

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Ibn Khaldoun – Tiaret  
Faculté des sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie



*Mémoire de fin d'études*

*En vue de l'obtention du diplôme de Master académique*

*Domaine : Sciences de la nature et de la vie.*

*Filière : Biotechnologie*

*Spécialité : Biotechnologie microbienne.*

*Présenté par :*

*M. KOUADRIA Tahar*

**THEME**

Evaluation de l'effet anticancéreux des huiles essentielles extraites de *Rosmarinus officinalis* de la région de Tiaret

*Soutenu publiquement le 02/07/2019*

**Jury**

**Président :** Mr KADDAR Bachir

**Encadreur :** Mr ALI-NEHARI Abdelkader

**Examineur :** Mme MEZOUAR Djamila

**Grade**

MCB

MCB

MCB

*Année universitaire : 2018/2019*

# *Remerciement*

*Je tiens à remercier le président Mr KADDAR Bachir, et Mme MEZOUAR Djamila de bien vouloir examiner ce travail*

*Mille mercis à tous les professeurs de l'équipe de formation de la spécialité Biotechnologie microbienne.*

*Mon encadreur Dr **ALI-NEHARI Abdelkader** pour tous ses efforts, sa sincérité et constante présence durant la réalisation de cette étude. Un grand homme, un grand chercheur et un grand frère. Merci.*

*Un grand merci au Dr **SASSI Mohamed** chef de la spécialité Biotechnologie microbienne, à Mr **ZEDEK Mohamed** Vice doyens de la faculté SNV.*

*Aux Pr **TAIBI Khaled**, Dr **AIT ABDERRAHIM Leila**, Dr **BENARABA Rachida**, Dr **HEMIDA Houari**, Dr **SLIMANI Khaled** et Dr **BENAISSA Toufik** pour leur contribution et aide qui n'ont pas d'égaux dans la réalisation de ce mémoire.*

*Ainsi que tous ceux qui ont participé à sa réalisation de prêt ou de loin.*

# *Dédicace*

*En premier lieu, je dédie cette modeste recherche à tous les patients cancéreux, tout en priant Allah de leur donner force et courage ainsi en leur souhaitant guérison et rétablissement. Espérant ainsi que cette étude sera d'une aide même que minimale dans l'avancement dans les méthodes de traitements de cancer.*

*A la mémoire de mon grand-père qui aurait aimé voir ce que je suis devenu.*

*A mes parents source de bonheur et raison de vie.*

*A mes sœurs*

*A mes oncles, tantes et ma respectueuse famille*

*Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.*

*A mes amis et ceux qui m'aiment*

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point vous exprimer mon amour et affection.  
Et c'est en laissant libre recours à ma sentimentalité que ce mémoire vous est dédié.*

## Tables de matières

*Liste des abréviations*  
*Liste des tableaux*  
*Liste de figures*  
*Résumé*

### *Introduction générale*

Introduction ..... 01

### *Partie expérimentale*

#### *Chapitre I : Matériels et méthodes*

1. Matériels biologiques .....	05
1.1. Matériels végétal .....	05
1.2. Matériels animal .....	06
1.3. Matériels et méthodes expérimentales .....	06
1.3.1. Dispositif d'hydrodistillation .....	06
1.3.1.1. Prétraitement de la plante .....	07
1.3.1.2. Principe du CEP .....	07
2. Déroulement de l'expérimentation .....	08
2.1. Elevage des rats .....	08
2.2. Induction du cancer.....	08
2.2.1. Concept de l'induction .....	08
2.2.2. Principe de l'induction .....	08
2.3. Préparation de la plantes médicinales .....	09
2.4. Extraction des HEs .....	10
2.5. Prétraitement avec CEP .....	11
2.6. Coupe histologique de la feuille avant et après au CEP .....	11
2.7. Dosage de l'activité antioxydante des HEs obtenues .....	12
2.8. Analyse des HEs par HPLC .....	13
2.9. Etude de l'effet anti-cancéreux des HEs et de leur Hydrolats .....	13

#### *Chapitre II : Résultats et discussions*

1. Caractéristiques des HEs de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	15
2. Rendement des HEs .....	15
3. Coupe histologique de la feuille avant et après prétraitement par CEP .....	17
4. Dosage de l'activité antioxydante .....	18
5. Résultats d'analyse des HEs par HPLC .....	19
6. Evaluation de l'effet anticancéreux des HEs .....	19
6.1. Variation du poids .....	20
6.2. Etude macroscopique .....	21
6.3. Analyse sanguine .....	23
Conclusion et perspectives .....	25
Références bibliographiques .....	26
Annexe .....	28

### *Liste des abréviations*

<b>AFNOR :</b>	Association française de normalisation
<b>CEP :</b>	Champs électrique pulsé
<b>DEN :</b>	Diéthylnitrosamine
<b>FRAP</b>	Pouvoir antioxydant réducteur du fer
<b>HEs :</b>	Huiles essentielles
<b>HPLC :</b>	High performance liquid chromatography
<b>kV :</b>	Kilo volt
<b>M :</b>	La masse en gamme de l'huile essentielle
<b>M' :</b>	La masse en gamme de matière végétale sèche
<b>R % :</b>	Rendement en pourcentage

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b>	Classification botanique du romarin utilisé .....	06
<b>Tableau 02</b>	Caractéristiques de la matière végétale utilisée .....	09
<b>Tableau 03</b>	Caractéristiques organoleptiques des HEs obtenues .....	15
<b>Tableau 04</b>	Variation du poids des rats .....	20
<b>Tableau 05</b>	Résultats d'analyse sanguine des sujets d'étude .....	23

## Liste des figures

<b>Figure 01</b>	Photo du romarin .....	05
<b>Figure 02</b>	Rats WISTAR .....	06
<b>Figure 03</b>	Schéma du dispositif d'hydrodistillation type « Clevenger » .....	07
<b>Figure 04</b>	Mode d'action du CEP sur la cellule .....	08
<b>Figure 05</b>	Confirmation de la formation du Carcinome hépatocellulaire .....	09
<b>Figure 06</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i> .....	10
<b>Figure 07</b>	Montage du dispositif d'extraction .....	10
<b>Figure 08</b>	Appareillage du prétraitement CEP .....	11
<b>Figure 09</b>	Rendement des HEs obtenus avec et sans prétraitement .....	16
<b>Figure 10</b>	Coupe histologique de la feuille prétraitée par le CEP	17
<b>Figure 11</b>	Coupe histologique de la feuille non-prétraitée par le CEP	18
<b>Figure 12</b>	Comparaison de l'activité antioxydante des HEs pures et diluées du romarin .....	18
<b>Figure 13</b>	Ecographie confirmant la présence de cancer .....	19
<b>Figure 14</b>	Intestins du témoin négatif .....	21
<b>Figure 15</b>	Intestin du rat cancéreux N°1 .....	21
<b>Figure 16</b>	Rate du rat cancéreux N°1 .....	21
<b>Figure 17</b>	Lésions intestinales du Carcinome hépatocellulaire .....	22
<b>Figure 18</b>	Rate du rat cancéreux N°2 .....	22
<b>Figure 19</b>	Lésions intestinales du Carcinome hépatocellulaire .....	22

## Résumé

La présente étude a pour objectif d'extraire les huiles essentielles (HEs) de *Rosmarinus officinalis* par hydrodistillation de type Clevenger, en vue de mettre en évidence leur effet anticancéreux sur des rats de souches WISTAR atteint de cancer de type Carcinome hépatocellulaire. D'après les résultats obtenus, le rendement d'extraction des HEs d'un échantillon sans prétraitement par CEP est de 0,28 % après 40 min d'extraction, tandis que celui prétraité a donné un rendement de 0,44 % en même durée, voir un rendement recors en courte durée. L'application sur les rats atteints de cancer durant 04 semaines a eu son effet après la lecture des résultats (prise de poids ; étude macroscopique ; analyse sanguine). Le poids des rats était stable après le début du traitement, suivi de l'étude macroscopique qui a montré la réduction des tailles des lésions, ainsi que les résultats sanguins qu'étaient très significatifs vu que les résultats des rats cancéreux étaient proches de celle du témoin négatif confirmant ainsi l'efficacité des HEs sur la prolifération des cellules cancéreuses.

Mots clé : huiles essentielles ; effet anticancéreux ; *Rosmarinus officinalis* ; Champs électriques pulsés.



