

Université Ibn Khaldoun, Tiaret
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master académique

en

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie.
Filière : Sciences Biologiques.
Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire.

Présenté par :

Zoulikha Inesse REMAIEL
Amel ZOUATNIA

Intitulé

Étude de la cytogénotoxicité du romarin *Rosmarinus tournefortii* (Noë ex Jord. & Fourr)

Soutenu publiquement le :

Devant les membres de jury :

Président	Dr. Abdelkader TADJ	Université de Tiaret
Examineur	Dr. Kada SOUANA	Université de Tiaret
Encadrant	Prof. Khaled TAIBI	Université de Tiaret
Co-encadrant	Dr. Mohamed ACHIR	Université de Tiaret

Résumé

Rosmarinus tournefortii est une plante médicinale très réputée, largement utilisée par les populations locales pour traiter plusieurs pathologies, y compris les maladies infectieuses. Le présent travail a pour objectif d'évaluer la cytotoxicité et la génotoxicité des extraits aqueux et éthanoliques de la plante *Rosmarinus tournefortii* en utilisant le test *Allium cepa*, ainsi que d'évaluer l'activité antioxydante et les principaux composants chimiques (polyphénols, flavonoïdes et tanins).

La teneur en polyphénols totaux est plus élevée dans l'extrait d'éthanol (0.186 ± 1 mg GAE/ml). Cependant, les flavonoïdes sont plus élevés dans l'extrait aqueux ($0,15 \pm 1$ mg QE/g). Toutefois, la teneur en tanins est supérieure dans l'extrait aqueux (75.12 ± 1 mg QE/g). L'activité antioxydante *in vitro* des différents extraits est plus élevée dans l'extrait éthanolique avec une CI_{50} de $85,19\% \pm 1$ mg/ml.

L'évaluation de la cyto-génotoxicité de *Rosmarinus tournefortii* a révélé que les extraits aqueux et éthanoliques des feuilles ne sont pas cytotoxiques. Il a été observé que l'indice mitotique augmente avec l'augmentation des concentrations des extraits. Les extraits, aqueux et éthanoliques, des feuilles de *Rosmarinus tournefortii*, se sont révélés génotoxiques à une concentration supérieure ou égale à 0,75 mg/ml.

Mots clés :

Rosmarinus tournefortii, Cytotoxicité, Génotoxicité, *Allium cepa*, Polyphénols, Flavonoïdes, Tanins, Activité antioxydante.

Abstract

Rosmarinus tournefortii is a very famous medicinal plant, widely used by local populations to treat several pathologies, including infectious diseases. The present work aims to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of aqueous and ethanolic extracts of the plant *Rosmarinus tournefortii* using the *Allium cepa* test, as well as to evaluate the antioxidant activity and the main chemical components (polyphenols, flavonoids and tannins).

The total polyphenol content is higher in the ethanol extract (0.186 ± 1 mg GAE/ml). However, flavonoids are higher in the aqueous extract (0.15 ± 1 mg QE/g). However, the tannin content is higher in the aqueous extract (75.12 ± 1 mg QE/g). The in vitro antioxidant activity of the different extracts is higher in the ethanolic extract with an IC₅₀ of $85.19\% \pm 1$ mg/ml.

Evaluation of cyto-genotoxicity of *Rosmarinus tournefortii* revealed that aqueous and ethanol extracts of the leaves are not cytotoxic. It was observed that the mitotic index increased with increasing concentrations of the extracts. The aqueous and ethanolic extracts of the leaves of *Rosmarinus tournefortii* were found to be genotoxic at a concentration greater than or equal to 0.75 mg/ml.

Keywords:

Rosmarinus tournefortii, Cytotoxicity, Genotoxicity, *Allium cepa*, Polyphenols, Flavonoids, Tannins, Antioxidant activity.

Remerciements

Avant tout, nous remercions "Allah" le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous voudrions remercier notre encadrent Pr. Taïbi Khaled, pour la confiance, le suivi, l'aide, le soutien et les conseils qu'il nous a accordés tout au long de notre projet de fin d'études.

Nous remercions aussi notre Co-encadrant Dr. Achir Mohamed, pour son encouragement, ses conseils et son aide.

On tient à exprimer nos gratitude à Dr. Souana Kada et Dr. Tadj Aek. pour avoir accepté de juger ce travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude à tous ceux qui nous ont soutenus, que ce soit de près ou de loin, en particulier à nos professeurs: Dr. Boussaid Mohamed, Dr. Souana Kada, Dr. Tadj Aek et Pr. AIT ABDERAHIM. L .

Pour finir, Un grand merci à nos parents, pour tout l'amour et le soutien qu'ils nous ont apporté à tous les moments de notre vie. Ils ont toujours été une source de tendresse et un modèle de travail, de sagesse et d'humilité.

Dédicaces

Au nom de Dieu, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux

Louange à Dieu pour le début et la fin, par amour, satisfaction et gratitude

(Et mes dernières prières vont à louer Dieu)

Notre début n'a pas été un voyage court ni un chemin rempli de facilités, mais je l'ai fait, alors
loué soit Dieu, louange abondante.

Au début, je dédie mon âme ambitieuse qui a patienté et lutté pour atteindre ce grand succès

Je dédie mon succès et ma graduation à celle à qui Dieu a mis le paradis sous ses pieds, à ma première enseignante qui a planté en moi l'amour du savoir et de la connaissance, à mon ange dans la vie, à la signification de l'amour et de la tendresse, au secret de la vie, à celle qui a illuminé mon chemin dans les nuits sombres, à celle qui a veillé et lutté pour moi, à celle dont les prières ont été le secret de mon succès, et à ma première supportrice, ma chère mère, source de ma force.

À mon père, toujours présent dans mon cœur, mon premier inspirateur, qui est parti avant de récolter les fruits de ses efforts, et qui embrasse ce succès. Que Dieu ait son âme, si elle venait à disparaître, le monde ne pourrait jamais la remplacer.

A celle qui a été une partie de ce succès, à ma sœur bien-aimée Farah, la prunelle de mes yeux.

À celui qui a été mon fiancé, qui m'a soutenu avec tout son amour dans mes moments de faiblesse, et qui a écarté les obstacles de mon chemin. À mon compagnon de route et à la prunelle de mes yeux, qui a partagé avec moi la joie et la tristesse, le succès et l'échec. À celui qui a attendu ces moments pour en être fier. À mon second appui et à mon partenaire de vie, Omar.

À mes compagnons de route, à mes amis de voyage et de succès qui m'ont soutenu dans les moments difficiles, à ceux avec qui j'ai senti le goût de l'amitié et de la vraie fraternité.

Ikram, zahra ,bouchra

Inasse

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A moi-même en premier lieu

Aux deux êtres les plus chers, mes parents pour tout ce qu'ils m'ont offert
d'amour et d'affection

A mes frères :

Mohamed, Khaled et Islam

A ma sœur : Douäa

Pour leur extrême serviabilité et compréhension

A mon amie : Bouchra

A toute la famille de ma mère : Bouchareb et surtout mes cousines : Houria et
Fatima

Amel

Liste des abréviations

A cepa : *Allium cepa*

DPPH: DPPH; 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

GAE: Gallic Acid Equivalent

IC_{50%} : Concentration inhibitrice de 50%

IM : Indice mitotique

MMS : Methyl methanesulfonate

MN : Micronoyaux

Na₂CO₃ : Solution de carbonate de sodium

NA: Anomalies nucléaires

RDT: Rendements d'extraction

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification de <i>Rosmarinus tournefortii</i>	8
Tableau 2 : Rendement des extraits	27
Tableau 3 : Les aberrations chromosomiques provoquées par les extraits de <i>Rosmarinus tournefortii</i> à différentes concentrations lors du test <i>A. cepa</i>	37

Liste des Figures

Figure 1 : photographie de l'espèce <i>Rosmarinus Tournefortii</i> (Originale).....	8
Figure 2 : Structure du flavonoïde (Garde-Cerdán et al., 2017).	10
Figure 3 : Réduction du NADH du MTT en formazan dans le cytoplasme d'une cellule viable (Badr, 2012).	16
Figure 4 : Les différentes formes d'atteinte de l'ADN par les composés chimiques génotoxiques (De L'eau Seine-Normandie et al., 2011).	19
Figure 5 : les étapes de l'extraction par les solvants (l'eau et l'éthanol).	22
Figure 6: La culture des bulbes et la préparation des extrémités racinaires	24
Figure 7: Variation de la teneur totale en composés phénoliques dans les extraits aqueux et éthanoliques de <i>Rosmarinus. T</i>	28
Figure 8: Variation de la teneur totale en composés flavonoïdes dans les extraits aqueux et éthanoliques de <i>Rosmarinus. T</i>	28
Figure 9: Variation de la teneur totale en composés tanins dans les extraits aqueux et éthanoliques de <i>Rosmarinus. T</i>	29
Figure 10 : Les valeurs d'IC50% pour différents extraits de <i>Rosmarinus.T</i>	29
Figure 11 : Effet des différentes concentrations d'extraits de <i>rosmarinus tournofortii</i> sur le nombre de racines chez <i>Allium cepa</i>	30
Figure 12: Effet des différentes concentrations d'extraits de <i>rosmarinus tournofortii</i> sur la longueur des racines chez <i>Allium cepe</i>	31
Figure 13 : Effet des différentes concentrations d'extraits de <i>rosmarinus tournofortii</i> sur la largeur des racines chez <i>Allium cepe</i>	32
Figure 14 : Effet des différentes concentrations des extraits de plante sur l'indice mitotique dans <i>Allium cepa</i>	33
Figure 15: Impact des différentes concentrations d'extraits de plante sur l'indice de prophase chez <i>Allium cepa</i>	33
Figure 16 : Effet des différentes concentrations des extraits de plante sur l'indice de métaphase dans <i>Allium cepa</i>	34
Figure 17 : Effet des différentes concentrations des extraits de plante sur l'indice d'anaphase dans <i>Allium cepa</i>	35

Figure 18 : Effet des différentes concentrations des extraits de plante sur l'indice de	
Télophase dans <i>Allium cepa</i>.....	35

Table des matières

Remerciement.....	
Dédicaces.....	
Liste des abréviations	
Leste des Tableaux.....	
Leste des Figures	
Résumé	
Introduction.....	3
Synthèse bibliographique	
Rosmarinus tournefortii	
Généralités.....	1.
7	
Taxonomie de Rosmarinus tournefortii :	2.
8	
Répartition géographique.....	3.
9	
Propriétés phytochimiques et les activités biologiques	4.
9	
Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin.....	5.
10	
Utilisation	6.
11	
6.1. Utilisation traditionnelle	11
6.2. Utilisations Moderne.....	12
Cytotoxicité	
Types de Mort Cellulaire Induits par la Cytotoxicité.....	1.
14	
1.1. L'apoptose :	14
1.2. L'autophagie ou la nécrose :	14
Analyse de cytotoxicité	2.
15	

2.1. Test de MTT	15
2.2. Le test au bleu trypan.....	16
Génotoxicité	
<i>Les agents génotoxiques</i>	1.
18	
1.1. Agents chimiques.....	18
1.2. Agents physiques	18
1.3. Agents biologiques.....	19
<i>Les aberrations chromosomiques</i>	2.
19	
<i>Tests de génotoxicité</i>	3.
19	
<i>Test Allium cepa</i>	4.
20	
Matériel et méthodes	
<i>La préparation des extraits de plantes</i>	1.
22	
<i>Composés phytochimiques</i>	2.
23	
2.1. Polyphénols.....	23
2.2. Flavonoïdes	23
2.3. Tanins.....	23
<i>Activité antioxydante utilisant le test de capture des radicaux DPPH</i>	3.
23	
<i>Analyse de l'indice mitotique</i>	4.
24	
Résultats	
<i>Extraction par macération</i>	1.
27	
27	Rendement des extraits 1.1.
<i>Dosage spectrophotométrique</i>	2.
27	
2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	27

