régénérés, mais une fois commencée elle devient autocatalytique (**Bondet et al., 1997**) et se déroule en trois phases principales (**Figure 14 et 15**) (**Sachdev et Davies, 2008**):

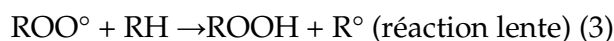
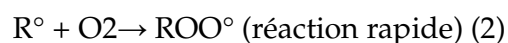
### 2.2. 1.L'initiation

C'est une rupture homolytique, occasionnées par un initiateur radicalaire, d'une liaison C-H doublée d'une perte d'un hydrogène de l'acide gras, ce qui en fait, un composé très réactif vis-à-vis de l'oxygène, appelé radical alkyle (1).



### 2.2.2. La propagation.

Durant cette étape, le radical libre (alkyle) formé lors de la phase d'initiation va fixer l'oxygène moléculaire et former le radical peroxy ( $\text{ROO}^\bullet$ ) (2), qui par la suite, va arracher un hydrogène à un autre acide gras, créant un nouveau radical libre (alkyle) et entretenant ainsi une réaction en chaîne, pour se transformer en hydroperoxydes lipidiques ( $\text{ROOH}$ ) (3). Ces derniers peuvent subir un clivage au niveau des liaisons C-C pour donner naissance aux aldéhydes volatiles et à d'autres produits.



### 2.2.3. La terminaison.

Entraînée par la réaction de deux radicaux pour donner une espèce moléculaire plus stable ou par intervention d'un composé antioxydant, dit « briseur de chaîne». Cette réaction suscite encore aujourd'hui un grand intérêt de la part des chercheurs, car elle a lieu *in vivo* et constitue un modèle simple d'étude et d'évaluation des substances antioxydantes. Cette phase est accélérée par de nombreux facteurs technologiques comme la réfrigération, la congélation, le broyage, la restructuration, l'irradiation, le chauffage, la cuisson et la salaison (**Renerre, 2000**).

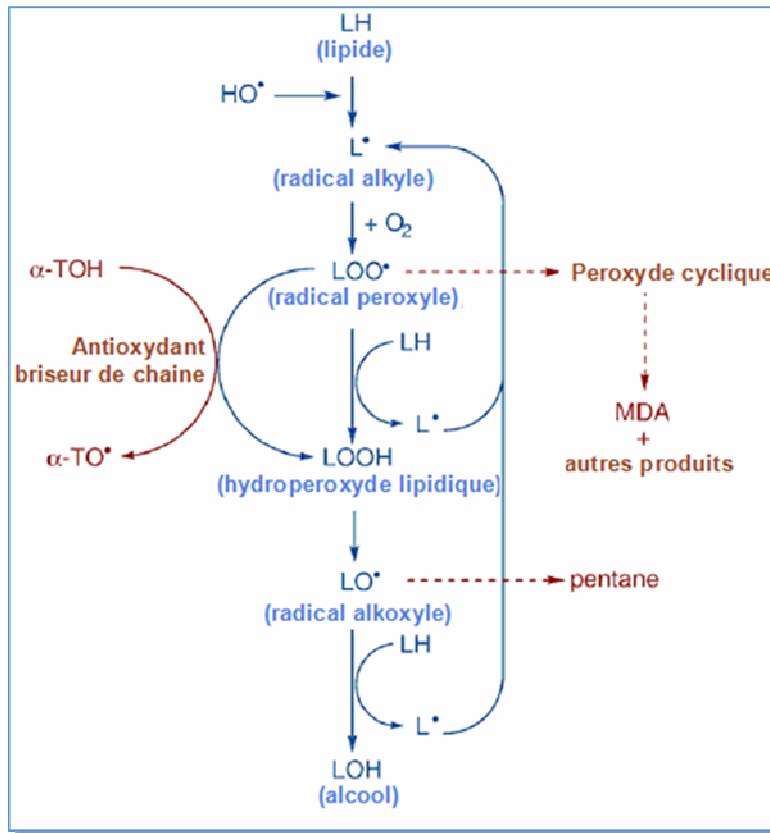


Figure 14. Les trois étapes de la peroxydation lipidique (Sachdev et Davies, 2008).

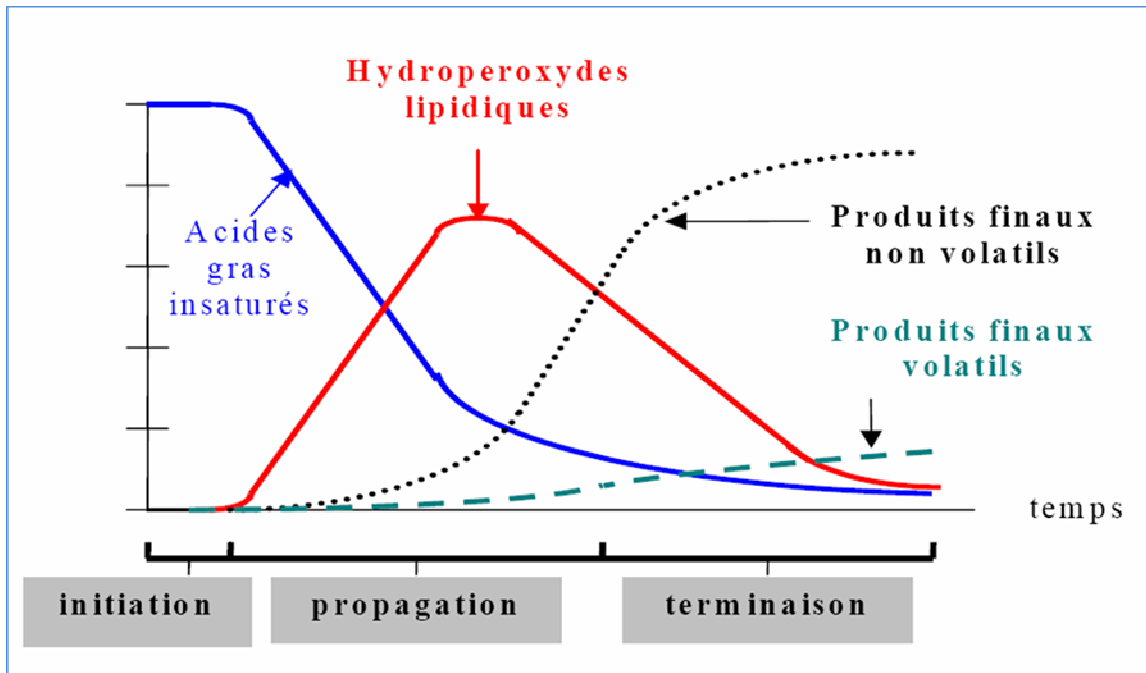


Figure 15. Schématisation de la cinétique d'oxydation des acides gras insaturés (d'après

*Genot, communication personnelle).*

La peroxydation lipidique provoque la détérioration de la qualité de la viande, qui se traduit par un changement de la flaveur, de la couleur, de la texture et de la valeur nutritive, et induit en plus des substances toxiques telles que le malondialdéhyde (MDA), les oxydes de cholestérol (**Onibi, 2000**) et d'autres produits secondaires tels que l'hexanal, le pentanal, l'heptanal et l'octanal (**Trout et Dale ., 1990**). La toxicité des aldéhydes volatils, souvent connus sous l'appellation de WOF (warmed-over flavor) (**Grun et al., 2006**), est surtout liée à leur forte réactivité vis-à-vis des protéines et des acides nucléiques (**Flourie et al., 2006**).

Les produits de la peroxydation lipidique sont normalement détoxifiés, entre autre, par voie de conjugaison enzymatique des glutathions S-transférases (GST), mais certains d'entre eux, dont le plus connu est le dialdéhyde malonique (MDA), échappent à cette détoxification (**Flourie et al., 2006**).

Aux cours des nombreux processus de transformation, les viandes deviennent encore plus vulnérables, spécialement celles hachées, dans lesquelles les membranes cellulaires sont rompues ; les composés lipidiques labiles sont encore plus exposés à l'O<sub>2</sub> (**O'Grady et al., 1998**). D'après **Gutteridge et Halliwell (1990)** le broyage du muscle favorise la diffusion de l'oxygène dans la chair et la perte des conditions anaérobies induit la production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la xanthine oxydase.

En effet, la viande hachée tend à devenir rance et brunit plus rapidement que les morceaux de muscle entier ; le hachage ne fait pas seulement qu'exposer une plus grande surface de la viande à l'air, aux traces de métaux, et aux contaminations microbiennes, mais il accélère aussi la perte de réducteurs intercellulaires, dont le rôle est de minimiser la formation de Metmyoglobine (**Phillips et al., 2001**).

Certains métaux lourds peuvent être à l'origine de ce processus ; les données provenant de différents laboratoires montrent une action de l'aluminium favorisant la " désorganisation " de la membrane plasmique et ce, à cause de sa liaison aux groupes phosphates des phospholipides. Il s'ensuit ainsi la création de discontinuités dans la paroi externe, facilitant le passage de certaines espèces chimiques, au sein desquelles les

ions  $Fe^{2+}$  produisent des radicaux  $OH\cdot$ , par les réactions de Fenton et celles d' Haber Weiss.

La cuisson est également une opération technologique hautement prooxydante ; une élévation de température favorise l'oxydation des lipides, le départ des hydrogènes allyliques et la décomposition des hydroperoxydes en produits secondaires. A des températures élevées (de l'ordre de  $70^{\circ}C$ ), il y a dénaturation des protéines, notamment de la myoglobine qui largue le fer et le rend directement disponible afin d'initier l'oxydation ou favoriser la décomposition des hydroperoxydes. De plus il se produit une désorganisation des structures cellulaires, favorisant les contacts entre substrats de l'oxydation et agents pro oxydants (**Khayat et Schwall, 1983**).

Par contre, la congélation est un bon moyen pour prolonger la durée de conservation des produits (**Genot, 2000**), car les vitesses d'oxydations des lipides et des pigments hémiques sont notablement réduites à faibles températures. Selon les travaux réalisés par **Mielnik et ses collaborateurs (2003)**, les dommages oxydatifs n'interviendraient qu'au delà de 2 mois de stockage à l'état congelé et l'utilisation d'extraits antioxydants présenterait un intérêt pour des durées de congélation supérieures à quatre mois et demi. Lors du stockage à l'état congelé, il est nécessaire d'atteindre des températures de  $-40^{\circ}C$  pour arrêter complètement l'oxydation car à une température moindre la formation de peroxydes reste possible (**Ke et al., 1977**).

Le pH influence le déroulement de l'oxydation par le biais de plusieurs mécanismes (**Genot et al., 2003 ; Eymard, 2003**). Primo, pour les réactions d'oxydoréduction faisant intervenir des protons ( $H^+$ ), le potentiel redox décroît linéairement avec le pH ; un pH acide favorise donc la réaction d'oxydation. Secondo, le pH intervient également dans la solubilité des composés impliqués dans l'initiation de la réaction. Ainsi, plus le pH n'est bas, plus la solubilité, le potentiel redox de ces derniers, et leur réactivité vis à vis des molécules oxydables sont élevés. Troisièmement, dans le cas du tissu musculaire, un pH bas favorise la dénaturation des protéines hémiques et la libération du fer. Il modifie également les interactions entre constituants du fait d'attractions et de répulsions électrostatiques liées à la charge des molécules, à un pH donné en fonctions de leur pK. Ainsi, les interactions entre cations métalliques et protéines sont favorisées quand le pH est supérieur à leur point

---

isoélectrique, ce qui est susceptible de favoriser l'oxydation lors du contact direct des protéines avec les lipides.

L'activité de l'eau d'un système influence les réactions d'oxydation. L'effet de l'eau est lié aux propriétés de solvation des ions et des radicaux libres et à son activité chimique. Par solvation, l'eau permet la mobilisation des substances prooxydantes ou antioxydantes ; elle interagit avec les cations métalliques et les rend plus ou moins disponibles dans la catalyse des réactions d'oxydation (Eymard, 2003).

D'autres agents peuvent également favoriser l'oxydation des lipides, comme la lumière. En effet, l'effet de la lumière sur l'oxydation des lipides a été démontré dans différents aliments, comme les huiles, le beurre, le lait et les viandes (Whang et Peng, 1988). Andersen et Skibsted (1991) rapportent que la lumière UV est plus inductrice que celle du visible sur ce phénomène.

## 2.2. Les pigments de la viande : la Myoglobine et l'oxydation.

La couleur de la viande est la première qualité perçue par le consommateur, elle le guide pour son choix d'achat (Haak et al., 2006). Williams et al (1992) avaient investi dans l'importance économique de la détérioration de la couleur de la viande et des produits dérivés, ayant observé que les ventes étaient réduites de 5,4 % pour les viandes fraîches et de 3,4% pour les produits dérivés.

Elle dépend de la quantité de pigment présent dans le muscle appelé myoglobine : plus il y en a, plus celle-ci est intense (Renerre, 1990). Durant le processus de production, de distribution et de stockage, les viandes subissent des détériorations d'ordre chimique et microbiologique ; en effet, l'oxydation de la Myoglobine durant le stockage, donne naissance à la Metmyoglobine, qui procure à la viande une couleur brune répulsive (Sañchez-Escalante et al., 2001).

En réalité, la Myoglobine existe sous trois formes chimiques différentes : la désoxymyoglobine (Mb) de couleur violette, qui est rapidement oxydée au contact de l'air en oxymyoglobine (Mb O<sub>2</sub>) de couleur rouge cerise ; par la suite d'un stockage prolongé de la viande, l'oxymyoglobine est transformée en metmyoglobine (Met Mb), il

en résulte une décoloration de la viande qui a tendance à brunir (**Faustman et Cassens, 1990**).

Le processus de détérioration de la couleur des viandes emballées est accéléré par des teneurs critiques en  $O_2$ , une croissance microbienne intense en surface, et par des températures élevées (**Rennerre, 1990**). Par contre, une atmosphère riche en  $O_2$  peut maintenir le pigment dans sa forme oxygénée, mais, dans la réalité ce dernier ne fait que retarder et non prévenir l'oxydation de l'oxymyoglobine (**Djenane et al., 2003**). **Faustman et Cassens (1990)** suggéraient qu'afin de minimiser la formation de la metmyoglobine dans la viande de bœuf fraîche, l' $O_2$  doit être soit totalement exclu lors de l'emballage, soit injecté jusqu'à un niveau de saturation. Cependant, les teneurs élevées en  $O_2$  favorisent en même temps l'oxydation des lipides et par conséquent une accumulation de metmyoglobine d'où décoloration de la viande (**Djenane et al., 2004**).

Une approche impliquant à la fois l'utilisation des atmosphères riches en  $O_2$  et d'antioxydants semble être appropriée pour préserver la myoglobine dans son état oxygéné, et ainsi prolonger la durée de vie de la viande (**O'Grady et al., 2000**).

Selon **Rennerre (2000)** la peroxydation lipidique et l'oxydation de la myoglobine sont intimement liées, l'une, étant le catalyseur de l'autre. En effet, dans la viande, durant l'auto oxydation du pigment, il y a en plus de la formation de metmyoglobine, la formation du radical  $O_2^{\cdot\cdot}$  Précurseur du  $H_2O_2$ ; l'interaction de la metmyoglobine avec  $H_2O_2$  génère le radical ferryl-myoglobine impliqué dans l'oxydation des lipides. Réciproquement, d'autres auteurs confirment que la présence d'acides gras libres ou de phospholipides dans le muscle, produits issus de l'oxydation des lipides, renforcent l'oxydation de l'oxymyoglobine; ils ont conclu que  $O_2^{\cdot}$ , initiateur de la peroxydation des lipides, conduit à la formation de substances prooxydantes susceptibles de réagir avec l'oxymyoglobine, et abouti à la formation de la metmyoglobine (**Genot et al., 1991**).

### **2.3. Les protéines et l'oxydation.**

Dans la viande, l'oxydation des protéines, atténue les qualités gustatives, réduit la tendresse et l'aspect juteux, provoque une détérioration de la saveur et une

---

décoloration (**Xiong, 2000**). Parmi les changements dans les protéines causée par l'oxydation, il y a la formation d'hydroperoxydes et de carbonyles, la formation de réticulations inter et intramoléculaires, la fragmentation des peptides, et la diminution de la solubilité des protéines (**Xiong, 2000**).

L'oxydation peut également jouer un rôle dans le contrôle de l'activité des enzymes protéolytiques (**Starke-Reed et Oliver, 1989**). De plus, la formation d'espèces réactives telles que les hydroperoxydes et la DOPA (3,4-dihydroxy-phénylalanine) peut engendrer un flux de radicaux et endommager d'autres structures biologiques (**Luxford et al., 1999**).

L'oxydation des protéines, se produit de la même manière mais plus rapidement que celle des lipides, dans les systèmes biologiques tels que le muscle (**Davies et Golberg, 1987; Srinivasan et Hultin, 1995**). D'ailleurs, la formation de groupes carbonyles à partir de protéines, est largement utilisée comme une mesure de l'oxydation (**Srinivasan et Hultin, 1995**).

### **3. Les stratégies de lutte contre l'oxydation des viandes.**

Le muscle squelettique contient un système antioxydant qui contrôle les réactions oxydatives chez l'animal vivant et qui continue à garder quelques activités après la mort. Le renforcement des systèmes enzymatiques détoxifiants, la supplémentation en vitamines antioxydantes et d'autres antioxydants représentent tous, des stratégies de défense contre l'oxydation des tissus biologiques. (**Henebelle et al., 2004**). La sélection génétique pourrait éventuellement permettre d'augmenter l'activité des enzymes antioxydantes in vivo (**Renner, 2000**).

La régulation des facteurs pro et antioxydants est perturbée à la mort de l'animal, durant le stockage et la transformation des viandes. Ce dérèglement induit des changements des propriétés biochimiques du muscle, d'où la nécessité d'utiliser des antioxydants exogènes (**Hultin, 1994**).

Les extraits végétaux suscitent un intérêt croissant puisqu'ils constituent des sources d'antioxydants naturels (**Madsen et Bertelsen, 1995**) ; ceux-ci peuvent agir

selon deux mécanismes différents, mais intimement liés : D'une part, ils inhibent l'oxydation de la myoglobine et préservent ainsi l'aspect rouge vif de la viande fraîche, d'autre part, ils protègent les acides gras contre les réactions d'oxydation et, éventuellement, contre l'apparition d'une odeur rance dans la viande (**Bioclips, 2007**). Ils diminuent la concentration de l'oxygène local, préviennent la phase d'initiation, se lient aux catalyseurs tels que les ions métalliques et décomposent les peroxydes ou les lipoperoxydes ; mais fonctionnent, également en tant que briseurs de chaînes afin de prévenir l'abstraction perpétuelle que font les radicaux libres à l'hydrogène (**Dorman et al., 2003**). De plus, certains parmi eux, sont capables de régénérer  $\alpha$ -tocophérol endogène dans la bicouche phospholipidique des particules des lipoprotéines (**Rice-Evans et al., 1996**)

Par ailleurs, l'utilisation d'emballages dits « actifs » se développe. Par ce terme, on fait référence à l'incorporation de certains additifs, qu'ils soient dispersés dans le paquet, attachés à l'intérieur sous forme de sachets ou de pastilles, ou encore incorporés au matériau lui-même. **Rooney, (1995)** définit ces types d'emballage comme étant des matériaux qui « jouent un rôle autre qu'un obstacle inerte à l'environnement extérieur », et dont l'objectif est de préserver les qualités sensoriels et sanitaires des produits sans avoir recours direct à l'utilisation des antioxydants (**Camo et al., 2008**). **Nerín et al (2006)** ont révélé des résultats prometteurs d'un nouveau système d'emballages actifs : un film plastique avec extrait de romarin incorporé, en mesure d'inhiber à la fois l'oxydation de la myoglobine et celle des lipides dans la viande bovine.

Cependant, l'emballage des viandes sous une atmosphère modifiée, à haute teneur en oxygène et le stockage au réfrigérateur maintiennent la couleur rouge vif souhaitable des viandes fraîches plus longtemps que celle des viandes emballées à l'air (**Penney et Bell, 1993**) ; il empêche par ailleurs, la croissance microbienne des germes pathogènes anaérobies (**Ogrydziak et Brown, 1982**). Le mélange des gaz le plus couramment utilisé pour les viandes contient approximativement 70% de O<sub>2</sub> et 30% de CO<sub>2</sub> ; il permet de prolonger d'avantage la durée de vie des produits par rapport à ceux emballés à l'air normal (**Gill, 1996**).

# **Partie expérimentale**



## 1- But

Les objectifs ciblés par cette expérimentation sont principalement, l'identification des principaux composants à activité antioxydante dans l'espèce *Rosmarinus officinalis* qui pousse à l'état sauvage dans les conditions pédoclimatiques algériennes des régions d'Oran et de Tlemcen. Pour cela, nous avons procédé à une caractérisation biochimique des principaux flavonoïdes par chromatographie sur couche mince.

Par ailleurs, d'autres analyses ont été faites, à savoir l'extraction et le calcul du rendement des différents extraits végétaux, le dosage des polyphénols totaux, la mise en évidence et le dosage des flavonoïdes, ainsi que l'estimation de l'activité antioxydante par la technique au DPPH et celle du pouvoir réducteur de ces extraits par la méthode d'Oyaizu.

Des analyses des sols des lieux de prélèvement des échantillons, des mesures des taux, d'humidité, de matière sèche et de cendre de l'espèce étudiée, ont été également faites afin de mieux cerner le matériel végétal.

Vu les problèmes liés à l'altération des viandes par le processus de la peroxydation lipidique, nous avons mis en place une étude visant à mesurer l'effet de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* sur la peroxydation lipidique de la viande hachée de bœuf au cours de la conservation ; pour ce faire, on a mesuré l'indice de peroxydation lipidique (TBA), en même temps que le PH et l'humidité de la viande ; on a procédé par la même occasion à un modeste test afin de mieux évaluer l'effet exercé par cette plante sur les qualités sensorielles de celle-ci .

## **2. Analyses du sol.**

### **2.1. Matière organique (NF 44- 041)**

Cette méthode de dosage permet de déterminer la matière organique totale dans les amendements organiques et les supports de culture. Appliquée aux sols, elle inclut également l'eau de constitution des argiles. L'échantillon est broyé à 2 mm et calciné à 480°C. La perte de masse par combustion correspond à la combustion de la matière organique.

### **2.2. Potentiel d'hydrogène, pH (Code interne ; procédure n° ps 0905, CIRAD., 2004)**

Cette méthode instrumentale de mesure de routine du pH est appliquée à tous les types de sols séchés à l'air. Une mise en équilibre ionique est réalisée entre la phase solide et la phase liquide ; la mesure est effectuée dans des conditions déterminées (rapport sol/solution=1/2,5) par la différence de potentiel existante entre une électrode de mesure et une électrode de référence plongées dans une solution aqueuse en équilibre avec l'échantillon de sol (**Annexe I**).

### **2.3. Granulométrie (Aubert, 1978)**

Cette technique permet de déterminer les différentes classes de particules minérales en se référant à leur taille. L'échelle utilisée est celle d'**ATTERBERG** qui donne 5 classes de particules :

- Argiles : 0 à 2 µm,
- Limons fins : 2 à 20 µm
- Limons grossiers : 20 à 50 µm,
- Sables fins : 50 à 200 µm,
- Sables grossiers : 200 µm à 2mm

L'analyse consiste en une mise en suspension des particules dans l'eau après destruction de la matière organique, des agrégats et dispersion de l'argile. Ces particules sont, par hypothèse, supposées avoir toutes la même densité et une forme sphérique ; cette suspension étant stabilisée dans des conditions bien définies, la séparation des différentes classes s'effectue par sédimentation gravitaire pour les fractions fines (<50 µm) et par tamisage pour les fractions grossières. Le pourcentage de sables grossiers, sables fins, limons grossiers, limon fins et d'argile est déterminé après

---

solubilisations périodiques d'une prise d'échantillon de sol dans de l'eau oxygénée à 20% (**Annexe II**).

#### **2.4. Conductivité (ISO 11265, 1995)**

La mesure est réalisée à l'aide d'un conductimètre et la lecture est directe selon l'échelle de lecture sélectionnée. L'appareil est étalonné par rapport à une solution de KCl à 56mg/l dont la conductibilité est de 100  $\mu\text{S}/\text{cm}$  à 25°C. Elle indique le degré de salinité des sols (**Annexe III**).

#### **2.5. Dosage de l'azote total (NF ISO 11621, 1995)**

Cette méthode permet de transformer l'azote organique d'un échantillon de sol en azote minéral [sulfate d'ammonium,  $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ ] sous l'action de l'acide sulfurique concentré à chaud en présence de catalyseurs appropriés. L'azote est ensuite déplacé du sulfate d'ammonium par l'action d'une lessive de soude. Le  $\text{NH}_3$  formé est entraîné par distillation et recueilli dans une solution aqueuse d'acide borique. En fin de distillation, la solution borique ammoniacale est titrée par une solution chlorhydrique (**Annexe IV**).

#### **2.6. Calcaire total (NF ISO : 10693, 1995)**

L'acide chlorhydrique est ajouté à un échantillon de sol, pour décomposer tous les carbonates présents. Le volume de gaz carbonique dégagé est mesuré à l'aide d'un calcimètre BERNARD et comparé à celui produit par du carbonate de calcium pur. Pour éviter de faire des corrections pour des différences de température et de pressions, toutes les mesures sont réalisées dans les mêmes conditions. La teneur en carbonate est exprimée par la concentration équivalente de carbonate de calcium ( $\text{Ca CO}_3$ ). En fait, la mesure concerne aussi bien tous les carbonates que les bicarbonates présents dans l'échantillon (**Annexe V**).

#### **2.7. Phosphore assimilable (NF X31-161, 1999)**

Cette méthode permet la dilution partielle du phosphore par une solution d'oxalate d'ammonium. Elle s'applique en principe à tous les types de sols dont le pH est supérieur à 6,80 ; l'extraction des formes de phosphore soluble est effectuée par un acide. La durée d'agitation est de 2 heures. La teneur en phosphore est mesurée par un spectrophotomètre à 660 nm (**Annexe VI**).

### 3. Etude phytochimique du matériel végétal.

#### 3.1. Cueillette des échantillons.

Le matériel végétal est constitué de rameaux herbacés (tiges feuillées) de *Rosmarinus officinalis* récoltés au mois de novembre 2008 dans la daïra de Sebdou (station de Sidi el Djilali) à 38 Km de la wilaya de Tlemcen et dans celle de Messerghine (forêt de Madagh) à 25 Km de la wilaya d'Oran(**Figure16**).

Les caractéristiques géographiques et bioclimatiques des placettes de récolte sont résumées dans les tableaux ci-dessous. Des échantillons de sol ont été également pris d'une manière aléatoire de la zone de prélèvement de l'espèce étudiée.

**Tableau 3.** Caractéristiques géographiques et bioclimatiques des placettes de la wilaya de Tlemcen et d'Oran.

Placettes	Madagh	El Bouihi	Khelil	Tinkial
Etage bioclimatique	Climat Méditerranéen	Climat semi aride à hiver froid et été chaud	Climat semi aride à hiver froid et été chaud	Climat semi aride à hiver froid et été chaud
Altitude en (m)	320	1365	1320	1425
Latitude nord (m)	677935	96800	99000	14000
Longitude ouest (m)	3947140	133400	130000	114000
Pluviométrie (mm)	300 mm	300 à 400 mm	300 à 400 mm	300 à 400 mm
Orientation	Terrain plat toute exposition	Nord ouest	Terrain plat toute exposition	Sud ouest



Figure 16. Régions des prélèvements des échantillons étudiés.

### 3.2. Séchage et conservation des plantes.

Les plantes médicinales et aromatiques contiennent un niveau élevé en humidité et en microorganismes ; c'est pour cela que le séchage immédiat reste l'opération la plus importante après la cueillette pour empêcher les pertes des constituants essentiels (Muller et al., 1989). Cependant, les températures élevées et les radiations solaires intenses, risquent par contre, d'affecter la qualité par la perte des vitamines, des huiles essentielles, et par le changement de couleur des produits séchés (Soysal et Oztekin, 2001).