## المخلص

الهدف من هذه الدراسة هو استخلاص الزيوت الأساسية من نبتة (إكليل الجبل) عن طريق عملية تعرية مائية Clevenger ، بهدف تسليط الضوء على تأثيرها المضاد للسرطان على فئران سلالات Wistar المصابة بسرطان الأمعاء. وفقاً للنتائج التي تم الحصول عليها ، فإن كفاءة استخراج الزيوت للعينة دون معالجة مسبقاً بواسطة الحقل الكهربائي النبضي قدرت بنسبة 0.28% في فترة 40 دقيقة بينما أعطت تلك المعالجة نسبة 0.44% في نفس المدة ، والتي تعتبر مدة قياسية بالنسبة لهذا عملية استخلاص. وقد أظهرت نتائج التطبيق على الفئران المصابة بالسرطان لمدة 4 أسابيع من خلال المؤشرات (زيادة الوزن ، الدراسة العيانية ، فحص الدم) أثر هذه الزيوت على تطور خلايا السرطان. حيث كان وزن الفئران مستقراً بعد بدء العلاج ، تلتها الدراسة العيانية التي أظهرت انخفاض أحجام الأورام ، في حين أن نتائج تحاليل الدم كانت مهمة للغاية حيث أن نتائج تحليل دم الفئران المصابة كانت قريبة من نتائج العينة الشاهدة السليمة. مما يؤكد وجود أثر للزيوت المدروسة على تكاثر الخلايا السرطانية.

الكلمات المفتاحية : الزيوت الأساسية. تأثير مضاد للسرطان، إكليل الجبل، الحقول الكهربائية النبضية.

## Abstract

The objective of this study is to extract essential oils (EO) from *Rosmarinus officinalis* by Clevenger-type hydrodistillation, with a view to highlighting their anticancer effect on rats of WISTAR strains with cancer of the hepatocellular carcinoma type. According to the results obtained, the extraction yield of the EO of a sample without pretreatment by Pulsed electric fields (PEF) is 0.28% after 40 min of extraction, while the pretreated one gave a yield of 0.44% within the same duration. The application to rats with cancer for 4 weeks had its effect after reading the results (weight gain, macroscopic study, blood test). The weight of the rats was stable after the beginning of the treatment, followed by the macroscopic study which has showed the reduction of the lesion sizes, as well as the blood results which were very significant since the results of the cancer rats were close to that of the negative control confirming the effect of EO on the cancer cells proliferation.

Key words: essential oils; *Rosmarinus officinalis*; anticancer effect; Pulsed electric fields.

*Introduction*  
*générale*

Les cellules cancéreuses ont une grande capacité de croissance ainsi qu'une grande résistance à l'apoptose ce qui rend le traitement du cancer douloureux au patient avec les actuelles méthodes de traitement (**Jessy M et al, 2016**). Ces dernières à la fois coûteuses, mais aussi très douloureuses avec des effets secondaires indésirables au point d'être plus mortelles que le cancer lui-même, la chimiothérapie comme exemple premier attaque les cellules saines et cancéreuses du fait de la complexité du traitement au quel on recourt de nos jours.

Pour cela des alternatives de traitement ont vu le jour dont l'une des plus prometteuse est l'utilisation des huiles essentielles (HEs) et d'évaluer son effet anticancéreux en décélant le mécanisme d'action potentiellement important.

Ainsi, les HEs utilisées depuis l'antiquité d'une manière empirique comme agents thérapeutiques des plus pratiques contre différents maux suscitent de plus en plus l'intérêt des chercheurs scientifiques. Elles font l'objet d'études actives dans le monde pour leur emploi possible en vue de la préservation des aliments contre l'oxydation et comme remèdes contre les infections.

Dans ce sens, le Romarin de son nom scientifique *Rosmarinus officinalis*, objet de notre recherche est originaire de la région de Taret qui offre par sa riche et diverse végétation un nombre important de plantes aromatiques et médicinales parmi elles le *R. officinalis* de son habitat essentiellement méditerranéen, il est utilisé comme plante médicinale vu ces capacités curatives où les feuilles sont la partie la plus utilisée.

*R.officinalis* est considéré parmi les meilleures plantes stimulatrices, antispasmodiques, stomachiques, carminatives et antiprolifératives en raison de sa richesse en nombreux principes actifs (**Sofiane H, 2005**).

L'extrait de *Rosmarinus officinalis* contient de nombreux polyphénols contenant de l'acide carosique et de l'acide rosmanrique. Contrairement aux cellules normales qui contrôlent la production et la libération de facteurs qui régulent la croissance, assurant ainsi l'homéostasie cellulaire et le maintien de l'architecture tissulaire normale, les cellules cancéreuses ont une capacité apoptotique réduite et une capacité de prolifération élevée vu qu'elle produisent des facteurs de croissance auxquels elles peuvent répondre par l'expression de récepteurs apparentés, mais ce qui rend les cellules cancéreuses hypersensibles au : facteur de croissance, au niveau où le nombre élevé de protéines réceptrices à la surface des cellules cancéreuses, voire même à la modification des molécules réceptrices qui facilitent l'activation des voies de signalisation du facteur de croissance (**Lucia Cattaneo et al, 2015**).

En outre, l'effet curatif des huiles essentielles obtenues par une opération d'extraction par hydrodistillation de type Clevenger est basée sur le fait que les métabolites secondaires présents dans la plante sont facilement entraînés par un courant de vapeur et ce par égard au principe qu'ils ne sont pratiquement pas solubles dans l'eau vu leur caractère hydrophobe selon AFNOR ,1997 et ISO, 2000. Quant à la récupération des HEs pures, elle a lieu après décantation.

Dans ce contexte, les techniques d'extraction sont extrêmement énergivores et consomment beaucoup d'eau. Pour les améliorer et en croître le rendement, des technologies innovantes et donc performantes sont développées. Elles se basent sur l'utilisation des micro-ondes, des fluides supercritiques, des ultrasons et des traitements électriques dont : les décharges électriques à hautes tensions « DEHT » et les champs électriques pulsés « CEP » (Bessah R, 2014).

Ainsi, les CEP s'avèrent rapides, efficaces et verts à l'opposé des autres méthodes d'optimisation dont l'extraction est énergivore et onéreuse. (Ghnimi S. *et al.*, 2011). Cette technique prouvée et déterminée, consiste à bombarder la membrane plasmique par des impulsions électriques fluidifiant la perméabilité (Lebovka *et al.*, 2012). Ces CEP sont donc une technologie non thermique et ne dégradant pas les molécules thermosensibles telles que les essences (Ghnimi S. *et al.*, 2011).

L'objectif principal de la présente étude est d'évaluer l'effet anticancéreux des HEs, extraites à partir du romarin, sur un animal atteint du cancer (de type Carcinome Hépatocellulaire). Les tests portent sur les variations du poids, l'analyse sanguine et l'étude microscopique.

D'une autre part, nous nous attelons à jeter une lumière crue sur l'impact du prétraitement par le CEP sur le rendement de l'extraction des HEs à partir de la plante étudiée.

Dans cette perspective, nous avons jugé utile d'articuler la présente étude en trois volets :

1. Prétraitement de l'échantillon de la plante médicinale par le CEP;
  - *Evaluation des changements probables.*
2. Extraction des HEs à partir de la plante médicinale;
  - *Comparaison des rendements d'extraction avec et sans prétraitement.*
3. Application des HEs extraites sur des rats de souche WISTAR pour tester leurs effets ;
  - *Préparation des échantillons des HEs extraites (Différentes concentrations).*
  - *Dosage de l'activité anti-oxydante des HEs obtenues*
  - *Induction de cancer chez les rats.*
  - *Evaluation de l'effet anticancéreux.*

*Partie*  
*expérimentale*

# *Chapitre I*

## *Matériels et méthodes*

## I. Matériels et méthodes :

Le but de notre travail est d'une part, la valorisation de la plante aromatique spontanée de la région de Tiaret à travers l'emploi de ses HEs comme agents anti-cancéreux. D'une autre part l'étude de la possibilité d'accroître le rendement de l'extraction des HEs par un prétraitement de la plante avec le CEP.

### 1. Matériels biologiques :

#### 1.1. Matériel végétal :

##### Le Romarin « *Rosmarinus officinalis* »

Le genre *Rosmarinus* est très répandu dans la région méditerranéenne présent surtout dans le maquis du Maghreb arabe et la péninsule Ibérique dont l'espèce la plus dominante en Algérie est *officinalis*.



Figure 01 : Photo du Romarin (Originale)

Le romarin possède un large spectre d'utilisation dont nous citerons, entre autres : (**Sofiane H, 2005**)

- Comme herbe médicinale, il est connu pour soulager les problèmes des voies respiratoires et ceux gastro-intestinaux (Anti-cancéreux ; anti-inflammatoire ; anti oxydant).
- Dans les produits cosmétiques.
- Condiment de saveur pour les aliments.

Le *Rosmarinus officinalis* (Fig. 01) est une espèce commune pour le territoire algérien, peut atteindre jusqu'à 2 mètres de hauteur, il est facilement discernable et perceptible en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous (**Mohammedi Z, 2013**).

La quantité de Romarin utilisée dans notre étude est de 3 Kg de feuilles.



**Tableau 01** : Classification botanique du romarin utilisé selon (Benoît Bock *et al.*, 2018)

<b>Romarin</b>	
<b>Règne</b>	<i>Plantea</i>
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Ordre</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Famille</b>	<i>Lamiaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Rosmarinus</i>
<b>Espèce</b>	<i>officinalis</i>

### 1.2. Matériel animal :

Les animaux ayant servi de cobayes à notre volet expérimental sont des rats de souches WISTAR que nous avons ramené de l'Université de Tlemcen.