2.2.	Dosage des flavonoïdes totaux :	28
2.3.	Dosage des tanins totaux des extraits :	28
	<i>Activité antioxydante</i> :	3.
29		
	<i>Évaluation de la cyto-génotoxicité à l'aide du test Allium cepa</i>	4.
30		
4.1.	La croissance des racines	30
4.1.1.	Nombre de racines	30
4.1.2.	Longueur des racines	30
4.1.3.	Largeur des racines	31
	<i>Indice mitotique</i>	5.
32		
	<i>Indice de prophase</i>	6.
33		
	<i>Indice de métaphase</i>	7.
34		
	<i>Indice de l'anaphase</i>	8.
34		
	<i>Indice de télophase</i>	9.
35		
	<i>Aberrations chromosomiques</i>	10.
36		
10.1.	Anaphase perturbation	36
10.2.	Les chromosomes retardataires.....	36
10.3.	Adhésion en télophase	36
10.4.	Les ponts chromosomiques.....	36
10.5.	Polyploïdes.....	36
10.6.	Métaphase en C.....	37
10.7.	Autres types d'aberrations chromosomiques.....	37
	<i>Discussion</i>	38
	<i>Conclusion</i>	43
	<i>Références</i>	45

Introduction

Introduction

Depuis des millénaires, les plantes ont servi de source de nourriture, de vêtements et d'abri à travers le monde. Environ dix pour cent des plantes possèdent des propriétés médicinales (Singh et al. 2023). Les plantes médicinales constituent la principale source de métabolites bioactifs naturels et sont utilisées dans le monde entier, tant dans les systèmes de médecine traditionnelle que moderne (Suri et al. 2024). La quête de molécules issues de plantes médicinales s'est intensifiée ces dernières années en réponse à l'émergence de complications sanitaires (Shafodino et al. 2023).

Le romarin, originaire de la région méditerranéenne, est largement répandu dans de nombreux pays à travers le monde. Il est utilisé depuis des milliers d'années à des fins culinaires et médicinales en raison de ses propriétés aromatiques et de ses bienfaits pour la santé. *Rosmarinus tournefortii* (Noë ex Jord. & Fourr), est une plante médicinale bien connue depuis longtemps, notamment en Algérie.

Dans la médecine traditionnelle, le romarin a été utilisé comme stimulant et analgésique léger, et il a été considéré comme l'une des herbes les plus efficaces pour traiter les maux de tête, la mauvaise circulation, les maladies inflammatoires, ainsi que la fatigue physique et mentale (Rašković et al., 2014).

Le romarin fait partie des parfums, notamment des parfums masculins et des eaux de Cologne, ainsi que des pommades pour la peau. Le romarin présente différents groupes de composés phénoliques tels que les diterpènes, les flavonoïdes et les acides phénoliques, qui sont responsables de ses propriétés antioxydantes.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la caractérisation et la valorisation des ressources phytogénétiques Algériennes locales d'une part, et la conservation et la maîtrise du savoir-faire ancestral traditionnel d'utilisation de ces ressources notamment dans le domaine de la médecine traditionnelle d'autre part. Cependant, le principal objectif de la présente étude est d'évaluer la cytotoxicité et la génotoxicité des extraits aqueux et éthanoliques de *Rosmarinus tournefortii* (Noë ex Jord. & Fourr), en utilisant le test d'*Allium cepa* afin de déterminer toute éventuelle toxicité et la légitimité d'utilisation traditionnelle et/ou moderne de cette espèce dans le domaine de la pharmacologie.

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

1. *Rosmarinus tournefortii*

La famille des Lamiacées englobe des plantes herbacées, des arbustes et parfois des arbres, présents de manière cosmopolite et comptant environ 300 genres et 7500 espèces (Beneddouch et al. 2011e). Le genre *Rosmarinus* L est constitué de trois espèces de buissons aromatiques indigènes de la région méditerranéenne. Ces espèces comprennent *R. tomentosus* Hub. -Mor. & Maire, *R. officinalis* L. et *R. tournefortii* de Noé (Syn. *R. eriocalyx* Jord. & Fourr.), dont les deux dernières se trouvent en Algérie (Outaleb et al. 2020). Le mot « romarin » dérive du mot latin ros-roris (rosée) et marinus (mer), ce qui signifie « rosée de la mer ». Il était également appelé « antos » par les anciens Grecs, ce qui signifie « la fleur », ou « libanotis » en raison de son odeur d'encens (Ribeiro-Santos et al. 2015).

Le romarin est l'une des plantes médicinales les plus anciennement connues en Algérie. Dans cette région, le genre *Rosmarinus* est considéré comme un remède universel sous les noms vernaculaire : Iklil al jabal, Klil, Hatssa louban, Hassalban, Lazir, Azîir, Ouzbir, Aklel, Touzala (Taïbi et al. 2021). Habituellement, on utilise les parties aériennes supérieures en fleurs, comprenant les feuilles, les rameaux et les inflorescences, pour la préparation d'extraits et d'huiles essentielles.



Figure 1. Photographie de l'espèce *Rosmarinus tournefortii* (Originale).

Rosmarinus tournefortii (Noë ex Jord. & Fourr), est un arbuste aromatique à feuillage persistant endémique sud de l'Espagne, d'Afrique du Nord, y compris de l'Algérie. Il se différencie de *R. officinalis* par ses feuilles plus petites, longues de seulement 5 à 15 mm et moins larges de moins de 2 mm, abondamment recouvertes de poils (Outaleb et al. 2020). Se caractérise principalement par ses tiges glabres, ses inflorescences courtes et ses fleurs bleues axillées par des bractées cordiformes persistantes. Les étamines sont proéminentes et le calice est grand, grisâtre et étoilé de poils (Menaceur et al. 2016).

2. Taxonomie de *Rosmarinus tournefortii*

Selon Cronquist (1981) la systématique du romarin est la suivante :

Tableau 1. Classification de *Rosmarinus tournefortii*

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Division	Magnoliophyta
Classe	Magniolopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus tournefortii</i>

3. Répartition géographique

Le romarin, appartenant à la famille des Lamiacées, est un arbuste aromatique dégageant un parfum intense et agréable rappelant celui du bois de pin. Principalement cultivé dans les pays méditerranéens tels que l'Espagne, le Maroc, la Tunisie, la France et l'Italie (Tahri et al., 2013), le romarin prospère dans une vaste étendue géographique. Il s'épanouit sur divers types de sols, notamment calcaires, argileux et limoneux, et préfère les environnements ensoleillés, chauds, secs et abrités du vent (Quezel et Santa 1963).

Rosmarinus tournefortii est endémique d'Afrique du Nord, se trouvant en Algérie, au Maroc et en Libye (Bendif et al., 2018). En Algérie, il est rare, pousse à l'état sauvage dans les régions montagneuses, où c'est une plante médicinale bien réputée, largement utilisée par les populations locales dans le traitement de plusieurs pathologies, y compris les maladies infectieuses (Benbelaid et al., 2016).

4. Propriétés phytochimiques et les activités biologiques

La plupart des effets pharmacologiques du romarin sont la conséquence de la forte activité antioxydante de ses principaux constituants chimiques, qui incluent le carnosol, l'acide carnosique, l'acide ursolique, l'acide rosmarinique et l'acide caféique (Rašković et al., 2014). Concernant les métabolites secondaires contenus dans *R. Tournefortii* et leur relation avec les activités antimicrobiennes, le dépistage phytochimique a indiqué que les huiles essentielles et les polyphénols, en particulier les flavonoïdes, sont présents en pourcentage élevé dans le romarin algérien, comme *R. Officinalis* (Benbelaid et al., 2016).

L'huile essentielle de *R. tournefortii* a montré une forte activité antimicrobienne contre *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli*. La composition de l'huile essentielle hydrodistillée à partir des tiges, des feuilles, et des fleurs de *R. tournefortii*. Trente-six composés ont été identifiés, représentant 96% du contenu total en huile. Les principaux composés détectés étaient le camphre (37,6%), le 1,8-cinéole (10,0%), et le p-cymène-7-ol (7,8%). Ces résultats montrent que *R. tournefortii* de la région occidentale algérienne comprend des chimiotypes de camphre et de 1,8-cinéole (Bendeddouche et al., 2011).

Les composés phénoliques sont l'une des classes les plus répandues de métabolites secondaires dans les plantes, avec de fortes propriétés redox, qui sont impliqués dans un large éventail de processus biologiques (Ziani et al., 2022). L'activité antioxydante du romarin est principalement due à la présence de deux diterpènes phénoliques : l'acide carnosique et le carnosol (Bensouici et al., 2019).

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires bioactifs largement répandus dans les plantes (Rasania et al., 2023). Ils sont réputés pour leurs divers effets bioactifs, y compris leur action antivirale, anti-inflammatoire, cardioprotectrice, antidiabétique, anticancéreuse, anti-âge, etc. (Wang et al., 2018).

Les extraits de *R. Tournefortii* possèdent des activités bactéricides et fongicides significatives. En raison de sa richesse en huile essentielle, et surtout en flavonoïdes, *R. eriocalyx* pourrait être une source d'agents antimicrobiens efficaces et sûrs (Benbelaid et al., 2016).

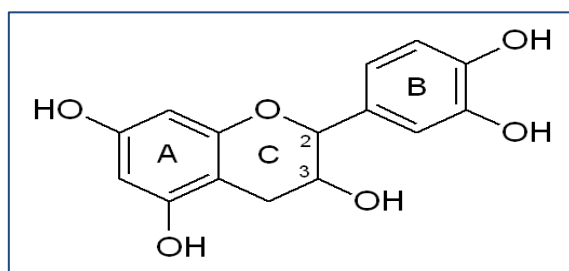


Figure 3. Structure du flavonoïde (Garde-Cerdán et al., 2017).

5. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin

Le romarin, est une plante médicinale bien connue pour ses diverses propriétés thérapeutiques, ainsi que pour ses utilisations en cuisine traditionnelle comme additif et arôme (Benbelaid et al., 2016). Cette espèce a été largement utilisée dans la médecine populaire méditerranéenne pour ses propriétés antiseptiques, antispasmodiques, stimulantes, stomachiques et toniques (Outaleb et al., 2020). D'autres propriétés médicinales ont également été trouvées dans les extraits de romarin, telles que l'effet antidépresseur, la réduction du cholestérol, les activités anti-inflammatoires (Hassani et al., 2016), et même une activité contre les cancers (Benbelaid et al., 2016).

Les activités biologiques de cette plante sont principalement liées aux constituants phénoliques et volatils, tels que le carnosol, l'acide carnosique et l'acide rosmarinique présents dans l'extrait de romarin, ainsi que l' α -pinène, l'acétate de bornyle, le camphre et l'eucalyptol présents dans l'huile essentielle de cette plante (Ribeiro-Santos et al., 2015).