La technique de séchage adoptée est celle d'Ibanez et al (1999) avec quelques modifications ; après la récolte, le matériel végétal est débarrassé des débris et étendu le plus vite possible en couche fine pour sécher à l'air libre et à l'ombre pendant environ un mois, en fonction des saisons. Il est par la suite conditionné sous forme de drogues

---

séchées, jusqu'au moment de l'analyse ; les précautions qui viennent d'être décrites permettent de minimiser les divers mécanismes de fermentation et de dégradation inhérents aux caractères organiques de ces matières premières, contribuant à l'inhibition de toute activité enzymatique responsable de leur dénaturation.

### **3.3. Détermination du taux de matière sèche (NF V03-913, AFNOR., 1985).**

#### *Principe*

La teneur en matière sèche de l'échantillon est déterminée par son poids après dessiccation dans l'étuve à 105+<sub>2</sub>°C jusqu'à poids constant. Le taux de matière sèche est donné par la formule suivante :

$$MS\%=(Y/X) \times 100$$

X : poids de l'échantillon humide.

Y : poids de l'échantillon après dessiccation.

### **3.4. Dosage des cendres brutes (ISO 5984-1978).**

#### *Principe*

Cette méthode s'adresse à tout matériel végétal ou ligneux. Le taux de cendres de matériel végétal est le résidu minéral après destruction de la matière organique par calcination.

#### *Mode opératoire*

On pèse, à 0,001 g près, environ 5 g de l'échantillon frais pour essai dans la capsule à incinération, préalablement chauffée durant au moins 30 min dans le four à moufle à 550°C, refroidie dans le dessiccateur et pesée à 0,001 g près. On place la capsule d'incinération contenant la prise d'essai sur la plaque chauffante ou le brûleur à gaz et on chauffe progressivement jusqu'à carbonisation. On transfère la capsule dans le four à moufle préalablement chauffé à 550 °C et on laisse séjourner 3 à 4 heures.

Les cendres brutes, exprimés en pourcentage en masse de l'échantillon pour essai, sont égales à :

$$\text{Teneur en cendre (en \% de la matière fraîche)} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \times 100$$

Où :  $m_0$  est la masse, en gramme, de la capsule vide.

$m_1$  est la masse, en gramme, de la capsule contenant la prise d'essai

$m_2$  est la masse, en gramme, de la capsule et des cendres brutes.

### 3.5. Dosage de la matière organique.

La matière organique est déterminée par différence entre la matière sèche et la matière minérale.

### 3.6. Préparation de l'extrait végétal.

On procède d'abord par le broyage et le tamisage des feuilles de romarin car sous cette forme broyée, la plante présentera une plus grande surface de contact avec les solvants extracteurs, permettant ainsi d'améliorer le rendement à l'extraction.

Les feuilles séchées et pulvérisées du romarin ont subi une extraction au méthanol (99,5%), suivant la méthode de **Kosar et al (2005) (Figure17)**, qui est une extraction solide liquide de type discontinue. 10 g de poudre de romarin ont été extraits avec 100 ml de méthanol (99,5%) dans un bain- marie avec agitation à 60°C pendant 20 minutes et puis filtré avec du papier filtre standard (110 mm). Cette procédure à été répétée trois fois en utilisant le même matériel de départ. Par la suite, les trois filtrats ont été combinés et le solvant évaporé sous vide au moyen d'un Rotavapor à 40°C (**Figure18**). L'extrait est finalement séché dans une étuve à 30°C pendant deux heures afin d'éliminer toute trace du solvant résiduel. L'extrait final obtenu se présente sous forme d'une poudre vert foncé.

### 3.7. Détermination du rendement à l'extraction.

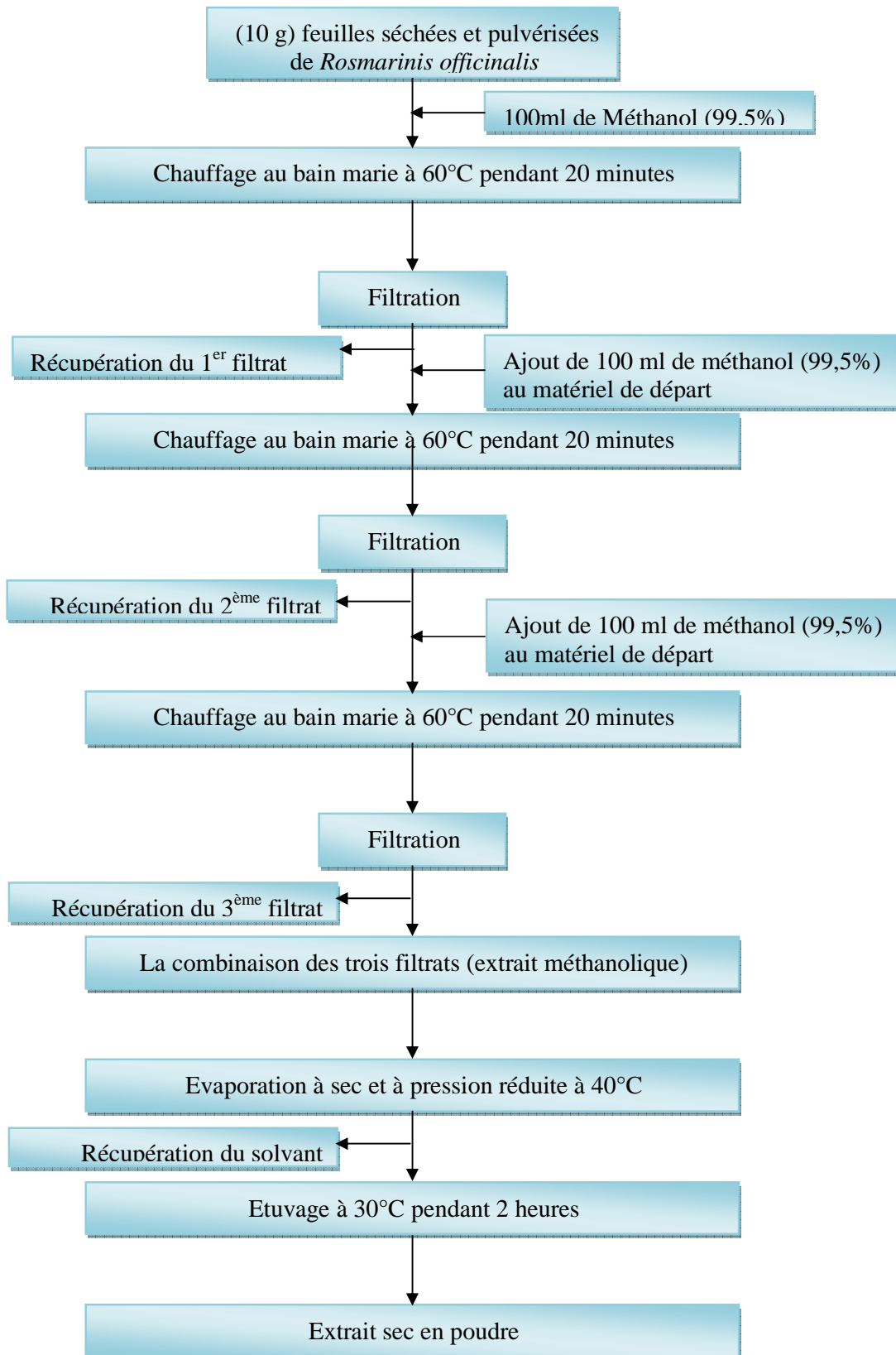
Le rendement à l'extraction a été estimé suivant l'équation suivante :

$$\text{Rendement \%} = (W_1 \cdot 100) / W_2 \quad (\text{Maisuthisakul et al., 2007})$$

Où :  $W_1$  : est le poids de l'extrait sec après évaporation du solvant, il est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein et le poids du ballon vide.

$W_2$  : est le poids sec de l'échantillon.

.



**Figure 17.** Diagramme d'extraction des extraits de *Rosmarinus officinalis* (Kosar et al., 2005).



**Figure 18.** *Evaporation à sec et sous pression réduite des extraits méthanoliques de Rosmarinus officinalis à l'aide d'un rotavapor.*

### 3.8. Dosage des polyphénols totaux de l'extrait de *Rosmarinus officinalis*.

#### *Principe*

Après extraction au méthanol, les polyphénols des feuilles de *Rosmarinus officinalis* sont dosés par spectrophotométrie à 765 nm en présence du réactif de Folin Ciocalteu, par référence à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique.

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3P W_{12} O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3P Mo_{12} O_{40}$ ); il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8 O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8 O_{23}$ ) (**Ribéreau-Gayon, 1968**). Cette réaction doit avoir lieu en milieu alcalin, d'où le besoin d'utiliser le carbonate de sodium. La coloration produite, dont l'absorption maximum, comprise entre 725 et 770 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**George' et al ., 2005**).

#### *Mode opératoire*

Les polyphénols totaux de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* ont été déterminés selon le procédé décrit par **Singleton et Rossi (1965)** citée par (**Tawaha et al ., 2007**).

Brièvement, 50 µl de l'extrait végétal, sont mélangés avec 450 µl d'eau distillée et 2,5 ml du réactif de Folin (0,2N). Après 5 min ,2 ml d'une solution saturée de carbonate de sodium (75 g/l) est ajoutée au mélange précédent et l'absorbance de la solution bleu résultante est mesurée à 765 nm après une durée d'incubation d'une heure et demi à 30° C en agitant de temps à autre.

En se référant à une courbe d'étalonnage ( $y=ax+b$ ) préparée avec l'acide gallique, la quantité totale en polyphénols est exprimée en mg équivalent d'acide gallique /g d'extrait.

### **3.9. Mise en évidence et dosage des Flavonoïdes.**

#### **3.9. 1. Mise en évidence des Flavonoïdes**

Par le test au Mg, on peut mettre en évidence les flavonoïdes dans l'extrait végétal, et ce, en ajoutant au minimum de volume de l'extrait méthanolique, quelques gouttes de HCl concentré (2 N) et 0,5 g de Mg : on laisse agir 3 minutes (**Karumi et al ., 2004**).

Lecture des résultats : la couleur rouge ou orange implique la présence des flavonoïdes.

#### **3.9. 2. Dosage des flavonoïdes**

La méthode de **Lamaison et Carnat (1991)** a été utilisée pour le dosage des flavonoïdes dans les différents extraits. 1,5 ml de l'extrait méthanolique (1 mg/ml) est ajouté à 1,5 ml de  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$  (2%) préparé dans le méthanol ; le mélange est ensuite agité vigoureusement à l'aide d'un vortex : après une durée d'incubation de 10 minutes à température ambiante, l'absorbance a été lue à 440 nm.

Pour la quantification des flavonoïdes, une courbe d'étalonnage ( $y=ax+b$ ), réalisée par la Quercétine à différentes concentrations, est pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons ; la teneur en flavonoïdes a été exprimée en mg équivalent de Quercétine /g d'extrait.

### **3.10. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

#### ***Principe***

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de séparation des constituants d'un mélange. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption et de partage ; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée, soit sur une plaque de verre, soit sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

### ***Mode opératoire***

Les analyses par chromatographie sur couche mince des quatre extraits de *Rosmarinus officinalis* ont été effectuées sur des plaques de gel de silice (G60 F254 ,20x20 cm) avec support rigide en aluminium, dans un système de migration constitué d'acétate d'éthyle, d'acide acétique, d'acide formique et d'H<sub>2</sub>O (10 :11 :11 :26 V/V/V/V) (Wagner et Bladt, 1996).

5 µl de chaque extrait méthanolique (1 mg/ml) sont déposés sur des points repaires à 1,5 cm du bord inférieur des plaques de chromatographie, qui sont par la suite introduites dans des cuves en verre préalablement saturées par les vapeurs de la phase mobile. Après développement, les plaques sont séchées avec un sèche cheveux, puis visualisées sous une lampe UV à 254 et 365 nm. Ces mêmes plaques sont par la suite pulvérisées avec un révélateur des flavonoïdes appelé réactif de Neu (2-Aminoethyl diphenylborinate. Après séchage et observation sous une lampe UV à 365 nm, on enregistre les couleurs des spots obtenus et on calcule leurs rapports frontaux comme suit :

$$R_f = d_i / d_s$$

$d_i$  : distance parcourue par le composé (mesuré au centre de la tache)

$d_s$  : distance parcourue par le front du solvant

#### 4. Estimation de l'activité antioxydante des différents extraits de *Rosmarinus officinalis*.

##### 4.1. Estimation de l'activité antiradicalaire des différents extraits de *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis du radical DPPH.

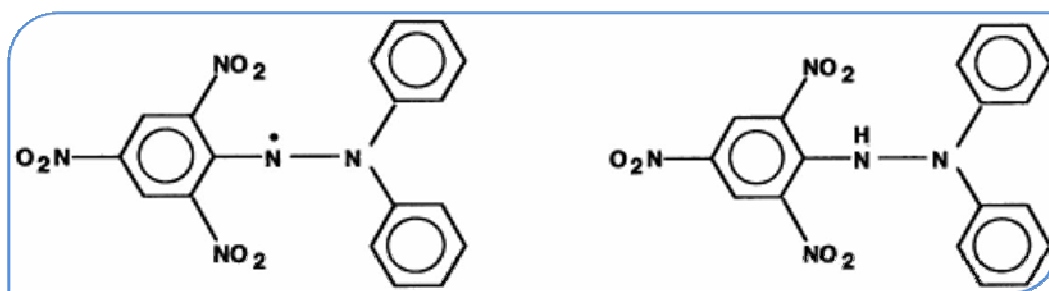
###### Principe

Pour détecter l'activité antiradicalaire, nous utilisons la méthode de Blois (Blois, 1958) citée par Erkan et al (2008) appelée aussi la méthode au DPPH (Pérez et al., 2007) avec quelques modifications. Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) est un radical libre (Figure 20), violet en solution, présentant un maximum d'absorption caractéristique à 518 nm.

La méthode de Blois est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH grâce à la donation d'un hydrogène par un composé antioxydant selon l'équation (1) (Figure 19). La réduction du radical DPPH se manifeste par un changement de couleur du violet intense vers le jaune pâle avec pour conséquence une diminution de l'absorbance. La quantité de DPPH restante après un certain temps est inversement proportionnelle à l'activité de piégeage des radicaux par les antioxydants.



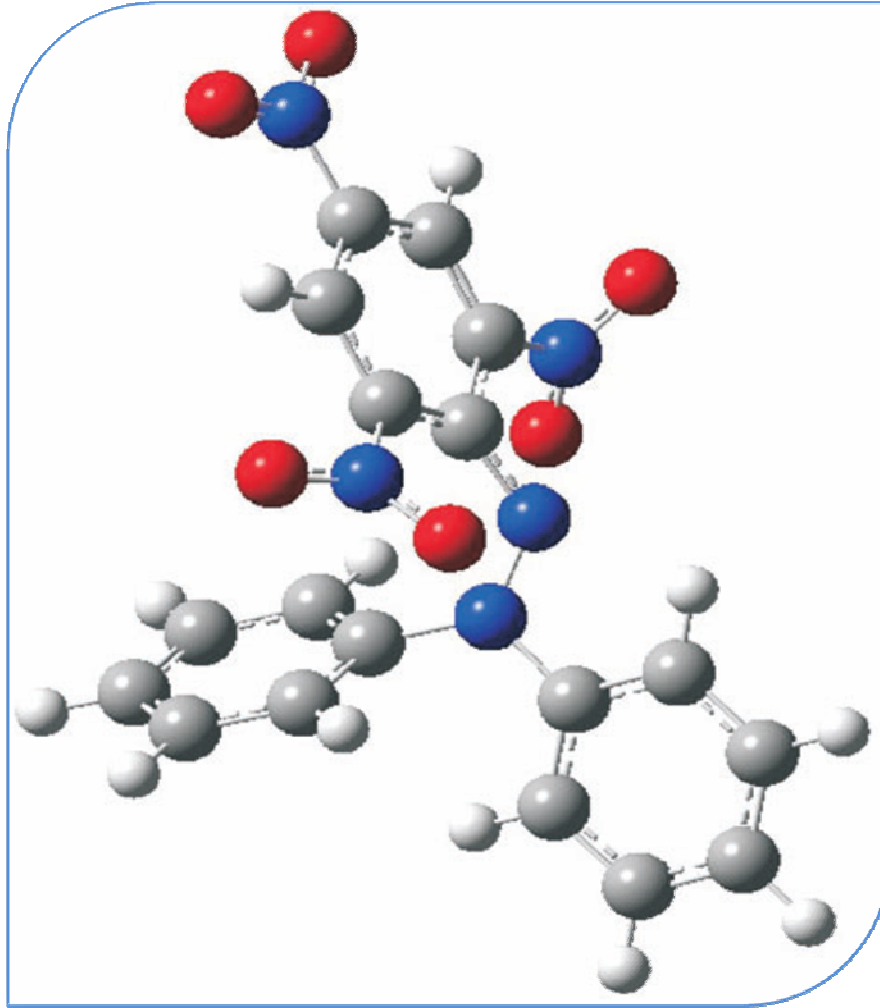
(1) (Frankel et Meyer, 2000).



Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre)

Diphenylpicrylhydrazine (non radical)

Figure 19. Forme libre et réduite du radical DPPH (Molyneux, 2004).



**Figure 20.** *Structure chimique du radical DPPH (C, gris foncé; H, gris clair ; N, bleu; O, rouge) (Zivko et al ., 2007).*

### *Mode opératoire*

#### **1. Préparation de la solution d'extrait**

Pour les extraits, on prépare des solutions dans du méthanol absolu à raison de 1 mg /ml ; ces dernières, dites solutions mères, subiront par la suite des dilutions pour obtenir différentes concentrations de l'ordre de microgrammes par millilitre.

## 2. Préparation de la solution de DPPH

Le DPPH (2,2-Diphényl -1picrylhydrazyl ( $C_{18} H_{12} N_5 O_6$ , Mr : 394,33) est solubilisé dans du méthanol pour avoir une solution de 0,3 mM.

## 3. L'essai au DPPH

Dans des tubes secs et stériles, 2.5 ml de différentes dilutions, de l'ordre des microgrammes, de l'extrait de romarin et de l'antioxydant standard (Quercétine), sont mélangés vigoureusement au moyen d'un vortex avec 1 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,3 mM) ; le mélange est conservé à l'abri de la lumière, à température ambiante, pendant 30 minutes : l'absorbance est lue à 518 nm par un spectrophotomètre.

Une solution contrôle, dite contrôle négatif, est préparée en mélangeant 2.5 ml de méthanol avec 1 ml d'une solution méthanolique au DPPH (0,3 mM).

La solution au DPPH est préparée le jour même et conservée dans des flacons bien scellés à l'abri de la lumière à 4°C. Le DPPH est un radical libre qu'il convient de manipuler avec précaution, en travaillant sous l'hôte.

## 4. Expression des résultats

La capacité des extraits à capter les radicaux libres, est calculée aussi en Pourcentage d'inhibition du radical DPPH selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition (P I)} = 100 \times (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}$$

(Yen et Duh, 1994)

Ou :

$A_{\text{contrôle}}$  est l'absorbance de la solution contrôle contenant tous les réactifs sauf l'échantillon.

$A_{\text{échantillon}}$  est l'absorbance de la solution à tester contenant l'échantillon.

L'activité antioxydante de l'extrait végétal est exprimée en IC<sub>50</sub>, calculée par analyse de régression linéaire, et définie comme étant la concentration du substrat, capable de causer la diminution de 50% de celle initiale du DPPH ou la concentration de l'extrait qui donne lieu à une réduction de l'absorbance de DPPH de 50% (Pérez et al., 2007 ; Erkan et al., 2008).

#### 4.2. Estimation du pouvoir réducteur des extraits de *Rosmarinus officinalis*

##### *Principe*

Les capacités réductrices des extraits végétaux ont été évaluées en utilisant l'habilité du Fe<sup>3+</sup> à être réduit en Fe<sup>2+</sup>, formant un complexe bleu (Yildirim et al., 2000). La méthode de (Oyaizu, 1986) citée par (Perez et al., 2007) à été utilisée à cet effet.

##### *Mode opératoire*

1 ml de différentes concentrations de l'extrait méthanolique ou de l'antioxydant standard (Quercétine) a été mélangé avec 2.5 ml d'une solution tampon de phosphate (200 mM, pH 6.6) et 2.5 ml d'Hexacyanoferrate de potassium (III) [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] (1%, p/v) : le mélange est incubé pendant 20 minutes à 50°C ; après refroidissement rapide, le mélange est centrifugé pendant 10 min à 2000 rpm, après avoir ajouté 2.5 ml d'acide trichloracétique (10%, p/v).

Finalement, 5 ml du surnageant sont mélangés avec 5 ml d'eau distillée et 1 ml de trichlorure de fer (FeCl<sub>3</sub>) (0,1%) ; après avoir secoué vigoureusement le mélange à l'aide d'un vortex, l'absorbance de la solution résultante est mesurée à 700 nm par un spectrophotomètre ; plus l'absorbance de la solution est élevée plus le pouvoir réducteur, qui est calculé à partir de l'équation ci-dessous, l'est aussi.

$$RP (\%) = \{[Am/Ab]-1\} \times 100 \quad (\text{Oyaizu, 1986}).$$

Ou:

Am = l'absorbance du mélange réactionnel (l'extrait de *Rosmarinus officinalis* plus les réactifs).

Ab = l'absorbance du blanc (l'eau distillée à la place de l'extrait).

La valeur  $IC_{50 (PR)}$ , qui représente la concentration de l'extrait correspondant à l'absorbance de 0.5 pour le pouvoir réducteur, a été obtenue par une analyse par régression linéaire (Pérez et al., 2007).

## 5. Etude de l'effet de *Rosmarinus officinalis* sur la peroxydation des viandes.

### Introduction

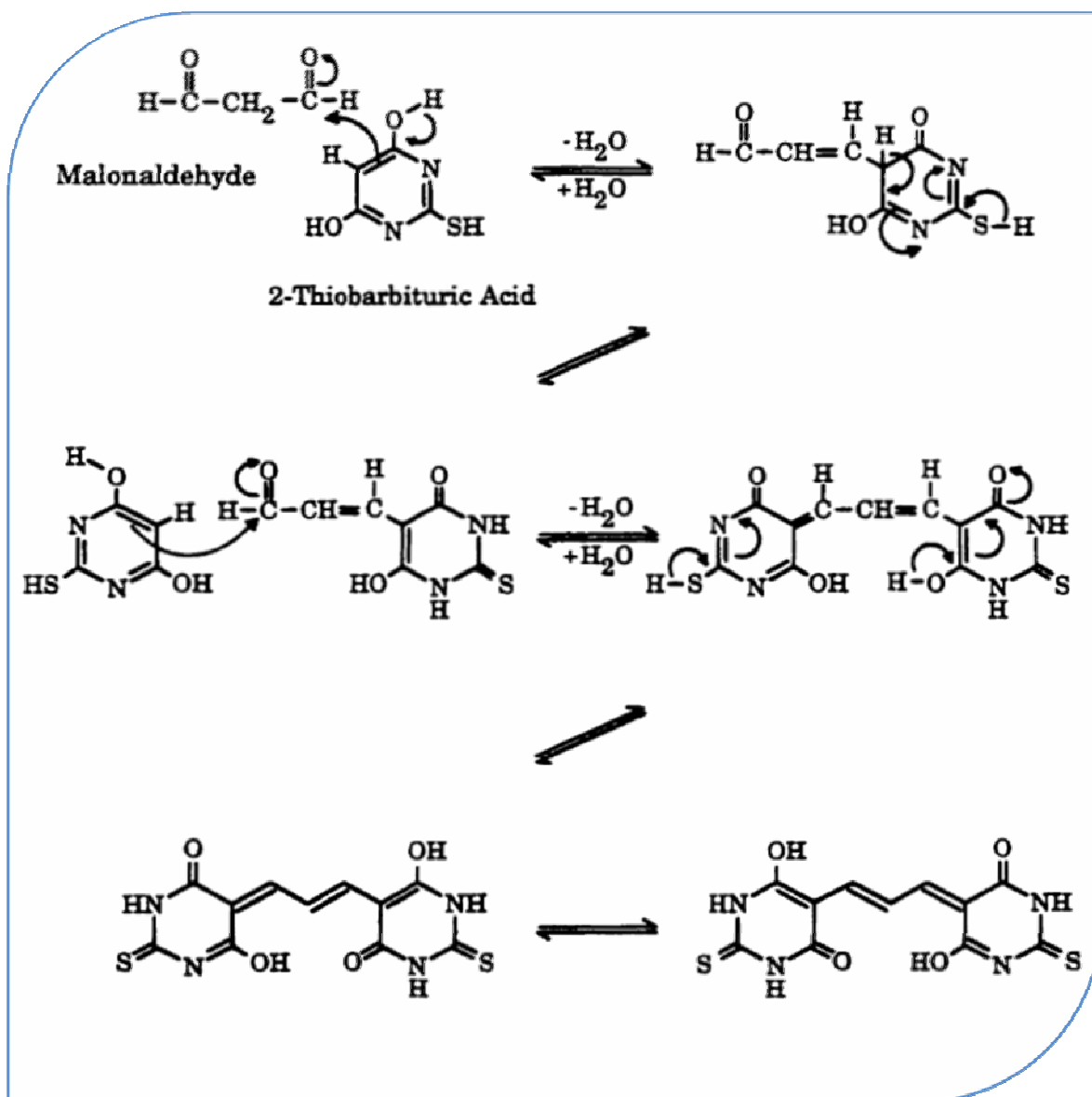
Pour estimer l'activité antioxydante du *Rosmarinus officinalis* et voir son effet sur l'oxydation des viandes, principalement bovines, nous avons incorporé à celles-ci 1000 ppm d'extrait de romarin en poudre ; un échantillon Contrôle (sans antioxydant) a été également préparé dans les mêmes conditions.

La viande était prélevée à partir du muscle de l'épaule de bœuf puis hachée, à laquelle a été additionné l'extrait de romarin(Madagh); les échantillons ont été emballés dans un film alimentaire puis conservés pendant 8 jours à l'obscurité dans un réfrigérateur à 2°C. L'indice de peroxydation lipidique (TBA) ainsi que le PH et l'humidité de la viande étaient calculés tous les deux jours de conservation, suivis par un modeste test sensoriel de l'odeur et de la décoloration.

### 5.1. Estimation du degré d'oxydation de la viande (TBA)

#### *Principe*

L'indice TBA ou TBARS est une méthode spectrophotométrique qui dose le malonaldehyde (MDA), ce dernier étant le produit secondaire de l'oxydation des acides gras polyinsaturés, le TBA réagit avec le malondialdehyde pour former un composé qui absorbe la lumière à 532-535 nm (Pegg, 1993)(Figure 21).



**Figure 21.** Mécanisme possible de la réaction du malondialdéhyde avec l'acide 2- Acide thiobarbiturique adapté par Pegg (1993).

### Mode opératoire

Pour mesurer l'indice TBA appelé aussi TBARS nous avons utilisé la méthode de (Salih et al, 1987 ;Botsoglou et al, 1994) adaptée par ( Genot, 1996). 2 g de viande hachée de bœuf, incorporée ou pas d'extrait de romarin, sont mélangés pendant 2 fois 30 secondes à 20 000 tpm, à l'aide d'un Ultra-turax, avec 16 ml d'acide trichloracétique (5%) et 100  $\mu\text{l}$  de BHT (1 g/L) (préparé dans l'éthanol absolu).

Le mélange est ensuite filtré : 2 ml du filtrat sont introduits dans des tubes à essai avec 2 ml d'acide thiobarbiturique (20 mM) et placés dans un bain marie à 70°C pendant 30 minutes (**Botsoglou et al., 1994**) ; on les laisse refroidir à température ambiante, puis on lit avec un spectrophotomètre, l'absorbance du mélange réactionnel et celle du blanc à 532, 509 et 580 nm. La coloration reste stable pendant 1 heure.

### *Expression des résultats*

#### *1. Par calcul*

**mg équivalent MDA / kg** =  $(0,72 / 1,56) * (A_{532} \text{ cor} * V_{\text{solvant}} * V_f) / PE$

A532 cor : DO corrigée selon la formule :

$A_{532} \text{ cor} = A_{532} - [(A_{509} - A_{580}) * (580 - 532)] / (580 - 509) - A_{580}$

Soit:

$A_{532} \text{ cor} = A_{532} - (A_{509} - A_{580}) * 48 / 71 - A_{580}$

V solvant : volume de la solution de dilution TCA+BHT, en ml

PE : masse de la prise d'essai, en gramme.