Ils sont au nombre de 10 et de sexe femelle.



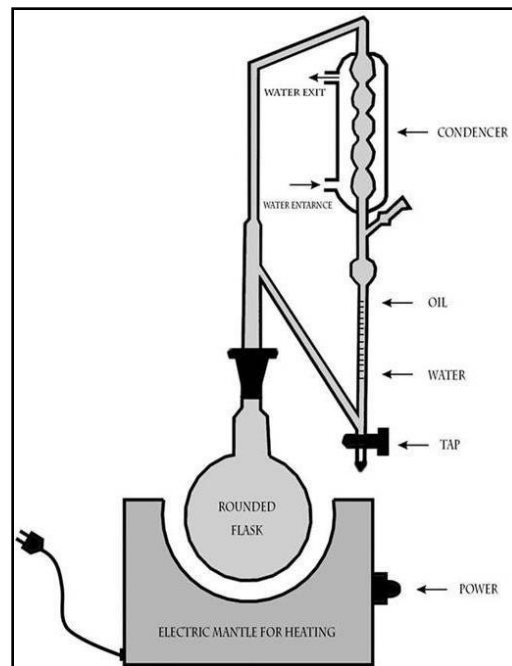
**Figure 02** : Rats *Wistar* (photo originale)

### 1.3. Matériels et méthodes expérimentales:

#### 1.3.1. Dispositif d'hydrodistillation :

L'extraction des HEs a été réalisée par hydrodistillation dans un dispositif de type « Clevenger » (Fig. 03) d'où le principe basé sur le fait que la plupart des composés odorants volatile contenus dans les végétaux sont susceptibles d'être entraînés par la vapeur d'eau à cause de leur point d'ébullition relativement bas et leur caractère hydrophobe.

Pour ce fait la plante est mise dans un ballon traversée par un courant de vapeur d'eau les principaux volatiles peu solubles dans l'eau sont entraînés, et après condensation ils sont séparés du distillat par décantation.



**Figure 03 :** Schéma du dispositif d'hydrodistillation type « Clevenger »

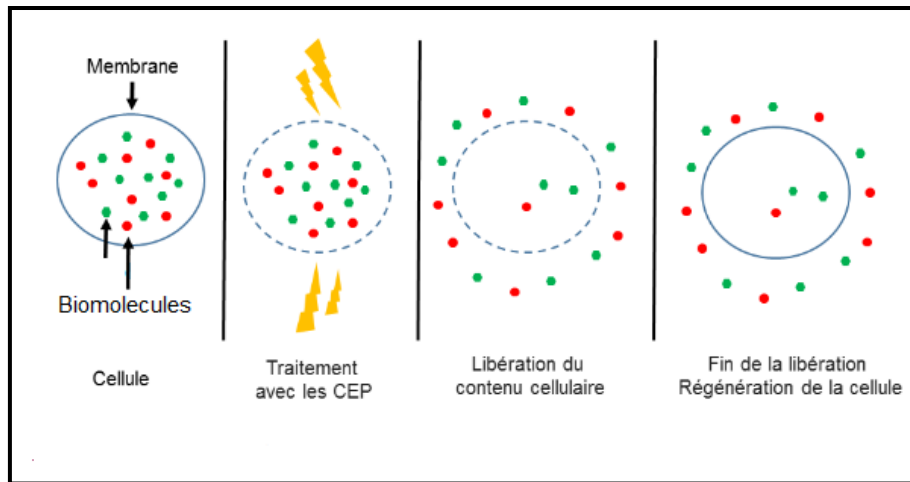
#### 1.3.1.1. Prétraitement de la plante :

Cette partie de notre recherche a pour but d'étudier l'éventuelle augmentation du rendement d'extraction des HEs en utilisant un champ électrique pour une probable production industrielle. Elle consiste à étudier l'impact du prétraitement par CEP à tensions moyennes sur l'amélioration du rendement des HEs du romarin et cela par comparaison des deux échantillons de ce dernier, l'un prétraité par CEP et l'autre non.

#### 1.3.1.2. Principe du CEP :

L'intensité du champ électrique pulsé joue un rôle très important dans les procédés de perméabilisation. Selon la théorie de l'électro-compression l'intensité du champ électrique pulsé doit atteindre une valeur critique pour que l'on puisse observer la perméabilisation vu que le CEP affaiblit la paroi cellulaire (Mykola S, 2007).

En outre, quand une cellule biologique est soumise à un champ électrique d'une forte intensité (kV/cm) et de courtes pulsions ( $\mu\text{s}$  à  $\text{ms}$ ) sa paroi est endommagée temporairement ou même de façon permanente provoquant ainsi la perméabilisation de la membrane ce qui va faciliter l'extraction des HEs par la diffusion succincte des milieux intra et extracellulaires qui définit l'état perméable, sachant que la désintégration de la membrane se fait si l'intensité du prétraitement est élevée (Bellebna Y et al, 2014).



**Figure 04** : Mode d'action du CEP sur la cellule.

## 2. Déroulement de l'expérimentation :

### 2.1. Elevage des rats :

L'expérimentation in-vivo exige des conditions d'élevage strictes et conventionnelles en plus du respect de l'éthique, à ce titre les rats sont maintenus dans des conditions d'élevage et d'entretien en accord avec ce type d'élevage, stables et propres. Ainsi que des rats ne présentent aucun signe clinique de pathologies tout en ayant un statut holoxénique.

Par ailleurs, l'autre condition d'élevage qu'est l'alimentation varie selon le type d'expérimentation voulu du fait le régime standard omnivore sous forme de pellets mise à disposition des rats à tout moment à base de glucides, protéines, vitamine et minéraux ainsi qu'un équilibre de graisse.

Dans notre expérimentation le régime change en fonction de notre étude pour deux femelles seulement pour une période de 04 semaines comme indiquer ci-dessous.

### 2.2. Induction du cancer :

#### 2.2.1. Concept de l'induction :

Le cancer induit chez les rats de test (deux femelles) a été obtenu par 50 ppm de Diéthylnitrosamine ajoutés à l'eau de boisson en plus d'un régime alimentaire hyper gras pendant 04 semaines. Deux autres femelles ont ensuite reçu le régime alimentaire témoin pendant la même période (Ulland *et al.*, 2005).

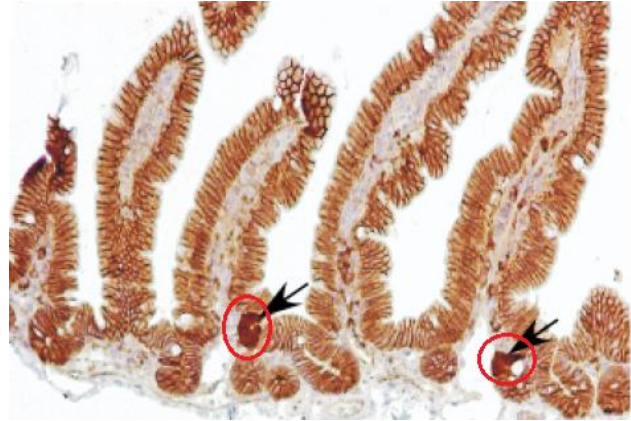
#### 2.2.2. Principe d'induction:

Le Diéthylnitrosamine (DEN) est un composé organique cancérigène et mutagène du groupe 2A classé en 1987 par l'organisation mondiale de la santé. Causant ainsi un cancer de type Carcinome hépatocellulaire par des mutations des Wnt-pathways chez des gènes tels que la polypose adénomateuse (APC). (Nick B *et al.*, 2009) et alkyle l'ADN, qui est lui-même converti en molécule réactive par des oxygénases (Renganathan G *et al* 2009).

Par conséquent le DEN entraîne un adénome rapide qui se forme dans l'intestin en 03 à 05 semaines (04 semaines dans notre recherche).



a) Echographie du Carcinome hépatocellulaire (photo originale)



b) Début de formation du carcinome hépatocellulaire après 3 jrs du début d'induction (Nick B *et al.*, 2009)

**Figure 05** : Confirmation de la formation du Carcinome hépatocellulaire

### 2.3. Préparation de la plante médicinale :

La plante étudiée *Rosmarinus officinalis* a été récoltée de divers endroits de la région de Tiaret durant la période février et mars 2019. Après la récolte la partie aérienne (feuilles) et séchée à l'ombre et dans une température ambiante durant 10 jours.

L'identification a été faite par des enseignants botanistes de la faculté SNV de l'université IBN KHALDOUN.