Les composants les plus importants du romarin, qui sont activement médicinaux et pharmacologiques, sont l'acide rosmarinique, l'acide carnosique et l'huile essentielle. Ces composés peuvent offrir des médicaments naturels prometteurs dans le traitement des affections pathologiques du système nerveux, y compris l'anxiété, la dépression, la maladie d'Alzheimer, l'épilepsie, la maladie de Parkinson et le syndrome de sevrage (Rahbardar & Hosseinzadeh, 2020).

6. Utilisations thérapeutiques

6.1. Utilisations traditionnelles

Dans la médecine traditionnelle, le romarin a été utilisé comme stimulant et analgésique léger, et il a été considéré comme l'une des herbes les plus efficaces pour traiter les maux de tête, la mauvaise circulation, les maladies inflammatoires, ainsi que la fatigue physique et mentale (Rašković et al., 2014). La plante entière, sous forme de décoction, d'infusion, d'extrait (pour application externe) et d'huile essentielle, était administrée contre les troubles digestifs (comme carminatif et stimulant gastro-intestinal), les maladies respiratoires (comme expectorant et antiseptique), les douleurs cardiaques (comme tonique cardiaque, stimulant artériel), l'inflammation et les vertiges, et pour améliorer la mémoire (Ribeiro-Santos et al., 2015).

L'huile essentielle de romarin est traditionnellement utilisée par voie orale pour soulager les symptômes de la dyspepsie et des troubles spasmodiques légers du tractus gastro-intestinal. En application cutanée et comme additif pour le bain, elle est utilisée pour soulager les douleurs musculaires et articulaires mineures ainsi que pour traiter les troubles circulatoires périphériques mineurs (Ribeiro-Santos et al., 2015).

Le romarin est utilisé dans les préparations culinaires sous deux formes principales : les feuilles fraîches et les feuilles séchées en poudre. Il possède un goût amer et astringent et dégage une forte aromatique. Il est couramment utilisé dans la cuisine traditionnelle méditerranéenne pour parfumer les plats en tant que condiment (Ribeiro-Santos et al., 2015).

6.2. Utilisations en médecine moderne

L'Agence européenne des médicaments (EMA) a publié une monographie en 2010 sur *Rosmarinus officinalis* L. Cette monographie décrit l'utilisation des feuilles et de l'huile de romarin à des fins médicinales (Ribeiro-Santos et al., 2015).

Le romarin a principalement été identifié comme un potentiel médicament anticancéreux en raison de son action antioxydante. En réalité, il est capable d'interagir avec les radicaux libres et pourrait se protéger contre leur impact oxydatif sur l'ADN, les protéines et les lipides (Allegra et al., 2020).

Selon Martini (2011), le romarin est utilisé dans la composition de parfums, en particulier les parfums masculins et les eaux de Cologne, ainsi que dans la formulation de pommades pour la peau. Grâce à sa capacité à stimuler les terminaisons nerveuses cutanées, le romarin est employé comme tonique dans les bains moussants et comme liniment pour les muscles fatigués à une concentration de 1 à 2 %. Il possède des propriétés dermopurifiantes qui le rendent utile dans la fabrication de déodorants, ainsi que de lotions et de shampooings.

7. Cytotoxicité

La cytotoxicité cellulaire fait référence à la destruction des cellules vivantes par l'utilisation de certains agents chimiques, biologiques ou physiques (Grewal et al., 2022). Un effet cytotoxique peut compromettre la viabilité d'une cellule en perturbant son intégrité métabolique ou structurelle, cependant, cela peut également être un événement réversible (Azqueta et al., 2022).

La mesure de la cytotoxicité cellulaire peut être effectuée *in vitro* et/ou *in vivo* sur différents types de cellules en utilisant diverses techniques de dosage. Les tests *in vitro* sont préférés par rapport aux tests *in vivo* en raison d'avantages tels que la mesure de la toxicité sur des tissus spécifiques, l'utilisation de quantités minimales de produits chimiques et la possibilité d'analyser des voies sous-cellulaires particulières telles que les voies de signalisation et le stress oxydatif (Grewal et al., 2022).

Les études de cytotoxicité constituent une étape initiale utile pour déterminer la toxicité potentielle d'une substance d'essai, y compris des extraits de plantes ou des composés biologiquement actifs isolés à partir de plantes. La toxicité minimale à nulle est essentielle pour le développement réussi d'une préparation pharmaceutique ou cosmétique et, à cet égard, les études de toxicités cellulaires jouent un rôle crucial (McGaw et al., 2014).

8. Types de Mort Cellulaire Induits par la Cytotoxicité

L'exposition des cellules à des substrats cytotoxiques peut entraîner une diminution de la viabilité cellulaire ou la mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Hiebl et al., 2017)

Les types les plus courants de mort cellulaire comprennent :

L'apoptose :

Se manifeste par des caractéristiques morphologiques telles que la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire, le blebbing de la membrane plasmique et le rétrécissement cellulaire, ce qui conduit finalement à la formation de petits fragments entourés de membrane.

L'autophagie ou la nécrose :

Un processus d'auto-cannibalisation, où les cellules dégradent leur propre cytoplasme et leurs organites dans les lysosomes.

La mort cellulaire peut être considérée comme un effet cytotoxique ultime et les deux termes sont généralement utilisés comme synonymes (Azqueta et al., 2022).

9. Analyse de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité, une exigence principale de toutes les normes majeures pour l'évaluation biologique des dispositifs médicaux, utilisent des systèmes de culture cellulaire *in vitro* pour évaluer les paramètres de la santé cellulaire tels que la croissance, la réplication et la morphologie après exposition à un matériau de test ou à un extrait/lessivat d'un matériau (Liu et al., 2018). Il existe une variété de méthodes d'essai basées sur diverses fonctions cellulaires telles que l'activité enzymatique, la perméabilité de la membrane cellulaire, l'adhérence des cellules, la production d'ATP, la fabrication de coenzymes et l'absorption des nucléotides (Adan et al., 2016).

Les tests conventionnels de cytotoxicité reposent sur la mesure d'un ou plusieurs indicateurs cytotoxiques, incluant la perte d'intégrité membranaire ou la cytolyse (par exemple, libération de LDH, coloration de l'ADN imperméable à la membrane), l'apoptose (par exemple, activation des caspases), la perte de macromolécules critiques (par exemple, épuisement de l'ATP, épuisement du GSH), les effets anti-métaboliques (par exemple, tests de sels de tétrazolium, test Alamar Blue), ou les effets anti-prolifératifs (par exemple, inhibition de la synthèse d'ADN ou de protéines) (Xu et al., 2004).

Et parmi les tests les plus couramment utilisés, on trouve :

9.1. Test de MTT

Le test MTT est l'un des plus couramment utilisés pour la détection de la cytotoxicité ou de la viabilité cellulaire après exposition à des substances toxiques, est un test colorimétrique basé sur l'évaluation de l'activité métabolique cellulaire (Bahuguna et al., 2017).

Le MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl] -2,5-diphényltétrazolium bromure) est un sel de tétrazolium soluble dans l'eau, qui est converti en formazan pourpre insoluble par clivage du cycle du tétrazolium par la succinate déshydrogénase dans les mitochondries. Le produit Formazan est imperméable aux membranes cellulaires et s'accumule donc dans les cellules saines. La validité du test MTT a été vérifiée sur diverses lignées cellulaires (Fotakis & Timbrell, 2006).

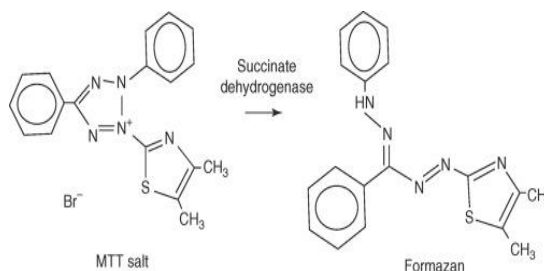


Figure 3. Réduction du NADH du MTT en formazan dans le cytoplasme d'une cellule viable (Badr, 2012).

9.2. Le test au bleu trypan

Le bleu de trypan est un colorant diazo négativement chargé d'environ 960 daltons, qui ne peut pénétrer que dans les membranes endommagées et est absorbé par les cellules mortes (Adan et al., 2016). Le principe de ce test est que les cellules vivantes ont des membranes cellulaires intactes qui excluent la coloration au bleu trypan, tandis que les cellules mortes ne le font pas. La suspension cellulaire est mélangée avec la coloration au bleu trypan et examinée visuellement sous microscopie optique pour déterminer si les cellules incluent ou excluent la coloration. Une cellule viable aura un cytoplasme clair, tandis qu'une cellule non viable aura un cytoplasme bleu (Kamiloglu et al., 2020).

10. Génotoxicité

La génotoxicité est une expression qui englobe les dommages tels que les ruptures de l'ADN, les mutations géniques, les anomalies chromosomiques, la clastogénicité et l'anéuploïdie qui se produisent dans la structure de l'ADN à l'intérieur du noyau (Rasgele et al., 2023).

Les agents qui provoquent la génotoxicité sont appelés génotoxines ; ce sont des mutagènes capables de provoquer des mutations. Les génotoxines comprennent à la fois les génotoxines radiatives et chimiques (Savale 2018).

Cette interaction entre la substance génotoxique et la structure et la séquence de l'ADN est responsable de cela. Ces éléments génotoxiques interagissent avec un lieu particulier ou une séquence de bases de la structure de l'ADN, provoquant des dommages, des cassures, des fusions, des suppressions, des ségrégations erronées ou des non-disjonctions, ce qui entraîne des dommages et des modifications génétiques (SAKS et al., 2017).

11. Les agents génotoxiques

Le terme "agent génotoxique" désigne un produit chimique ou un autre agent qui altère l'ADN cellulaire, provoquant des mutations ou un cancer (Saks et al., 2017). Les agents génotoxiques sont des éléments qui peuvent causer des altérations génétiques au sein des cellules. Ils ont des propriétés chimiques, physiques ou biologiques (López-Romero et al., 2018).

11.1. Agents chimiques

Il s'agit de mutagènes électrophiles liés covalentement à un site nucléophile d'une base d'ADN. Les agents chimiques génotoxiques ciblent principalement les sites nucléophiles, tels que les azotes aromatiques, les groupements hydroxyles et carbonyles des bases constitutives d'ADN (Benhacine et Sahil, 2016).

11.2. Agents physiques

Les radiations ionisantes hautement énergétiques, comme les rayons X ou gamma, ainsi que les radiations non ionisantes, comme la lumière ultraviolette, sont principalement des agents physiques. Ces agents ont la capacité de provoquer des mutations variées. (Les virus tels que les rétrovirus (sida), les Filoviridae (virus d'Ebola) sont des mutagènes biologiques. La toxicité de leurs gènes peut entraîner la formation de tumeurs (Dégremont et Cachot, 2009).

11.3. Agents biologiques

Les agents biologiques se réfèrent à des organismes vivants tels que les virus, les bactéries, les plantes, les parasites et les champignons, en particulier ceux qui produisent des métabolites secondaires (López-Romero et al., 2018).