Vf : volume de filtrat prélevé

0,72 / 1,56 : correspond à la prise en compte du coefficient d'extinction moléculaire du complexe TBA-MDA à la valeur de:  $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (**Buege et Aust, 1978**) et au poids moléculaire du MDA d'une valeur de  $72 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

#### *2. Par rapport à la gamme étalon TEP hydrolysé*

Exprimer le résultat en mg équivalent MDA / kg, après détermination de la concentration sur la droite d'étalonnage réalisée avec le TEP.

### **5.2. Détermination du PH de la viande**

Pour déterminer le pH de la viande on a adopté la méthode (**AOAC, 1984**) : 1 g de viande hachée est mélangé, pendant 2 minutes, avec 9 ml d'eau distillée à l'aide d'un mixeur, le tout est filtré, le pH étant mesuré avec un pH mètre.

### 5.3. Détermination de la teneur en eau

Le taux d'humidité a été déterminé par la différence de poids de l'échantillon (5 g), avant et après 18 heures de séchage à 100°C ; l'analyse a été faite en trois fois, les résultats sont exprimés en g d'eau par Kg d'échantillon humide (Eymard et al., 2005).

### 5.4. Test sensoriel

Les échantillons de viande hachée ont été évalués par un panel de six membres, selon la méthode de Djenane et al (2001) avec quelques modifications. Les attributs étudiés ont été la décoloration et l'odeur, et notés selon sur une échelle de 5 points descriptifs ; les scores pour la décoloration se référaient au pourcentage de la surface décolorée soit : 1 = aucune, 2 = 0-10%, 3 = 11-20%, 4 = 21-60%, et 5 = 61-100%. Les scores de l'odeur se référaient à l'intensité des odeurs associées à l'oxydation des lipides soit : 1 = aucune, 2 =très faible, 3 =faible; 4 = modéré; et 5 = extrême. Il n'y a que les résultats prédominants, exprimés par les panélistes, qui sont pris en considération.

## 6. Analyse statistique

Les résultats ont subi une analyse de variance monofactorielle ou bifactorielle, organisée en randomisation, suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls par un logiciel software (Stat box 6.4.). Les valeurs de  $p \leq 0.05$  sont considérées statistiquement significatives ; les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> (DPPH) et IC<sub>50</sub>(PR) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition =  $f$  (concentrations)] et de la courbe [Pouvoir réducteur%= $f$  (concentrations)].

# **Résultats et discussion**

## 1. Analyses du sol

Les résultats de l'analyse chimique des sols sont représentés dans le **tableau 5**. Les sols où ont été récoltées les plantes de *Rosmarinus officinalis* accusaient tous un pH basique ; le sol de la région de Madagh possède le pH le plus élevé (8.78), suivi par celui de la région de Khelil avec un pH de 8.51. Quant aux régions d'El Bouihi et de Tinkial leurs pH est de 8.40. Les pH alcalins sont les signes d'une carbonisation. A ce pH du milieu, la plante ne peut connaître de limitation d'adsorption en certains éléments minéraux (**Mehlich, 1981**).

La salinité s'avère être extrêmement faible en raison des faibles conductivités électriques enregistrées (**ISO 11265., 1995**) qui sont de 0.05 ms/cm pour la région de Madagh, 0.08 ms/cm pour la région de Khelil, 0.06 et 0.043 ms/cm pour les régions d'El Bouihi et de Tinkial. Une salinité faible signifie qu'il n'y a aucun problème ou impact sur les relations sol -plante (**Gouny et Cornillon, 1973**).

En ce qui concerne le taux de calcaire total, le pourcentage le plus important a été observé dans le sol de la région d'El Bouihi, avec une valeur moyenne de 11.88 %, suivi par la région de Khelil avec une valeur moindre (8.91%). Par contre, des valeurs identiques de 2.12 %, considérées comme étant des valeurs négligeables, sont enregistrées dans les régions de Tinkial et de Madagh. On peut conclure que les sols de Tinkial et de Madagh dont les résultats du calcaire total sont inférieurs à 3% ne présentent aucun indice de calcarité élevé ; par contre, les sols de la région d'El Bouihi et Khelil dont les résultats sont supérieurs à 8% peuvent être classés parmi les sols calcaires ; ces résultats concordent avec ceux de **Sardans et al (2005)** qui affirment que cette espèce a une préférence pour ce type de sol.

Pour le taux de matière organique, la région de Madagh s'avère être la moins riche avec une valeur de 1.05 % qui est tout de même une valeur assez réduite. Cependant, les régions de Tinkial et de Khelil présentent des pourcentages moyens respectifs de 2.32 et 2.43%. La région d'El Bouihi, quant à elle est pourvue d'une assez bonne quantité de matière organique (3.80%).

Par ailleurs, des pourcentages pauvres à moyens en azote total ont été remarqués dans les sols d'où provient notre matériel végétal allant de 0.7 % dans la région de Madagh à 1.4% dans la région de Tinkial, les régions d'El Bouihi et de Khelil accusant des pourcentages identiques de 1.22% en matière azotée.

Toutefois, des valeurs négligeables en phosphate assimilable ( $P_{205}$ ) ont été notées dans trois régions différentes (1.22 ,16.66 et 33.33 ppm) contre 66.66 ppm dans la région d'El Bouihi qui reste quand même une valeur assez faible comparativement aux terrains de grandes cultures contre 100 ppm en moyenne dans les sols moyennement pourvus en ce composé (NF X31-161., 1999).

L'analyse granulométrique du sol de la région de Madagh (Oran) révèle des pourcentages élevés en sable fin et en sable grossier : 52.71 et 41.60% respectivement. Par contre, des quantités négligeables en argile, limon fin et grossier ont été constatées (1.72, 1.87 et 2.11%). Quant à la région d'El Bouihi, des taux moyens en limon fin, sable fin et grossier ont été observés (18.89, 18.13, 23.18%) ; le taux en limon grossier (27.23%) constitue par ailleurs la part la plus élevée, alors que celle, la moins élevée est attribuée à l'argile (12.58%) (**Tableau 4**).

La quantité de sable grossier est relativement élevée (31.84 %) dans le sol de la région de Khelil contrairement aux faibles taux d'argile et de limon fin calculés à partir du même matériau (9.70 et 10.15 %). Cependant, des teneurs moyennes de 23.95 et 24.36 % sont le résultat du taux calculé de sable fin et de limon grossier dans cette même région.

Le test granulométrique du sol de la région de Tinkial démontre d'une part qu'il renferme de forts taux en limon grossier (36.73%) et d'autre part, les teneurs en limon fin et en sable fin relativement moyennes (19.60 et 21.07%). Par ailleurs, les taux les plus bas (8.97 et 13.64%) sont ceux du sable grossier et de l'argile.

En conclusion, on peut dire que du point de vue granulométrie, les sols de la région de Sebdou présentent tous une texture limono- sablo -argileuse, alors que celui de Madagh présente une texture limono -sableuse. L'espèce étudiée peut donc pousser,

en cas de culture, dans différents sols. Cependant **Krussmann (1966)** affirme que le romarin possède, quand même, quelques exigences culturales à savoir : un sol léger, sableux, et calcaire.

**Tableau 4.** Résultats de l'analyse granulométrique.

Paramètres calculés	Argile (%)	Limon fin (%)	Sable fin (%)	Sable grossier (%)	Limon grossier (%)
Régions					
Madagh	1.72	1.87	52.71	41.60	2.11
El Bouihi	12.58	18.89	18.13	23.18	27.23
Khelil	9.70	10.15	23.95	31.84	24.36
Tinkial	13.64	19.60	21.07	8.97	36.73

**Tableau 5.**Caractérisation chimique du sol des quatre régions étudiées.

Paramètres étudiés	pH	Conductivité électrique (C.E) (ms/cm)	Calcaire total CaCO <sub>3</sub> (%)	Matière organique (%)	Azote total (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> assimilable (ppm)			
<b>Régions</b>									
Madagh	8.78	0.050	2.12	1.05	0.70	16.66			
El Bouihi	8.40	0.060	11.88	3.80	1.22	66.66			
Khelil	8.51	0.080	8.92	2.43	1.22	1.22			
Tinkial	8.40	0.043	2.12	2.32	1.40	33.33			
<b>Normes</b>	pH<3,5 ...hyper acide 3.5<pH<5...très acide 5<pH<6.5...acide 6.5<pH<7.5...neutre 7.5<pH<8.5...basique pH>7.8...très basique	CE= 0.6 ....Peu salé CE= 1.2...salé CE= 2.4....très salé CE= 6...extrêmement salé	<2.....trace 02 à 10.....faible 10 à 25....moyen 22 à 55....forte >55...très forte	<1.....très pauvre 1 à 2....pauvre 2 à 4...moyenne >4...bien pourvu	<0.5....très pauvre 0.5 à0 1.0...pauvre 1.0 à 1.5...moyenne >4.....bien pourvu	<b>Grandes cultures et prairies</b>			
							<b>Slé</b>	<b>SM</b>	<b>SLo</b>
						Très faible	40	50	100
						Faible	50	100	150
						Moyenne	100	150	200
						Bien pourvu	150	200	250
						<b>Maraîchage</b>			
							<b>Slé</b>	<b>SM</b>	<b>SLo</b>
						Très faible	50	100	150
						Faible	100	150	200
						Moyenne	150	200	250
						Bien pourvu	200	250	300
						<b>Vignes et arbres fruitiers</b>			
							<b>Slé</b>	<b>SM</b>	<b>SLo</b>
Très faible	-	40	50						
Faible	40	50	100						
Moyenne	50	100	150						
Bien pourvu	100	150	200						
<b>Sources</b>	(Cirad, 2004)	(ISO 11265., 1995)	(NF ISO : 10693., 1995)	(NF 44-041, 1995)	(NF ISO 11261., 1995)	(NF X31-161., 1999)			

Slé : Sol léger ; SM : Sol moyen ; SLo : Sol lourd.

## 2. Etude phytochimique de l'espèce *Rosmarinus officinalis*

### 2.1. Matière sèche.

Le *Rosmarinus officinalis* de la région de Khelil semble renfermer une quantité significativement plus importante ( $P < 0.01$ ) en matière sèche qui est de 66.67% MF, comparativement à celui de la région de Tinkial (65.33% MF) et d'El Bouihi (62.67 % MF). Dans les trois cas, la plante renferme approximativement les 2/3 de son poids de matière sèche (**Tableau 6**). Par contre, un plus faible niveau en matière sèche a été enregistré dans la région de Madagh (60.67 % MF) par rapport aux trois autres régions. Ceci est du probablement aux conditions climatiques et à l'aire géographique de chaque plante. D'ailleurs, nous pouvons remarquer que le romarin de la région de Madagh (Oran) renferme une teneur moins importante en matière sèche et par conséquent un taux d'humidité plus élevé par rapport au romarin des hauts plateaux à savoir le romarin de la région d'El Bouihi, Khelil et Tinkial.

### 2.2. Matière minérale.

Dans le *Rosmarinus officinalis*, les taux les plus élevés ( $P < 0.01$ ) en matière minérale ont été observés dans les régions d'El Bouihi 8.80 % MS suivis par la région de Khelil avec un moindre taux de 7.87 % MS, alors que les faibles teneurs en matière minérale sont celles trouvées dans le romarin de Madagh et de Tinkial, qui accusent des quantités comparables ( $P > 0.05$ ) de 6.83 et 6.73 % MS (**Tableau 6**). Cela vient confirmer les résultats trouvés par **Ozcan (2004)** qui a révélé que cette espèce s'avère être très riche en éléments minéraux, notamment le Ca (10899 mg/Kg), le Mg (3868 mg/Kg) et le K (9356 mg/Kg); par ailleurs des taux assez importants mais moins élevés en Fe (547 mg/Kg), en Al (486 mg/Kg) et en P (418 mg/Kg) ont été mesurés. Par contre le Zn n'est présent que sous forme de traces de 15.6 mg/Kg.

### 2.3. Matière organique.

Concernant la matière organique, des quantités significativement moins importantes ( $P < 0.01$ ) ont été constatées dans le romarin de la région d'El Bouihi avec une valeur de 85.95% MS. Les teneurs proches en matière organique de l'espèce des placettes de Khelil et de Madagh sont de 88.19 et 88.74 % MS ; alors que la teneur la plus élevée en cette matière est attribuée au romarin de Tinkial (89.69% MS) (**Tableau 6**) ; Ceci

peut refléter la présence de nombreuses molécules organiques dans cette espèce, qui restent à identifier.

**Tableau 6.** Taux de matière sèche, minérale et organiques des feuilles de *Rosmarinus officinalis* des quatre régions de l'étude.

Facteurs étudiés	Madagh (Oran)	El Bouihi (Tlemcen)	Khelil (Tlemcen)	Tinkial (Tlemcen)	Effet du facteur étudié F1
Composants chimiques					
Matière sèche (% MF)	60.67 ± 0.42 a	62.67 ± 1.16 a	66.67 ± 3.06 a	65.33 ± 2.31 a	NS
Matière minérale (% MS)	6.83 ± 0.15 c	8.80 ± 0.20 a	7.87 ± 0.31 b	6.73 ± 0.12 c	**
Matière organique (%MS)	88.74 ± 0.15 b	85.95 ± 0.20 c	88.19 ± 0.31 b	89.69 ± 0.12 a	**

F 1 : Facteur relatif aux régions où les espèces de *Rosmarinus officinalis* ont été récoltées MF : Matière fraîche ; MS : Matière sèche ; (\*\*): Effet hautement significatif du facteur étudié ; NS : Effet non significatif du facteur étudié. Chaque valeur représente la moyenne ± écart type de trois échantillons ; Les valeurs affectées des lettres diverses sont significativement différentes.

## 2.4. Rendement à l'extraction.

Les extraits méthanoliques récupérés après évaporation à sec et sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant. Le rendement a été déterminé par rapport à 100 g de matériel végétal et les résultats sont exprimés en pourcentage.

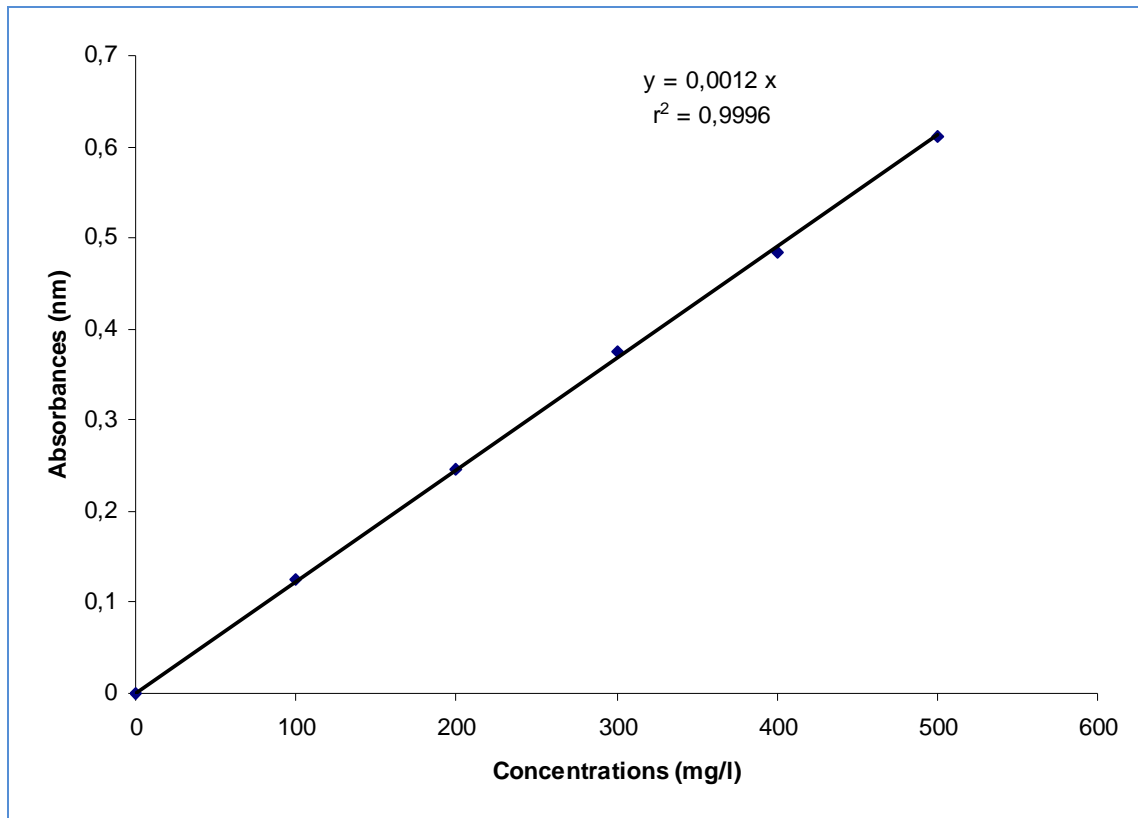
Concernant l'aspect et la couleur des extraits bruts après évaporation du solvant, il s'agit bien d'une poudre verte foncée. Les résultats portés dans le **tableau 7** montrent que les extraits des quatre régions recèlent des rendements presque identiques de l'ordre de 43%. Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et étroitement lié aux méthodes d'extractions et à la qualité du solvant employé. **Dorman et al (2003)** ont trouvé que le rendement de l'extrait sec obtenu par hydrodistillation des feuilles de romarin était de 24%, alors que **Mata et al (2007)** avaient trouvé que le rendement à l'extraction était de 51.1% pour l'extrait aqueux et de 29.2% pour l'extrait éthanolique des feuilles de romarin.

**Tableau 7.** Aspect, couleur, et rendement à l'extraction des différents extraits méthanoliques des régions étudiées.

Région	Aspect	Couleur	Rendement à l'extraction (%)
Madagh	Poudre	Vert foncé	43.20
El Bouihi	Poudre	Vert foncé	43.67
Khelil	Poudre	Vert foncé	42.96
Tinkial	Poudre	Vert foncé	43.17

## 2.5. Polyphénols totaux.

Le contenu en polyphénols totaux a été estimé par la méthode colorimétrique de Folin–Ciocalteu mise en place par **Singleton et Rossi (1965)**. Une courbe d'étalonnage linéaire de l'acide gallique avec des concentrations allant de 100 jusqu'à 500  $\mu$ g/ml et un coefficient de détermination ( $r^2$ ) d'une valeur de 0.9996 a été réalisée (**Figure 22**). Les polyphénols totaux sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique /g d'extrait.



**Figure 22.** Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne  $\pm$  écart type de trois essais).

La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour le dosage des polyphénols et ce pour les raisons suivantes :

- (1) c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité.
- (2) la disponibilité du réactif de Folin.
- (3) la grande longueur d'onde (765 nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré.
- (4) c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde (**Huang et al., 2005**), mais l'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne donne qu'une estimation grossière du taux de polyphénols totaux présents dans un extrait végétal ; elle n'est pas spécifique aux polyphénols, mais de nombreux interférents peuvent réagir avec le réactif donnant une concentration apparente élevée en produits phénoliques (**Prior et al., 2005**). Par ailleurs, les différents

---

composés phénoliques réagissent différemment à ce test, en fonction du nombre de groupes phénoliques qu'ils contiennent (**Singleton et Rossi, 1965**).

Comme le montre le **tableau 8** il n'y a pas une différence significative ( $P > 0.05$ ) entre les quantités de polyphénols totaux dans les différents extraits méthanoliques des quatre régions étudiées. Ces quantités varient entre 36 et 40 mg (EAG)/g d'extrait et sont considérées comme des quantités assez importantes. Le romarin de la région d'El Bouihi semble être le plus riche en polyphénols avec une concentration de 40 mg (EAG)/g d'extrait suivi par le romarin de Madagh avec la concentration de 36.70 mg (EAG)/g d'extrait, alors que les romarins de la région de Tinkial et de Khelil s'avèrent les moins riches en polyphénols avec des concentrations respectives de 36.21 et 36.05 mg (EAG)/g d'extrait.

Il existe différentes informations publiées dans la littérature sur la teneur totale des composés phénoliques dans le romarin. Ceci est dû selon **Del Bano et al (2003)** ; **Ibanez et al (2003)** à des facteurs intrinsèques de la plante, mais les processus et les conditions d'extraction affectent aussi, les concentrations en ces composés (**Albu et al ., 2004**).

Des résultats similaires aux nôtres ont été avancés par **Tawaha et al (2007)** ayant utilisé une méthode d'extraction similaire et le même solvant, où le taux de polyphénols dans l'extrait méthanolique était de 39.1 mg (EAG)/g de matière sèche alors que celui de l'extrait aqueux était de 48.9 mg (EAG)/g de matière sèche. **Erkan et al (2008)** en utilisant la méthode d'extraction au Soxhlet à l'aide du méthanol comme solvant avait trouvé que le taux de polyphénols était de 162 mg (EAG)/g de matière sèche.

De ce qui précède, on est tenté de noter que nos résultats concordent avec ceux de **Haak et al (2009)** qui ont révélé que les principaux agents antioxydants des extraits de *Rosmarinus officinalis* sont des polyphénols ; l'Epicatechins, l'Epigallocatechine gallate (EGCG), l'Epigallocatechine (EGC), l'Epicatechine gallate (ECG) et l'Epicatechine (EC), mais les principaux polyphénols sont des diterpènes phénoliques (abietane diterpènes) ; le Carnosol et l'acide Carnosique.

La chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) a été utilisée pour l'analyse et l'identification des composés responsables de l'activité antioxydante par **Senorans et al (2000)**. Deux groupes de composés phénoliques ont été identifiés : Les diterpènes tels que le Carnosol, le Rosmadial, l'acide Carnosique, le Méthyl carnosate, le Rosmanol, un isomère du Carnosol, et les flavonoïdes, comme le Cirsimaritin et le Scutellarein. D'autres composés ont également été détectés, mais leur identification complète n'était pas possible. Tous ces composés polyphénoliques ont la capacité d'agir en tant qu'antioxydants par un mécanisme de piégeage des radicaux libres et aussi grâce à leur capacité connue de chélation des métaux de transition (**Marti'n et al., 2002**).

**Tableau 8.** Taux de polyphénols et de Flavonoïdes des feuilles de *Rosmarinus officinalis* des quatre régions de l'étude.

Facteurs étudiés	Madagh (Oran)	El Bouihi (Tlemcen)	Khelil (Tlemcen)	Tinkial (Tlemcen)	Effet du facteur étudié F1
Composants chimiques					
Polyphénols (mg EAG/g d'extrait)	36.70 ± 1.18 a	40.00 ± 3.51 a	36.05 ± 0.87 a	36.21 ± 4.53 a	NS
Flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait)	10.96 ± 0.25 a	8.43 ± 0.27 b	6.99 ± 0.28 c	8.74 ± 0.47 b	**

F 1 : Facteur relatif aux régions où les espèces de *Rosmarinus officinalis* ont été récoltées ; EAG : Equivalent acide gallique ; EC : Equivalent de Quercétine. (\*\*): Effet hautement significatif du facteur étudié ; NS : Effet non significatif du facteur étudié. Chaque valeur représente la moyenne ± écart type de trois échantillons ; Les valeurs affectées des lettres diverses sont significativement différentes.

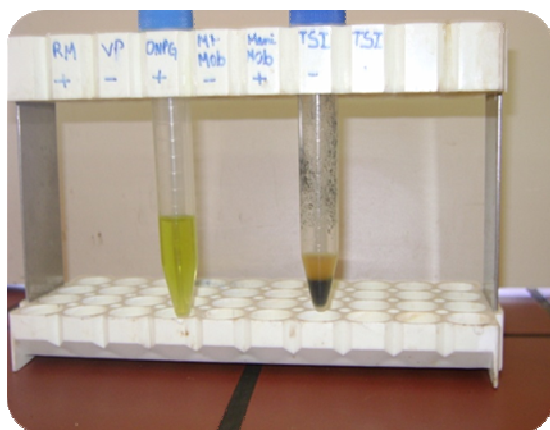
## 2.6. Mise en évidence et dosage des Flavonoïdes.

### 2.6.1. Mise en évidence des Flavonoïdes.

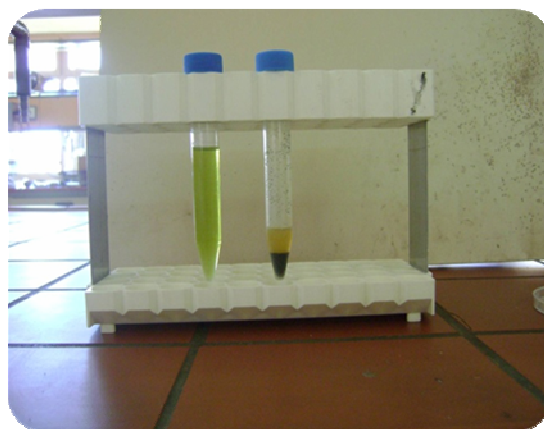
La technique de **Karumi et al (2004)**, basée essentiellement sur l'ajout de Mg en milieu légèrement acide a été utilisée pour mettre en évidence les flavonoïdes dans les quatre extraits végétaux.

Comme nous pouvons le remarquer sur les figures ci-dessous (**Figure 23**), il y a eu virage de la couleur de l'extrait végétal du vert vers l'orange impliquant la présence de flavonoïdes dans les quatre extraits de *Rosmarinus officinalis* mais avec des intensités différentes.

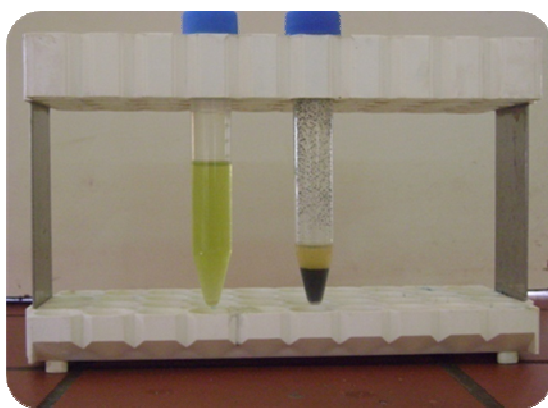
Le virage de la couleur de l'extrait est très accentué chez le romarin de la région de Tinkial suivi par celui de la région de Khelil, mais la couleur est moins intense dans l'espèce de la région d'El Bouihi par rapport aux deux premières régions. Enfin, l'extrait de la région de Madagh paraît être le moins riche en Flavonoïdes et ceci en se référant aux résultats de la mise en évidence des Flavonoïdes qui donne un très faible virage de couleur, signe d'une absence ou d'une faible teneur en ces composés.