**Tableau 02** : Caractéristiques de la matière végétale utilisée

Espèces	Période de récolte	Poids Matière sèche totale	Parties utilisées	Provenance
<i>Rosmarinus officinalis</i> « Sans traitement »	Mars/Avril	100g	Feuilles	Ville de Tiaret
<i>Rosmarinus officinalis</i> « Traitée par CEP »		100g		

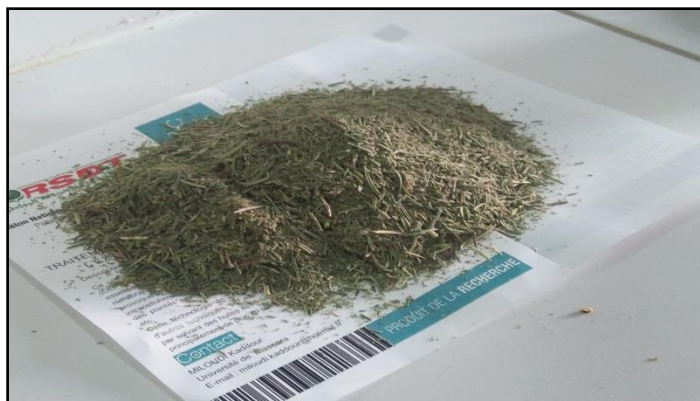


Figure 06 : *Rosmarinus officinalis* (Photo originale)

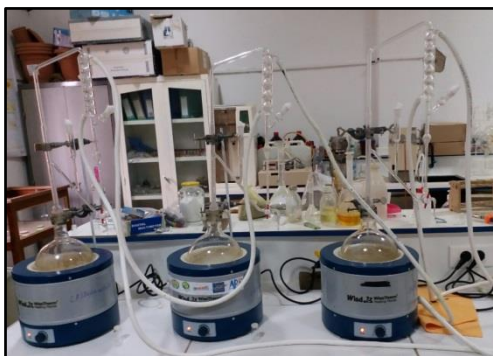
#### 2.4. Extraction des HEs :

L'extraction des HEs a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie de la faculté SNV de l'Université IBN KHALDOUN à Tiarret par la méthode d'hydrodistillation sur un dispositif de type « Clevenger ».

La technique d'extraction consiste à submerger la matière végétale séchée avec de l'eau distillée après broyage dans un ballon à raison de 100 mL d'eau distillée pour 10 g de matière sèche, le ballon est ensuite chauffé pour une période de 03 à 04 heures fournissant ainsi la vapeur d'eau entraînant les substances volatiles qui se condensent au contact du froid.

Les HEs sont après récupérés après condensation, et ainsi le processus d'extraction s'accomplit après épuisement de la matière sèche préparée.

Après obtention des HEs, ces dernières sont conservées dans des flacons en verre enveloppés de papier aluminium à température située entre 4 à 6 °C pour empêcher la dégradation des HEs qui peut être causée par l'action de la lumière et l'air.



a) Dispositif Clevenger



b) Hydrodistillateur normal

Figure 07 : Montage du dispositif d'extraction. (Photos originales)

### ➤ Calcul du rendement :

Selon Afnor (1986) le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse d'HE obtenue après l'extraction ( $M'$ ) et la masse sèche du matériel végétal utilisée ( $M$ ). Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné selon la formule suivante :

$$Rd \% = (M / M') * 100$$

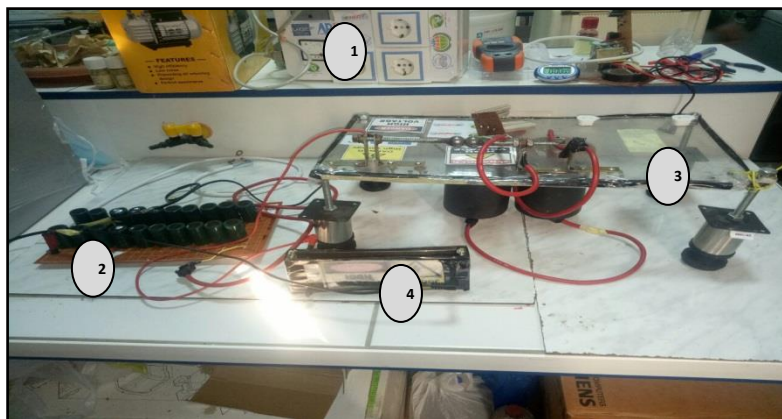
### 2.5. Prétraitement avec CEP :

Le prétraitement a été réalisé au niveau du laboratoire de génie électrique de l'université Mustapha Stambouli à Mascara.

La matière sèche de *Rosmarinus officinalis* étudiée a été répartie en 03 échantillons de 30g (capacité maximale de la chambre de traitement), afin de pouvoir évaluer l'effet du prétraitement par CEP. Un échantillon fut envoyé à l'extraction dans le dispositif « Clevenger » (Fig. 07) sans avoir à être prétraité.

Les échantillons restant furent humectés afin d'assurer la conductivité pour le passage au CEP.

La distance entre les électrodes de la chambre de traitement est de 2 cm constituée de deux électrodes verticalement placés. Le prétraitement est concrétisé en utilisant un générateur d'une intensité de 02 kV/cm de manière répétée (pulsé), en de très courtes durées. C'est terme de nombre d'impulsions électriques « n », où  $n_1 = 100$  et  $n_2 = 200$  impulsions respectives (deux conditions) que fut le prétraitement des deux échantillons. La durée d'extraction des HE a été estimée à 45 min (fig. 08).



**Figure 08 :** Appareillage du prétraitement CEP (Photo originale)

- 1- Générateur de courant ; 2- Commutateur ; 3- Eclateur ; 4- Chambre de traitement

### 2.6. Coupe histologique de la feuille avant et après prétraitement au CEP :

La comparaison des coupes histologiques a pour but de montrer l'impact du prétraitement par CEP sur les tissus de la plante. Une série de coupes transversales effectuées à l'aide d'une lame de rasoir, à défaut de microtome, au niveau de la feuille de *Rosmarinus officinalis L.*



Elles sont placées ensuite dans des verres de montre contenant de l'eau distillée. Les plus fines sont alors sélectionnées pour la coloration.

➤ **La double coloration des coupes :**

La technique utilisée est celle de la double coloration ou Carmino-vert d'Iode. Le but recherché par cette technique, est de mettre en évidence les deux types de tissus existants dans la structure histologique de la feuille de *Rosmarinus officinalis L.*

➤ **Analyse des résultats et observation :**

Les meilleures coupes anatomiques ont été choisies pour déterminer les différents tissus sous microscope.

### 2.7. Dosage de l'activité antioxydante des HEs obtenues :

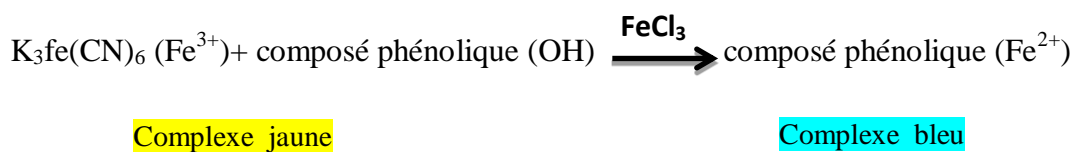
Les HEs sont le mélange de divers groupements fonctionnels, comportements chimiques et polarités. Les résultats peuvent être égaillés en fonction des applications des extraits. En outre l'approche analytique pour but d'évaluer le potentiel antioxydant des HEs serait pertinent et fondamental (Brahimi, 2018).

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer l'activité anti-oxydante. Dans cette recherche on procède par la méthode de frap (FerricReducing-Antioxydant Power).

➤ **Principe :**

Le pouvoir réducteur du fer ( $Fe^{3+}$ ) dans l'extrait a été déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu en 1986.

La méthode de réduction du fer est basée sur la réduction du fer ferrique  $Fe^{3+}$  en sels de fer ferreux  $Fe^{2+}$  par les antioxydants qui donnent la couleur bleu.



Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 0 à 0,1 mg/mL) est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2,5 mL d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction.

Après un repos de 10 min, un aliquote (2,5 mL) de surnageant est combinée avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de  $FeCl_3$  à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-Visible spectrophotomètre).

## 2.8. Analyse des HEs par HPLC :

L'analyse des HEs par HPLC a été réalisée en utilisant un chromatographe liquide de marque Waters. Equipé d'une pompe type Waters 600E, d'un auto-injecteur Waters 717, d'un détecteur à barrette diodes. Un logiciel Waters Empower 2 pour contrôler la pompe, l'auto-injecteur, la température de la colonne et le système à barrette de diodes. Les longueurs d'ondes utilisées étaient de 284 et 329 nm pour la quantification des polyphénols. La séparation chromatographique s'effectue avec une colonne Purospher Star RP-18 (250 x 4 mm D.I. ; dont la dimension des particules est de 5 µm (VWR)), et est munie d'une précolonne RP-18 (4 x 4 mm D.I.). La colonne et la pré-colonne sont toutes deux maintenues à la température de 37°C. La phase mobile dont le débit est de l'ordre de 1 mL /min, est constituée de : Solvant A: contenant 0,5 % acide acétique et Solvant B : 100 % d'acétonitrile. Une programmation des solvants a été effectuée selon (**Bousbia N, 2011**).