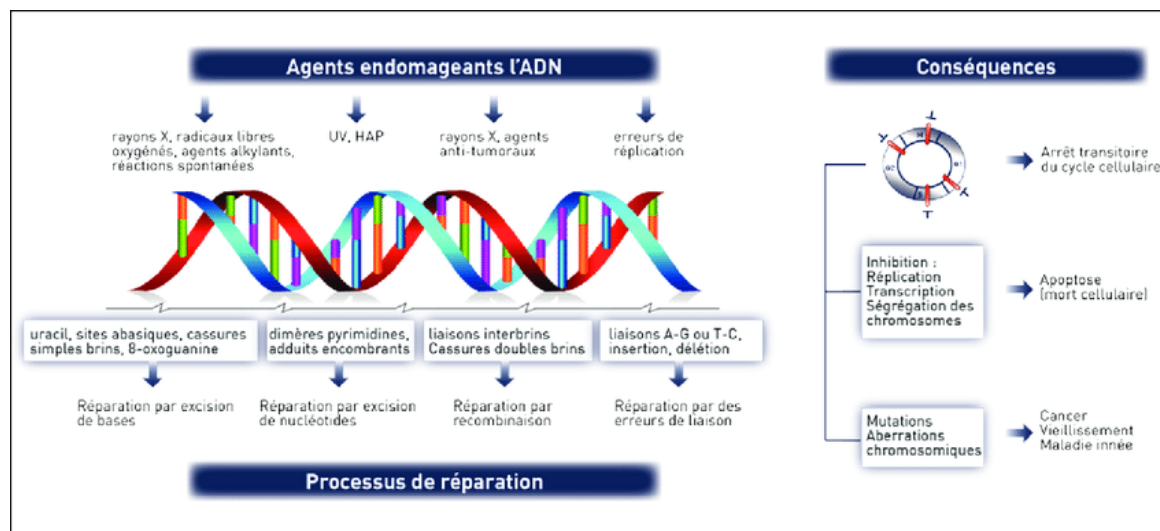


Figure 4. Les différentes formes d'atteinte de l'ADN par les composés chimiques génotoxiques (De L'eau Seine-Normandie et al., 2011).

UV : rayonnement ultraviolet HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

12. Aberrations chromosomiques

Les aberrations chromosomiques (AC) sont définies comme toute irrégularité ou anomalie de la distribution, du nombre, de la structure ou de l'arrangement des chromosomes, pouvant être associées à des maladies génétiques ou à des différences entre les espèces (Abhishek K. Jain et al., 2018).

Les AC sont l'une des conséquences biologiques importantes de l'exposition humaine aux rayonnements ionisants et autres agents génotoxiques (Obe et al., 2002).

Les anomalies chromosomiques peuvent être classées en aberrations numériques (euploïdie, telles que la monoploïdie, la polyploïdie et l'aneuploïdie—monosomie, trisomie) ainsi qu'en réarrangements structuraux (Holečková et al., 2021).

13. Tests de génotoxicité

Les tests de génotoxicité, une technique qui aide à identifier les produits chimiques provoquant des altérations génétiques, comprennent des tests de mutagénicité et de dommages à l'ADN (Luan & Honma, 2021). Les cellules procaryotes, telles que les bactéries, peuvent être utilisées pour détecter les mutations géniques, tandis que les cellules eucaryotes, telles que les

mammifères et les plantes, peuvent être utilisées pour détecter les dommages chromosomiques et les aneuploïdies (Leme and Marin-Morales, 2009).

Le test d'Ames, le test des comètes, le test des anomalies chromosomiques, le test d'échange de chromatides sœurs et le test des micronoyaux (MN) sont les tests de mutagénicité les plus couramment utilisés in vitro et in vivo, qui permettent d'établir une corrélation entre les systèmes génétiques et les éventuels carcinogènes et mutagènes des substances à tester pour leur génotoxicité (Rasgele et al., 2023)

13.1. Test *Allium cepa*

L'*Allium cepa* L. se distingue des autres modèles végétaux par sa grande taille et son faible nombre de chromosomes ($2n = 16$), ce qui facilite l'évaluation des caractéristiques génotoxicologiques (dommages à l'ADN, micronoyaux et aberrations chromosomiques) et cytotoxicologiques (indice mitotique) (Üstündağ et al., 2023).

En effet, le test *Allium cepa* est important parce qu'il permet de mesurer des paramètres macroscopiques et microscopiques pour évaluer les dommages à l'ADN, comme les aberrations chromosomiques, qui indiquent la présence de cytotoxicité, ainsi que pour les perturbations du cycle mitotique et l'inhibition de la croissance des racines, qui sont des paramètres généraux de cytotoxicité (Fiskesjö, 1985 ; Mota et al., 2022).

Méthodologie

Méthodologie

1. Préparation des extraits de plantes

Les échantillons de *Rosmarinus tournefortii* ont été collectés de la forêt de Harmila. Ils ont été nettoyés de toutes les impuretés, puis séchés à l'air libre dans l'obscurité à température ambiante. Ensuite, les feuilles ont été broyées dans un mixeur électrique pour obtenir une poudre relativement fine qui a été conservée dans un bocal bien fermé et à l'abri de la lumière.

L'extrait aqueux a été préparé par macération de 50 g de poudre de plante et 500 mL d'eau distillée dans un flacon en verre. Le mélange a été laissé sous agitation à température ambiante dans l'obscurité pendant 24 heures. L'extrait a ensuite été filtré à l'aide de papier Whatman, et le filtrat obtenu a été déshydraté dans un incubateur à 37 °C pour obtenir un résidu sec, qui a ensuite été conservé dans une boîte propre.

L'extrait éthanolique a été préparé en mettant 60 g de poudre dans un flacon en verre contenant 600 mL d'éthanol à 70 %. Le mélange a été agité pendant 3 heures puis macéré pendant 24 heures. L'extrait obtenu a ensuite été filtré à l'aide de papier Whatman, et le filtrat a été déshydraté dans un incubateur à 37 °C pour obtenir un résidu sec, qui a ensuite été conservé dans un récipient propre.

Le rendement d'extraction est la proportion de la quantité d'analyte extrait par rapport à la quantité d'échantillon de plante :

$$\text{Rendement (\%)} = (\text{Poids de l'extrait sec} \times 100) / \text{Poids initial de la plante sèche.}$$

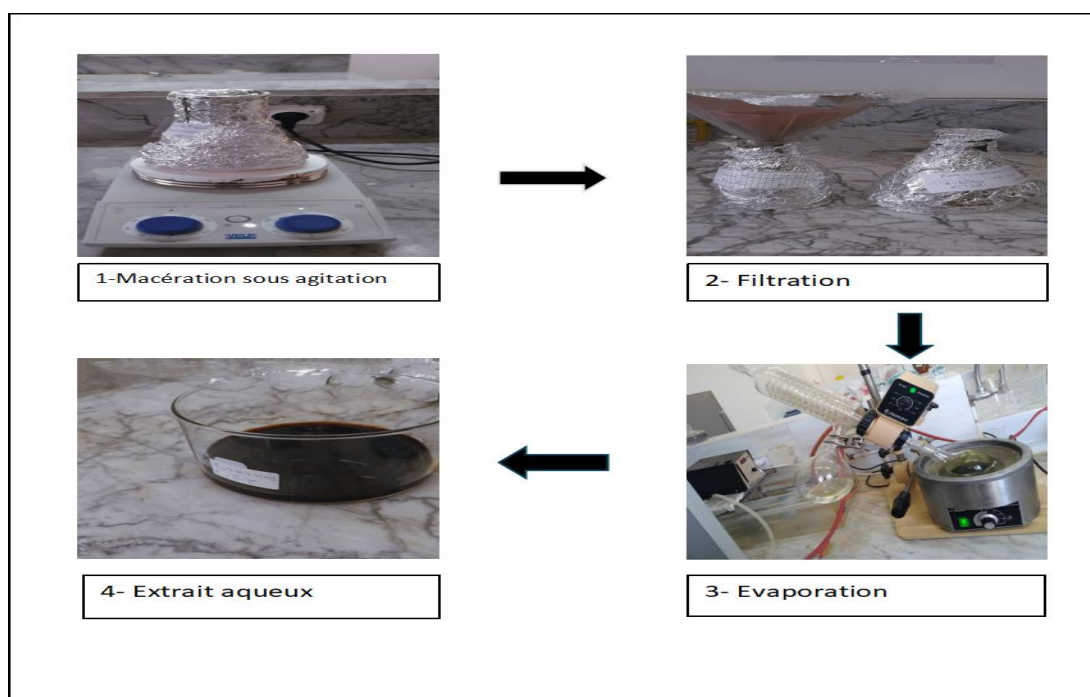


Figure 1 : les étapes de l'extraction par les solvants (l'eau et l'éthanol).

2. Composés phytochimiques

2.1. Polyphénols

En utilisant une micropipette, un volume de 200 µL de chaque extrait (aqueux et éthanolique) avec les mêmes concentrations qu'auparavant (0,1, 0,5, 0,75, 1 mg/mL), a été ajouté à des tubes Eppendorf avec 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dix fois. Les tubes sont protégés de la lumière et incubés pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite, chaque tube est complété avec 800 µL d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5 %. Après agitation, les tubes sont laissés pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 765 nm. La teneur totale en polyphénols est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage, et les résultats sont exprimés en équivalent acide gallique (EAG) en mg/mL d'extrait. Chaque expérience a été répliquée au moins trois fois.

2.2. Flavonoïdes

Dans un tube Eppendorf, 1 mL de chaque extrait a été mélangé avec 1 mL de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2 % dans du méthanol. La solution a été vigoureusement agitée à l'aide d'un vortex avant d'être incubée dans l'obscurité pendant 15 minutes. L'absorbance a été mesurée immédiatement à 430 nm par rapport à un blanc (eau distillée). La teneur totale en flavonoïdes a été estimée en utilisant une courbe d'étalonnage, et les résultats sont exprimés en équivalent quercétine (QE) en mg/mL d'extrait. Chaque expérience a été répétée au moins trois fois.

2.3. Tanins

Chaque extrait a été ajouté en volume de 50 µL à 1500 µL de solution de vanilline/méthanol à 49 % puis mélangé vigoureusement. Ensuite, 750 µL d'acide chlorhydrique concentré (HCl) ont été ajoutés. Pendant 20 minutes, le mélange résultant a été laissé à réagir à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 550 nm par rapport à un blanc. La teneur totale en tanins a été évaluée à l'aide d'une courbe d'étalonnage, et les résultats sont exprimés en équivalent quercétine (TAE) en mg/mL d'extrait. Chaque expérience a été répliquée au moins trois fois.

3. Activité antioxydante utilisant le test de capture des radicaux DPPH

L'activité de capture des radicaux libres de l'extrait a été évaluée en utilisant la 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine (DPPH). 0,2 mL d'extrait de plante ont été ajoutés dans des tubes Eppendorf, puis 1 mL de solution de DPPH (2 mg dans 100 mL de méthanol) a été ajouté. Les tubes ont été incubés dans l'obscurité pendant 30 minutes. Après l'incubation, les mesures de l'absorbance pour chaque échantillon ont été effectuées à 517 nm.

$$\text{La réduction de DPPH (\%)} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

4. Analyse de l'indice mitotique

Les bulbes d'oignon, *Allium cepa* ($2n = 16$), appartenant à la famille des Alliacees, ont été achetés sur un marché local à Tiaret (Algérie), en fonction de leur taille, et ont été nettoyés à l'eau distillée après avoir retiré les racines et la première peau. Avant de commencer le test des anaphases-télophases d'*Allium*, les écailles externes des bulbes ainsi que la plaque sèche inférieure ont été retirées sans endommager les primordia racinaires. Après 2 jours de contact avec de l'eau distillée dans l'obscurité à 22 ± 4 °C, les bulbes dont les racines mesuraient de 1 à 2 cm ont été utilisés pour cette étude. Cela consiste à placer chaque bulbe germé dans un tube à essai contenant de l'eau distillée, de sorte que seules les racines soient immergées. Ensuite, les quatre meilleurs bulbes en croissance ont été exposés pendant 48 heures à différentes concentrations aqueuses et éthanoliques de solutions de *Rosmarinus tournefortii* (0,1, 0,5, 0,75 et 1 mg/mL respectivement). L'eau distillée a servi de témoin négatif tandis que le méthyl méthane sulfonate (MMS, 10 ppm) a été utilisé comme témoin positif.