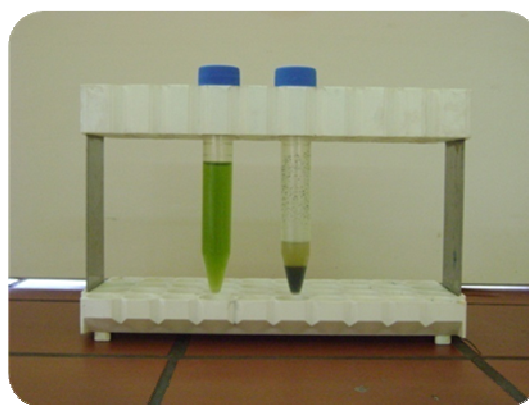
(a) ++++



(b) +++



(c) ++

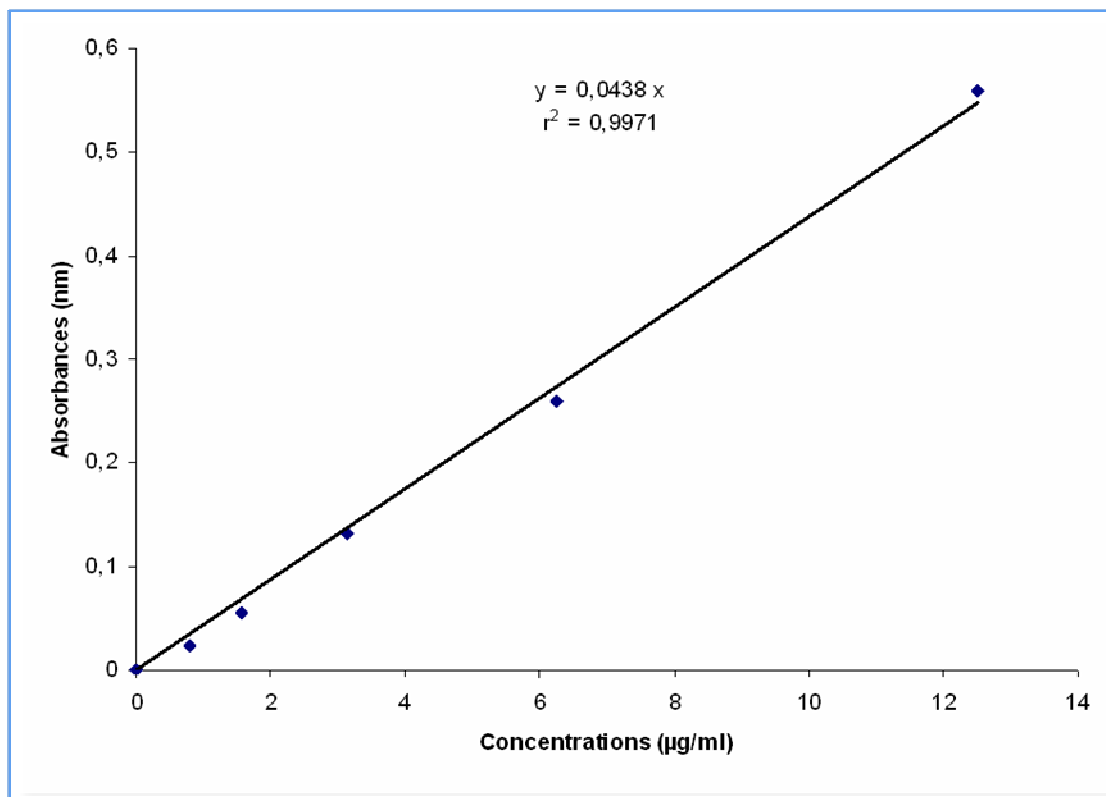


(d) +

**Figure 23.** Mise en évidence des flavonoïdes dans les quatre extraits étudiés. (a) : extrait de *Rosmarinus officinalis* de la région de Tinkial, (b) : extrait de *Rosmarinus officinalis* de la région de Khelil, (c) : extrait de *Rosmarinus officinalis* de la région d'El Bouihi. (d) extrait de *Rosmarinus officinalis* de la région de Madagh. + : intensité de la couleur orange (présence des flavonoïdes).

### 2.6.2. Dosage des Flavonoïdes.

Le dosage des flavonoïdes par la technique de **Lamaison et Carnat (1991)** en se référant à une courbe d'étalonnage de la Quercétine (**Figure 24**) a abouti aux résultats suivants : les flavonoïdes constituent une fraction importante des polyphénols présents et déjà dosés dans *Rosmarinus officinalis* des quatre régions, avec des valeurs oscillant de 7 à 11 µg équivalent de Quercétine /g d'extrait.



**Figure 24.** Droite d'étalonnage de la Quercétine (moyenne  $\pm$  écart type de trois essais).

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du Tri chlorure d'aluminium révèle que les extraits alcooliques de *Rosmarinus officinalis* montrent tous une différence hautement significative ( $P < 0.01$ ) (**Tableau 8**). L'extrait de romarin de la région de Madagh s'avère être le plus riche ( $P < 0.01$ ) en flavonoïdes avec des teneurs de 10.96 mg EQ/g d'extrait suivi par ceux des régions d'El Bouihi et de Tinkial avec des valeurs proches ( $P > 0.05$ ) de 8.43 et 8.74 mg EQ/g d'extrait. Cependant, seulement 7 mg EQ/g d'extrait ont été trouvés dans l'extrait de romarin de la région de Khelil.

En effet, beaucoup de travaux de recherches annoncent que les flavonoïdes sont en abondance dans *Rosmarinus officinalis* notamment les Flavones qui représentent une classe importante parmi ces derniers. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Luis et al (2007)** qui avaient trouvé après analyse par HPLC des feuilles de *Rosmarinus officinalis* qu'elles contenaient une quantité assez importante de flavonoïdes à savoir 0.57mg/g de Naringinine, 0.08mg/g de Cirsimariten et 0.02 mg/g d'Hespiduline. Des résultats similaires ont été obtenus par **Frutos et Hernandez –Herrero (2005)** et les principaux flavonoïdes sont la Genkoanine, le Cirsimariten, la Lutéoline, l'Hespiduline, la Nepétine, la Nepetrine, qui ont été également décrits comme étant des puissants antioxydants.

Ces flavonoïdes peuvent agir selon deux mécanismes différents ; soit en tant que puissants piègeurs ou capteurs des électrons des radicaux libres (**Rice-Evans et al ., 1997 ; Grace et al .,1998**) ou comme donneurs d'électrons aux radicaux libres comme le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules (**Yamasaki, 1997**).

## 2.7. Chromatographie sur couches minces (CCM).

Pour la caractérisation du contenu en métabolites secondaires de *Rosmarinus officinalis*, nous avons utilisé la méthode de CCM décrite dans les travaux de **Wagner et Bladt (1996)**. Le criblage phytochimique effectué sur les quatre extraits végétaux au moyen de la CCM, et le calcul des rapports frontaux (R<sub>f</sub>) des différents échantillons a donné les résultats consignés dans le tableau 9.

L'analyse qualitative après CCM des quatre extraits avec un système de migration constitué d'acétate d'éthyle, d'acide acétique, d'acide formique et d'H<sub>2</sub>O (10 :11 :11 :26 : V/V/V/V), a permis d'avoir une très bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots. Le CCM visualisé sous UV à 365 nm avant révélation présente des taches de couleur bleu foncé qui peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires(**Tableau9**).

Pour préciser la nature de ces composés, un réactif spécifique aux flavonoïdes (réactif de Neu ou le 2-Aminoethyl diphenylborinate) a été utilisé. Ce réactif révèle les flavonoïdes en orange, rouge, jaune, bleu, vert (**Wagner et Bladt, 1996**). La révélation au réactif de Neu et visualisation sous UV à 365 nm, a permis de mettre en évidence deux types de fluorescence : l'orange et le bleu vert (**Figure 25**).

Comme nous pouvons l'observer sur la plaque du chromatogramme, la couleur orange paraît un peu moins accentuée dans l'extrait du romarin de la région de Madagh par rapport à ceux des trois autres régions ; ceci est synonyme de la présence d'une plus faible quantité de flavonoïdes.

Ces résultats correspondent à ceux de la mise en évidence des flavonoïdes par la méthode de **Karumi et al (2004)** ; Mais par contre, pas tout à fait aux résultats obtenus lors du dosage des flavonoïdes par la méthode de **Lamaison et Carnat (1991)** dont la teneur la plus élevée était attribuée à l'extrait de romarin de la région de Madagh.

La couleur orange selon **Wagner et Bladt, (1996)** correspond à une classe de flavonoïdes appelée les flavones de type Lutéoline.

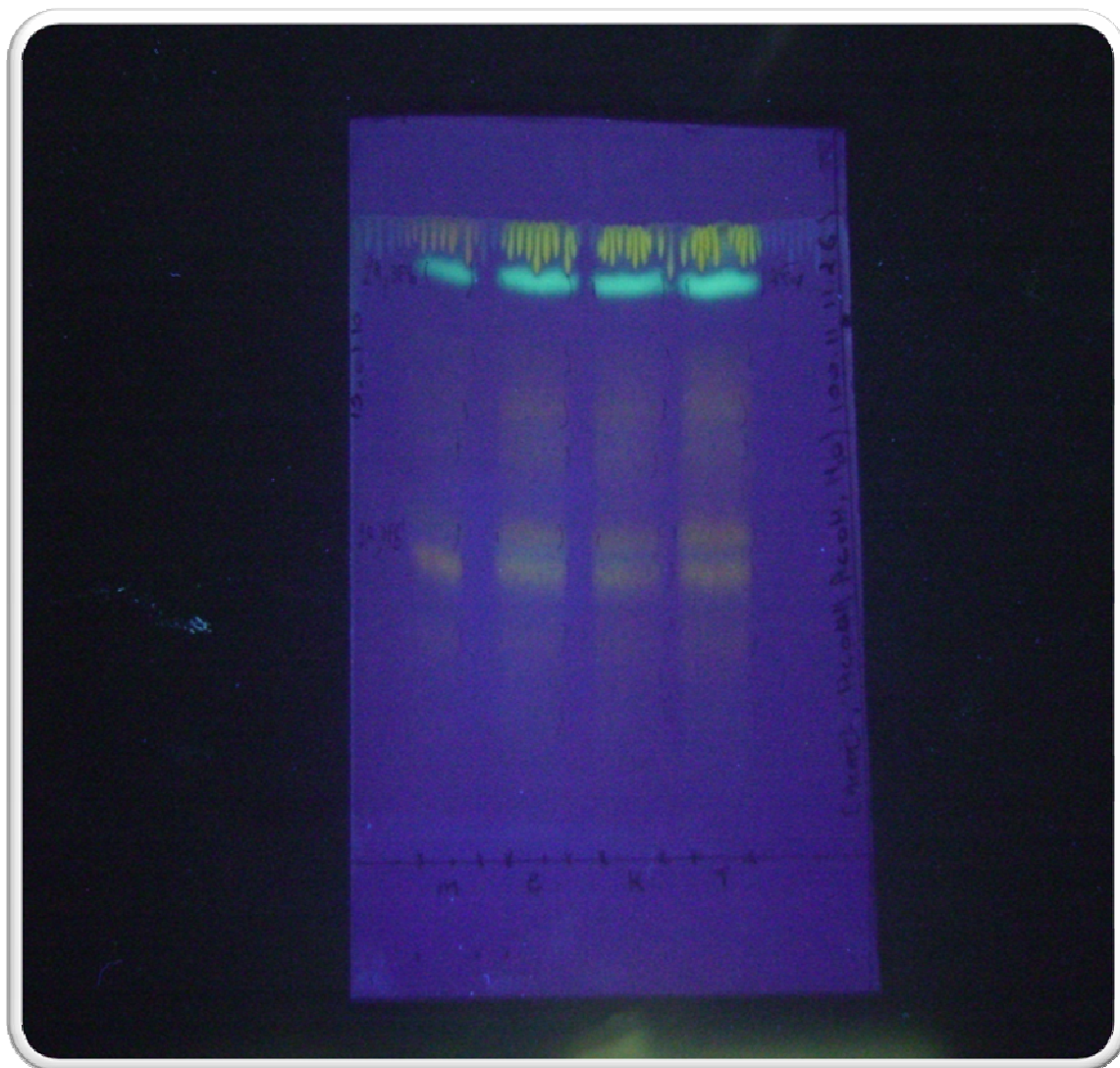
La Lutéoline est reconnue pour sa capacité de stimulation de certaines hormones estrogènes, d'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses et la tumorigénèse et également de piégeage de l'action nocive des radicaux libres au niveau de l'ADN. (**Radu et al ., 2006**). D'autres chercheurs ont observé qu'elle inhibait de manière dose dépendante, la diminution du captage de la dopamine par les neurones et la perte de neurones dans la maladie de parkinson (**Chen et al ., 2008**).

D'après l'ensemble des résultats que nous avons obtenus, nous déduisons que tous les spots révélés correspondent aux flavonoïdes, ce qui confirme la richesse des extraits de romarin en cette famille de métabolites secondaires. Ces résultats correspondent à ceux de **Regnault-Roger et al (2004)** qui avaient trouvé que les flavonoïdes inclus dans l'huile essentielle de romarin sont majoritairement des flavones glucosylés ou aglycones, suivis par de petites quantités de flavanones. Plusieurs types

de flavones ont été identifiés tels que les Trihydroxyflavones éther de méthyle comme la Genkwamine et la Genkwamine-4-glucoside, la Nepetine-7-glycoside. Les Tetrahydroxyflavones éther de méthyle tel que la Luteoline-7-glucoside et le Scutellarein-7-glucoside. Les Pentahydroxyflavones éther de méthyle comme le 6-hydroxyluteoline-7- glucoside. **Xiao et al (2009)** ont pu détecter dans l'extrait alcoolique Chloroforme –Méthanol (1/3,v/v) des feuilles séchées de *Rosmarinus officinalis* au moyen de la HPLC –DAD-SPE-CryoNMR-MS deux type de Flavonoïdes à savoir le 6-methoxyluteoline -7-glucoside et l'Homoplantagin.

**Tableau 9.** Chromatographie sur couche mince des quatre extraits de feuilles de romarin révélés avec le réactif de Neu et développement sur acétate d'éthyle, acide acétique, acide formique et H<sub>2</sub>O (10: 11:11 :26 : v /v/v/v).

extrait	Avant révélation		Types de composés possibles		
	Rf	Couleur	Réactif de Neu		
			Rf	Couleur	
Madagh	0.5	Quenching à 254 nm	0.5	Orange clair	Flavonoïdes+
	0.9	Bleu foncé à 365 nm	0.9	Bleu Vert	Flavonoïdes+++
El Bouihi	0.5	Quenching à 254 nm	0.5	Orange intense	Flavonoïdes+++
	0.9	Bleu foncé à 365 nm	0.9	Bleu Vert	Flavonoïdes+++
Khelil	0.5	Quenching à 254 nm	0.5	Orange intense	Flavonoïdes+++
	0.9	Bleu foncé à 365 nm	0.9	Bleu Vert	Flavonoïdes+++
Tinkial	0.5	Quenching à 254 nm	0.5	Orange intense	Flavonoïdes+++
	0.9	Bleu foncé à 365 nm	0.9	Bleu Vert	Flavonoïdes+++

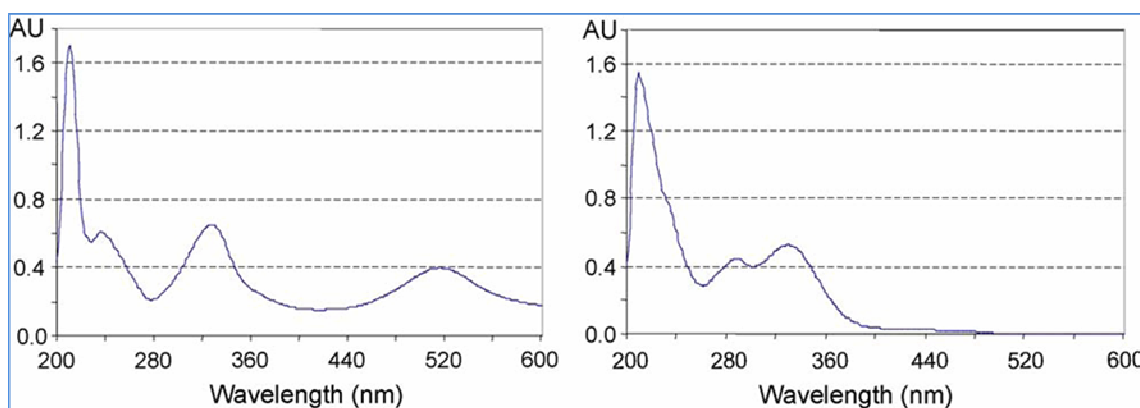


**Figure 25.** Chromatographie sur couches minces des quatre extraits de feuilles de *Rosmarinus officinalis* (Plaque Révélée au réactif de Neu et visualisée sous UV à 365 nm).

### 3. Estimation de l'activité antioxydante des différents extraits de *Rosmarinus officinalis*

#### 3.1. Estimation de l'activité antiradicalaire des quatre extraits de *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis du radical DPPH (Effet scavenger du radical DPPH).

L'activité antioxydante des différents extraits vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie. Le DPPH est un radical stable présentant une absorption maximale à 517 nm et à 328 nm, mais pour éviter les interférences avec la matrice de *Rosmarinus officinalis*, la longueur d'onde de 517 nm a été choisie (Almela et al., 2006)(Figure26). Bien que communément utilisé pour déterminer l'activité antioxydante in vitro, le test DPPH ne ressemble pas étroitement aux situations biologiques car c'est un radical exogène (Chen et al., 2006).

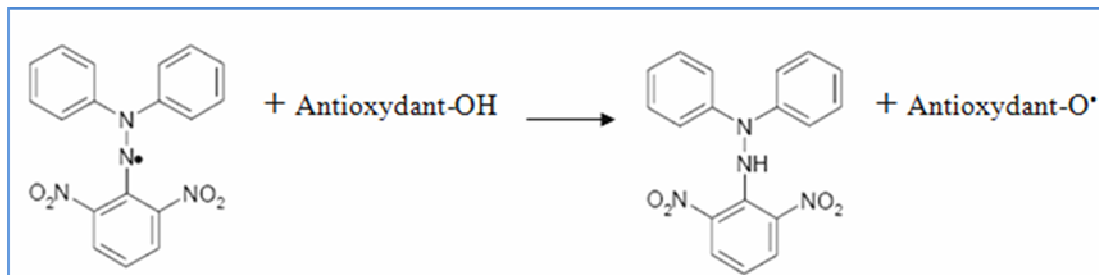


**Figure 26.** Spectre UV-visible du radical DPPH• (méthanol) (A) et l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* (B) (Almela et al., 2006).

Ce radical libre peut facilement subir une réduction par un antioxydant (AH), démontrée par la réaction suivante :  $\text{DPPH} \bullet + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A} \bullet$  (Frankel et Meyer, 2000) (Figure27).

En raison de la facilité et de la commodité de cette réaction, celle-ci est largement utilisée dans l'évaluation de l'activité antiradicalaire (Wu et al., 2003). La disparition de

l'absorption du radical DPPH à 517 nm sous l'action des antioxydants est prise comme une mesure de l'activité antioxydante.



**Figure 27.** Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

La détermination d'une valeur absolue de la capacité antioxydante d'un extrait est difficile car elle dépend de la concentration réelle du radical, de sa dégradation lors de l'analyse, ou de son interférence avec la matrice (**Almela et al., 2006**).

Dans la présente étude, l'habilité de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* à piéger le DPPH est évaluée sur la base de sa valeur  $IC_{50}$  (DPPH) définie comme étant la concentration de l'extrait à tester qui diminue de moitié l'absorbance de la molécule de DPPH à 517 ou bien la concentration efficace de l'extrait qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (**Dorman et al., 2003**). Cette valeur a été obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage par le tracé du pourcentage d'inhibition calculé à partir de l'équation notée ci-dessous en fonction de la concentration de l'échantillon à tester et est exprimée en mg/ml (**Tableau 10**).

$$\% \text{ d'inhibition (P I)} = 100 \times (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}} \quad (1) \quad (\text{Dorman et al., 2003})$$

Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, deux autres paramètres ont été introduits :

**1-Calcul de l'EC<sub>50</sub>** qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel [concentration effective à 50%,  $EC_{50} = (IC_{50} / \text{mg de DPPH/ml})$ ].

**2-Calcul du pouvoir antiradicalaire (ARP)** qui est inversement proportionnel à l'EC<sub>50</sub> (ARP= 1/ EC<sub>50</sub>) ; exprimé par mg de DPPH piégé par 1 mg d'antioxydant (Mielnik et al., 2003).

**Tableau 10.** *Activité antiradicalaire des quatre extraits de Rosmarinus officinalis étudiés et de la Quercétine.*

	IC <sub>50</sub> (DPPH) (mg/ml)	EC <sub>50</sub> (mg /mg DPPH)	ARP= 1/ EC <sub>50</sub> (mg DPPH /mg)
<b>Madagh</b>	0.030 ± 0.00 b	0.38 ± 0.00 b	2.6 3 ± 0.00 a
<b>El Bouihi</b>	0.031 ± 0.00 b	0.39 ± 0.01 b	2.56 ± 0.07 a
<b>Khelil</b>	0.038 ± 0.00 a	0.47 ± 0.02 a	2.13 ± 0.08 b
<b>Tinkial</b>	0.037 ± 0.00 a	0.46 ± 0.00 a	2.17 ± 0.00 b
<b>Quercétine</b>	0.008 ± 0.003	0.095 ± 0.003	10.80 ± 3.41

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± écart.

Les valeurs affectées des lettres diverses sont significativement différentes et concernent uniquement les colonnes.

Les **figures 33 à 36** montrent le pouvoir scavenging des extraits méthanoliques des feuilles de *Rosmarinus officinalis*. Ce pouvoir antiradicalaire exprimé en pourcentage d'inhibition(IP) du radical DPPH à été analysé dans la gamme de concentration qui varie entre 2 et 125 µg d'extrait sec de romarin /ml de méthanol.

Les profils de l'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits de *Rosmarinus officinalis* possèdent une activité antioxydante dose dépendante ; plus les concentrations des extraits augmentent plus leurs activités vis-à-vis du radical 2,2-Diphényl -1picrylhydrazyl sont importantes. Les différences des valeurs  $IC_{50(DPPH)}$  entre les quatre extraits expérimentaux sont hautement significatives ( $P < 0.01$ ) (**Tableau 10**). Toutefois, les romarins de la région de Madagh et d'El Bouihi possèdent une activité antiradicalaire presque identique ( $P > 0.05$ ) et un peu plus élevée que celle des romarins de la région de Khelil et Tinkial. Les extraits de Madagh et d'El Bouihi ayant des valeurs respectives des  $IC_{50(DPPH)}$  de 0.030 et de 0.031 mg/ml, qui sont inférieures à celles de la région de Khelil et de Tinkial avec des valeurs des  $IC_{50(DPPH)}$  de 0.038 et 0.037 mg/ml ( $P > 0.05$ ).

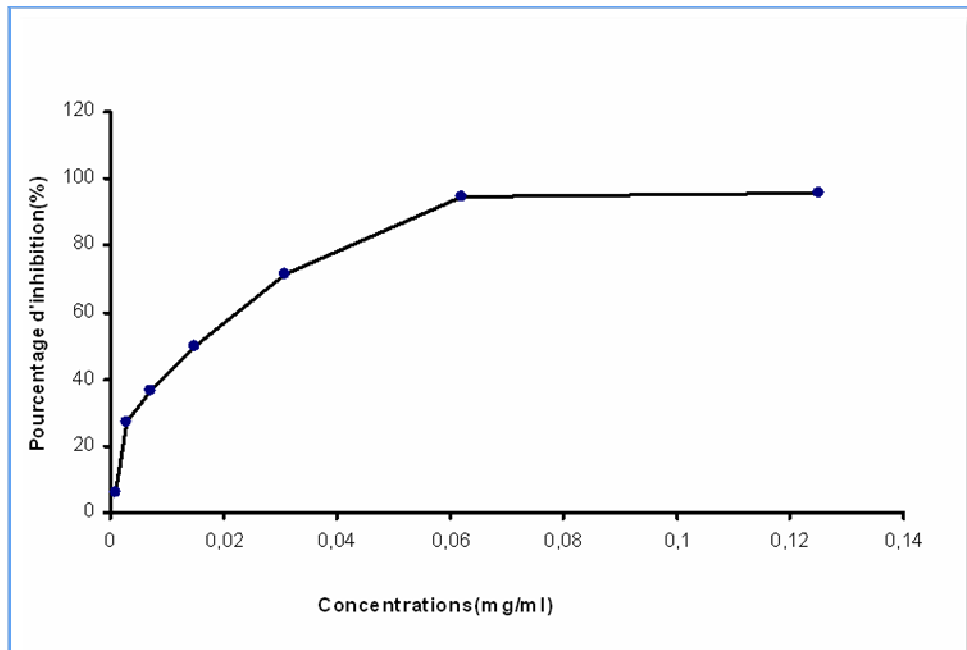
Des résultats similaires ont été obtenus par **Almela et al (2006)** qui avaient signalé que l'extrait obtenu à partir de feuilles de romarin, fraîches ou séchées au soleil, a montré des niveaux proches de l'activité antioxydante, avec des valeurs  $IC_{50}$  respectives de 0.029 et de 0.030 mg/ml. Des résultats presque similaires ont été trouvés également par **Mata et al (2007)** en estimant l'activité antioxydante de l'extrait aqueux et éthanolique des feuilles de *Rosmarinus officinalis* représentée par leurs  $IC_{50}$  respectifs de 0.037 et 0.036 mg/ml.

**Montero et al (2005)** révélaient que les petites concentrations et le temps de la réaction réduit sont importants pour définir une bonne activité antioxydante, car moins le  $IC_{50}$  est élevée plus l'antioxydant est considéré comme meilleur. D'après **Sánchez-Moreno et al (1998)** un bon antioxydant doit réagir rapidement et à des petites concentrations. Ceci a été récemment confirmé par **Terpinc et al (2009)** qui sont persuadés que des valeurs supérieures des  $IC_{50}$  indiquaient une faible capacité de piéger le radical DPPH.

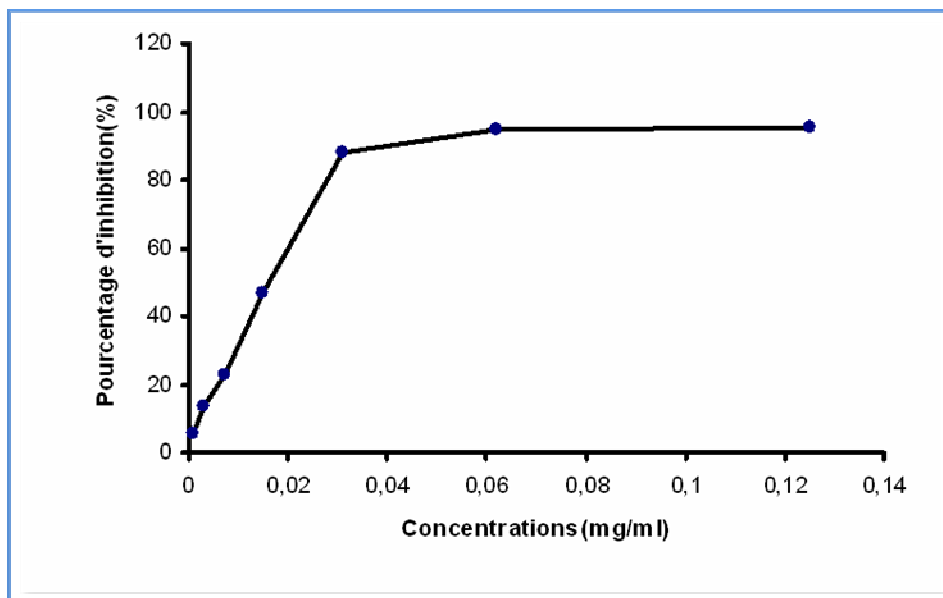
À des fins comparatives un antioxydant standard a été utilisé ; il s'agit de la Quercétine qui a montré une activité antiradicalaire très puissante avec des  $IC_{50(DPPH)}$  de l'ordre de 0.008 mg/ml et un ARP de l'ordre de 10.80 (**Figure 37**). L'acide Ascorbique, le BHA et le BHT étaient pris comme références par **Hinneburg et al (2006)**. Les  $IC_{50(DPPH)}$  étaient de  $0.09 \pm 0.01$  mg/ml pour l'acide ascorbique et le BHA. Le BHT montrait un  $IC_{50(DPPH)}$  de  $0.21 \pm 0.01$  mg/ml.

Cette activité antioxydante peut être attribuée à leur teneur élevée en polyphénols, et en Flavonoïdes, car une étroite corrélation entre l'activité antioxydante et le contenu en composés phénoliques des extraits végétaux obtenus à partir de diverses sources naturelles a été démontré par de nombreux chercheurs. **Pe´rez et al (2007)** trouvaient qu'il existe une bonne corrélation ( $r^2 = 0.844$ ) entre le contenu en polyphénols totaux et l'activité antioxydante de l'extrait des feuilles de *Rosmarinus officinalis* dans le test au DPPH. Ils avaient conclu suite aux résultats de leurs recherches que l'extrait de romarin peut agir comme donneur d'hydrogène et / ou d'électrons et mettre ainsi fin aux réactions en chaîne de ces radicaux libres. **Tawaha et al (2007)** trouvaient eux aussi qu'il existe une corrélation linéaire positive entre l'activité antioxydante et le contenu phénolique total des extraits aqueux et méthanolique avec des coefficients de corrélation respectifs de 0.892 et de 0.851. Alors que **Kahkonen et al (1999)**, par contre, trouvaient que le pouvoir antioxydant des extraits végétaux n'est pas nécessairement lié à une teneur élevée en ces composés. L'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la quantité des polyphénols, mais aussi des facteurs structuraux comme le nombre et la position des groupements hydroxyles ou méthoxyles (**Shahidi et Wanasundara, 1992**).