## 2.9. Etude de l'effet anti-cancéreux des HEs et de leurs hydrolats :

### ➤ Objectif :

Tester et évaluer l'effet anti-cancéreux des HEs extraites de *Rosmarinus officinalis* et leurs hydrolats sur des rats de souches WISTAR atteints de cancer des intestins.

### ➤ Critères d'évaluation :

L'effet anti-cancéreux des HEs est évalué par :

- Analyse sanguine.
- Prise de poids.
- Etude microscopique.

### ➤ Réalisation des tests :

L'application se fait par (03) trois diverses :

- Par étalement.
- Par injection.
- Par vaporisation.

Les rats sont répartis en fonction du type de traitement :

- Témoins ne subissant aucun traitement.
- Sujets traités avec d'HEs pure.
- Sujets traités avec de l'Hydrolat des HEs.



# *Chapitre II*

## *Résultats et discussion*



## II. Résultats et discussion :

Cette partie, consiste à présenter et interpréter les résultats obtenus de partie expérimentale afin d'évaluer l'effet anti cancéreux des HEs de *Rosmarinus officinalis* sur des rats de souches WISTAR atteints d'un Carcinome hépatocellulaire.

### 1. Caractéristiques des HEs de *Rosmarinus officinalis* :

Parmi les caractéristiques des HEs extraites de *Rosmarinus officinalis* : l'odeur et la couleur qui diffèrent en fonction des deux techniques d'extraction en l'occurrence avec et sans prétraitement. Le tableau XX montre les différences constatées entre les HEs obtenues.

**Tableau 03:** Caractéristiques organoleptiques des HEs obtenues.

	Huiles essentielles	
	Avec prétraitement	Sans prétraitement
Propriétés		
Couleur	Jaune très foncé	Jaune claire
Odeur	Odeur puissante	Odeur moins puissante

### 2. Rendement des HEs :

#### Calculs du rendement des HEs obtenues par hydrodistillation de type Clevenger :

Selon AFNOR (1986) le rendement en HEs est le rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite et le poids de la matière végétale sèche. Ce dernier s'exprime en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$Rd \% = (M / M') * 100$$

- **R %** = Pourcentage en HEs.
- **M'** = la masse en gamme de matière végétale sèche.
- **M** = la masse en gamme de l'huile essentielle.

L'objectif de cette étape est de comparer le rendement des HEs avec et sans prétraitement.

**Rendement obtenu sans prétraitement :**

$$- M' = 100 \text{ g} \quad M = 0,28$$

Nous avons obtenu le résultat suivant :

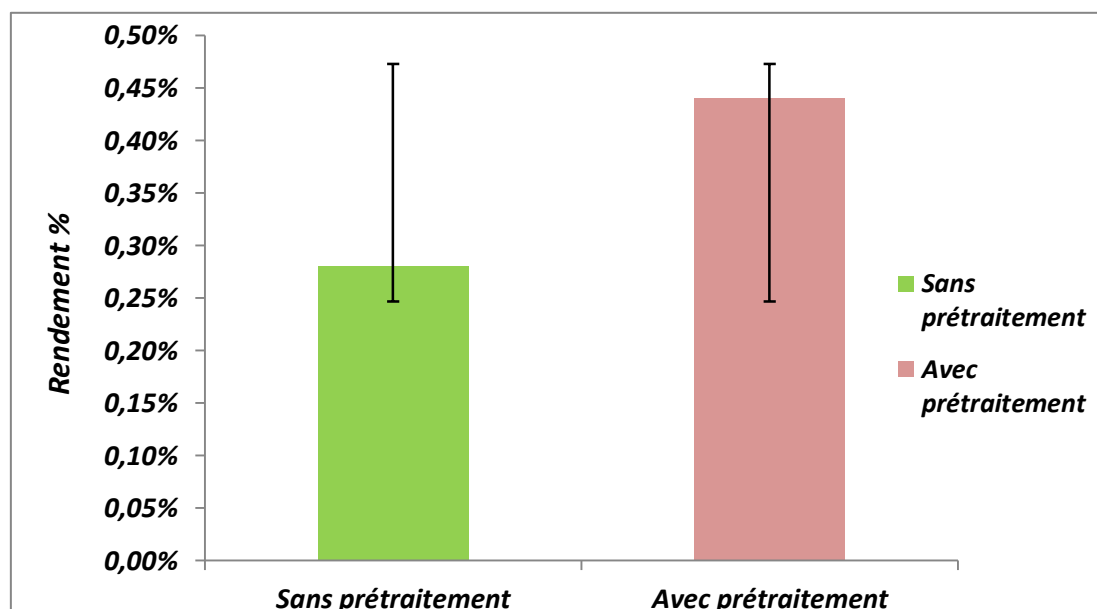
$$- R\% = \frac{0,28}{100} \times 100 = 0,28$$

**Rendement obtenu avec prétraitement :**

$$- M' = 100 \text{ g} \quad M = 0,44$$

Nous avons obtenu le résultat suivant :

$$- R\% = \frac{0,44}{100} \times 100 = 0,44$$



**Figure 09 :** Rendement des HEs obtenus avec et sans prétraitement

Le meilleur rendement en HEs obtenu par la méthode d'hydro distillation par Clevenger est enregistrée chez le *R.officinalis* ayant subi un prétraitement par CEP avec 0,44 % suivi de 0,28 % de l'échantillon non prétraité pour une période de 40 min.

Des rendements relativement proches aux résultats ci-dessus sont obtenus par (Makhloufi, 2013) en tenant compte de la longue période d'extraction réalisée soit un rendement de 1,8 % en 2H30 contrairement à la nôtre 0,44 % en 40 min pour l'échantillon prétraité et 0,28 % pour l'échantillon non-prétraité.

Ceci confirme le fait que le CEP influence le rendement en HEs d'après (Mykola S, 2007) permettant ainsi la perméabilisation des cellules biologiques.

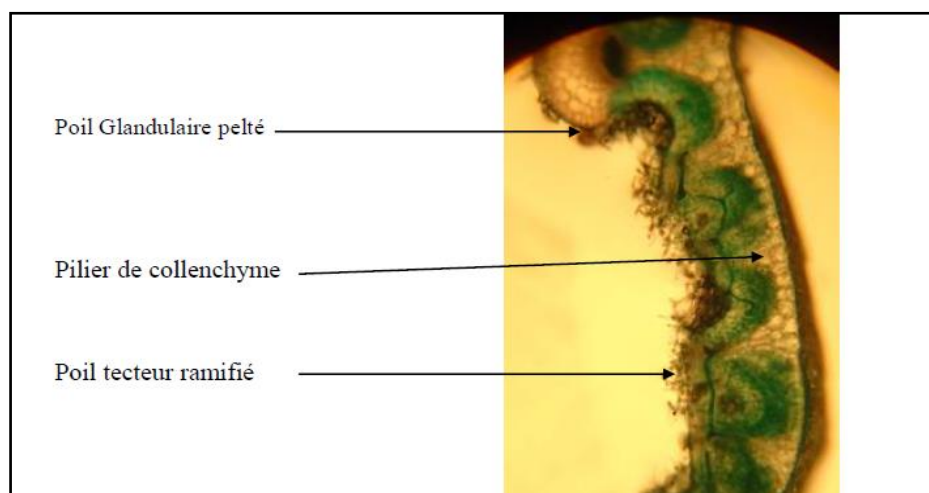
Si une cellule est exposée à un champ électrique suffisamment élevé, sa membrane devient temporairement perméable aux molécules qui, autrement, ne peuvent pas passer à travers elle, dans ce cas l'électroporation est réversible. Ce procédé a été utilisé comme outil pour introduire des substances étrangères telles que l'ADN exogène dans les cellules (électrotransfert de gène) [9] ou pour introduire des médicaments imperméables à la membrane afin de tuer des cellules cancéreuses (électrochimiothérapie) (ZELMAT A, 2017).

En outre les CEP ont déjà montré leur efficacité dans de recherches similaires visant à voir l'impact de ce dernier sur la cellule biologique selon (Ghnimi *et al.*, 2011) où il a y eu une extraction optimale qui dépend à la fois du produit végétal prétraité et la durée et intensité des champs exercés sur le végétal.