Après 48 heures d'exposition dans l'obscurité, les derniers 2 cm de racine ont été prélevés et fixés dans la solution de Carnoy à 4 °C pendant au moins une nuit, puis conservés à long terme dans de l'éthanol à 70 % à 4 °C. Ces racines ont ensuite été hydrolysées dans une solution d'acide chlorhydrique 1 N pendant 8 minutes et colorées avec le colorant Feulgen à l'abri de la lumière (Silva et al., 2011).

L'indice mitotique (IM), la polynucléose et la fréquence des aberrations chromosomiques (Cas) ont été réalisés selon Saxena et al. (2005). Pour chaque échantillon, cinq racines ont été préparées en écrasant les extrémités des racines avec de l'acide acétique à 45 % (1 pointe de racine par lame); entre 5000 et 6000 cellules ont été comptées pour déterminer les différents stades de la mitose et exprimées en pourcentage. Pour le test des aberrations chromosomiques, entre 500 et 600 cellules en anaphase ou télophase ont été examinées. Les types d'aberrations notées comprennent les anaphases-télophases perturbées, les retards chromosomiques, la stickiness et les ponts d'anaphase.

L'analyse macroscopique implique d'observer les changements morphologiques dans la racine après chaque traitement pour déterminer l'effet cytotoxique de l'extrait testé. Elle se base sur la détection d'anomalies telles que des changements de couleur, de forme ou la présence de gonflements. La longueur des racines a été mesurée pour déterminer l'arrêt de la croissance.

L'indice mitotique (MI) représente le nombre de cellules en division par le nombre total de cellules comptées multiplié par 100 :

$$MI (\%) = \text{Nombre de cellules en division (P + M + A + T)} / \text{Nombre total de cellules comptées} \times 100.$$

L'indice de phase (PI) est obtenu en divisant le nombre de cellules dans une phase spécifique par le nombre total de cellules en division, puis en multipliant le résultat par 100 :

$$PI (\%) = \text{Nombre de cellules dans la phase spécifique} / \text{Nombre total de cellules en division} \times 100.$$

L'indice des aberrations chromosomiques (CA) est déterminé par le nombre de cellules aberrantes parmi le nombre total de cellules observées, multiplié par 100 :

$$CA (\%) = \text{Nombre de cellules aberrantes} / \text{Nombre total de cellules comptées} \times 100;$$

Résultats

Résultats

1. Rendement des extraits

Les résultats indiquent que le rendement de l'extrait éthanolique de *Rosmarinus tournefortii* est significativement supérieur à celui de l'extrait aqueux. Ainsi, l'extrait éthanolique affiche un rendement de 14.60 %, tandis que le rendement de l'extrait aqueux est de 11.2 %.

Tableau 2. Rendement des extraits.

Extrait	Extrait aqueux	Extrait éthanolique
Poudre (g)	5.60	8.70
Rendement (%)	11.2	14.60

2. Analyse phytochimique

2.1. Composés phénoliques

L'analyse des données révèle une importante variation dans la quantité de composés phénoliques parmi les extraits végétaux étudiés. L'extrait éthanolique présente généralement des teneurs plus élevées en composés phénoliques par rapport à l'extrait aqueux.

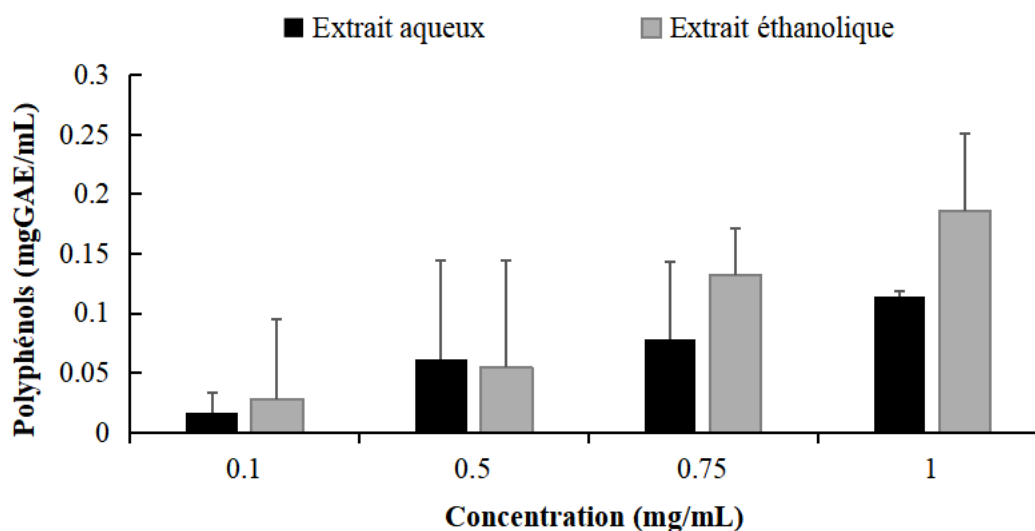


Figure 6. Variation de la teneur en composés phénoliques dans les extraits aqueux et éthanoliques de *R. tournefortii*.

Les teneurs en composés phénoliques varient entre $0,114 \pm 0,1$ mg GAE/mL et $0,016 \pm 0,1$ mg GAE/mL dans les traitements de l'extrait aqueux. Cependant, elles varient respectivement entre $0,186 \pm 0,1$ mg GAE/mL et $0,028 \pm 0,1$ mg GAE/mL dans l'extrait éthanolique.

2.2. Flavonoïdes totaux

L'extrait aqueux présente un contenu flavonoïdes plus élevés que l'extrait éthanolique. La valeur la plus élevée pour l'extrait aqueux était de $0,15 \pm 1$ mg QE/g, tandis que la valeur la plus basse était de $0,01 \pm 0,1$ mg QE/g. Pour l'extrait éthanolique, la valeur la plus élevée est de $0,056 \pm 1$ mg QE/g, tandis que la valeur la plus basse est de $0,003 \pm 0,1$ mg QE/g.

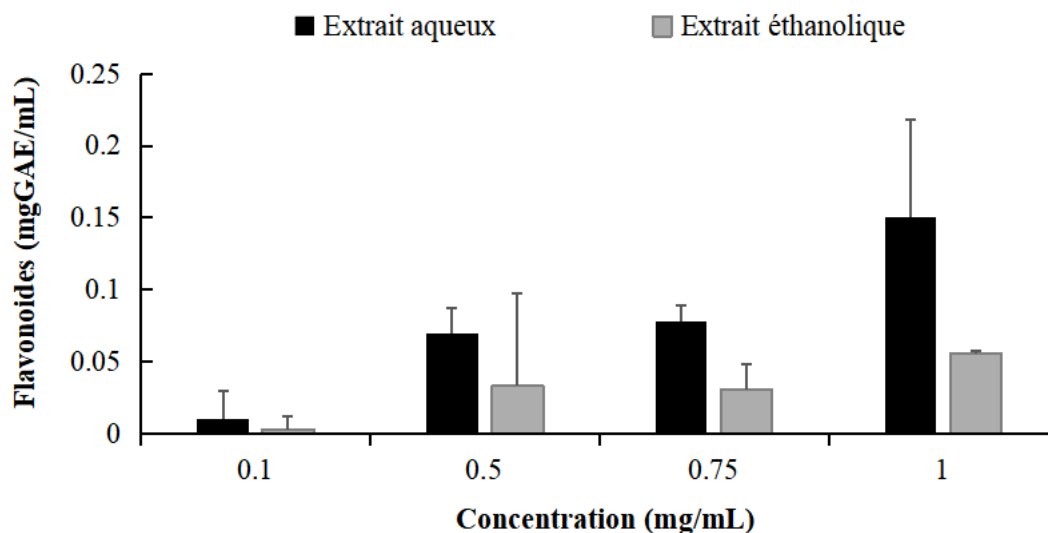


Figure 7. Variation de la teneur totale en flavonoïdes dans les extraits aqueux et éthanoliques de *R. tournefortii*.

2.3. Tanins condensés

Les teneurs en tanins dans l'extrait aqueux sont plus élevées que celles dans l'extrait éthanolique.

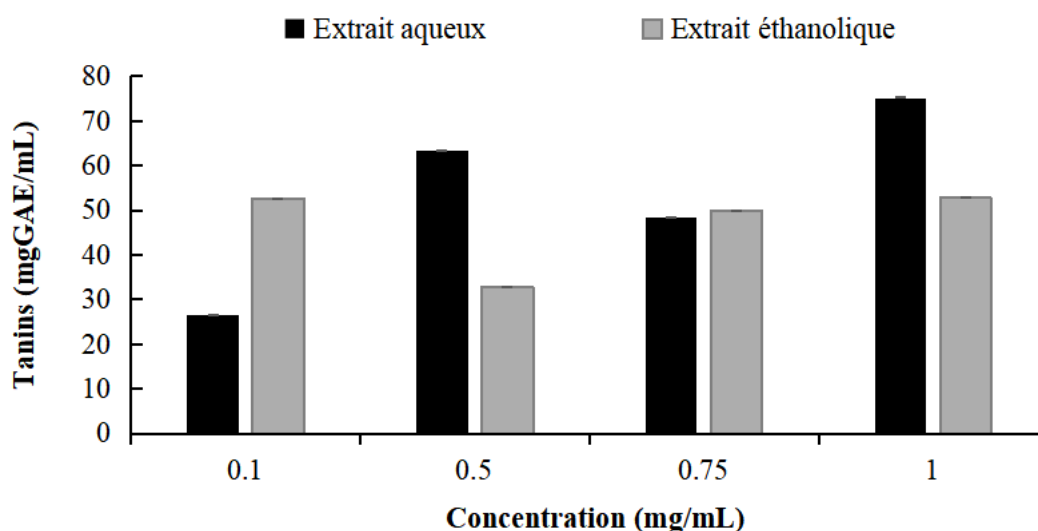


Figure 8. Variation de la teneur totale en composés tanins dans les extraits aqueux et éthanoliques de *R. tournefortii*.

La teneur la plus élevée en tanins est enregistrée dans l'extrait aqueux à 1 mg/mL (75.12 ± 1 mg QE/g) tandis que la teneur la plus faible est enregistrée dans le traitement à 0.1 mg/mL (26.58 ± 0.1 mg QE/g).

En ce qui concerne l'extrait éthanolique, la valeur maximale a atteint 52.74 ± 1 mg QE/g, et la valeur minimale 32.9 ± 0.5 mg QE/g.

3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante est significativement élevée dans l'extrait éthanolique. La valeur la plus élevée (85,19%) est enregistrée dans le traitement à 1 mg GAE/mL et un minimum de 83,24% à 0,1 mg GAE/mL.