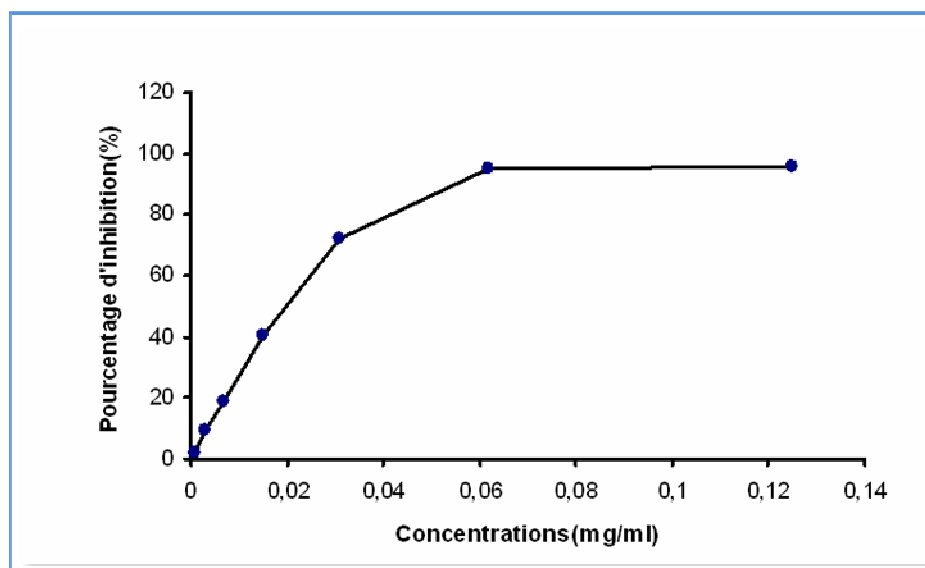
Ces principes actifs peuvent désactiver les radicaux libres par deux principaux mécanismes : par réduction en leur transférant des électrons ou par transfert d'atome d'hydrogène. Ces deux processus peuvent également se produire en parallèle (**Huang et al., 2005**), mais selon **Foti et al (2004)** le piégeage du radical DPPH est principalement fondé sur le transfert d'électrons, le transfert d'atome d'hydrogène étant une voie marginale de la réaction.



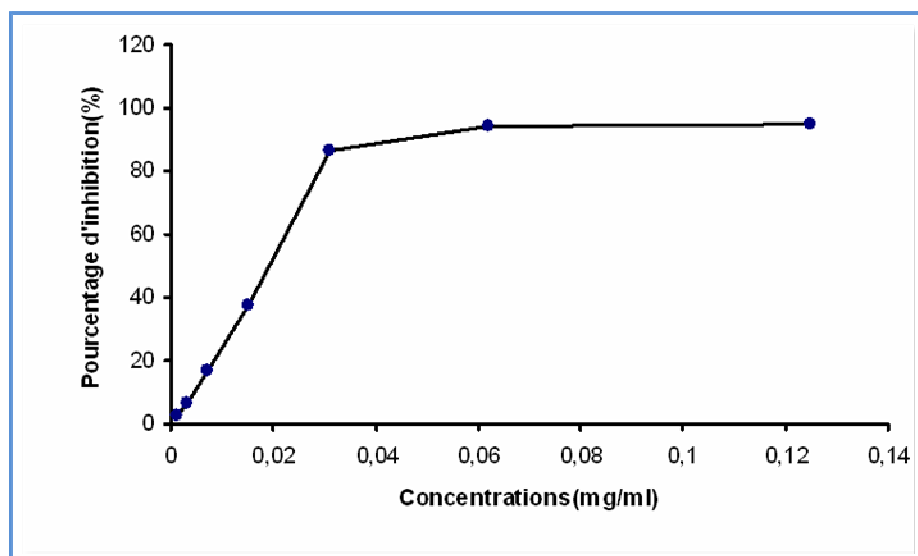
**Figure 28.** *Activité antiradicalaire de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région de Madagah.*



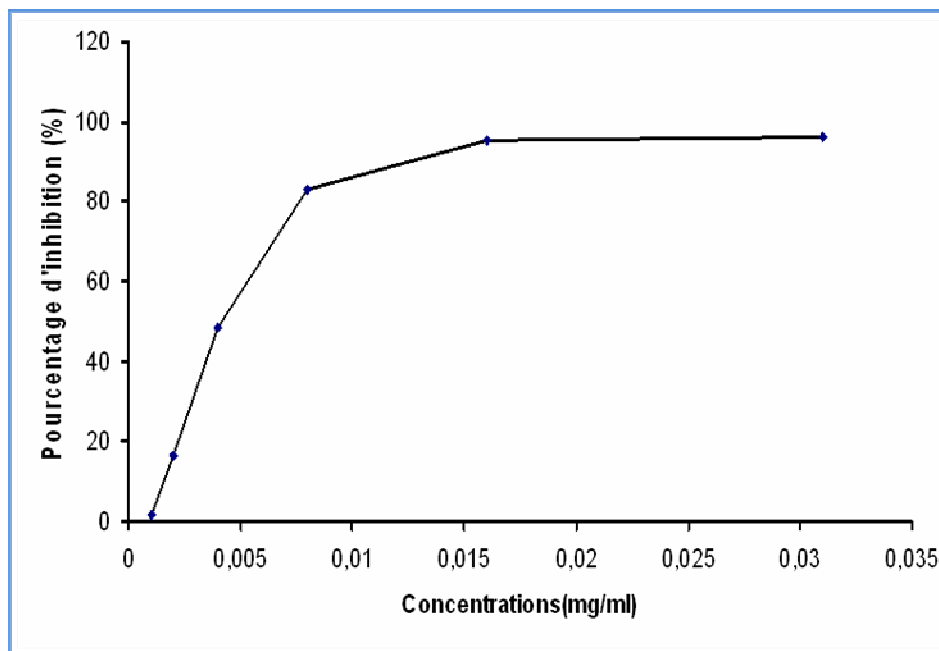
**Figure 29.** *Activité antiradicalaire de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région d'El Bouihi.*



**Figure 30.** *Activité antiradicalaire de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région de Khelil.*



**Figure 31.** *Activité antiradicalaire de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région de Tinkial.*



**Figure 32.** *Activité antiradicalaire de la Quercétine.*

### 3.2. Estimation du pouvoir réducteur des extraits de *Rosmarinus officinalis*.

Le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique des feuilles de *Rosmarinus officinalis* a été évalué par la méthode de réduction de ferricyanure de potassium pour une gamme de concentration comprise entre 0.03 et 1 mg d'extrait sec de romarin / ml de méthanol. Dans cet essai, la réduction du fer de l'état ferrique  $Fe^{3+}$  à l'état ferreux  $Fe^{2+}$  a été évaluée ; le pouvoir réducteur de l'échantillon reflétant sa capacité de donner des électrons a ainsi été estimé (Dorman et al., 2003).

Tous les extraits de *Rosmarinus officinalis* ont montré, sans différences significatives ( $P > 0.05$ ), une capacité réductrice importante exprimée par le  $EC_{50 (PR)}$ , qui représente la concentration de l'extrait correspondant à l'absorbance de 0.5 pour le pouvoir réducteur (Pérez et al., 2007), a été obtenue par une analyse par régression linéaire.

**Tableau 11.** Pouvoir réducteur des extraits de *Rosmarinus officinalis* et de la Quercétine.

	$EC_{50 (PR)}$ ( $\mu g/ml$ )
Madagh	$429 \pm 31.00$ a
El Bouihi	$476 \pm 18.23$ a
Khelil	$436 \pm 21.73$ a
Tinkial	$427 \pm 28.92$ a
Quercétine	$213 \pm 0.02$

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais  $\pm$ écart type.

Les valeurs affectées de la lettre a sont significativement non différentes.

Comme nous avons pu l'observer sur le **tableau 11**, le romarin de la région d'El Bouihi présente le pouvoir réducteur le plus élevé avec un  $EC_{50 (PR)}$  égal à  $476 \mu g/ml$  suivi par celui de la région de Khelil avec une valeur de  $436 \mu g/ml$  ; des valeurs presque identiques ( $P > 0.05$ ) ont été enregistrées dans les régions de Madagh et de Tinkial avec respectivement  $429$  et  $427 \mu g/ml$ .

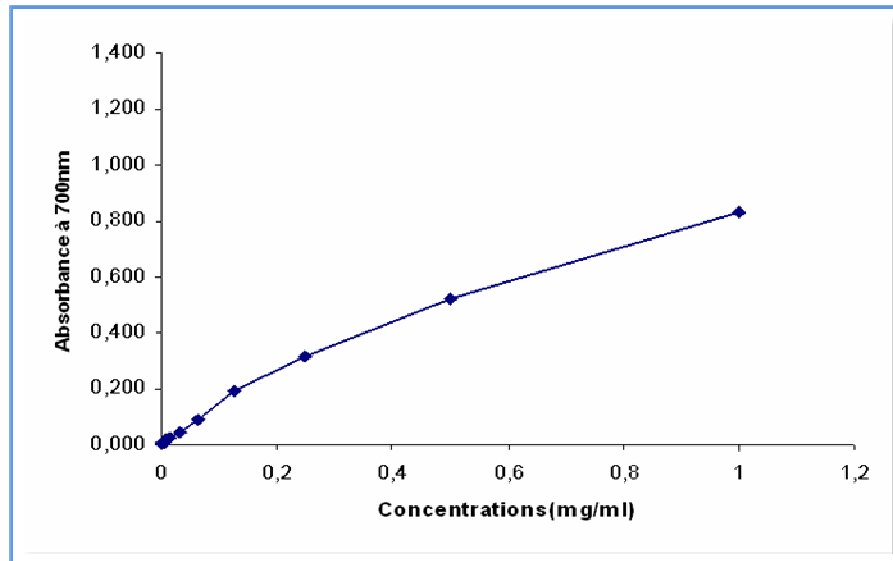
Le pouvoir réducteur des extraits étudiés a été comparé à celui de la Quercétine ; une gamme de concentration allant de 0,015 à 0.5 mg /ml avait été utilisée. Cet antioxydant s'est révélé être pourvu d'un puissant pouvoir avec un  $IC_{50} (PR)$  égal à 213  $\mu$ g/ml (**Figure 37**).

La capacité de réduction des quatre extraits ainsi que celle de la Quercétine ressemble à celle de l'inhibition du radical DPPH (**Figure 33 à 37**), car plus leurs concentrations augmentent plus leur pouvoir réducteur est élevé. Les données de l'essai de réduction de fer suggèrent que les extraits sont en mesure de libérer des électrons, et devraient donc être en mesure de les transférer aux radicaux réactifs en les convertissant en molécules plus stables et inoffensives.

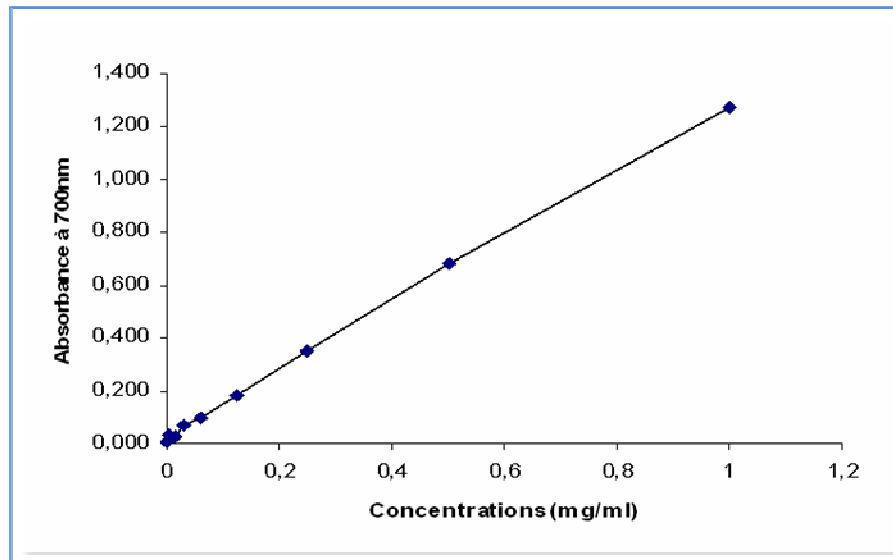
Les résultats du pouvoir réducteur de l'extrait alcoolique de *Rosmarinus officinalis* ont été aussi observés par d'autres chercheurs. Le pouvoir réducteur de l'extrait aqueux des feuilles séchées de romarin, a été étudié en fonction de la concentration, par **Dorman et al (2003)** ; une augmentation linéaire ( $r^2 = 0.996$ ) de l'absorbance à 700 nm a été observée pour une gamme de concentrations comprises entre 0 et 1 mg / ml. Alors que **Pe' rez et al (2007)** quant à eux ont observé que cette linéarité s'étend à des concentrations de 15 mg/ml d'extrait aqueux ( $r^2 = 0.995$ ).

D'après **Pe' rez et al (2007)** la technique du pouvoir réducteur semble être une bonne méthode d'évaluation de l'activité antioxydante dans les systèmes biologiques, puisque le Fe est une composante métabolique naturelle. Néanmoins, les deux méthodes celle du DPPH et celle du pouvoir réducteur sont utiles pour obtenir des renseignements préliminaires sur l'activité antioxydante, in vitro, des extraits de romarin.

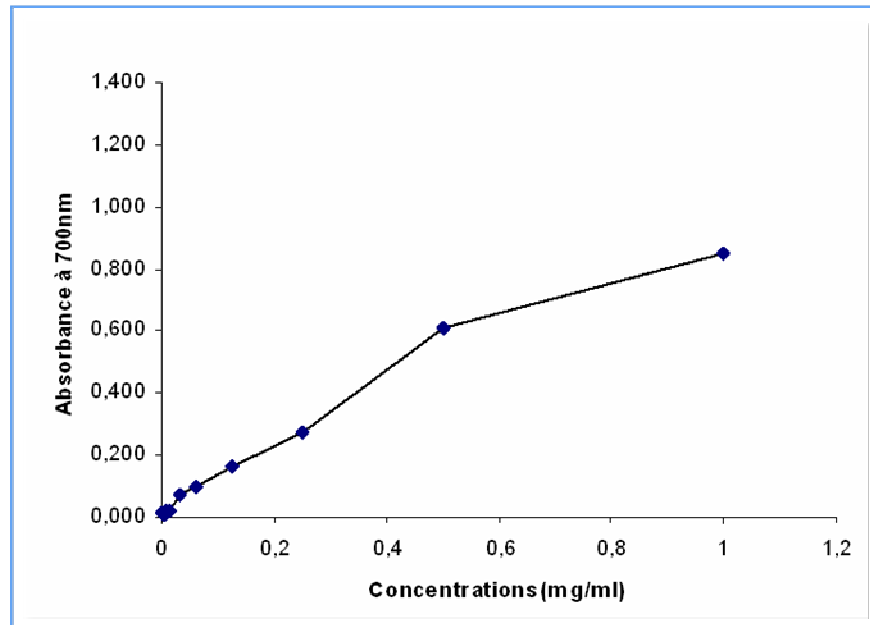
Ce pouvoir réducteur des quatre extraits végétaux est du probablement à la présence des substances polyphénoliques. Plusieurs auteurs ont rapporté qu'il existe effectivement une bonne corrélation entre le contenu en poly phénols totaux et le pouvoir réducteur de l'extrait de *Rosmarinus officinalis*. **Pe' rez et al (2007)** avaient obtenu un coefficient  $r^2 = 0,720$  dans le test du pouvoir réducteur.



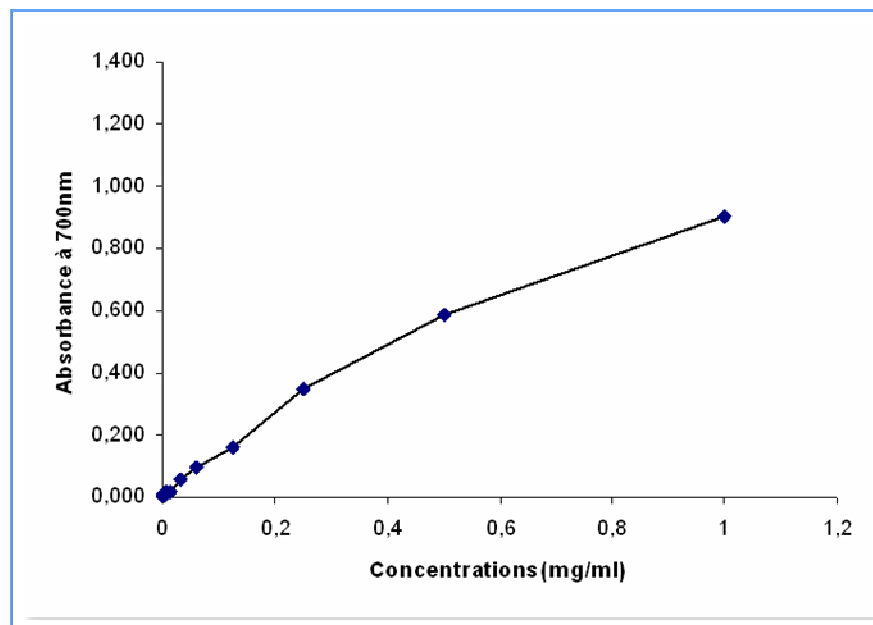
**Figure 33.** Pouvoir réducteur de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* de la région de Madagh.



**Figure 34.** Pouvoir réducteur de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* de la région d'El Bouihi.



**Figure 35.** *Pouvoir réducteur de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région de Khelil.*



**Figure 36.** *Pouvoir réducteur de l'extrait de Rosmarinus officinalis de la région de Tinkial.*

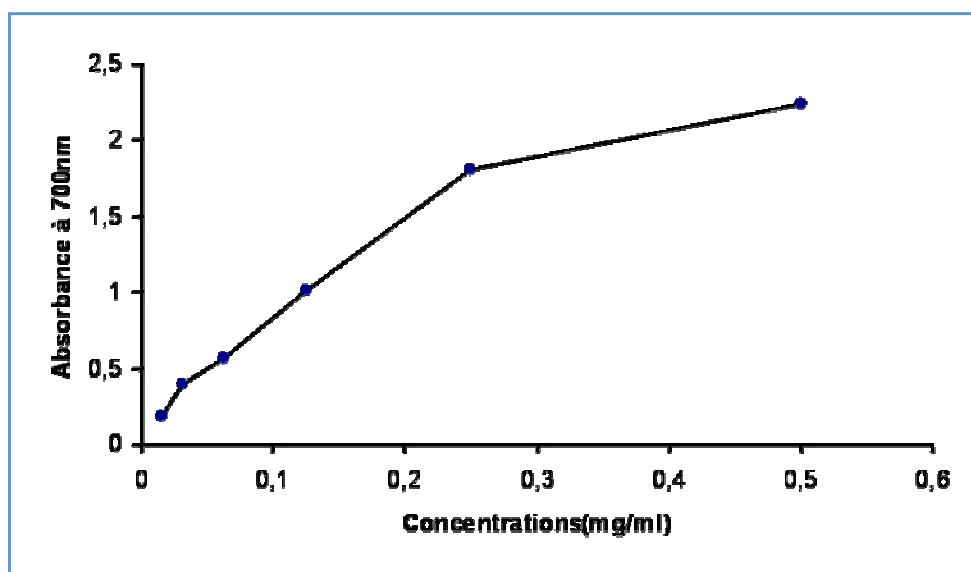


Figure 37. *Pouvoir réducteur de la Quercétine.*

#### 4. Etude de l'effet de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* sur la peroxydation des viandes.

##### 4.1. Indice de peroxydation lipidique (TBA)

L'indice TBA, appelé aussi test de l'acide thiobarbiturique (TBA) est l'une des méthodes les plus connues pour la détermination de l'oxydation des lipides ; elle est sensible et simple à exécuter. Le test permet de déterminer le degré de peroxydation lipidique par mesure spectrophotométrique du malondialdéhyde (MDA), un des produits de dégradation des endoperoxydes cycliques générés pendant l'oxydation des lipides. Le MDA produit, réagit avec deux molécules d'acide thiobarbiturique avec lequel il forme un chromophore rose qui absorbe à 532 nm (Dahle et al., 1962; Rosmini et al., 1996) (figure 38).

D'autres aldéhydes, autres que le MDA, produits de la peroxydation lipidique peuvent pareillement réagir avec le TBA pour produire un pigment jaune ( $\lambda_{\max}=455$  nm), orange ( $\lambda_{\max}=495$  nm) et rouge ( $\lambda_{\max}=532$  nm) (Kosugi et Kikugawa, 1989).

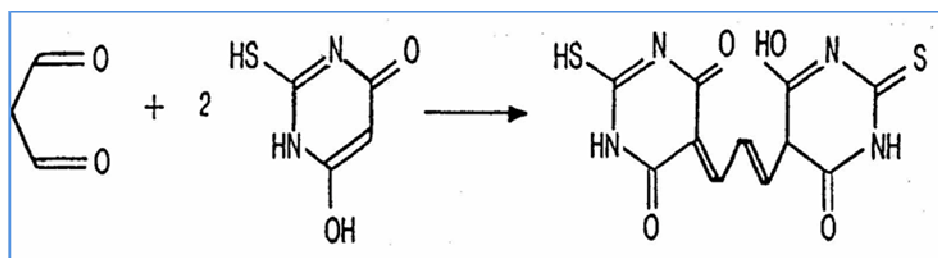


Figure 38. Formation du complexe MDA-TBA

L'effet de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* sur la lipo-oxydation du steak haché est illustré dans le **tableau 12**. L'analyse de variance pour les résultats des TBARS indique que les valeurs TBA sont significativement affectées ( $P < 0.01$ ) par les deux paramètres simultanément : le temps de conservation et le traitement. En revanche, les données n'ont démontré aucun effet significatif ( $P > 0.05$ ) dans l'interaction entre le traitement et la durée du stockage.

L'ajout d'extrait de romarin dans la formulation des steaks hachés protège significativement ( $P < 0.01$ ) les lipides des phénomènes de peroxydation au cours de la période de conservation qui était de huit jours à 2 C°. Les valeurs TBA décelées au cours des deux premiers jours d'entreposage étaient de 0.23 mg équivalent de MDA /kg de viande hachée traitée contre 0.39 mg équivalent de MDA /kg de viande hachée non traitée.

Au bout du quatrième jour de conservation, les valeurs TBA continuaient à augmenter dans les deux lots mais moins intensément ( $P < 0.01$ ) dans les viandes traitées que dans celles non traitées, avec des valeurs respectives de 0.44 contre 0.66 mg équivalent de MDA /kg de viande hachée.

Les valeurs TBA enregistrées pendant la durée restante d'entreposage évoluaient dans le même sens avec des valeurs au sixième jour, de 0.47 mg équivalent de MDA /kg de viande hachée traitée et 0.70 mg équivalent de MDA /kg de viande hachée non traitée. Enfin et au bout du huitième jour des valeurs respectives de 0.52 et 0.80 mg équivalent de MDA /kg de viande hachée traitée et non traitée ont été obtenues.

On remarque aussi que les valeurs TBA augmentent significativement ( $p < 0.05$ ) pendant les quatre premiers jours de conservation dans les deux lots, ces mêmes valeurs ayant tendance à se stabiliser à partir de ce moment. Ces résultats concordent avec ceux de **Gokalp et al (1983)** et **Kuo et al (1987)** qui ont expliqué cela par le fait que durant le stockage, le malondialdéhyde, produit intermédiaire de l'oxydation des lipides est par la suite oxydé en d'autres composés organiques et en alcools qui ne peuvent plus réagir au TBA. C'est sans doute pour cette raison, que les valeurs TBA commencent à se stabiliser.

**Greene et Cumuze (1982)** considéraient les valeurs TBA qui varient entre 600–2000 µg de MDA /kg de viande comme étant des niveaux minimum pour la détection d'un goût d'oxydation dans la viande hachée de bœuf examinée par des personnes inexpérimentées. Alors que selon **Ockerman (1976)**, les Produits à base de viande avec des concentrations en MDA supérieures à 1000 µg / kg sont considérés comme rances.

---

**Sheard et al (2000)** quant à eux indiquaient que les concentrations de MDA supérieures à 500  $\mu$  g/ kg sont des valeurs seuils pour le rancissement.

D'après les résultats de **Sheard et al (2000)** les échantillons témoins de notre essai dans la présente étude seraient perçus comme dépassant largement le seuil de rancissement et ceci après seulement deux jours de conservation, tandis que dans la viande traitée, le contenu en MDA ne dépassait guère les 500  $\mu$  g / kg de viande jusqu'à la fin de la période de stockage. Ces résultats sont similaires à ceux de **Sanchez-Escalante et al (2003)** et **Djenane et al (2002)**, qui ont trouvé que l'extrait de romarin était capable de retarder l'oxydation des lipides de plus de six jours.

On peut dire que l'extrait de *Rosmarinus officinalis* a un effet antioxydant prononcé durant toute la durée de conservation. Nos résultats sont comparables à ceux de **Sánchez-Escalante et al (2001)** qui affirment que le *Rosmarinus officinalis* ajouté à raison de 1000 ppm au pâté de bœuf emballé sous atmosphère modifiée (70% O<sub>2</sub>+20% CO<sub>2</sub>+10% N<sub>2</sub>) et conservé à 2°C était hautement efficace pour inhiber en même temps l'oxydation des lipides et la formation de la metmyoglobine.

D'après **Han et Rhee (2005)**, le romarin inhibe l'oxydation des lipides jusqu'à 69%, puisque à 0.25% d'extrait de romarin, les niveaux de la peroxydation lipidique avait atteint un niveau minimal dans le pâté de bœuf cuit ou cru emballé dans un film PVC perméable à l'oxygène durant la période de stockage de 6 jours à 4°C. **Fernaández-Lopez et al (2005)** ont constaté que les deux extraits, l'extrait aqueux à 0.15 % (p /p) et l'huile de *Rosmarinus officinalis* à 0.10 % (p /p) étaient très efficaces avec une élimination pratiquement complète du rancissement dans la viande de bœuf cuite dans une période de 12 jours.

Selon plusieurs auteurs, l'activité antioxydante des extraits de *Rosmarinus officinalis*, dans les viandes et produits à base de viande, est associée à la présence de substances bioactives. Ces données sont confirmées par **Wellwood et al (2004)** qui affirment que plusieurs molécules présentes dans le romarin tels que l'acide carnosique, le Carnosol, le rosmanol, le rosmariquinone et le rosmaridiphenol, l'acide rosmarinique et les flavonoïdes ont pour rôle la stabilisation des hydroperoxydes et la prévention

de leur dégradation supplémentaire en formes oxydées encore plus actives telles que le malondialdéhyde. Leurs propriétés antioxydantes sont liées à leurs structures chimiques, en particulier à la délocalisation électronique sur leurs noyaux aromatiques. Lors de la réaction de ces composés avec des radicaux libres, de nouvelles espèces radicalaires sont générées et stabilisées par résonance (**Cosio et al., 2006**).

Un synergisme favorable entre les abietanes diterpènes et les acides phénoliques du *Rosmarinus officinalis* peut être raisonnablement suggéré. Les diterpènes phénoliques comme l'acide Carnosique et ses dérivés sont lipophiles, alors que les acides phénoliques comme l'acide rosmarinique et l'acide caféique sont des composés polaires. C'est pour cette raison selon **Sanjust et al (2008)** que l'extrait des feuilles de romarin peut être utilisé pour protéger un large éventail de produits alimentaires.

En plus de l'inhibition de l'oxydation des lipides, plusieurs auteurs ont signalé que certains des composés présents dans les extraits de romarin possèdent des propriétés antibactériennes (**Cuvelier et al., 1996 ; Del Campo et al., 2000 ; Djenane et al ., 2002; Ferna'ndez-Lopez et al., 2005**).