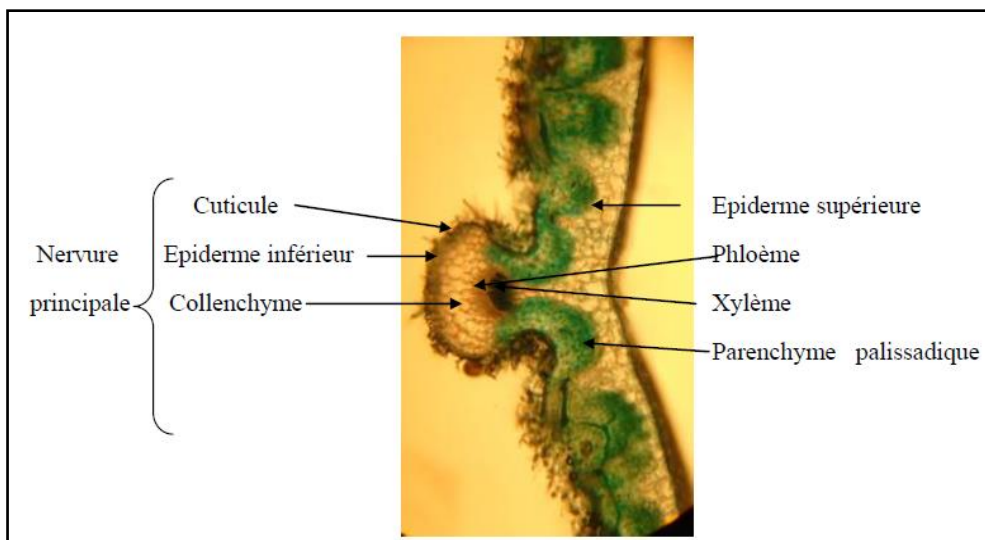
On constate que le rendement est variable malgré que la technique d'extraction est la même ; cette variabilité est due probablement à la variation des facteurs suivants : le stade de croissance, les conditions pédoclimatique, la période du récolte, le temps du récolte, séchage.

### 3. Coupe histologique de la feuille avant et après prétraitement par CEP :

L'étude histologique vise à mieux comprendre le comportement morphologique et physiologique des espèces végétales. Dans notre recherche le but de la réalisation des coupes histologiques est de mettre en évidence l'impact du CEP sur les tissus de *R.officinalis*. Les coupes transversales observées par microscope optique des feuilles prétraitées (Fig. 10) et non-prétraitées (Fig. 11), ne montrent aucune différence dans les structure des tissus (Cuticule, épiderme, Parenchyme, Sclérenchyme, phloème, etc). Donnant raison à l'hypothèse de l'effet négatif du CEP sur la structure des tissus permettant au tissu de retrouver sa forme d'origine ce qui aurait pu arriver lors de la préparation des coupes. Cependant selon (ZELMAT A, 2017) Il n'existe pas une description précise sur ce qui se passe-t-il au niveau membranaire dans le cas d'impulsions. La communauté scientifique n'a pas définitivement statué sur le sujet, mais ils ont simulé des théories pour expliquer ce phénomène. En effet, le fait, qu'à ce jour, les deux termes électroporation et électro-perméabilisation restent utilisés, témoigne de cette incertitude.



**Figure 10** : Coupe histologique de la feuille prétraitée par le CEP  
(Grossissement 10×10)

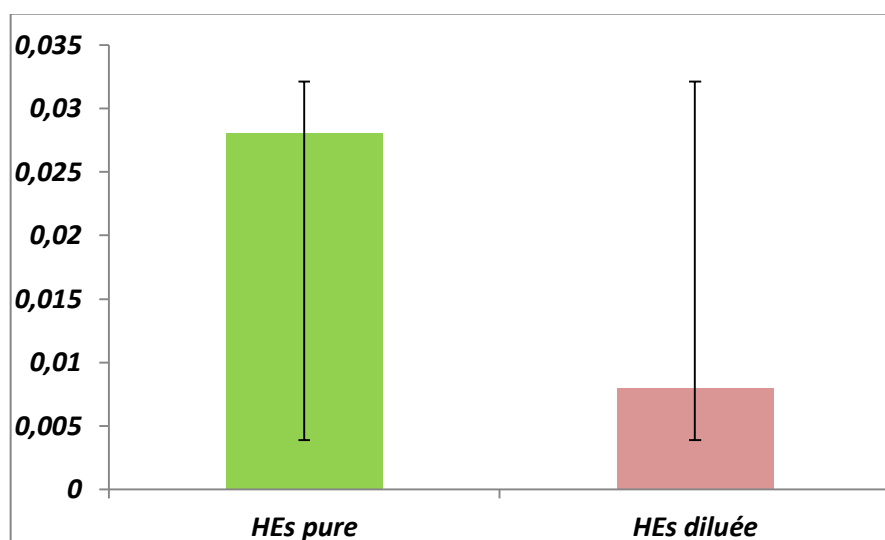


**Figure 11** : Coupe histologique de la feuille non-prétraitée par le CEP  
(Grossissement 10x10)

#### 4. Dosage de l'activité antioxydante :

L'activité antioxydante des HEs en utilisant la méthode de FRAP est un essai simple, rapide et reproductible, cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$  par conséquent le  $Fe^{2+}$  peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnelle à 700 nm.

A partir de nos résultats (Fig. 12), l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées des HEs, le changement de la couleur du milieu réactionnelle du jaune au bleu vert, les HEs du *R.officinalis* présentent une capacité antioxydante et exerce une meilleure activité réductrice à 0,1 mg/mL avec une absorbance de 0,270 abs. (Boumadjen R, 2018)



**Figure 12** : Comparaison de l'activité antioxydante des HEs pures et diluées du romarin

L'activité réductrice des HEs pures est plus élevée que celle des HEs diluées, ce qui est facilement remarquable à première vue du fait que les HEs pures ont une odeur puissante et une couleur foncée laissant à penser directement à une forte concentration.

Ceci laisse à penser que le CEP permet la sortie rapide des métabolites secondaires sans avoir à exciter la plante ou l'attente jusqu'à épuisement de la matière végétale ce qui permet de réduire les pertes par vaporisation.

### 5. Résultats d'analyse des HEs par HPLC :

Le *R. officinalis* est l'espèce la plus répandue dans le bassin méditerranéen, parmi les autres espèces du genre *Rosmarinus*. Plusieurs recherches ont montré que la variabilité de la composition ainsi que du rendement en HEs de romarin est due à des facteurs intrinsèques (génétique, sous-espèces et âge de la culture) ou à des facteurs extrinsèques comme le climat et les conditions de culture ou encore à la méthode d'extraction (Özcan et Chalchat, 2008 ; Varela et al., 2009). Dans notre étude, et selon les standards externes disponibles qui ont été utilisés pour la quantification des composés de l'HEs du romarin, nous avons pu détecter quatre composés majoritaires dans les HEs obtenus. Il s'agit de  $\alpha$ - pinène (39 %), linalol (19 %),  $\gamma$ -terpinène (13 %) et le para-cymène (11 %). Les mêmes résultats ont été trouvés par Flamini et al. (2002) qui a signalé un taux de (30,3 %) pour  $\alpha$ - pinène.

### 6. Evaluation de l'effet anticancéreux des HEs :

Après induction du cancer la confirmation est faite par échographie, la sonde est réglée entre 5 et 6 MHz (fig. 13).

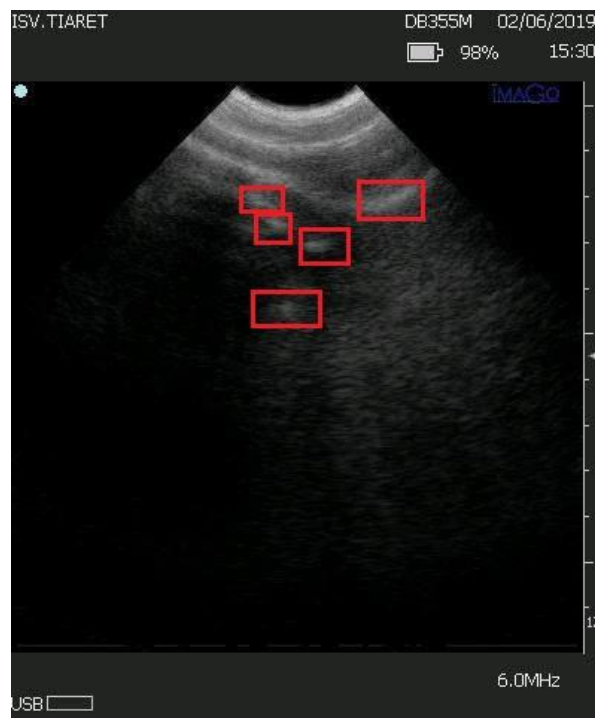


Figure 13 : Echographie confirmant la présence de cancer

L'échographie faite au niveau de l'institut vétérinaire de Tiaret montre des lésions intestinales qui confirment la présence de cancer de type Carcinome hépatocellulaire.

Après confirmation du cancer, le traitement des rats par HEs pures et HEs diluées ce fait par étalement ; injection et vaporisation comme indiqué dans la partie matériels et méthodes. Tandis que le suivi est fait par mesure de la variation du poids ; analyse sanguine et étude microscopique.

### 6.1. Variation du poids :

Le tableau ci-dessous montre la variation du poids (en gramme) des rats avant et durant le traitement.