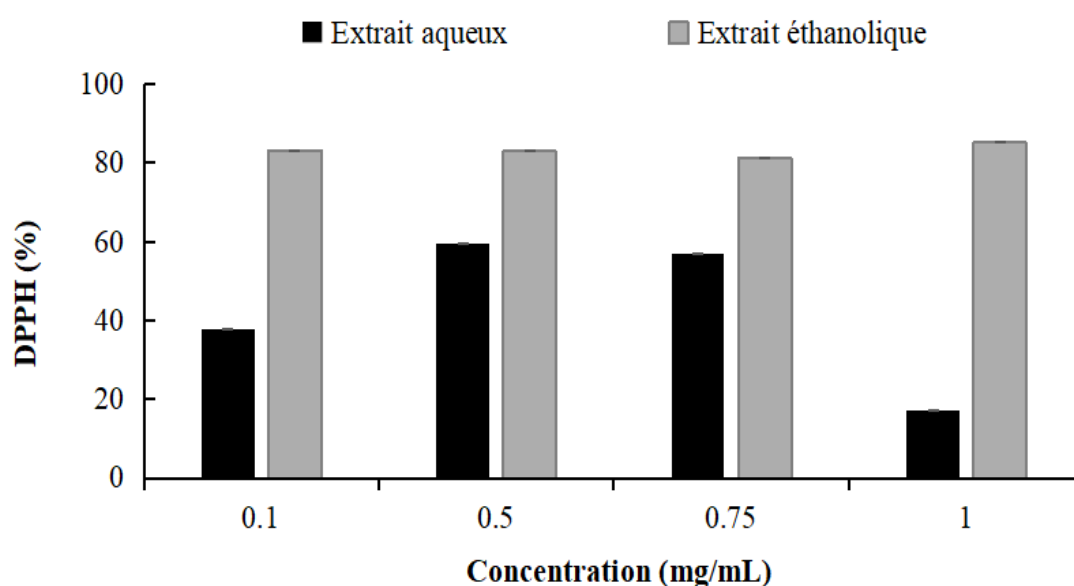


Figure 9. Activité antioxydante DPPH IC₅₀% pour différents extraits de *R. tournefortii*.

En ce qui concerne l'extrait aqueux, la valeur maximale a atteint 59,39% 0,5 mg GAE/mL et la valeur minimale 17,04% 1mg GAE/mL.

4. Évaluation de la cytotoxicité à l'aide du test *Allium cepa*

4.1. Croissance des racines

- Nombre de racines

Pour le témoin positif, il y a eu une diminution significative du nombre de racines après l'ajout de la solution de MMS (de 21 à 10). Cependant, le nombre de racines est resté inchangé dans le témoin négatif avec de l'eau distillée.

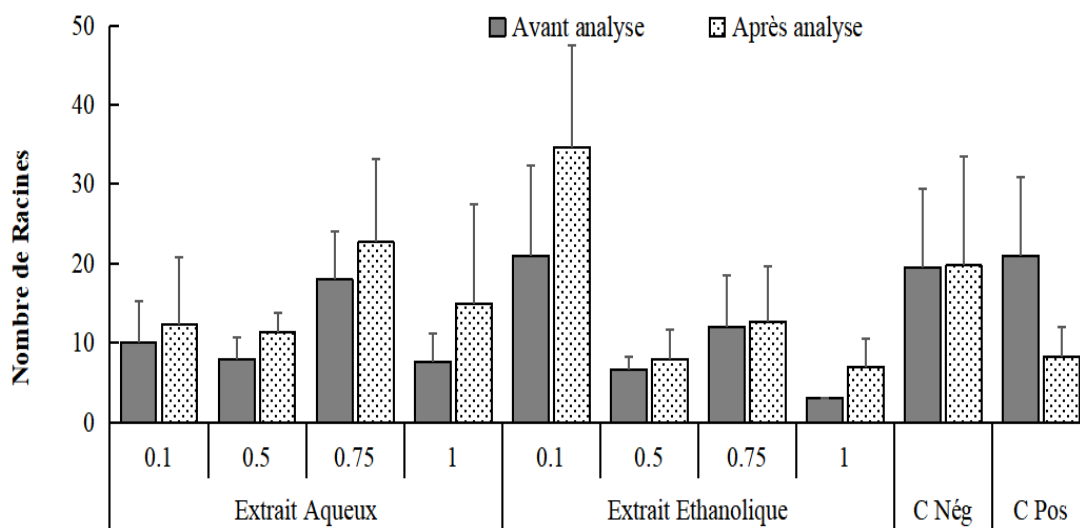


Figure 10. Effet des différentes concentrations d'extraits de *R. tournefortii* sur le nombre de racines chez *Allium cepa*.

CN : contrôle négatif

CP : contrôle positif

Pour les extraits aqueux, la valeur maximale avant le traitement était de $18 \pm 0,75$ mg/mL et la valeur minimale était de $7,7 \pm 1$ mg/mL. Après le traitement, la valeur maximale était de $22,7 \pm 0,75$ mg/mL et la valeur minimale était de $11,3 \pm 0,5$ mg/mL.

En ce qui concerne les extraits éthanologiques, la valeur maximale avant le traitement était de $21 \pm 0,1$ mg/mL et après le traitement, la valeur maximale était de $34,7 \pm 0,1$ mg/mL et la valeur minimale était de 7 ± 1 mg/mL.

- Longueur des racines

De la même manière, la longueur des racines a été mesurée avant et après le traitement par les extraits de *R. tournefortii* (Figure 11). La croissance des racines en longueur a été arrêtée après l'ajout de la solution de MMS comme témoin positif. Cependant, elle a triplé en longueur dans le témoin négatif avec de l'eau distillée.

L'extrait aqueux a incité significativement la croissance des racines jusqu'à concentration 0.75 mg/mL alors que les concentrations supérieures à 0.5 mg/mL de l'extrait éthanologique inhibe la croissance racinaire.

Les racines atteignent une longueur maximale de $32,4 \pm 0,75$ mg/mL dans les traitements à les extraits aqueux alors que la plus faible longueur est de $28,5 \pm 1$ mg/mL.

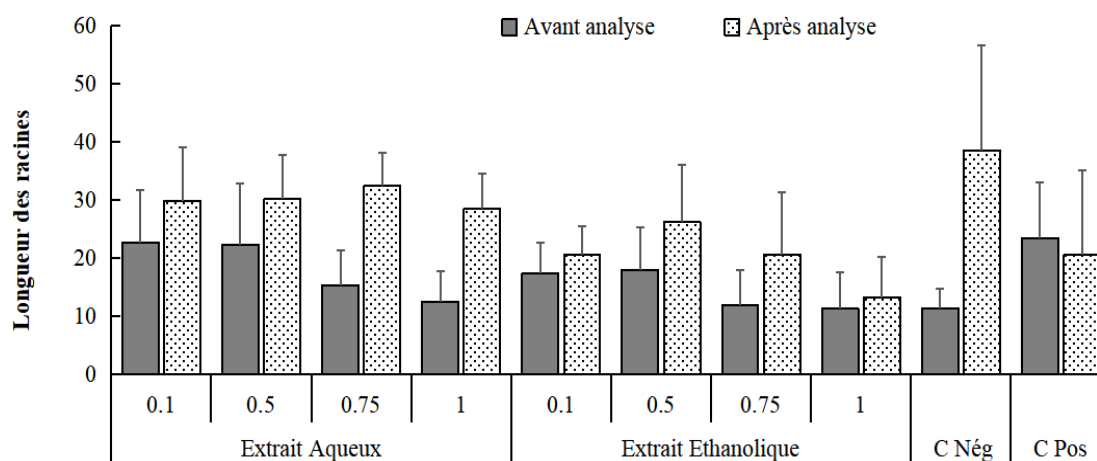


Figure 11. Effet des différentes concentrations d'extraits de *R. tournefortii* sur la longueur des racines chez *Allium cepa*

CN : contrôle négatif

CP : contrôle positif

Dans les traitements aux extraits éthanoliques, la plus grande longueur des racines est de $26,2 \pm 0,5$ mg/mL alors que la plus faible longueur est de $13,3 \pm 1$ mg/mL.

- Diamètre des racines

Le diamètre des racines a également été évalué avant et après l'ajout des extraits de plantes (Figure 12). Il y a eu une diminution notable du diamètre des racines dans les échantillons témoins, positifs et négatifs.

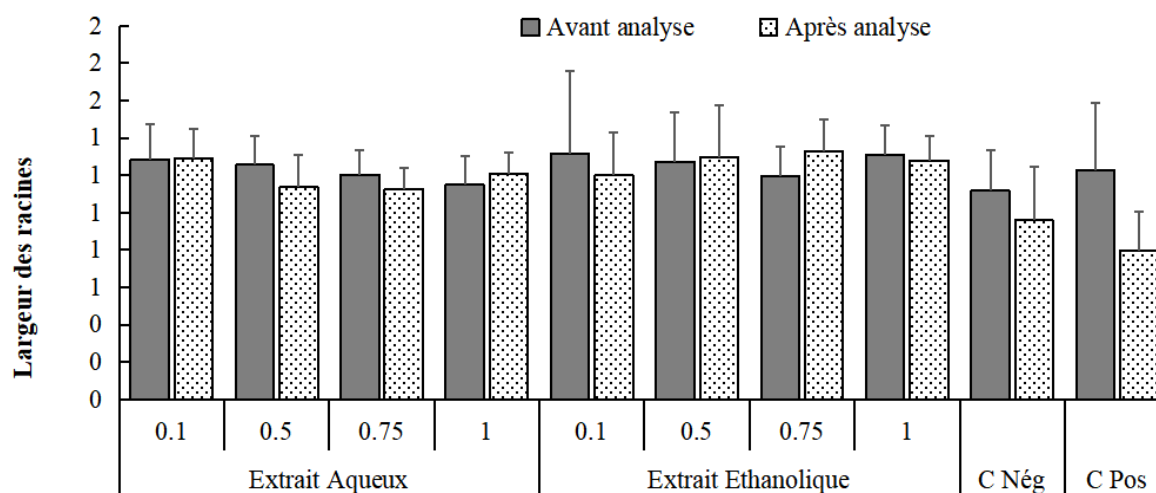


Figure 12. Effet des différentes concentrations d'extraits de *R. tournefortii* sur le diamètre des racines chez *Allium cepa*

Avant le traitement des racines avec les extraits aqueux, le diamètre maximal est de 1,3 aux concentrations 0,1 mg/mL et 0,5 mg/mL et de 1,1±1 mg/mL. Après le traitement, la valeur maximale est restée constante à 1,3±0,1 mg/mL et a diminué à 1,1 mm dans les concentrations de 0,5 mg/mL et 0,75 mg/mL.

De même, pour les extraits éthanoliques, le diamètre maximal avant traitement était de 1,3 mm dans les traitements 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL et 1 mg/mL, et a diminué à 1,2 mm sous traitement 0,75 mg/mL. Après le traitement par l'extrait, le diamètre maximal est resté constant à 1,333 aux concentrations de 1 mg/mL et 0,5 mg/mL et a diminué à 1,2 mg/mL.

4.2. Indice mitotique

L'indice mitotique des racines traitées avec l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique est significativement différent des témoins négatif (33,82 %) et positif (29,84 %).

L'extrait aqueux représente une valeur plus élevée que l'extrait éthanolique, à l'exception du troisième traitement de 0,75 mg/mL. La valeur la plus élevée (35,11%) est enregistrée dans le traitement à 0,75 mg/mL et un minimum de 26,78% dans le traitement 0,5 mg/mL.