**Tableau 12.** Indice TBA dans les viandes traitées et non traitées avec l'extraits de *Rosmarinus officinalis* (mg de MDA / kg de viande)

Facteurs étudiés		Temps					F1 (n=2)					F2 (n=5)		Effets des facteurs		
		Jour 0	Jour 2	Jour 4	Jour 6	Jour 8	Jour 0	Jour 2	Jour 4	Jour 6	Jour 8	Viande traitée	Viande non traitée	F1	F2	Interactio n F1 x F2
Traitement	Viande traitée	0.14 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.44 ± 0.11	0.47 ± 0.03	0.52 ± 0.08	0.14 ± 0.01 c	0.31 ± 0.10 b	0.55 ± 7.90 a	0.58 ± 0.03 a	0.66 ± 0.14 a	0.36 ± 0.05 b	0.54 ± 0.01 a	**	**	NS
	Viande non traitée	0.14 ± 0.01	0.39 ± 0.16	0.66 ± 0.03	0.69 ± 0.03	0.79 ± 0.20										

F1 : Facteur relatif à la durée de conservation ; F2 : Facteur relatif aux traitements de la viande ;(\*\*): Effet hautement significatif du facteur étudié. NS : Effet non significatif du facteur étudié.

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type de trois échantillons ; Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes.

## 4.2. pH de la viande.

Les valeurs du pH de la viande sont indiquées dans le **tableau 13**. Une différence hautement significative ( $p < 0.01$ ) a été enregistrée pour les deux lots : viande traitée à l'extrait de romarin et non traitée selon la durée de conservation ou le traitement.

En effet, les PH diminuent légèrement pendant les deux premiers jours de conservation pour les deux lots respectivement pour atteindre 5.17 pour la viande traitée à l'extrait de romarin et 5.05 pour l'échantillon contrôle. Cette diminution peut être attribuée selon **Hernández-Hernández et al (2008)** à la production des acides par la microflore de contamination présente dans la viande.

Toutefois, à partir du troisième jour ces valeurs commencent à augmenter graduellement mais un peu plus intensément ( $p < 0.05$ ) pour atteindre au huitième jour, 6.10 dans la viande contenant l'extrait de *Rosmarinus officinalis* contre 5.91 pour l'échantillon témoin.

Ainsi, nous sommes tentés de constater que le steak haché additionné d'extrait de romarin présente un pH un peu plus élevé par rapport à celui n'ayant subi aucun traitement. Les résultats du pH reflètent le degré de l'oxydation des lipides évalué par la mesure de l'indice TBA qui montrait que l'extrait de *Rosmarinus officinalis* agit efficacement pour minimiser l'oxydation des lipides dans la viande hachée de bœuf. Ces résultats correspondent à ceux de **Rhee (2000) ; Kuo et Chu (2003)** qui remarquent que l'oxydation des lipides diminue lorsque le pH augmente dans les viandes. Le pH le plus bas semble aussi être responsable des degrés élevés de l'oxydation selon **Yasosky et al (1984)** qui trouvent que les valeurs TBA de la viande de porc diminuent lorsque les valeurs du pH augmentent.

Ces mêmes données sont soutenues par **McDonald et Hultin (1987)** et **Genot et al (2003)**, qui rapportent également que l'oxydation lipidique est affectée par le pH, le type de lipide, la force ionique, la température, le potentiel redox, la teneur en fer et l'exposition au soleil.

D'après **Genot et al (2003)** et **Eymard (2003)**, le pH influence le déroulement de l'oxydation par le biais de plusieurs mécanismes. Premièrement, pour les réactions d'oxydoréduction faisant intervenir des protons ( $H^+$ ), le potentiel redox décroît linéairement avec le pH ; un pH acide favorise donc la réaction d'oxydation. Deuxièmement, le pH intervient également dans la solubilité des composés impliqués dans l'initiation de la réaction. Ainsi, plus le pH est bas, plus la solubilité, le potentiel redox de ces derniers, et leur réactivité vis à vis des molécules oxydables sont élevés. Troisièmement, dans le cas du tissu musculaire, un pH bas favorise la dénaturation des protéines héminiques et la libération du fer.

Cette élévation du pH dans la viande traitée à l'extrait végétal est peut être due aussi au développement des populations de bactéries à Gram négatif comme les Entérobactéries et les pseudomonas, les levures et les moisissures, cause de la dégradation des protéines et des acides aminés produisant l'ammoniaque et par conséquence une élévation du pH (**Nychas et al., 1998**). Cette contamination peut avoir lieu au moment de l'incorporation de l'extrait de romarin à la viande, d'où la nécessité de travailler dans les meilleures conditions d'asepsie.

**Tableau 13.** Variations du PH dans les viandes traitées et non traitées avec l'extrait de *Rosmarinus officinalis*

Facteurs étudiés		Temps					F1 (n=2)					F2 (n=5)		Effets des facteurs		
		Jour 0	Jour 2	Jour 4	Jour 6	Jour 8	Jour 0	Jour 2	Jour 4	Jour 6	Jour 8	Viande traitée	Viande non traitée	F1	F2	Inter F1x F2
Traitement	Viande traitée	5.39 ± 0.04 d	5.17 ± 0.06 f	5.44 ± 0.07 c d	5.54 ± 0.11 c	6.10 ± 0.06 a	5.39 ± 0.04 b	5.11 ± 0.05 c	5.34 ± 0.05 b	5.43 ± 0.08 b	6.00 ± 0.06 a	5.53 ± 0.06 a	5.38 ± 0.05 b	**	**	*
	Viande non traitée	5.39 ± 0.04 d	5.05 ± 0.05 g	5.24 ± 0.05 e f	5.32 ± 0.06 d e	5.91 ± 0.07 b										

F1 : Facteur relatif à la durée de conservation ; F2 : Facteur relatif aux traitements de la viande ;(\*): Effet significatif du facteur étudié .Chaque valeur représente la moyenne ± écart type de trois échantillons ; Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes.

### 4.3. Teneur en eau de la viande.

Le taux d'humidité de la viande hachée au cours des huit jours de conservation à 2 C° a été déterminé par la différence du poids de l'échantillon avant et après 18 heures de séchage à 100°C.

L'analyse de variance pour les teneurs en eau dans la viande indique qu'il y a une différence hautement significative ( $P < 0,01$ ) pour les deux paramètres simultanément : le temps de conservation et le traitement. En revanche, les données n'ont démontré aucun effet significatif ( $P > 0,05$ ) dans l'interaction entre le traitement et la durée du stockage (**Tableau 14**).

Par ailleurs, il convient d'observer que les teneurs en eau diminuent remarquablement pendant les deux premiers jours de conservation du steak haché additionné ou pas d'extrait de romarin. Toutefois, la viande hachée traitée semble avoir un taux d'humidité un peu moins élevé (243 g/kg) que celui de la viande non traitée (251 g/kg).

Ces teneurs augmentent progressivement à partir du deuxième jour, dans les deux lots traité et non traité, et atteignent au huitième jour des valeurs respectives de 268 et 280 g/kg.

Il est constaté que dans la viande hachée traitée à l'extrait de *Rosmarinus officinalis*, la teneur en eau est un peu moins élevée pendant toute la période de stockage par rapport à la viande non traitée, ce qui peut influencer positivement les processus oxydatifs des lipides contenus dans la viande. Selon **Eymard (2003)** l'activité de l'eau d'un système influence les réactions d'oxydation des lipides. L'effet de l'eau est lié aux propriétés de solvatation des ions et des radicaux libres et à son activité chimique. Par ce phénomène, l'eau permet la mobilisation des substances prooxydantes ou antioxydantes ; elle interagit avec les cations métalliques et les rend plus ou moins disponibles dans la catalyse des réactions d'oxydation.

En effet dans la viande hachée à teneur en eau moins importante, traitée à l'extrait de romarin, les valeurs TBA enregistrées étaient aussi moins élevées, inversement à l'échantillon non traité.

**Tableau 14.** Variations de l'humidité dans les viandes traitées et non traitées avec l'extrait de *Rosmarinus officinalis* (g/kg)

Facteurs étudiés		Temps					F1 (n=)					F2 (n=)		Effets des facteurs		
		Jour 0	Jour 2	Jour 4	Jour 6	Jour 8	Jour 0	Jour 2	Jour 4	Jour 6	Jour 8	Viande traitée	Viande non traitée	F1	F2	Inter F1 x F2
Traitement	Viande traitée	267 ± 3.06	243 ± 1.73	253 ± 3.22	261 ± 3.51	268 ± 3.51	267	247	259	269	274	258	268	**	**	NS
	Viande non traitée	267 ± 3.06	251 ± 3.06	266 ± 12.06	276 ± 6.66	280 ± 3.51	267 ± 2.73 a	247 ± 2.22 c	259 ± 7.90 b	269 ± 4.76 a	274 ± 3.14 a	258 ± 2.60 b	268 ± 5.62 a			

F1 : Facteur relatif à la durée de conservation ; F2 : Facteur relatif aux traitements de la viande ;(\*\*): Effet hautement significatif du facteur étudié. NS : Effet non significatif du facteur étudié

Chaque valeur représente la moyenne ± écart type de trois échantillons ; Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes.

#### 4.4. Résultats du test sensoriel.

Les scores de la décoloration de la viande hachée de bœuf dans cette présente étude sont illustrés dans le **tableau 15**. La perte de la couleur rouge vif de la viande hachée fraîche augmente significativement dans la viande traitée et non traitée pendant toute la période d'entreposage. Néanmoins, la viande traitée à l'extrait de *Rosmarinus officinalis* présente des scores inférieurs pendant les huit jours de conservation à 2°C par référence à l'échantillon control. D'ailleurs, l'échantillon traité n'avait atteint le score de 3 qu'après le sixième jour de conservation, ce qui correspond à un taux variant de 11 à 20% de décoloration, considéré comme un score assez tolérable (**Djenane et al., 2001**).

**Tableau 15.** Effet de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* sur la couleur de la viande hachée de bœuf.

Traitement	Durée de stockage				
	0 Jour	2 <sup>ème</sup> Jour	4 <sup>ème</sup> Jour	6 <sup>ème</sup> Jour	8 <sup>ème</sup> Jour
Contrôle	1	2	5	5	5
Extrait de <i>Rosmarinus officinalis</i>	1	1	2	3	4

1=nulle, 2=0-10%, 3=11-20%, 4=21-60%, 5=61-100%.  
Les résultats sont exprimés en score prédominant.

Les trois propriétés importantes par lesquelles les consommateurs jugent la viande sont : l'apparence, la texture et la flaveur (**Faustman et Cassens, 1990**); l'apparence et spécialement la couleur sont une qualité déterminante pour ce dernier (**O'Grady et al., 2006**). Quant la couleur de la viande vire du rouge vif vers le brun, il est constaté une discrimination du produit, qui est associée à une perte de la qualité. **Greene et al (1971)** rapportent que 40% de metmyoglobine sont la cause du rejet de la viande par les consommateurs, alors que **Hood et Riordan (1973)** trouvaient que la présence de 20% de MetMb à la surface de la viande de bœuf était suffisante pour diminuer les ventes de 50%. **Sánchez-Escalante et al (2001)** avaient remarqué que le taux de metmyoglobine dans le pâté de bœuf additionné de 1000 ppm de romarin ne

dépassait jamais les 40% qu'au bout du huitième jour de conservation et que ce pourcentage était significativement plus faible par rapport au témoin.

L'effet de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* sur la couleur de la viande a été comparé aux résultats de **Sánchez-Escalante et al (2001)** qui ont trouvé que celui-ci, combiné à la vitamine C s'avère très utile pour prévenir l'oxydation de la myoglobine dans le pâté de bœuf. **Sebranek et al (2005)** rapportaient que les saucisses de porc congelées additionnées de 2500 ppm d'extrait de romarin avaient une meilleure rétention de la couleur rouge que celles traitées avec un mélange de BHA/BHT, après 84 jours de conservation.

Une réaction de brunissement est également possible lors de l'ajout de romarin, qui peut contribuer au changement de la couleur de la viande. Les Polyphénols oxydases (PPOs), enzymes largement présentes dans de multiples plantes sont responsables du phénomène de brunissement dans celles-ci. En présence de l'oxygène, les PPOs vont oxyder les composés phénoliques de la plante en quinones qui sont par la suite condensées en composés foncés (**Dogan et Dogan, 2004**).

Les résultats du test sensoriel concernant l'odeur sont résumés dans le **tableau 16**. Pendant toute la période de préservation, la viande hachée additionnée d'extrait de *Rosmarinus officinalis* était largement différente du point de vue odeur, de la viande n'ayant subi aucun traitement.

**Tableau 16.** Effet de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* sur l'odeur de la viande hachée de bœuf.

Traitement	Durée de stockage				
	0 Jour	2 <sup>ème</sup> Jour	4 <sup>ème</sup> Jour	6 <sup>ème</sup> Jour	8 <sup>ème</sup> Jour
Contrôle	1	3	4	5	5
Extrait de Rosmarinus officinalis	1	1	2	3	3

1 = Nulle ; 2 = Légère ; 3 = Petite ; 4 = modérée ; 5 = extrême.  
Les résultats sont exprimés en score prédominant.

Les résultats montrent que l'odeur augmente pendant la période de stockage pour les deux lots, mais pas avec la même intensité. La viande non traitée dégagait des petites odeurs dès le deuxième jour d'entreposage et les plus extrêmes au sixième jour de conservation ; alors que la présence du romarin préservait l'odeur de la viande fraîche plus longtemps et n'avait atteint le score de 3 qu'au bout du sixième jour de stockage. Ces résultats concordent avec ceux de **Barbut et al (1985)**, qui ont trouvé que le romarin empêchait l'apparition d'odeurs indésirables dans les saucisses de dinde conservées à 4°C.

Par ailleurs, les résultats du test sensoriel de l'odeur et de la décoloration concordent avec les résultats de l'oxydation des lipides révélés par les valeurs TBARS, discutées ci-dessus. D'ailleurs plusieurs études concernant la corrélation entre le test sensoriel et les valeurs TBA avaient abouti aux mêmes résultats. **Tarladgis et al (1960)** trouvaient qu'il existe une corrélation significative ( $r^2=0.89$ ) et avaient conclu que l'arome de rancidité était détectable à des valeurs TBA variant entre 0.5 à 1.0 mg de MDA/kg d'échantillon. Ces résultats indiquent les avantages significatifs de l'utilisation de l'extrait de romarin pour protéger les produits à base de viande très susceptibles au rancissement.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le stress oxydatif se réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire, durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défense antioxydant. En raison de la toxicité des antioxydants synthétiques, le recours à des phytonutriments doués d'activités antioxydantes s'avère très avantageux et d'actualité.

Le *Rosmarinus officinalis*, plante pérenne qui pousse en abondance à l'état sauvage dans le bassin méditerranéen, est parmi celles fortement utilisées de nos jours, aussi bien en médecine traditionnelle qu'en agroalimentaire.

Dans notre étude, les extraits de *Rosmarinus officinalis* semblent présenter un intérêt réel et potentiel par leurs activités antioxydantes, établies *in vitro*.

La détermination des rendements à l'extraction méthanolique des espèces des quatre régions a révélé des rendements presque identiques aux environs de 43 % qui sont considérés comme étant des rendements assez importants.

Le dosage des composés phénoliques contenus dans les quatre extraits méthanoliques indiquait des teneurs considérables en polyphénols oscillant entre 36 et 40 mg équivalent d'acide gallique / g d'extrait et des quantités appréciables en flavonoïdes (7 à 11 mg équivalent de Quercétine/g d'extrait).

Le criblage préliminaire des extraits en CCM a dévoilé la présence de plusieurs flavonoïdes, principalement des Flavones de type lutéoline et d'autres et ceci ne fait que confirmer les résultats antérieurs concernant le dosage et la mise en évidence des flavonoïdes.

L'estimation de l'activité antiradicalaire par mesure de la capacité des quatre extraits à piéger le radical libre DPPH, a démontré que cette espèce est réellement dotée d'un puissant pouvoir antiradicalaire. Les valeurs  $IC_{50}$  (DPPH) calculées étaient en moyenne de 0,030 mg/ml pour les extraits de romarin de la placette de Madagh et d'El Bouihi et de 0,038 mg/ml pour celles de Khelil et de Tinkial. Ceci est du probablement

à la présence de plusieurs constituants bioactifs, parmi eux, les polyphénols dont le rôle principal est de piéger les espèces réactives à l'oxygène.

Le test du pouvoir réducteur a révélé que les quatre extraits manifestent un pouvoir réducteur relativement élevé avec des valeurs  $EC_{50}$  (PR) de  $427 < 429 < 436 < 476 \mu\text{g/ml}$  pour les extraits de romarin des régions respectives de Madagh, El Bouihi, Khelil et Tinkial.

L'activité antioxydante de *Rosmarinus officinalis* a pu être démontrée également, in vitro, sur les viandes bovines, par la mesure de l'indice TBA. Au bout de huit jours de conservation des échantillons à 2°C, on avait enregistré 0.52 mg de MDA / kg de viande traitée contre 0.79 mg de MDA / kg de celle non traitée à l'extrait de romarin. Les résultats des mesures du potentiel d'hydrogène et de l'humidité des échantillons au cours de cette même période soutenaient les données obtenues lors du dosage du TBA. Les valeurs du pH étant de 6,10 et de 5,91 dans les échantillons traités et non traités respectivement, alors que les taux d'humidité enregistrés étaient de 268 et 280 g/kg de viande traitée et non traitée.

Ces résultats révèlent que cette plante peut réellement contribuer à la diminution du processus de peroxydation lipidique dans la viande bovine et le test sensoriel n'a fait que les confirmer.

Cependant, le romarin comme toutes les plantes aromatiques, contient des arômes, des pigments et d'autres impuretés qui peuvent limiter son utilisation en tant qu'antioxydant ; il convient donc, de chercher des techniques d'extraction et de purification plus performantes afin d'obtenir les principes actifs, sans couleur, ni goût, ni odeur et qui agissent aussi efficacement à des petites concentrations.

# **Références Bibliographiques**

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A.** (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, 74, 636-643.
- Ahmed, M., Yousuf, S., Khan, M.B., Hoda, M.N., Ahmed, A.S., Ansari, M.A., Ishrat, T., Agrawal, A.K., Islam, F.** (2006). Attenuation by *Nardostachys Jatamansi* of 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: behavioral neurochemicals and immunohistochemical studies. *Pharmacol, Biochem, Behav*, 83, 150-160.
- Akgul, A.** (1993). Spice science and technology. Turkish Association of Food Technologists, Publ. N° 15.
- Akhtar, H.** (1994). Essential oil plants and their cultivation. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 292p.
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., 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., S´anchez-Munoz, B., Fern´andez-L´opez, J.A., Roca, M.J., Rabea, 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.
- Al-Sereiti, M.R., Abu-Amer, K.M., Sen, P.** (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37, 124-130.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Martínez, M.A., Ares, I., García-Risco, M.R., Señoráns, F.J., Reglero, G.** (2008). Acute oral safety study of rosemary extracts in rats. *Journal of Food Protection*, 71, 790-795.
- Andersen, H. J., Skibsted, L. H.** (1991). Oxidative stability of frozen pork patties. Effect of light and added salt. *Journal of Food Science*, 56, 1182-1184.
- AOAC** (Association of Official Chemists). (1984). Official method of analysis. 14th edn. Washington.

- Arslan, D., Musa Ozcan, M.** (2008). Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and colour characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management*, 49, 1258-1264.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J.** (1992). Antioxidant and prooxidant properties of active rosemary constituents: Carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, 22, 257–268.
- Bakirel, T., Bakirel, U., Keleş, O.U., Ulgen, S.G., Yardibi, H.** (2008). In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal Ethnopharmacol*, 116, 64-73.
- Barbut, S., Josephson, D. B., Maurer, A. J.** (1985). Antioxidant properties of rosemary oleoresin in turkey sausage. *Journal of Food Science*, 50, 1356-1359.
- Barnes, J., Linda, A., Anderson, J., David, P.** (2007). *Herbal Medicines*, Toisième édition.
- Bean, N.H., Griffin, P.M., Goulding, J.S., Ivey, C.B.** (1990). Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, (1983-1987). *Journal Food Protection*, 53, 711-728.
- Beloued, A.** (2001). *Plantes médicinales d’algérie*. édition O.P.U.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Marín, F.R., Ortuño, A., Del Rio, J.A.** (1997). Uses and Properties of Citrus Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4505-4515.
- Bensebia, O., Barth, D., Bensebia, B., Dahmania, A.** (2009). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of rosemary: Effect of extraction parameters and modelling. *J. of Supercritical Fluids*, 49, 161–166.
- Berger. M.M.** (1997). Role antioxydant des micronutriments : pertinence en épidémiologie et en réanimation . *Nutr Clin Métabol*, 11,125-132.
- Berger, M.M., Chioléro, R.L.** (2001). Apport d’antioxydants en réanimation : pourquoi, lesquels, avec quels objectifs ? *Réanimation*, 10,527-534.
- BioClips.** (2007). volume 15.
- Blois, M. S.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset C.** (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method . *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 30, 609–615 .
- Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J.** (2003) .Radicaux libres et anti-oxydants. IN : *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. Delattre, J ., Durand, G ., Jardillier, J.C.Eds: Médecine-sciences. Flammarion (Paris), 59-81p.
- Bostoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V.N., Mantis, A.J., Trakatellis, A.G.** (1994). Rapid sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *J Agric Food Chem* ,42,1931-1937 .

- Boutekedjiret.** (1998) .The essential oils from *Rosmarinus officinalis* .L in Algéria.J.Essent Oil Res., 10,680-682.
- Bown, D., Hawthorne, L.** (1997). Plantes aromatiques et médicinales. Marabout, côté jardin, 48-50 p.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E.** (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 55, 7879-7885.
- British Herbal Medicine Association.** (1996). British herbal pharmacopeia, 162–163.
- Brookman, P.** (1991). Antioxidants and consumer acceptance. Food Technology in New Zealand, 26, 24–28.
- Buckley, D. J., Morrissey, P. A., Gray, J. I.** (1995). Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. Journal of Animal Science, 73, 3122–3130.
- Buege,** (1978). Methods in Enzymology, 52, 302.
- Bult, H., Herman, A.G., Rampart, M.** (1995). Modification of endotoxin induced haemodynamic and haematological changes in the rabbit by methyl prednisolone F (ab') 2 fragments and rosmarinic acid. Br. J.Pharmacol, 84,317-327.
- Buttler, A. J., Larick, D. K.** (1993). Effect of antioxidant on the sensory characteristics and storage stability of aseptically processed Low-fat beef gels. Meat Science, 35, 355–369.
- Camo, J., Beltrán, J.A., Roncalés, P.** (2008). Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging .Meat Science, 80, 1086–1091.
- Cao, K., Cheng, W., Li, C., Pan, X., Xie, X., Li, T.** (2005). DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 719, 177–183.
- Chan, M.M., Hoc, T., Huang, H.I.** (1995). Effects of three dietary phytochemicals from tea, rosemary and turmeric on inflammation –induced Nitrite production .Cancer Lett, 96, 23-29.
- Chen, Q., Shi, H., Ho, C.T.** (1992). Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. J Am Oil Chem Soc, 69,999-1002.
- Chen, F., Wu, A., Shieh, P., Kuo, D., Hsieh, C.** (2006). Evaluation of the antioxidant activity of *Ruellia tuberosa*. Food Chemistry, 94, 14–18.
- Chen, H.Q., Jin, Z.Y., Wang, X.J., Xu, X.M., Deng, L., Zhao, J.W.** (2008). Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. Neurosci Lett.
- Choi, B.H., Choi, J.S., Min, D.S., Yoon, S.H., Rhie, D.J., Jo, Y.H., Kim, M.S., Hahn, S.J.** (2001) . Effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate, the main component of green tea, on the cloned rat brain Kv1.5 potassium channels. Biochem. Pharmacol., 62,527–535.

- Cohen, M.** (2002) .Stress oxydant, glycation protéique, vieillissement et maladies liés à l'âge. La phytothérapie Européenne, 6, 18-26.
- Cosio, M.S., Buratti, S., Mannino, S., Benedetti, S.** (2006). Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family .Food Chemistry, 97, 725–731.
- Cuendet, M.** (1999). Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie *Fagraea blumei* .Thèse de doctorat .Faculté des sciences de l'université de Lausanne.
- Cuvelier, M.E., Berset, C., Richard, H.** (1994). Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). J. Agric. Food Chem., 42, 665-669.
- Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C.** (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. Journal of the American Oil Chemists Society, 73, 645–652.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., Polissiou, M. G.** (2003). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 2576-2581.
- Dafni, A., Lev, E.** (2005). **Communication personnelle.**
- Dahle, L.K., Hill, E. G., Holman, R. T.** (1962). The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. Archives of Biochemistry and Biophysics, 98, 253-267.
- Damerdj, A., Ladjmi, L., Doumandji.** (2005). Malacofaune associée à *Rosmarinus officinalis* L (Labiacées): inventaire et aperçu bioécologique près de Mansourah (Tlemcen, Algérie).Sciences & Technologie, 23, 11-20.
- Davies, K.J., Golberg A.L.** (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. J. Biol.Chem.,262,9895–9901.
- Decker, E. A., Mei, L.** (1996). Antioxidant mechanisms and applications in muscle foods. Reciprocal Meat Conference Proceedings, 49, 64–72.
- Decker, E.A., Xu, Z.** (1998) .Minimizing rancidity in muscle food. Food technology, 52, 54-61.
- De Cleene, M., Lejeune, M.C.,** (2003). Compedium of Symbolic and Ritual plants in Europe. Man and Culture. Ghent, Belgium.
- Del Bano, M.J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Del Rio, J.A., Ortuno, A., Quirin, K.W., Gerard, D.** (2003). Phenolic diterpenes, flavones and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. J Agric Food Chem ,51 , 4247-4253.

- Del Campo, J., Amiot, M.J., Nguyen-The, C.** (2000). Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 63,1359–1368.
- Dellacassa, E., Lorenzo, D., Moyna, P., Frizzo, C.D., Serafini, L.A., Dugo, P.** (1999). *J. Essent. Oil Res.*, 11, 27–30.
- Densiov, E.T., Afanas'ev, I.B.** (2005) IN: *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*.Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A), 703-861p.
- D'Evoli, L., Huikko, L., Lampi, A.M., Lucarini, M., Lombardi-Boccia, G., Nicoli, S., Piironen, V.** (2006). Influence of rosemary (*Rosmarinus officinalis, L.*) on plant sterol oxidation in extra virgin olive oil. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50,818-823.
- Diego, M.A., Jones, N.A., Field, T., Hernandez-Reif, M., Schanberg, S., Kuhn, C., et al.**(1998).Aromatherapy positively affects mood, EEG patterns of alertness and math computations. *Int J Neurosci*,96,217- 224.
- Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, M., Roberfroid, M., Stahl, W., Vin a-Ribes, J.** (1998). Functional food science and defense against reactive oxidative species. *British J. Nutrition*,81, 79-98.
- Directive 2006/52/EC** of the European Parliament and of the Council of 5 July 2006 amending Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners and Directive 94/35/EC on sweeteners for use in foodstuffs.
- Djenane, D., Sánchez-Escalante, A., Beltrán, J. A., Roncalés, P.** (2001). Extension of the retail display life of fresh beef packaged in modified atmosphere by varying lighting conditions. *Journal of Food Science*, 66, 181–186.
- Djenane, D., Sa´nchez-Escalante, A., Beltra´n, J. A., Roncale´s, P.** (2002). Ability of a-tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 76, 407–415.
- Djenane, D., Sa´nchez-Escalante, A., Beltra´n, J. A., Roncale´s, P.** (2003). The shelf-life of beef steaks treated with dl-lactic acid and antioxidants and stored under modified atmospheres .*Food Microbiology*, 20, 1–7
- Djenane, D., Martı´nez, L., Sa´nchez-Escalante, A., Beltra´n, J. A., Roncale,´ P.** (2004). Antioxidant effect of carnosine and carnitine in fresh beef steaks stored under modified atmosphere *Food Chemistry* ,85 ,453–459.
- Dogan, S., Dogan, M.** (2004). Determination of kinetic properties of polyphénols oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii*). *Food Chemistry*, 88, 69–77.
- Doolaege, E.H.A., Raes, K., Smet , K., Andjelkovic, M., Van poucke, C., De smet, S., Verheea, A.** (2007). Characterization of Two Unknown Compounds in Methanol Extracts of Rosemary Oil. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7283-7287.

- Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M. J.** (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83, 255–262.
- 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.
- Este´vez, M., Ventanas, S., Cava, R.** (2006). Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver paˆte. *Meat Science*, 74, 396–403.
- European Scientific Cooperative on Phytotherapy.** (1997). Monographs on the medicinal uses of plant drugs. Exeter, UK, 3, 1–3.
- Eymard, S.** (2003). Mise en ´evidence et suivi de l’oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des proc´edés. Thèse de doctorat .Ecole polytechnique de l’Université de Nantes.
- Eymard, S., Carcouët, E., Rochet, M.J., Dumay, J., Chopin, C., Genot, C.** (2005). Development of lipid oxidation during manufacturing of horse mackerel surimi .*Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1750-1756.
- FAO/WHO Food Standards.** (2005). Codex Alimentarius. General Standard for Food Additives Codex, Rev.6. Available in Internet under the URL <[http://www.codexalimentarius.net/download/standards/4/CXS\\_192e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/4/CXS_192e.pdf)>.
- Faustman, C., Cassens, R.G., Schaefer, D., Buege, D.R., Scheller, K.K.** (1989). Vitamin E. Supplementation of Holstein steer diet improves sirloin steak colour. *J. Food Sci.*, 54, 485-486.
- Faustman, C., Cassens, R. G.** (1990). The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review. *Journal of Muscle Foods*, 1, 217–243.
- Favier, A.** (2003) .Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L’actualité Chimique*, 108-115.
- Fawcett, J.R., Bordayo, E.Z., Jackson, K., Liu, H., Peterson, J., Svitak, A., Frey II, W.H.** (2002). Inactivation of the human brain muscarinic acetylcholine receptor by oxidative damage catalyzed by a low molecular weight endogenous inhibitor from Alzheimer’s brain is prevented by pyrophosphate analogs, bioflavonoids and other antioxidants, *Brain Res.*, 950 10–20.
- Ferna´ndez-Lopez, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Pe´rez-Alvarez, J. A., Kuri, V.** (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69,371–380.

- Flourie, F., Arab, K., Rossary, A., Steghens, J.P.** (2006). Effets de différents antioxydants sur la lipoperoxydation in vitro initiée par le radical OH°. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 21, 229–233.
- Folin, O., Denis, W.** (1915). A colorimetric method for the determination of phenols and phenol derivatives in urine. *J. Biol. Chem.*, 22, 305–308.
- Fontaine, E.** (2007). Production et élimination des radicaux libres oxygénés. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. troisième édition. Springer Paris, 251-257.
- Foti, M. C., Daquino, C., Geraci, C.** (2004). Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *Journal of Organic Chemistry*, 69, 2309–2314.
- Frankel, E.N.** (1998). Lipid oxidation. The Oily Press. Dundee, Scotland. 10, 10.
- Frankel, E. N., Meyer, A. S.** (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925–1941.
- Frutos, M.S., Hernandez –Herrero, J.A.** (2005). Effect of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) on the stability of bread with an oil, garlic and parsley dressing. *LWT*, 38, 651-655.
- Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Efferth, T., Liang, H., Liu, Z., Liu, W.** (2007). Investigation of antibacterial activity of rosemary essential oil against *Propionibacterium acnes* with atomic force microscopy. *Planta Med*, 73, 1275-1280.
- Genot, C., Borel, M.N., Metro, B., Gandemer, G., Renerre, M.** (1991). Enhancement of myoglobin autoxidation induced by phospholipids extracted from beef muscles of various metabolic types [abstract]. In: Proceedings of the 37th International Congress of Meat Science and Technology; Sept. 1991; Kulmbach, Germany. *Meat Science and Technology*, 356-359.
- Genot, C.** (1996). Some factors influencing TBA test, Annual report of the Vth PCRD EU project: Dietary treatment and oxidative stability of muscle and meat products: nutritive value, sensory quality and safety (Diet-ox), AIR III-CT-92-1577.µ
- Genot, C.** (2000). Congélation et qualité de la viande. Techniques et pratiques, INRA Editions, Paris.
- Genot, C., Meynier, A., Riaublanc, A., Chobert, J.M.** (2003). Protein Alterations Due to Lipid Oxidation in Multiphase Systems. In *Lipid oxidation pathways*, édition Kamal-Eldin A., AOACS Press Champaign, 265-292.
- George, S., Brat, P., Alter, P., Amio, M.J.** (2005). Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1370-1373.
- Gill, C.O.** (1996). Extending the storage life of raw chilled meats. *Meat Science*, 99–109.

- Gladine, C., Morand, C., Rock, E., Gruffat, D., Bauchart, D., Durand, D.** (2007). The antioxidative effect of plant extracts rich in polyphenols differs between liver and muscle tissues in rats fed *n*-3 PUFA rich diets *Animal Feed. Science and Technology*, 139, 257–272.
- Gokalp, H. T., Ockerman, H. W., Plimpton, P. F., Harper, W. J.** (1983). Fatty acids of neutral and phospholipids, rancidity scores and TBA values as influenced by packaging and storage. *Journal of Food Science*, 48, 829-834.
- Goudable, J., Favier, A.** (1997) Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 11,115-20.
- Gouny, P., Cornillon, P.** (1973). La salinité, aspect théorique, modes de contrôle. *PHM – Revue Horticole*, 142,3- 7.
- Grace, S. C., Logan, B. A., Adams, W. III,** (1998). Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant Cell and Environment*, 21, 513–521.
- Greene, B. E., Hsin, I. M., Zipser, M. W.** (1971). Retardation of oxidative color changes in raw ground beef. *Journal of Food Science*, 36, 940–942.
- Greene, B.A., Cumuze, T. H.** (1982). Relationship between TBA numbers and inexperienced panelists assessments of oxidised flavor in cooked beef. *Journal of Food Science*, 47, 52–58.
- Gritz, D.C., Srinivasan, M.,Smith, S.D.,Kim, U.,Lietman, T.M.,Wilkins, J.H,Priyadharshini, B.,John, R.K., Aravind, S.,Prajna, N.V.,Duraisami Thulasiraj, R.,Whitcher, J.P.**(2006).The antioxidants in prevention of cataracts study:effects of antioxidant supplements on cataracts progression in south India. *Br. J .Ophtalmol.*, 90,847-851.
- Grun, I.U., Ahn, J., Clarke, A.D., Lorenzen, C.L.** (2006). Reducing oxidation of meat. *Food Technol* 60, 36–43.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B.** (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 15, 129-135.
- Haak, L., Raes, K., Smet, K., Claeys, E., Paelinck, H., De Smet, S.** (2006).Effect of dietary antioxidant and fatty acid supply on the oxidative stability of fresh and cooked pork.*Meat Science*, 74, 476–486.
- Haak, L., Raes, K., De Smet, S.** (2009). Effect of plant phénolics, tocophérol and ascorbic acid on oxidative stability of pork patties. *J Sci Food Agric*, 89, 1360-1365.
- Hale, A.L.** (2003).Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds and differentiating russet norkotah strains using AFLP and microsatellite marker analysis .Office of graduate studies of texas A& M. university genetics .260.
- Hall, C., Cuppett, S.,** (1997). Structure activities of natural antioxidants. In *Antioxidant Methodology* Aruoma OI, Cuppett S (eds), 141-172. AOCS Press, Champaign, IL.

- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., Aruoma, O. I.** (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chemistry and Toxicology*, 33, 601-617.
- Halliwell, B.** (1996). Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie*, 44, 6-13.
- Han, J., Rhee, K.S.** (2005). Antioxidant properties of selected Oriental non-culinary/nutraceutical herb extracts as evaluated in raw and cooked meat. *Meat Science*, 70 25–33.
- Haraguchi, H., Saito, T., Okamura, N., Yagi, A.** (1995). Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica*, 61, 333–336.
- Harborne, J.B.** (1967). *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. Academic Press, London.
- Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P., Dormann, P.** (2005). Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 17, 3451–3469.
- Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M.** (2006). Ethnobotany and ethnopharmacology Interdisciplinary links with the historical sciences. *Journal of Ethnopharmacology*, 107,157–160.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F.** (2004) .Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif .*Phytothérapie*, 1, 3-6.
- Hennebelle, T.** (2006). Investigation chimiques, chimiotaxonomiques et pharmacologiques des lamiales productrices d'antioxydants. Thèse de doctorat. Université des sciences et technologies de Lille. Lille1.
- Hernández-Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M.E., Guerrero Legarreta, I.** (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) and oregano (*Origanum vulgare L.*) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, 81, 410–417.
- Herrera, J.** (2005) .Flower Size Variation in *Rosmarinus officinalis*: Individuals, Populations and Habitats .*Annals of Botany*, 95, 431–437.
- Hinneburg, I., Damien Dorman, H.J., Hiltunen, R.** (2006).Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 97, 122–129.
- Hoefler, C. F., Laurentin, J., Mortier, F., Pelt, J. M., Guillemain, J.** (1987). Comparative choleric and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extract of *Rosmarinus officinalis L.* in rats. *J. Ethnopharmacol*, 19,133–143.
- Hood, D. E., Riordan, E. B.** (1973). Discoloration in pre-packaged beef: measurement by reflectance spectrophotometry and shopper discrimination. *Journal of Food Technology*, 8, 333–343.

- Hooker, C. W., Lott, W. B., Harrich, D.** (2001). Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase target distinct phases of early reverse transcription. *Journal of Virology*, 75, 3095–3104.
- Horvath, G., Wessjohann, L., Bigirimana, J., Jansen, M., Guisez, Y., Caubergs, R., Horemans, N.** (2006). Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry*, 67, 1185–1195.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L.** (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856.
- Hultin, H.O.** (1994). Oxidation of lipids in seafoods. In *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*. Shahidi, F. & Botta, J.R. (Eds), Blackie Academic & Professional, New York, 49-74.
- Hur, Y.G., Yun, Y., Won, J.** (2004). Rosmarinic acid induces p53-dependent apoptosis in Jurkat and peripheral T cells via mitochondrial pathway independent from Fas/Fas ligand interaction. *J. Immunol.*, 172, 79–87.
- Ibanez, E., Murga, A. O. G., Lopez-Sebastian, S., Tabera, J., Reglero, G.** (1999). *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1400.
- Ibanez, E., Kubatova, A., Senorans, F. J., Caverro, S., Reglero, G., Hawthorne, S.B.** (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 375–382.
- Ibanez, E.** (2005). In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extract from rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*). *Eur. Food Res. Technol.*, 221, 478-486.
- Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H.** (1983). *Agric. Biol. Chem.*, 47, 521.
- Inoue, K., Garnec, C., Ackermann, B.L., Oe, T., Blair, I.A.** (2006). Liquid chromatography/Tandem Mass Spectrometry characterisation of oxidized amyloid beta peptides as potential biomarkers of Alzheimer disease. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 20, 911-918.
- Ito, H., Miyazaki, T., Ono, M., Sakurai, H.** (1998). Antiallergic activities of Rabdosin and its related compounds: chemical and biochemical evaluations. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 6, 1051–1056.
- Jacamon, M.** (1992). *Guide de dendrologie 3ème édition Arbres, arbustes et arbrisseaux des forêts françaises*. E.N.G.R.E.F.
- Javanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.J.** (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. 116, 4846-4851.
- Joyeux, M., Rolland, A., Mortier, F., Dorfman, P.** (1990). Terbutylhydroperoxide induced injury in isolated rat hepatocytes. A model for studying antihepatotoxic crude drugs. *Planta Med.*, 56, 171–174.

- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T. S.** (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954–3962.
- Kanner, J.** (1994). Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. *Meat Sci.* 36, 169-189.
- Karumi, Y., Ouyeyili, P.A., Ogugbuaja, V.O.** (2004). Identification of Active Principles of *M.balsamia* (Balsam apple) leaf extract. *J.Med. Sci.*, 4,179-182.
- Katzer, G.**, (1998). Gernot Katzer's Spice Pages. Available at: <http://www.unigraz.at/katzer/engl/>.
- Ke, P.J., Ackman, R.G., Linke, B.A., Nash, D.M.** (1977). Differential lipid oxidation in various part of frozen mackerel. *Journal of Food Technology*, 12, 37-47.
- Kennedy, D.O., Scholey, A.B.** (2006).The Psychopharmacology of European Herbs with Cognition-Enhancing Properties. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 4613-4623.
- Khayat, A., Schwall, D.** (1983) .Lipid oxidation in seafood. *Food Technology*, 130-140.
- Kircher, T., Britton, J.** (2002).Guide des plantes médicinales. Québec. Modus Vivendi, 132.
- Koehler-Ramonatxo, C.** (2006).Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*, 20,165-177.
- Koppenol, W.H.** (2001).The Haber-Weiss cycle, 70 years later. *Redox Rep*, 6,229–234.
- Kosar, M., Dorman, H. J. D., Hiltunen, R.** (2005). Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 91, 525–533.
- Kosugi, H., Kikugawa, K.** (1989). Reaction of thiobarbituric acid with saturated aldehydes. *Lipids*, 21, 537-542.
- Kovar, K.A., Gropper, B., Freiss, D., Ammon, H. P. T.** (1987). Blood levels of 1,8 cineole and locomotor activity of mice after inhalation and oral administration of rosemary oil. *Planta Med*, 53,315–318.
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonamone, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E.** (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.*, 113,71-88.
- Krussmann, G.** (1966). La pipinière T1 ; La multiplication des arbres, arbustes et conifères .édition La maison rustique.
- Kuo, J. C., Dresel, J., Huang, C. J., Ockerman, H. W.** (1987). Effect of phosphate type, packaging method and storage time on characteristics of Chinese sausage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 11, 325–338.

- Kuo, C. C., Chu, C. Y.** (2003). Quality characteristics of Chinese sausages made from PSE pork. *Meat Science*, 64, 441–449.
- Lai, P.K., Roy, J.** (2004). *Curr. Med. Chem.*, 11, 1451.
- Lamaison, J.L., Carnat, A.** (1991). Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D.C) en fonction de la végétation, *Plantes Médicinales Phytothérapie XXV*, 12–16.
- Lee, S., Decker, E.A., Faustman, C., Mancini, R.A.** (2005). The effects of antioxidant combinations on color and lipid oxidation in *n-3* oil fortified ground beef patties. *Meat Science*, 70, 683–689.
- Lee, J.W., Park, K.S., Kim, J.G., Oha, S.H., Lee, Y.S., Kima, J.H., Byuna, M.W.** (2005). Combined effects of gamma irradiation and rosemary extract on the shelf-life of a ready-to-eat hamburger steak. *Radiation Physics and Chemistry*, 72, 49–56.
- Lin, Y. L., Chang, Y., Kuo, Y. H., Shiao, M. S.** (2002). Anti-lipid-peroxidative principles from *Tournefortia sarmentosa*. *Journal of Natural Products*, 65, 745–747.
- Liu, G. T., Zhang, T. M., Wang, B. E., Wang, Y. W.** (1992). Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochemical Pharmacology*, 43, 147–152.
- Litvinenko, V.I., Popova, T.P., Simonjan, A.V., Zoz, I.G., Sokolov, V.S.** (1975). “Gerbstoffe” und Oxyzimtsäureabkömmlinge in Labiaten. *Planta Med.*, 27, 372–380.
- Lo, A.H., Liang, Y.C., LinShian, C.Y.** (2002). Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor KB in mouse macrophage. *Carcinogenesis*, 23, 983-991.
- Luis, J.C., Martí n Pérez, R., Valde´s Gonza´lez, F.** (2007). UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. *Food Chemistry*, 101, 1211–1215.
- Luxford, C., Morin, B., Dean, R.T., Davis, M.J.** (1999). Histone H1 and other protein and amino acid hydroperoxides can give rise to free radicals which oxidize DNA. *Biochem.J.*, 344, 125-134.
- Madhavi, D. L., Singhal, R. S., Kulkarni, P. R.** (1995). Technical aspects of food antioxidants. In: *Food Antioxidants. Technological, Toxicological and Health Perspectives*; Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K., Eds Marcel Dekker, New York, 159-265.
- Madsen, H. L., Bertelsen, G.** (1995). Spices as antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 271–277.

- Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmanit, R.** (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100, 1409–1418.
- Marc, F., Davin, A., Deglène Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., Fritsch, P.** (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydants dans les aliments. *Médecine sciences*, 20,458-463.
- Martin, F. R., Frutos, M. J., Pe´rez-Alvarez, J. A., Martí´nez-Sa´nchez, F., Del Ri´o, J. A.** (2002). Flavonoids as nutraceuticals: structural related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation. In Atta-Ur-Rahman (Ed.). *Studies in natural products chemistry*, 26,324–389.
- Mata, A.T., Proenca, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Arau´ Jo, M.E.M.** (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices .*Food Chemistry*, 103, 778–786.
- Mazoyer, M.** (2002). *Larousse agricole : le monde agricole au XXI e siècle*. Édition Mathilde Majorel.
- Mazumder, A., Neamati, N., Sunder, S., Schulz, J., Pertz, H., Eich, E., et al.** (1997). Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 3057–3063.
- McDonald, R. E., Hultin, H. O.** (1987). Some characteristics of the enzymic peroxidation system in the microsomal fraction of flounder skeletal muscle. *Journal of Food Science*, 52, 15–21, 27.
- Mcgarvey, D., Croteau, R.**, (1995). Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1015-1026.
- Mehlich**, (1981). Charge properties in relation to sorption and desorption of selected cations and anions. In: *Chemistry in the Soil Environnement*. Mathias, S., Dowdy, R.H., Ryan, J.A., Volk, V.V. and Baker, D.E (Eds).
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J.** (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol.Med.*, 17,235-248.
- Mielnik M.B., Aaby K., Skrede G.** (2003). Commercial antioxidants control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat.*Meat Science*, 65, 1147-1155.
- Mitsumoto, M., Faustman, C., Cassens, R. G., Arnold, R. N., Schaefer, D. M., Scheller, K. K.** (1991). Vitamins E and C improve pigment and lipid stability in ground beef. *Journal of Food Science*, 56, 194–197.
- Molyneux, P.** (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26,211-219.

- Montero, P., Giménez, B., Pérez -Mateos, M., Gómez-Guillén, M.C.** (2005). Oxidation stability of muscle with quercetin and rosemary during thermal and high-pressure gelation Food Chemistry, 93, 17–23.
- Muller, J., Reisinger, G., Muhlbauer, W.** (1989) .Drying of medicinal and aromatic plants in a greenhouse solar dryer. Landtechnik, 2, 58–65.
- Munné-Bosch, S., Nogués, S., Alegre, L.** (1998). Daily patterns of photosynthesis of two Mediterranean shrubs in response to water deficit. In: GarabG(Ed), Photosynthesis: mechanisms and effects, vol V. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 4015-4018p.
- Munné-Bosch, S., Schwarz, K., Alegre, L.** (1999). Enhanced formation of  $\alpha$ -tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water-stressed rosemary plants. Plant Physiol, 121, 1047-1052.
- Munne´-Bosch, S., Alegre, L.,** (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. Crit. Rev. Plant Sci. 21, 31–57.
- Munne´-Bosch, S.** (2007). Alpha–tocophérol: a multifaceted molecule in plants, [Vitam .Horm.](#), 76,375-92.
- Nassu, R.T., Alves, L.A.G.G., da Silva, M.A.A.P., Pereira, M. A. A., Beserrac, F. J.** (2003). Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant, Meat Science, 63, 43–49.
- Nerín, C., Tovar, L., Djenane, D., Camo, J., Salafranca, J., Beltrán, J. A.**(2006). Studies on the stabilization of beef meat by a new active packaging containing natural antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 7840–7846
- Noctor, G., Foyer, C.H.** (1998) .Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 49,249–279.
- Novelli, G.P.**(1997). Role of free radicals in septic shock. J.Physiol.Pharmacol., 48,517-527.
- Nychas, G.J. E., Drosinos, E. H., Board, R. G.** (1998). Chemical changes in stored meat. In R. G. Board & A. R. Davies (Eds.), The Microbiology of Meat and Poultry. London: Blackie Academic and Professional. 288–326.
- Ockerman, H. W.** (1976). Quality control of postmortem muscle and tissue. PhD thesis. The Ohio State University, Columbus.
- Ogrydziak, D. M., Brown, W. D.** (1982). Temperature effects in modified atmosphere storage of seafoods. Food Technology, 36, 86–96.
- O’Grady, M.N., Monahan, F.J., Bailey, J., Allen, P., Buckley, D.J., Keane, M.G.** (1998). Colour-stabilising effect of muscle vitamin E in minced beef stored in high oxygen packs. Meat Sci, 50, 73–80.

- O'Grady, M. N., Monahan, F. J., Burke, R. M., Allen, P.** (2000). The effect of oxygen level and exogenous alpha-tocopherol on the oxidative stability of minced beef in modified atmosphere packs. *Meat Science*, 55, 39–45.
- O'Grady, M. N., Maher, M., Troy, D. J., Moloney, A. P., Kerry, J. P.** (2006). An assessment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Science*, 73, 132–143.
- Onibi, G.E.** (2000). Oxidative deterioration in fresh beef as influenced by cooking and storage conditions. *Nig. Food J.*, 18, 70-73.
- Oyaizu, M.** (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- O' zcan, M.** (2004) .Mineral contents of some plants used as condiments in Turkey. *Food Chem*, 84,437–440.
- Palmer, H.J., Paulson, K.E.** (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutrient Reviews*, 55, 353-361.
- Parnham, M.J., Kesselring, K.,** (1985). Rosmarinic acid. *Drugs of the Future*, 10, 756–757.
- Passwater, R.** (1995). *Lipoic Acid: The metabolic Antioxydant*. New Canaan, CT: Keats put inc.
- Pegg, R.B.** (1993). *Development of Nitrite-Free Meat Curing Systems*. Ph.D. Thesis, Memorial University of Newfoundland, St John's, NF, Canada.
- Penney, N., Bell, R. G.** (1993). Effect of residual oxygen on the colour and taste of carbon dioxide packaged beef, lamb and pork during short term storage at chill temperatures. *Meat Science*, 33, 245–252.
- Pe´rez, M.B., Calderon, N.L., Croci, C. A.** (2007). Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) .*Food Chemistry*, 104, 585–592.
- Petersen, M., Simmonds, M.S.J.** (2003). Rosmarinic acid, *Phytochemistry*, 62, 121–125.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O.** (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme* ,16 ,233–239.
- Pincemail, J., Meurisse, M. Limet, R. Defraigne, J.O.** (1998).Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine. *Midi sphère*, 73.
- Pizzocaro, F., Senesi, E., Babbini, G.** (1994). Effetto protettivo di salvia e rosmarino freschi su hamburger surgelati di carne bovina. *Industrie Alimentari*, 33, 289–294.
- Phillips, A. L., Faustman, C., Lynch, M. P., Govoni, K. E., Hoagland, T.A., Zinn, S. A.** (2001). Effect of dietary  $\alpha$ -tocopherol supplementation on color and lipid stability in pork. *Meat Science*, 58, 389–393.

- Pokorny, J.** (1991). Natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science and Technology*, 2, 223–227.
- Polle, A.** (2001). *Plant Physiol.* 126, 445-462.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K.** (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4290–4302.
- Pryor, W.A.** (1987). The involvement of free radicals in chemical carcinogenesis. *Anti-carcinogenesis and radiation protection*, 71-80.
- Qiao, S., Li, W., Tsubouchi, R., Haneda, M., Murakami, K., Takeuchi, F., Nisimoto, Y., Yoshino, M.** (2005). Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. *Free Radical Research*, 39, 995-1003.
- Raccach, M.** (1984). The antimicrobial activity of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Safety*, 6, 141–170.
- Radu, O.L., Armand, S., Lenouvel, F., Driguez, H., Cimpean, A., Iordachescu, D.** (2006). Luteolin glycosylation in organic solvents under catalytic action of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*. *Revue Roumaine de Chimie*, 51, 147–152.
- Rasooli, I., Fakoor, M.H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., Rezaei, M.B.** (2008). Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 135–139.
- Regnault-Roger, C., Ribodeau, M., Hamraoui, A., Bateau, I., Blancharda, P., Gil-Munoz, M.I., Barberan, F.T.** (2004). Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research*, 40, 395–408.
- Rennerre, M.** (1990). Factors involved in the discolouration of beef meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 25, 613–630.
- Rennerre, M.** (2000). *Antioxidants in Muscle Foods*, John Wiley, New-York, 113.
- Rhee, K. S., Ziprin, Y. A.** (1987). Lipid oxidation in retail beef, pork and chicken muscles as affected by concentrations of heme pigments and nonheme iron and microsomal enzymic lipid peroxidation activity. *Journal of Food Biochemistry*, 11, 1–15.
- Rhee, K.S.** (2000). Fatty acids in meat and meat products. In: Chow CK, editor. *Fatty acids in foods and their health implications*. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker. 83-108.
- Ribéreau-Gayon, P.** (1968). Les tannins in : *Les composés phénoliques des végétaux*. Edition Dunod Paris, 173-201.
- Ribéreau-Gayon, P.** (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Edition Dunod Paris, 254p.

- Rice-Evans, C.** (1995). Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem. Soc. Symp.*, 61, 103-116.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G.** (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933–956.
- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G.** (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 153–159.
- Richheimer, S. L., Bailey, D. T., Bernart, M. W., Kent, M., Vininski, J. V., Anderson, L.D.** (1999). Antioxidant activity and oxidative degradation of phenolic compounds isolated from rosemary. *Recent Research Development in Oil Chemistry*, 3, 45–58.
- Roccabruna, L.** (2003). IL rosmarino, un'aromatica per il palato e il benessere dell'organismo. *Vita in Campagna*, 10, 24-26.
- Rouillard, N.C.** (2003). Antioxydants contre radicaux libres. *Guide ressources*, 19, 38-39.
- Rosmini, M. R., Perlo, F., Perez-Alvarez, J. A.** (1996). TBA test by an extractive method applied to 'pate'. *Meat Science*, 42, 103-110.
- Rolland, Y.** (2004). Antioxydants naturels végétaux .OCL, n°11.
- Rooney, M.L.** (1995). *Active Food Packaging*, Blackie Academic & Professional. London : Chapman & Hall.
- Sachdev, S., Davies, K.J.A.** (2008). Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, 44, 215–223.
- Salido, S., Altarejos, J., Noguerras, M., Sánchez, A., Luque, P.** (2003). *J. Essent. Oil Res*, 15, 10–14.
- Salih, A.M., Smith, D.M., Price, J.F. Dawson, L.E.** (1987). Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. *Poult Sci*, 66, 1483-1488.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F.** (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270–276.
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrecano, G., Beltrán, J.A., Roncales, P.** (2001). The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Science*, 58, 421–429.
- Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrecano, G., Beltrán, J.A., Roncales, P.** (2003). Antioxidant action of borage, rosemary, oregano and ascorbic acid in beef patties packaged in modified atmosphere. *Journal of Food Science*, 68, 339–344.
- Sanjust, E., Mocci, G., Zucca, P., Rescigno, A.** (2008). Mediterranean shrubs as potential antioxidant sources. *Natural Product Research*, 22, 689–708.