**Tableau 04 :** Variation du poids des rats

Rats	Avant traitement	1 <sup>ère</sup> semaine de traitement	2 <sup>ème</sup> semaine de traitement	3 <sup>ème</sup> semaine de traitement	4 <sup>ème</sup> semaine de traitement
Témoin	250 g	250 g	252 g	250 g	254 g
Traité par HEs pure	190 g	170 g	173 g	173 g	173,7 g
Traité par HEs dilué	200 g	205 g	190 g	194 g	190 g

La variation du poids chez les sujets atteints de cancer peut-être prise en considération comme facteur montrant l'impact du cancer sur l'organisme. Mais l'un des plus importants préjugés sur le cancer est de dire que les traitements qui lui sont associés ont tendance à provoquer un amaigrissement. On remarque que le sujet traité par HEs pure perd du poids puis se stabilise au enivrant de 173 g, celui traité par HEs dilué ne présente pas une grande chute, ce qui laisse dire que le poids ne peut être un facteur important dans le suivi des sujet cancéreux care cela varie en fonction du traitement selon **Fassier P et al, 2016** certains patients atteints de cancer ont tendance à perdre du poids, d'autres au contraire subissent une prise de poids, qui peut avoir un impact sur le pronostic, le risque de récurrence ou de second cancer.

Le traitement utilisé dans notre étude est 100 % ce qui laisse à penser que le poids ne représente pas une variation significative vu la réduction des effets secondaires qui surgissent lors des autres méthodes telles que la radiothérapie.

### 6.2. Etude macroscopique :

Cette étude a pour but de comparer les intestins des sujets cancéreux avec un sujet sain, après d'avoir effectué un sacrifice sous la tutelle de Dr HEMIDA au niveau de l'institut vétérinaire de Tiaret, ainsi qu'une comparaison avec l'échographie (Fig.13) faite avant le début du traitement et déterminer par la suite la taille des lésions (Carcinome hépatocellulaire).



**Figure 14 :** Intestins du témoin négatif

Le témoin négatif (Fig. 14) ne présente aucune anomalie au niveau des intestins signe de son parfaite hygiène alimentaire.

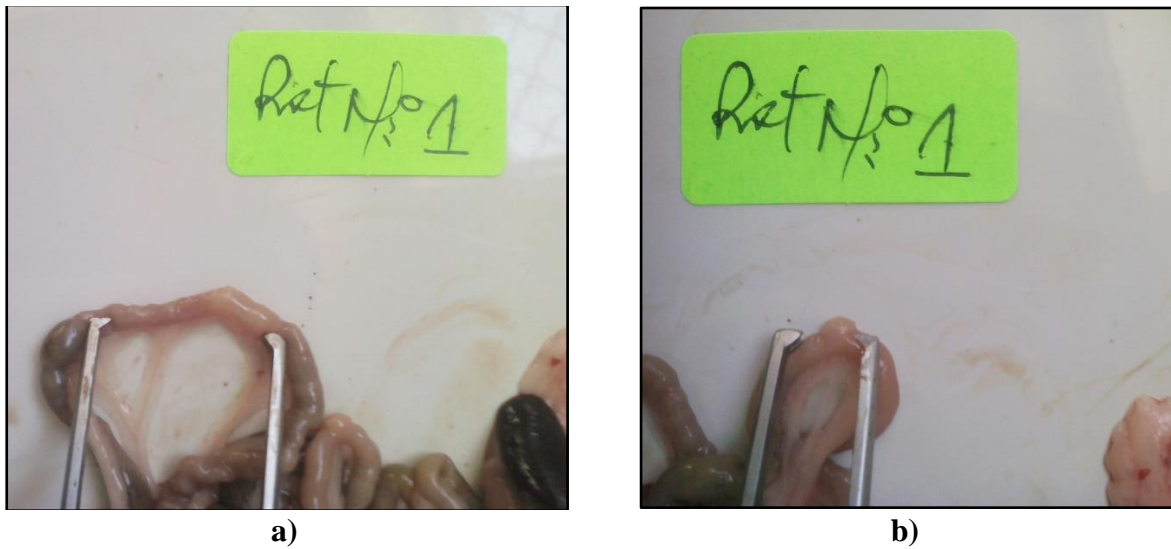


**Figure 15 :** Intestin du rat cancéreux N°1



**Figure 16 :** Rate du rat cancéreux N°1





**Figure 17 :** Lésions intestinales du Carcinome hépatocellulaire

On remarque que le rat cancéreux N°1 possède une rate d'une large splénomégalie (Fig. 16) qui est due aux lésions intestinales. Les segments intestinaux lésés (Fig. 17) prouvent des anomalies du cancer intestinal (Carcinome hépatocellulaire), mais ils sont de taille réduite par rapport à celle montré dans l'échographie ce qui laisse à penser que les HEs ont fait leur effet.



**Figure 18 :** Rate du rat cancéreux N°2



**Figure 19 :** Lésions intestinales du Carcinome hépatocellulaire

Le rat cancéreux N°2 présente les mêmes symptômes que le rat N°1 vu qu'ils ont subis le même type d'induction du cancer, contrairement au traitement ou ce dernier fut traité par l'hydrolat des HEs. A ce fait l'hydrolat a eu son effet d'après la taille des lésions minimale par rapport à celle vue en échographie.

**Remarque :** les larges splénomégalies des rates ont aussi été remarquées chez des rats ayant subis des perturbateurs endocriniens et d'autres figures de cancer par leur régime alimentaire dans une étude parallèle menée par les étudiantes Ait Amer Meziane Chanez et Zegai hanane sous l'encadrement de Dr Benaraba.

### 2.3. Analyses sanguine :

L'analyse sanguine représente une nécessité dans le diagnostic biomédical. Pour le cas du cancer, elle est d'une importance majeure dans le suivi de l'état des sujets.

Le tableau ci-dessous montre les résultats des analyses sanguines des sujets d'étude.

**Tableau 05 :** Résultats d'analyse sanguine des sujets d'étude

Paramètres	Rat cancéreux N°1	Rat cancéreux N°2	Témoin négatif	Témoin positif
Hématies (millions/mm <sup>3</sup> )	4,9	5,1	4,95	8,2
Hémoglobine (g/100 ml)	17,05	18,15	16	21,3
Hématocrite (%)	53,5	57,5	51	67
Leucocytes (/mm <sup>3</sup> x1000)	11350	12550	8500	17000
Taux de plaquettes sanguines (/mm <sup>3</sup> )	380000	400000	200000	740000

Les analyses sanguines réalisées au niveau du centre anti-cancer de Tlemcen montrent que les deux rats atteints de cancer de type Carcinome hépatocellulaire sont en voie de guérison vu que leurs résultats sont assez proches de celles du témoin négatif (sein). Tandis que le témoin positif montre des résultats hors normes, ce qui conclue que les HEs essentielles et leur hydrolat ont un effet anticancéreux.

*Conclusion*

## **Conclusion et perspectives**

A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futur médicaments.

Notre étude dans le cadre de recherche de traitements alternatifs aux actuelles techniques de traitement de cancer a pour objectif non seulement la valorisation de la flore algérienne, mais aussi, offrir la possibilité vers un avenir prometteur en médecine moderne. Cela par la mise en évidence d'une plante aromatique *Rosmarinus officinalis* de la région de Tiaret.

La démarche à suivre consiste à extraire les HEs du romarin, par la technique hydrodistillation de type Clevenger puis à les appliquer sur nos sujet de recherches des rats de souche WISTAR de sexe femelle atteints d'un Carcinome hépatocellulaire. Leur rendement était de l'ordre de 0,44% en une courte durée (40 min).

L'application sur les rats a montré une grande efficacité contre le cancer avec une activité antiproliférative très significative. Les HEs pures comme leur hydrolat ont mené vers l'ouverture de d'autre perspective de recherche après les résultats positifs obtenus, où le comportement des sujets témoigne leur efficacité. Les rats sont devenus plus vifs et l'odeur de leur matière fécale est redevenue à la normale et leur poids est resté stable.

Le second objectif de la recherche est d'évaluer l'impact du CEP sur les rendements d'extraction des HEs. Dans cet axe la comparaison du rendement après que l'échantillon fut bombardé par des impulsions différentes  $n_1= 100$  et  $n_2= 200$ . Les résultats obtenus montrent que le prétraitement du romarin par CEP a pu augmenter significativement le rendement des extractions. (0,44 % pour l'échantillon prétraité et 0,28 pour l'échantillon non-prétraité pour une durée de 40 min). Cette technique reste économique et verte pour les organismes de production des HEs ainsi que l'organisme de stockage.

En fin de ce travail nous souhaitons ouvrir des perspectives qui pourront mener à une continuité de cette recherche :

- Valorisation de *Rosmarinus officinalis* origine de nos HEs.
- Elargir les recherches sur d'autres types de cancer.
- Comprendre le mécanisme d'action des HEs sur les cellules cancéreuses.
- Identifier les molécules actives ayant l'effet antiprolifératif.
- Virer vers les techniques d'amélioration de rendement telle que le CEP.

## *References bibliographiques*

**AFNOR, 1986** : « Huiles Essentielles ». 2e édition, page 57.

**Bellebna, Y., Ouiddir, R., Dey, Z., Miloudi, M. and Tilmatine, A., 2014** ; « Robustness testing of the juice extraction process using a pulsed electrical field ». *International Journal of Environmental Studies*, N°71, 360–371.