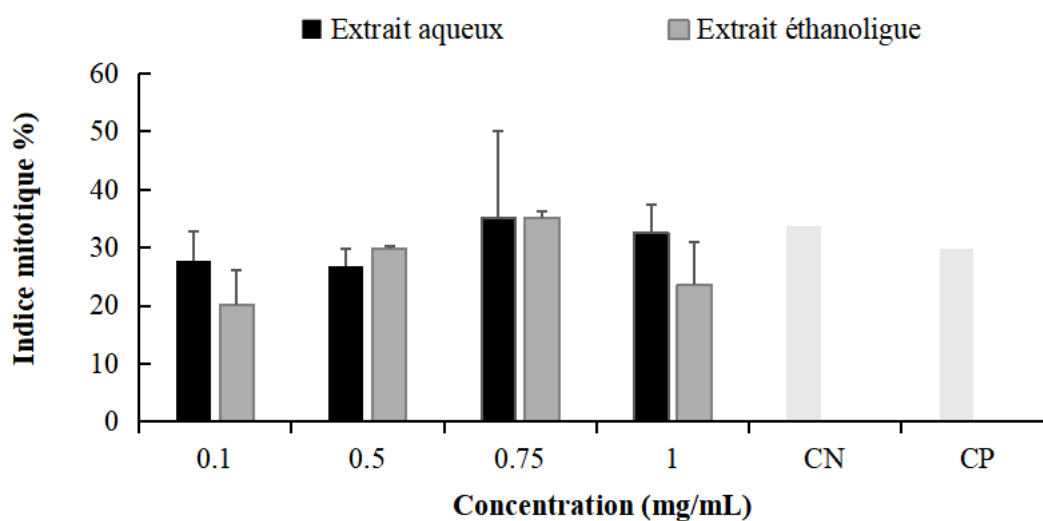


Figure 13 : Effet des différentes concentrations des extraits de plante sur l'indice mitotique dans *Allium cepa*.

CN : contrôle négatif

CP : contrôle positif

Tandis qu'ils varient respectivement entre 35,17 %± 0,75 mg/mL et 20,11% ± 0,1 mg/mL dans l'extrait éthanolique.

4.3. Indice de prophase

L'indice de prophase des racines traitées avec l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique est significativement plus élevé que celui des témoins négatif (23,2%) et positif (29,21%).

Dans l'extrait aqueux, la valeur la plus élevée de l'indice de prophase (53,07 %) est enregistrée dans le traitement à 0,75 mg/mL, et un minimum de 44,49 % à 0,5 mg/mL, comparé au témoin négatif qui était à environ 23,2 %.

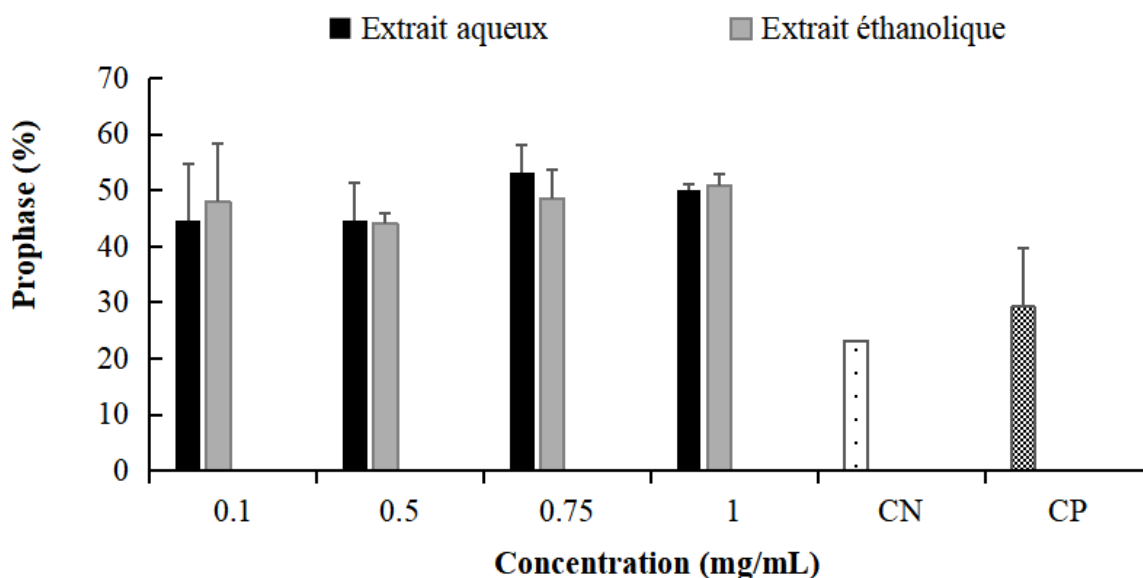


Figure 14. Impact des différentes concentrations d'extraits de plante sur l'indice de prophase chez *Allium cepa*.

En ce qui concerne l'extrait éthanolique, l'indice de prophase a significativement augmenté à un traitement de 1 mg/mL à une valeur de 50,74 %, et a diminué à 44,09 % sous traitement 0,5 mg/mL, comparé au témoin positif (29,21 %).

4.4. Indice de métaphase

L'indice de métaphase est significativement élevé dans l'extrait aqueux. La valeur la plus élevée (27,53%) est enregistrée dans le traitement à 0,5 mg/mL alors que le minimum (23,22 %) est enregistré sous traitement à 1 mg/mL.

Pour l'extrait éthanolique, l'indice maximal a été atteint sous traitement de 0,5 mg/ml, soit 24,65 %, tandis que l'indice a atteint son minimum sous concentration 0,1 mg/mL, soit 21,14 %.

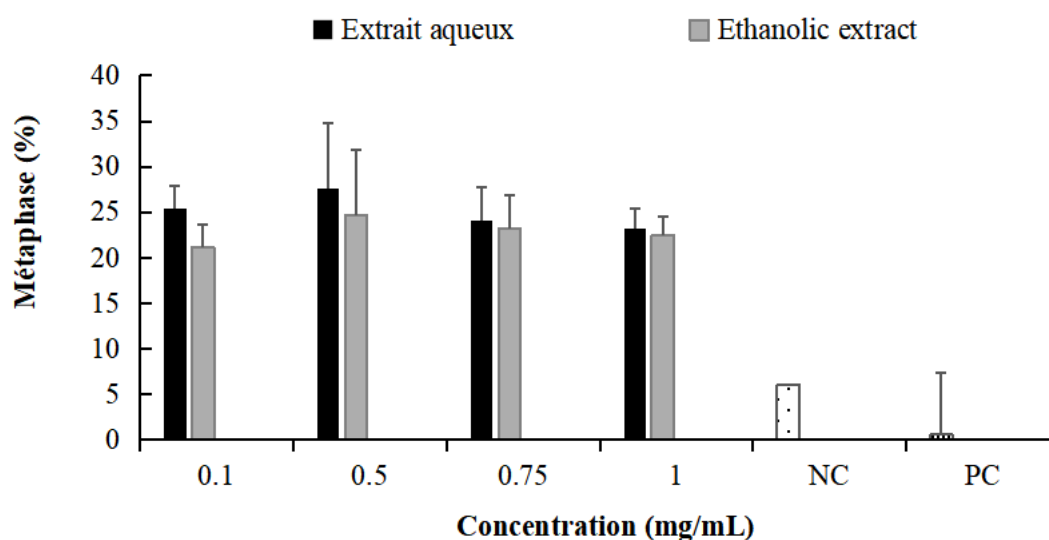


Figure 15. Effet des différentes concentrations des extraits de plante sur l'indice de métaphase dans *Allium cepa*.

4.5. Indice de l'anaphase

Le nombre de cellules en anaphase dans les racines traitées avec l'extrait éthanolique était plus élevé que celui de l'extrait aqueux par rapport au témoin négatif, qui était de $3,85 \pm 2,86$ %, et presque nul dans le témoin positif, soit $0,09 \pm 0,98$ %.

L'indice de métaphase a atteint la valeur la plus élevée dans les extraits éthanoliques, soit 20,24 % sous traitement 0,75 mg/mL et la valeur la plus basse, soit 18,13 % sous traitement 0,5 mg/mL.

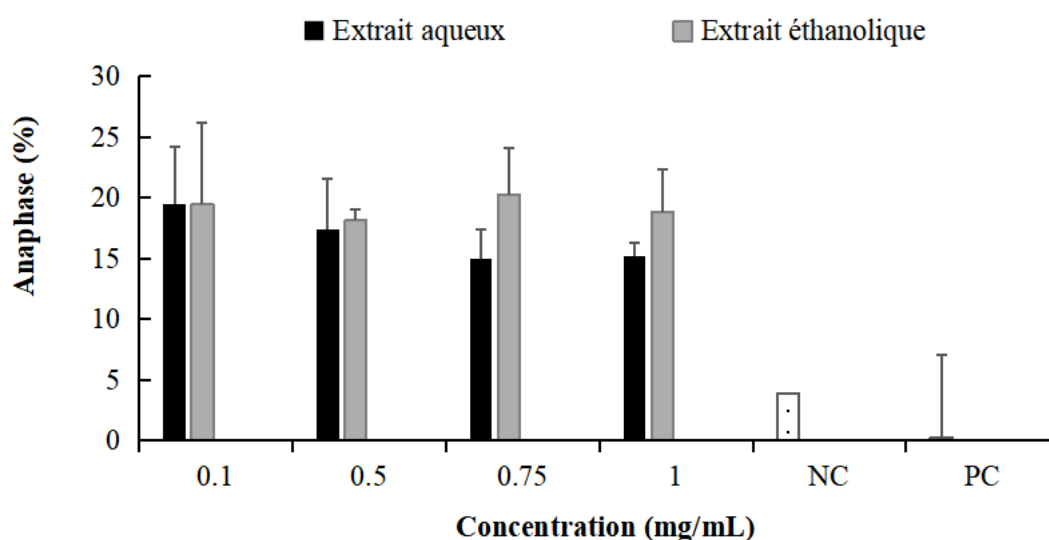


Figure 16. Effet des différentes concentrations des extraits de plante sur l'indice de l'anaphase chez *Allium cepa*.

Dans l'extrait aqueux, le plus grand nombre de cellules en anaphase (19,44 %) sous traitement 0,1 mg/mL alors que la valeur la plus basse (14,94 %) est obtenue sous traitement 0,1 mg/mL.

4.6. Indice de télophase

Le nombre de cellules en télophase dans les racines traitées avec l'extrait éthanolique est supérieure dans les traitements inférieurs à 0.5 mg/mL. Toutefois, les valeurs enregistrées dans les différents traitements demeurent supérieures à celles du témoin ($0,89 \pm 0,56$ %).