- Sardans, J., Rodà, F., Peñuelas, J.** (2005). Effects of water and a nutrient pulse supply on *Rosmarinus officinalis* growth, nutrient content and flowering in the field. *Environmental and Experimental Botany*, 53, 1–11.
- Sattler, S.E., Giligand, L.U., Magallanas-Lundback, M., Pollard, M., DellaPenna, D.,** (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell*, 16, 1419–1432.
- Scalbert, A., Williamson, G.** (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130, 2073-2085.
- Scarpati, M.L., Oriente, G.** (1958). Isolamento e costituzione dell'acidorosmarinico (dal *rosmarinus off.*). *Ric. Sci.*, 28, 2329–2333.
- Scartezzini, F.** (2001). Il tempo dei Rosmarini – Influenza dell'epoca di raccolta sul contenuto e la composizione dell'olio essenziale di due cloni di rosmarino (*Rosmarinus officinalis* L.) coltivati in Trentino. *Erboristeria domani*, 10, 42-46.
- Schwarz, K., Ternes, W.** (1992). *Z Lebensm. Unters. Forsch.* 195-199.
- Sebranek, J. G., Sewalt, V. J. H., Robbins, K. L., Houser, T. A.** (2005). Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Science*, 69, 289–296.
- Senorans, F.J., Ibanñez, E., Cavero, S., Tabera, J., Reglero, G.** (2000). Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants *Journal of Chromatography A*, 870, 491–499.
- Setelo-Felix, J.I., Martínez-Fong, D., Muriel, P., Santillán, L., Castillo, D.** (2002). Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* L in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J. Ethnopharmacol.*, 81, 145–154.
- Shahidi, F., Wanasundara, P. K. J. P. D.** (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 67–103.
- Sheard, P. R., Enser, M., Wood, J. D., Nute, G. R., Gill, B. P., Richardson, R. I.** (2000). Shelf life and quality of pork and pork products with raised n-3 PUFA. *Meat Science*, 55, 213–221.
- Sheldon, B. W., Curtis, P. A., Dawson, P. L., Ferkert, P. R.** (1997). Effect of dietary vitamin E on the oxidative stability, flavour, colour and volatile profiles of refrigerated and frozen turkey breast meat. *Poultry Science*, 76, 634-641.
- Shelef, L. A., Naglik, O. A., Bogen, D. W.** (1980). Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary, and allspice. *Journal of Food Science*, 45, 1042–1044
- Shivas, S. D., Kropf, D. H., Hunt, M. C., Kastner, C. L., Kendall, J. L. A., Dayton, A. D.** (1984). Effects of ascorbic acid on display life ground beef. *Journal of Food Protection*, 47, 11.

- Shklar G.** (1998). Mechanisms of cancer inhibition by anti-oxidant nutrients. *Oral Oncol*, 34, 24–29.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144–158.
- Skibsted, L. H., Mikkelsen, A., Bertelsen, G.** (1998). Lipid-derived off-flavours in meat. In F. Shahidi (Ed.), *Flavor of meat, meat products and sea food* (2nd ed., pp. 215–256). London: Blackie Academic and Professional.
- Small, E., Catling, P. M.** (2000). *Les cultures médicinales canadiennes, Version française de Canadian medicinal crops*, Les Presses scientifiques du CNRC, Ottawa, 281.
- Smet, K., Raes, K., Huyghebaert, G., Haak, L., Arnouts, S., De Smet, S.** (2008). Lipid and Protein Oxidation of Broiler Meat as Influenced by Dietary Natural Antioxidant Supplementation. *Poultry Science*, 87, 1682–1688.
- Smirnoff, N., Wheeler, G.L.** (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit Rev Plant Sci*, 19, 267–290.
- Soliman, F.M., El-Kashoury, E.A., Dathy, M.M., Gonaïd, M.H.** (1994). *Flavour Fragr. J.*, 9, 29–33.
- Somon, E.** (1987). *Arbres, arbustes et arbrisseaux en Algérie*. Edition O.P.U. Alger.
- Souza, C. R. F., Schiavetto, I. A., Thomazini F. C. F., Oliveira W. P.** (2008). Processing of *Rosmarinus officinalis linné* extract on spray and spouted bed dryers, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25, 59 – 69.
- Soysal, Y., O' ztekin, S.** (2001). Postharvest technology technical and economic performance of a tray dryer for medicinal and aromatic plants. *J. Agric. Eng. Res.*, 79, 73–79.
- Sroka, Z., Fecka, I., Cisowski, W.** (2005). Antiradical and anti-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> properties of polyphenolic compounds from an aqueous peppermint extract. *Zeitschrift für Naturforschung*, 60, 826–832.
- Stadtman, E.R.** (1986). Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem. Sci.*, 11, 11–12.
- St. Angelo, A. J., Crippen, K.L., Dupuy, H. P., James Jr., C.** (1990). Chemical and sensory studies of antioxidant-treated beef. *Journal of Food Science*, 55, 1501–1539.
- Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N.** (1989). Protein oxidation and proteolysis during ageing and oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 275, 559–567.

- Stefanovits-Bányai, É., Tulok, M.H., Hegedûs, A., Renner, C., Varga, I.S.** (2003).Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) clones .Acta Biologica Szegediensis,47,111-113.
- Swain, S.D., Rohn, T.T., Quinn, M.T.** (2002). Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. Antioxid Redox Signal, 4, 69–83.
- Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T., Kubo, M.** (2002). Identification of rosmarinic acid as a novel antidepressive substance in the leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (*Perillae Herba*). Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi, 22, 15–22.
- Tarladgis, B. G., Watts, B. M., Younathan, M. T.** (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. Journal of the American Oil Chemists Society, 37, 44–48.
- Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T.** (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species .Food Chemistry ,104 ,1372–1378.
- Terpinc, P., Bezjak, M., Abramovic, H.** (2009) .Analytical Methods. A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts, Food Chemistry, 115, 740–744.
- Tessier, F., Marconnet, P.** (1995).Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice.Science et Sports, 10,1-13.
- Thomas, S.R., Stocker, R.** (2000).Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: implications for atherosclerosis. Free Rad Biol Med, 28, 1795–805.
- Thoresen, M.A., Hildebrand, K.S.** (2003).Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extract.Aspect of accurate quantification .J.Chromatogr.A, 119-125.
- Tomei, P. E., Cioni, P. L., Flamini, G., Stefani, A.** (1999).J. Essent. Oil Res., 7, 279–282.
- Tompkins, R.B.** (1986). Microbiology of Ready to eat meat and poultry products. In: Bacus JN, Advances in meat research, 2, 89- 121.
- Torre, J., Lorenzo, M. P., Martinez-Alcazar, M. P., Barbas, C.** (2001). Simple high-performance liquid chromatography method for a-tocopherol measurement in *Rosmarinus officinalis* leaves new data on a-tocopherol content. Journal of Chromatography A, 919, 305–311.
- Trindade, R.A., Lima, A., Andrade-Wartha, E.R., Oliveira e Silva, A.M., Mancini-Filho J., Villavicencio, A.L.C.H.** (2009). Consumer’s evaluation of the effects of gamma irradiation and natural antioxidants on general acceptance of frozen beef burger, Radiation Physics and Chemistry. 78, 293–300.

- Trout, G.R., Dale, S.** (1990). Prevention of warmed-over flavor in cooked beef: Effect of phosphate type, phosphate concentration, a lemon juice/phosphate blend, and beef extract. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 665–669.
- USDA.** (2000). Code of federal regulations, title 9, chapter III, part 318.7. Approval of substances for use in the preparation of products, Washington, DC, USA: Government Printing Office.
- US Food and Drug Administration** (2006). Food additive status list. Available in Internet under the URL <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-appa.html>.
- Vinson, J.A.** (2006). Oxidative stress in cataracts. *pathophysiology* 13, 151-162.
- Viuda-Martos, M., Ruíz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A.** (2007). Chemical Composition of the Essential Oils Obtained from Some Spices Widely Used in Mediterranean Region. *Acta Chim. Slov.*, 54, 921–926.
- Wada, S., Fang, X.** (1992). The synergistic antioxidant effect of rosemary extract and  $\alpha$ -tocopherol in sardine oil model system and frozen-crushed fish meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 16, 263–274.
- Wagner H., Bladt S.** (1996). Plant drug analysis in thin layer chromatography atlas, 2e edition, Springer Verlag, Berlin: 384.
- Watts, B. M., Lehmann, B. T.** (1952). Ascorbic acid and meat color. *Food Technology*, 6, 194.
- Wellwood, C. R. L., Cole, R. A.** (2004). Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.) accessions for optimization of antioxidant yield. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 6101–6107.
- Wei, G., Ho, C.** (2006). A stable quinone identified in the reaction of carnosol, a major antioxidant in rosemary, with 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Food Chemistry*, 96, 471–476.
- Wenkert.** (1965). *J. Org. Chem.*, 30, 2931.
- Whang, K., Peng, I. C.** (1988). Photosensitized lipid peroxidation in ground pork and turkey. *Journal of Food Science*, 53, 1596–1598.
- Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Shackelford, S. D.** (1996). Effect of vitamin C concentration and co-injection with calcium chloride on beef retail display colour. *Journal of Animal Science*, 74, 1846–1853.
- Williams, S. N., Frye, T. M., Frigg, M., Schaefer, D. M., Scheller, K. K., Liu, Q.** (1992). Vitamin E. *Meat Focus International*, 3, 22–23.
- Williams, G. M., Jeffrey, A. M.** (2000). Oxidative DNA damage: Endogenous and chemically induced. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32, 283–292.

- Wu, H.C., Shiau, C.Y., Chen, H.M., Chiou, T.K.** (2003). Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11, 148–153.
- Xiao, C., Dai, H., Liu, H., Wang, Y., Tang, H.** (2008). Revealing the Metabonomic Variation of Rosemary Extracts Using NMR Spectroscopy and Multivariate Data Analysis. *J Agric Food Chem*, 9.
- Xiao, C., Liu, H., Dai, H., Tseng, L., Spraul, M., Wang, Y., Tang, H.** (2009). Efficient identification and structural elucidation of metabolites using HPLC-DAD-Cryo NMR -MS method. *Chinese Journal of Magnetique Resonance*, 26, 01-16.
- Xiong, Y. L.** (2000). Protein oxidation and implications for muscle food quality. In E. Decker & C. Faustman (Eds.), *Antioxidants in Muscle Foods*, 85–111.
- Yamasaki, H.** (1997). A function of colour. *Trends in Plant Science*, 2, 7–8.
- Yasosky, J. J., Aberle, E. D., Peng, I. C., Mills, E. W., Judge, M. D.** (1984). Effects of pH and time of grinding on lipid oxidation of fresh ground pork. *Journal of Food Science*, 49, 1510–1512.
- Yen, G.C., Duh, P.D.** (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 629–632.
- Yen, G.C., Duh, P.D., Tsai, H.L.** (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem*, 79, 307-313.
- Yildirim, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A. A., Algur, O. F., & Bilaloglu, V.** (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea*), sage (*Salvia triloba L.*), and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5030–5034.
- Zheng, W., Wang, S. Y.** (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165–5170.
- Zhivko, A., Velko, V., Mikhail, K., Kolev, Tadjer, A.V.** (2007). Modeling and statistical analysis of DPPH scavenging activity of phenolics. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 72, 1461–1471.
- Zou, Z.W., Xu, L.N., Tian, J.Y.** (1993). Antithrombotic and antiplatelet effects of rosmarinic acid, a water-soluble component isolated from *radix Salviae miltiorrhizae* (danshen). *Yao Xue Xue Bao.*, 28, 241-5. Chinese.

# Annexes



## Techniques d'analyse des sols

### Annexe I. Mesure de pH (Code interne ; procédure n° ps0905, CIRAD., 2004)

Cette méthode instrumentale de mesure en routine du pH est appliquée à tous les types de sols séchés à l'air. La mesure s'effectue à l'aide d'une électrode de verre combinée trempant dans une suspension de sol dans un rapport (M/V) de 1/2.5 :

- dans l'eau : pH H<sub>2</sub>O.
- dans le K Cl 1 mol/L : pH K Cl.

#### *Mode opératoire :*

- Peser 20 g de terre fine (séchée à l'air) dans un flacon de 500 ml.
- Ajouter 50 ml d'eau distillée (pour mesurer le pH eau) ou 50 ml de K Cl (1 mol/L) (pour mesurer le pH K Cl).
- Agiter le contenu du flacon durant 1 heure à l'aide d'un agitateur électrique et laisser reposer la solution pendant 1/2 heure.
- Calibrer le pH mètre, et introduire l'électrode dans la suspension.
- Lire le chiffre affiché sur le pH mètre.
- Laver l'électrode avec de l'eau distillée.

**Annexe II. Granulométrie (Aubert., 1978)*****Mode opératoire :***

-Mettre 10 g de sol séché à l'aire dans un flacon de 500 ml.

-Ajouter 50 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 20%.

-Agiter le flacon pendant 2 heures, à l'aide d'un agitateur.

-Prélever dans des tares de poids connus 10 ml de la suspension à l'aide d'une pipette :

- Après 45 secondes (pour les sables grossiers).
- Après 1 minute et 6 secondes (pour les sable fins).
- Après 4 minutes (pour les limons grossiers).
- Après 40 minutes (pour les limons fins).
- Après 6 à 8 heures (pour l'argile).

-Mettre les tares sur une plaque chauffante.

-Peser les tares après évaporation.

$$X\% = 100. P/10$$

X% : Pourcentage de (sables grossiers ou fins, limons grossiers ou fins et argile).

P : Poids de l'échantillon.

### **Annexe III. Conductivité électrique (ISO 11265., 1995)**

#### ***Mode opératoire :***

- Peser 10 g de terre fine (séchée à l'air) dans un flacon de 500 ml ;
- Ajouter 50 ml d'eau distillée.
- Agiter le contenu du flacon durant 2 heures à l'aide d'un agitateur et laisser reposer la solution ½ heure.
- Calibrer le conductimètre et introduire la cellule de conductivité au centre du récipient de la suspension ; les deux électrodes doivent bien immerger dans la solution de sol.
- Lire le chiffre de la conductivité affichée sur le conductimètre.
- Laver la cellule avec de l'eau distillée.

---

**Annexe IV. Dosage de l'azote total (NF ISO 11261., 1995)****1- Mode opératoire :****1-1 Minéralisation**

- Introduire dans un matras 1 g de terre fine (séchée à l'air).
- Ajouter 3 g du sulfate de potassium  $K_2 SO_4$  et 20 ml d'acide sulfurique  $H_2SO_4$  concentré.
- Porter le matras sur la rampe d'attaque placé dans une chauffe ballon.
- Chauffer d'abord doucement, puis augmenter progressivement l'intensité du chauffage jusqu'à ce que le contenu du matras soit porté à ébullition.
- Lorsque le mélange de la solution se décolore et prend une teinte légèrement verdâtre poursuivre encore l'attaque à l'ébullition durant une heure.
- En suite, laisser refroidir progressivement le matras.
- Lorsque la température du mélange est voisine à celle du laboratoire, verser par petites quantités 50 ml d'eau déminéralisé pour diluer la suspension contenue dans le matras.
- Verser le contenu du matras dans une fiole de 100 ml et compléter la solution à 100 ml par l'eau déminéralisé.

**1-2 Distillation**

- Prélever dans un matras à l'aide d'une pipette 20 ml de la solution préalable contenue dans la fiole, ajouter quelques gouttes phénophtaléine et verser 50 ml de soude 33% jusqu'au virage de la couleur.
- Raccorder immédiatement le matras à l'appareil de distillation.
- Adopter un chauffage du matras ; les vapeurs d'ammoniac et d'eau sont entraînées dans une colonne réfrigérante ou elles se condensent.
- L'ammoniac est recueilli dans un bécher de 40 ml contenant 20 ml de l'acide borique  $H_3BO_3$  de quelques gouttes de rouge de méthyle.
- Arrêter la distillation quand le volume de l'ammoniac et d'eau évaporé atteindre 20 ml.

**1-3 Titration**

-Titrer le contenu du b cher en fin de la distillation avec une solution d'acide sulfurique (0,05 N) jusqu'à coloration rouge persistence de l'indicateur coloré.

**1-4 Expression des résultats**

**La teneur d'azote dans la prise d'essai (v) :**

$$N = V_0 \cdot 7/20 \cdot 10^{-4} \text{ g d'N}$$

V<sub>0</sub> : Volume H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (N/20) utilisé pour la neutralisation.

v : Volume d'échantillon correspondant (20ml).

V : Volume d'extraction de fiole (100 ml).

P : Prise d'essai (1 g).

**Teneur d'azote dans le volume d'extraction (V) :**

$$N = V_0 \cdot 7/20 \cdot 10^{-4} \cdot V/v$$

V : Volume d'échantillon correspondant (20 ml).

**Annexe V. Calcaire total (NF ISO 10693., 1995)****Mode opératoire :**

- Déposer 1 g de terre fine (séchée à l'air) dans un flacon.
- Remplir l'appendice latéral du flacon avec 5 ml d'HCl 0,5 N.
- Relier le flacon au calcimètre de Bernard.
- Amener au zéro les niveaux de l'eau dans la colonne et dans l'ampoule.
- Répondre l'acide sur la terre.
- A l'aide de l'ampoule, rétablir le niveau et lire le volume de CO<sub>2</sub> dégagé (en cm<sup>3</sup>).
- Une fois le dégagement de CO<sub>2</sub> est terminée, enlever l'ampoule du calcimètre jusqu'à ce que le niveau de l'eau de cette dernière soit dans un même plan horizontal que celui dans la colonne.
- Déposer un poids de CaCO<sub>3</sub> pur, pour l'étalonnage de l'appareil, tel qu'il provoque un dégagement gazeux et recommencer les mêmes étapes précédemment décrites.

**Expression des résultats**

p : Poids de CaCO<sub>3</sub>, pur utilisé pour l'étalonnage.

V : Volume du gaz carbonique dégagé par l'échantillon du sol.

P : Poids de l'échantillon du sol.

v: Volume du gaz carbonique dégagé par le CaCO<sub>3</sub>.

**Annexe VI. Dosage du phosphore assimilable (NF X31-161., 1999)****1- Réactifs**

*-Solution d'acide oxalique 0.1mole.l<sup>-1</sup>*

*-Solution molybdique*

- Dissoudre 25 g de molybdate d'ammonium dans 200 ml d'eau déminéralisée chaude.
- Diluer 280 ml d' H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre un volume de 660 ml.
- Verser dans une fiole de un litre la solution molybdique puis l'acide sulfurique dilué et compléter le mélange à 1 litre avec de l'eau déminéralisée.

*-Solution de chlorure stanneux*

- Dissoudre 25 g de Sn Cl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O dans 1000 ml d'acide chlorhydrique dilué à 10%.
- La solution filtrée n'est préparée qu'au moment de l'emploi, sinon elle doit être conservée à l'abri de la lumière.

*-Solution étalon de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (1 g/l)*

- Peser exactement 1.917g de phosphate mono potassique (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).
- Introduire dans une fiole jugée de 1000 ml et compléter à 1 litre avec de l'eau déminéralisée.
- A la fin, ajouter une goutte de chloroforme.

*-Solution étalon de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (10 mg/l)*

- Verser 10 ml de la solution (1 g/litre) dans une fiole de 1000 ml et compléter la solution jusqu'à 1000 ml avec de l'eau déminéralisée.

**2- Mode opératoire****2-1 Extraction à l'acide**

- Mettre 1 g de sol, séché à l'aire et broyé, homogénéisé et passé au tamis de 0,2 mm dans un flacon de 500 ml.
- Ajouter 50 ml de solution d'acide oxalique.
- Agiter la solution durant 2 heures à l'aide d'un agitateur.
- Filtrer sur un filtre blanc n°111ϕ 110 ml : le filtrat recueilli constituera la solution d'extraction et sera récupérée dans une fiole de 100 ml.
- Verser de nouveau 50 ml de solution d'acide oxalique et compléter à 100 ml.

## 2-2 Dosage colorimétriques du phosphore

Dans un erlenmeyer de 100 ml, verser :

- 20 ml de la solution d'extraction.
- 25 ml d'eau déminéralisée.
- 5 ml de solution molybdique.
- Laisser reposer pendant 10 minutes.
- Ajouter 2 gouttes de  $\text{Sn Cl}_2$  dans la fiole, pour réduire le complexe phospho-molybdique.
- Au bout de 5 minutes effectuer un dosage colorimétrique à 630 nm.

### *Expression des résultats*

$$\text{P 2 O 5 } \% = 25.Q/P$$

P= poids de terre à la prise d'essai.

Q= teneur de phosphore en mg/l (à partir de la courbe).

**Tableau A 1: pouvoir antiradicalaire des extraits alcooliques de *Rosmarinus officinalis* des différentes régions (% pourcentage d'inhibition)**

Facteurs étudiés	Régions				F 1(n=7)				F 2(n=4)							Effets des facteurs			
	Madagh	El Bouihi	Khelil	Tinkial	Madagh	El Bouihi	Khelil	Tinkial	125µg/ml	63µg/ml	31µg/ml	16µg/ml	8µg/ml	4µg/ml	2µg/ml	F1	F2	Inté F1 x F2	
Concentrations (µg/ml)	125	95,42 ± 0,25 a	95,28 ± 0,17 a	95,66 ± 0,71 a	95,13 ± 0,23 a	54,37 ± 1,75 a	52,45 ± 1,89 b	47,62 ± 1,45 c	48,52 ± 1,52 c	95,37 ± 0,34 a	94,57 ± 0,42 a	79,33 ± 1,90 b	43,62 ± 2,29 c	23,76 ± 2,03 d	14,23 ± 1,89 e	4,28 ± 1,78 f	**	**	* *
		94,54 ± 0,28 a	94,76 ± 0,13 a	94,76 ± 0,84 a	94,23 ± 0,43 a														
	71,20 ± 3,26 c	87,83 ± 0,77 b	71,89 ± 2,75 c	86,39 ± 1,05 b															
	49,66 ± 1,54 d	46,97 ± 4,42 d	40,24 ± 0,74 e	37,61 ± 2,55 e															
	8	36,43 ± 1,61 e	22,89 ± 2,34 g	18,94 ± 3,23 h	16,80 ± 2,03 h i														
	4	27,02 ± 1,37 f	13,60 ± 3,07 i	9,68 ± 0,96 j	6,61 ± 2,71 j k														
	2	6,34 ± 3,62 k j	5,78 ± 0,68 k j	2,16 ± 0,52 k	2,84 ± 1,92 k														

F1 : Facteur relatif aux régions de prélèvement des échantillons à analysé ; F2 : Facteur relatif aux concentrations de l'extrait de *Rosmarinus officinalis*;(\*\*): Effet hautement significatif du facteur étudié. NS : Effet non significatif du facteur étudié. Chaque valeur représente la moyenne ± écart type de trois échantillons ; Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes.

**Tableau A2.** Les variations du pouvoir réducteur des différents extraits de *Rosmarinus officinalis* (absorbance)

Facteur étudiés	Régions				F1 (n=6)				F2 (n=4)						Effets des facteurs			
	Madagh	El Bouihi	Khelil	Tinkial	Madagh	El Bouihi	Khelil	Tinkial	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	63 µg/ml	31 µg/ml	F1	F2	Interaction F1 x F2	
Concentrations µg/ml	1000	0,834 ± 0,08 b	1,270 ± 0,01 a	0,902 ± 0,06 b	0,851 ± 0,05 b													
	500	0,521 ± 0,02 e	0,681 ± 0,06 c	0,588 ± 0,01 d e	0,611 ± 0,08 d													
	250	0,313 ± 0,04 f	0,350 ± 0,04 f	0,351 ± 0,04 f	0,274 ± 0,02 f	0,333 ± 0,03 b	0,443 ± 0,04 a	0,360 ± 0,03 b	0,344 ± 0,04 b	0,964 ± 0,06 a	0,600 ± 0,04 b	0,322 ± 0,03 c	0,175 ± 0,02 d	0,097 ± 0,01 e	0,063 ± 0,02 f	*	*	**
	125	0,193 ± 0,02 g	0,182 ± 0,02 g	0,163 ± 0,01 g	0,160 ± 0,03 g													
	63	0,092 ± 0,02 g	0,101 ± 0,01 g	0,099 ± 0,01 g	0,096 ± 0,01 g													
	31	0,047 ± 0,02 h	0,071 ± 0,02 h	0,060 ± 0,03 h	0,073 ± 0,02 h													

F1 : Facteur relatif aux régions de prélèvement des échantillons à analysé ; F 2 : Facteur relatif aux concentrations de l'extrait de *Rosmarinus officinalis*;(\*\*): Effet hautement significatif du facteur étudié. NS : Effet non significatif du facteur étudié. Chaque valeur représente la moyenne ± écart type de trois échantillons ; Les valeurs affectées des lettres différentes sont significativement différentes.

## Résumé

Le travail expérimental a porté sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* préparés à partir de feuilles séchées de romarin prélevées dans trois sites différents dans la région de Seb dou (station de Sidi El Djilali) dans la wilaya de Tlemcen et dans un seul site dans la région de Messerghine (forêt de Madagh) dans la wilaya d'Oran. Des échantillons de sol pour analyse ont été également prélevés aléatoirement sur les lieux de récolte de l'espèce étudiée.

L'analyse des extraits végétaux par CCM a révélée la richesse de *Rosmarinus officinalis* en flavonoïdes notamment des flavones de type lutéoline et ses dérivés glucosides, ce qui confirme les résultats du dosage des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu et ceux des flavonoïdes par la méthode de Lamaison et Carnat.

L'évaluation quantitative des polyphénols totaux ainsi que des flavonoïdes montre que les quatre extraits végétaux sont assez riches en polyphénols avec des valeurs qui varient entre 36 et 40 mg EAG/g d'extrait et en flavonoïdes avec des valeurs allant de 7 jusqu'à 11 mg EQ/g d'extrait. L'estimation du pouvoir antiradicalaire des quatre différents extraits végétaux vis-à-vis du radical DPPH confirme que ces extraits sont très actifs avec des valeurs  $IC_{50(DPPH)}$  qui fluctuent entre 0,03 et 0,04 mg/ml. Cette activité antioxydante a été également déterminée par le test du pouvoir réducteur des extraits méthanoliques par la méthode de Oyaizu qui a pu démontrer également que le *Rosmarinus officinalis* a la capacité de réduire les radicaux libres en les transformant en molécules stables et inactives.

Enfin, la mesure de l'indice TBA appelé aussi indice de peroxydation lipidique dans la viande hachée de bœuf adjuvée d'une unique dose de 1000 ppm d'extrait de *Rosmarinus officinalis* et conservé pendant une semaine à 2°C a donné au bout du huitième jour, des résultats significatifs de 0,52 mg de MDA /kg de viande hachée traitée à l'extrait de romarin contre 0,79 mg de MDA /kg dans l'échantillon contrôle.

D'après les résultats obtenus dans ce travail, on peut dire que l'espèce *Rosmarinus officinalis* est réellement dotée d'un puissant pouvoir antioxydant et qu'elle peut se substituer efficacement aux antioxydants de synthèse ; les résultats du test sensoriel n'ont fait que confirmer ces mêmes données.

**Mots clés :** Pouvoir antiradicalaire, Pouvoir réducteur, Composés phénoliques, TBA, *Rosmarinus officinalis*.

## Abstract

The experimental work has focused on evaluating the antioxidant activity of methanol extracts of *Rosmarinus officinalis* prepared from dried rosemary leaves collected from three different sites in the region of Seb dou station (Sidi el Djilali) in the wilaya of Tlemcen and one site in the region Messerghine (forest of Madagh) in the wilaya of Oran. Soil samples for analysis were also randomly taken from the place of harvest of the species studied.

Analysis of plant extracts by thin layer chromatography (TLC) revealed a wealth of *Rosmarinus officinalis* in flavonoids including flavones luteolin-type and glucosides derivatives, confirming the results of the determination of polyphenols by the Folin Ciocalteu method and those of the flavonoids by method of Lamaison and Carnat.

Quantitative evaluation of total polyphenols and flavonoids that shows that the four plant extracts are relatively rich in polyphenols with values ranging between 36 and 40 mg GAE / g of extract and flavonoids with values ranging from 7 to 11 mg QE/ g of extract. The antiradical power estimate of four different plants extracts vis-à-vis the radical DPPH confirm that the extracts are very active with  $IC_{50(DPPH)}$  values that fluctuate between 0.03 and 0.04 mg / ml. The antioxidant activity was also determined by the test of reducing power of méthanolics extracts by the method of Oyaizu who could demonstrate that the *Rosmarinus officinalis* also has the ability to reduce free radicals by converting them into stable and inactive molecule.

Finally, measurement of the TBA index also called index of lipid peroxidation in minced beef incorporated a single dose of 1000 ppm extract of *Rosmarinus officinalis* and kept for one week at 2 ° C was given after the eighth Updated significant results of 0.52 mg MDA / kg meat treated with rosemary extract against 0.79 mg MDA / kg in the control sample. From the results obtained in this work, we can say that the species *Rosmarinus officinalis* is really with a powerful antioxidant and can effectively substitute for synthetic antioxidants, the results of sensory test were done confirm these data.

**Keywords:** Antioxidant power, Reducing power, phenolics compounds, TBA, *Rosmarinus officinalis*.