**Bessah R. , 2014** : « Valorisation des déchets des industries des plantes aromatiques et médicinales » Division Bioénergie et Environnement – CDER ; N°33.

**Boumadjen R ; Kimouche S 2018**, Etude phytochimique et evaluation de l'activité antioxydante de Romarin (*Rosmarinus officinalis*). Département de de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire Université des Frères Mentouri Constantine.

**Bousbia, N. (2011)**. *Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires* (Doctoral dissertation, Université d'Avignon).

**Fassier P. , L. Zelek , P. Bachmann, M. Touillaud, N. Druesne-Pecollo, S. Herberg, P. Galan, P. Cohen, H. Hoarau, P. Latino-Martel , M. Deschasaux, M. Touvier** Variation de poids après un diagnostic de cancer et facteurs socio-économiques, démographiques, et cliniques associés : résultats de la cohorte prospective NutriNet-Santé. Résumés des présentations aux JFN de Marseille 2015 / Nutrition clinique et métabolisme 30 (2016) 46–61.

**Flamini G., Cioni P.L., Morelli I., Macchia M., Et Ceccarini L., (2002 )**. Main Agronomic – Productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 50, pp : 3512–3517.

**Ghni S., Grimi N., Challal R. et Vorobiev E., 2011** :«Optimisation de l'extraction des composés phénoliques par champ électrique pulsé et décharges électriques de haute tension à partir des écorces et plaquettes fines d'épicéa commun (*Picea abies*) » Récents Progrès en Génie des Procédés – Numéro 101 – 2-910239-75-6, Ed. SFGP, Paris, France.  
Hepatocellular Carcinoma Induction by Diethylnitrosamine in Male Wistar Rats. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 10, 2009

**Lucia Cattaneo, L., Cicconi, R., Mignogna, G., Giorgi, A., Mattei, M., Graziani, G., ... & Marra, M. (2015)**. Anti-proliferative effect of *Rosmarinus officinalis* L. extract on human melanoma A375 cells. *PloS one*, 10(7), e0132439.

**MOHAMMEDI, Z. (2013)**. *Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie* (Doctoral dissertation).

**Mohammedi, Z., & Atik, F. (2013)**. Fungitoxic effect of natural extracts on mycelial growth, spore germination and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus*. *Australian Journal of Crop Science*, 7(3), 293.

**Mykola Shynkaryk Mai 2007** Influence de la perméabilisation membranaire par champ électrique sur la performance de séchage des végétaux. l'université de technologie de compiègne.

**Özcan M.M. et Chalchat J.C., (2008)** . Chemical composition and antifungal activity of rosemary(*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *Inter. J. Food sci. nutri.*, Vol.59, pp : 691 – 698.

**Renganathan Gayathri et al 2009** Ursolic Acid Attenuates Oxidative Stress-mediated

**Sofiane H (2005)**, extraction et analyse des huiles essentielles de trois espèces végétale médicinales (Armoise ; Eucalyptus ; Romarin), département des sciences agronomiques et biologique Univ Ibn Khaldoun Tiaret.2005.

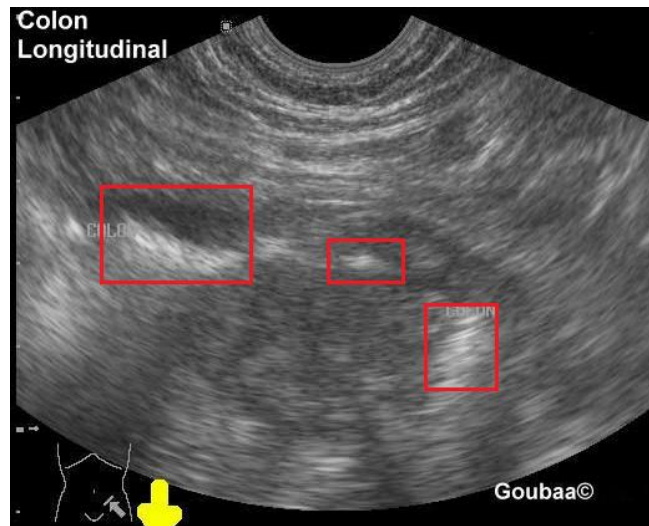
**Varela F., Navarrete P., Cristobal R., Fanlo M., Melereo R., Sotomayor J.A., Jordan M.J., Cabot P., Sanchez De Ron D., Calvo R. Et Cases A., (2009)**. Variability in the chemical composition of wild *Rosmarinus officinalis* L. *Acta Horti.*, Vol. 826, pp : 167 – 174.

**Zaouali, Y., Bouzaine, T. et Boussaid, M.**, «Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis*L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities.» *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 48, no. 11, p. 3144-3152. (2010)

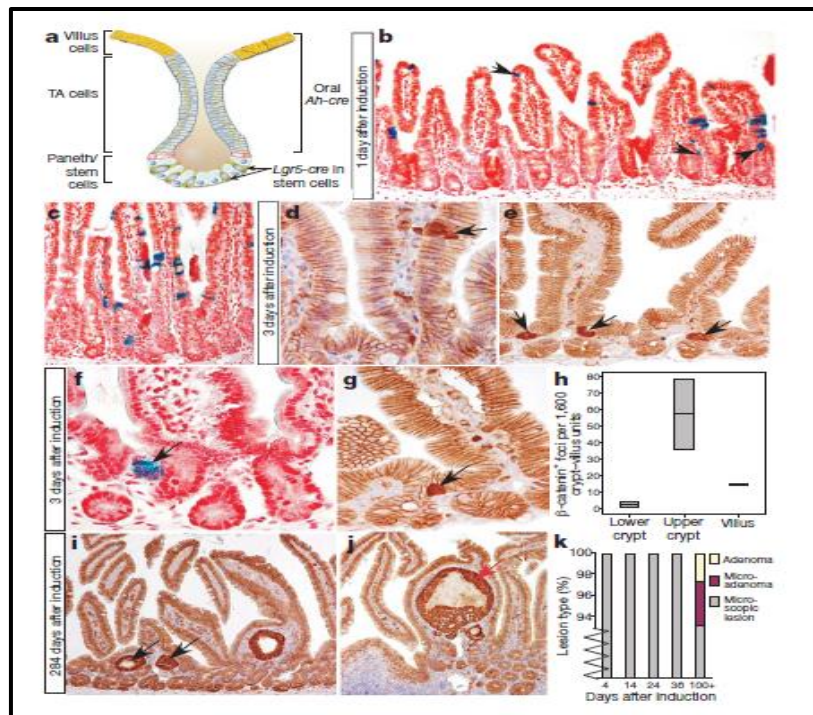
**ZELMAT A, 2017**, Analyse des effets du champ électrique pulsé haute tension sur le tissu cellulaire, département d'électronique, faculté de génie électrique, USTO 2016/2017.

*Annexe 01 : Normes d'analyse sanguine*

<i>Paramètres</i>	<i>Normes</i>
Taux de plaquettes sanguines (/mm <sup>3</sup> )	160.000 - 350.000
Hématies (millions/mm <sup>3</sup> )	4 - 6
Hémoglobine (g/100 ml)	13 - 18
Leucocytes (/mm <sup>3</sup> x1000)	4000 - 11000
Hématocrite (%)	40 - 52



*Annexe 2 : Echographie de carcinome chez l'homme*



*Annexe 3 : Evaluation du cancer d'intestin après induction*

Table 4. Anticancer effects of Rosemary Extract (RE). In vitro studies: liver and lung cancer.

Cancer Cell	Dose/Duration	Findings	Mechanism
Hep-3B (Hepatocellular carcinoma)	0.5–5 µg/mL (24 h)	↓ cell viability	↑ TNF $\alpha$
Hep-3B (Hepatocellular carcinoma)	6.25–50 µg/mL (48 h)	↓ cell viability IC50 ~22.88 µg/mL	
Bel-7402 (Hepatocellular carcinoma)	0.0625%–1% rosemary essential oil (48 h)	↓ cell viability IC50 0.13%	
HepG2 (Hepatocellular carcinoma)	10–120 µg/mL (48 h)	↓ cell viability IC50 42 µg/mL GI50 20 µg/mL	
NCI-H82 (Lung carcinoma; SCLC)	6.25–50 µg/mL (48 h)	↓ cell viability IC50 ~24.08	
V79 (Normal hamster lung)	0.1–30 µg/mL (3–24 h)	Cytotoxic to cells at 30 µg/mL (24 h) Long and short term antioxidant effects	↓ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced DNA strand breaks and oxidative damage. ↓ visible-light induced oxidative damage
A549 (Lung adenocarcinoma)	2.5–200 µg/mL (48–72 h)	↓ cell proliferation ↓ cell survival ↑ apoptosis IC50 ~15.9	↓ p-Akt ↓ p-mTOR ↓ p-P70S6K ↑ PARP cleavage

mTOR (mammalian target of rapamycin), PARP (poly(ADP-ribose) polymerase).

*Annexe 4 : Effet des HEs du romarin sur le carcinome hépatocellulaire*