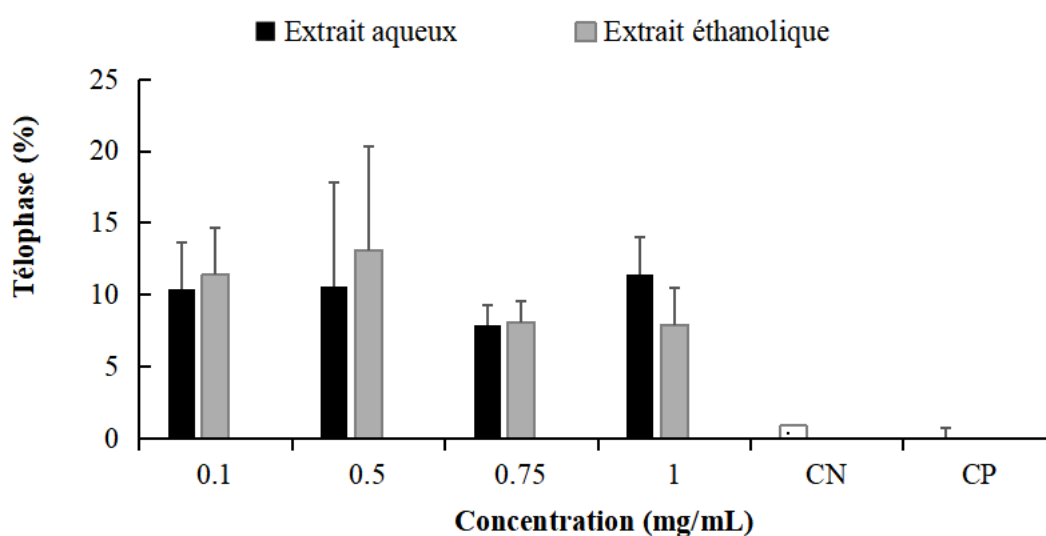


Figure 17 : Effet des différentes concentrations des extraits de plante sur l'indice de Télophase dans *Allium cepa*.

Le nombre le plus élevé des cellules en télophase (13,11 %) est enregistré dans les extraits éthanoliques sous traitement 0,5 mg/mL alors que la valeur la plus faible (7,9 %) est enregistré sous le traitement 1 mg/mL.

Pour l'extrait aqueux, la valeur la plus élevée (11,93 %) est enregistrée sous traitement 1 mg/mL alors que la valeur la plus faible (7,85 %) est enregistrée sous traitement 0,75 mg/mL.

5. Aberrations chromosomiques

Le nombre le plus élevé d'aberrations chromosomiques a été observé dans les racines traitées par l'extrait éthanolique. Cependant, le traitement à l'extrait aqueux présente des valeurs qui ne diffèrent pas significativement du contrôle négatif à l'eau distillée.

5.1. Perturbation de l'anaphase

Les racines traitées par l'extrait éthanolique ont manifesté de nombreuses perturbations lors de la division cellulaire, avec jusqu'à 143 perturbations observées au traitement de 0,75 mg/mL. En revanche, les racines traitées avec l'extrait aqueux ont montré peu de perturbations, avec un maximum de 47 cellules affectées lors du quatrième traitement à 1 mg/mL. Toutes les concentrations testées montrent des valeurs supérieures à celles du témoin négatif et du témoin positif.

5.2. Chromosomes retardataires

L'extrait éthanolique induit un nombre élevé de chromosomes retardataires, indépendamment de sa concentration, atteignant jusqu'à 97 sous traitement 0,75 mg/mL, par rapport aux extraits aqueux, 47 sous traitement 1 mg/mL.

Toutefois, toutes les concentrations testées montrent des valeurs supérieures à celles du témoin négatif et positif.

5.3. Adhésion en télophase

Les racines traitées par l'extrait aqueux montrent un faible nombre de d'adhésion de chromosomes en télophase indépendamment de la concentration testée. Pour les racines traitées avec l'extrait éthanolique, le nombre de chromosomes collants en télophase est élevé et augmente avec la concentration de l'extrait dans le milieu, de 9 sous traitement 0,1 mg/mL à 11 sous traitement 1 mg/mL.

5.4. Ponts chromosomiques

Le nombre de ponts chromosomiques induits par l'extrait aqueux augmente à mesure que la concentration de l'extrait augmente. Le nombre de ponts le plus élevé est 27 sous traitement 1 mg/mL tandis que, dans l'extrait éthanolique, le nombre de ponts chromosomiques augmente dans le traitement 0,5 mg/mL à 56.

5.5. Perturbation du nombre de chromosomes

L'extrait éthanolique induit un nombre élevé d'anomalies de nombres de chromosomes indépendamment de la concentration en étude. Ainsi, la valeur la plus élevée (109) est enregistrée dans la concentration 0,75 mg/mL, tandis qu'elle est de 97 sous traitement 1 mg/mL de l'extrait aqueux.

5.6. Métaphase C

L'extrait éthanolique induit un nombre élevé de perturbations de type métaphase C, indépendamment de sa concentration où il atteint 19 sous concentration 0,5 mg/mL. De plus, le nombre de métaphase C causé par l'extrait aqueux augmente à mesure que la concentration de l'extrait augmente de 11 sous traitement 0,1 mg/mL à 15 sous traitement mg/mL.

Toutes les concentrations testées montrent des valeurs supérieures à celles du témoin négatif et du témoin positif.

5.7. Autres types d'aberrations chromosomiques

Autres types d'aberrations chromosomiques sont également observés (Tableau 3), tels que les cellules binucléées et les micronoyaux, qui sont présentes dans les cellules méristématiques traitées à la fois avec des extraits éthanoliques et aqueux à faible pourcentage. De plus, l'adhérence en métaphase est observée dans les cellules traitées avec l'extrait éthanolique et est absente dans les groupes traités avec les extraits aqueux.

Discussion

Discussion

Rosmarinus tournefortii de Noé est une espèce d'arbuste aromatique endémique poussant dans la steppe aride algérienne localement appelé "Iklil El-Jabal" (Nedjimi et al. 2015). Les feuilles du romarin sont utilisées dans la cuisine traditionnelle méditerranéenne mais aussi comme antioxydant dans les aliments, les compléments nutritionnels et les produits cosmétiques, ou comme arôme alimentaire (Bensouici et al. 2019).

Les activités pharmacologiques anti-cancéreuse, anti-diabétique et hépato protectrice sont également démontrées (Chama et al. 2022). L'huile de romarin est largement utilisée en médecine traditionnelle. De plus, l'infusion des feuilles fraîches est diurétique, apéritive, tonique, cholagogue, cholérétique, stomachique et emménagogue (Elamrani et al. 2003).

Dans la présente étude, la toxicité et la génotoxicité des extraits aqueux et éthanoliques de *R. tournefortii* sont évaluées par le test *Allium cepa* en prenant en considération trois paramètres : l'inhibition de l'élongation racinaire, l'effet sur l'index mitotique et l'étude des aberrations chromosomiques.

L'analyse des données révèle une variation significative du contenu total en composés phénoliques. Les résultats obtenus montrent que la teneur en ces métabolites dans l'extrait éthanolique est plus élevée que l'extrait aqueux. Ainsi, la valeur la plus élevée dans l'extrait éthanolique des feuilles est de 0.186 sous traitement 1 mg GAE/mL. Tandis que dans l'extrait aqueux, elle est de 0,114 sous traitement 1 mg GAE/mL. Ces résultats demeurent inférieurs à ceux trouvés par Bensouici et al. (2019) qui ont trouvé une teneur en polyphénols des feuilles à $168.60 \pm 3.32 \mu\text{g GAE/mg}$. Par ailleurs, Bendif et al. (2017) ont montré un contenu élevé en polyphénols totaux dans les extraits éthanoliques (entre 64 903 et 89 842 mg/kg), par rapport aux extraits aqueux (entre 2661 et 4316 mg/kg).

Les résultats de l'activité antioxydante montrent que les extraits éthanoliques étaient plus efficaces que les extraits aqueux. La teneur maximale en polyphénols des extraits éthanoliques a atteint 85,19% à 1 mg GAE/mL. Ces résultats demeurent inférieurs à ceux trouvés précédemment par Boudiar et al. (2018), ont montré que l'extrait hydro-alcoolique de *R. eriocalyx* a montré une légère activité antioxydante plus faible.

Gaamoune et al. (2018) ont montré que dans les extraits de romarin, la présence de différents groupes de phénoliques tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques est responsable des propriétés antioxydantes observées. Les principaux composants des extraits de *R. eriocalyx*.

Des effets anticancéreux significatifs sont exhibés par les métabolites secondaires des plantes tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les polyphénols, les saponines, les lignanes, les huiles volatiles et les terpènes, soit en inhibant les protéines et les enzymes qui activent les cellules cancéreuses, soit en modifiant de nombreuses voies de signalisation comme CDK2, NF- κ B, Bcl-2, les cytokines, PI3K, Akt, MAPK/ERK, et MMP, ou en activant la réparation de l'ADN (Abdelhameed et al. 2023).

Le test *Allium cepa* est un excellent test très sensible qui fournit des informations sur l'effet des substances toxiques au niveau cellulaire et moléculaire, et il est préféré par l'Organisation mondiale de la santé (Schreiner et al. 2024).

Le traitement des racines par l'extrait aqueux et éthanolique, à différentes doses, n'a pas significativement réduit le nombre de cellules en division, par rapport au témoin positif. Il a été observé que la valeur de l'indice mitotique augmente avec l'augmentation des concentrations.

Pour l'extrait aqueux, la concentration la plus élevée (0,75 mg/ml) a suffi pour augmenter l'indice mitotique à 35,11%, ce qui était statistiquement différent du témoin à 29,84%. Pour l'extrait éthanolique (EE), la dose de 0,75 mg/ml a également entraîné une augmentation significative de l'IM (35,17%). Il convient également de noter que pour la dose de 0,75 mg/ml des deux extraits, l'augmentation de l'IM était très importante, même supérieure à celle du témoin négatif, et significativement différente de celui-ci. À partir de ces résultats, on peut conclure que les extraits aqueux et éthanoliques des feuilles de *Rosmarinus tournefortii* ne contiennent pas de composés capables d'interférer avec les composants du cycle cellulaire et d'inhiber la mitose. Par conséquent, la plante n'a aucun effet toxique sur les cellules.

Dans une étude menée par Turković et al. (2023), les extraits de romarin n'ont montré aucun effet cytotoxique statistiquement significatif dans la lignée cellulaire CAL 27 de carcinome épidermoïde de la langue. En comparaison avec le témoin, il n'y avait pas de variations statistiquement significatives dans la survie cellulaire (viabilité, MTT% (romarin) = 93,41-105,87 % ; C = 100 %). De plus, l'huile essentielle de romarin n'a pas montré d'activité cytotoxique significative dans les cellules HeLa, provenant d'un carcinome épidermoïde du col de l'utérus (traitement), comparativement aux cellules HepG2, issues d'un carcinome hépatocellulaire (témoin). Les principaux composants de l'huile essentielle de romarin étaient des monoterpènes (1,8-cinéole et α -pinène), comme confirmé par le test MTT. (Santos et al., 2016).

L'extrait de romarin est riche en carnosol, acide carnosique, acide rosmarinique et acide bétulinique, qui sont présents dans l'extrait en fonction de la méthode d'extraction, et ont démontré des effets anti-prolifératifs sur différents types de cellules tumorales (Turković et al., 2023). En raison de ses propriétés antioxydantes, le romarin a été reconnu comme un médicament potentiel pour lutter contre le cancer. En réalité, il est en mesure d'interagir avec les

radicaux libres et de préserver l'ADN, les protéines et les lipides des oxydations (Allegra et al., 2020).

Contrairement à certaines études qui ont montré que le *Rosmarinus tournofertii* cytotoxique. Des études récentes sur le romarin ont été développées, telles que celle de Yesil-Celiktas et al. (2010), qui ont évalué l'activité des extraits aqueux et alcooliques des feuilles de *R. officinalis*, à des concentrations de 12,50 à 47,55 mg/mL, sur des lignées cellulaires humaines NCI-H82 (carcinome pulmonaire), DU-145 (carcinome de la prostate), Hep-3B (carcinome hépatocellulaire), K-562 (leucémie myéloïde chronique) et MCF-7 (adénocarcinome du sein), et ont vérifié que le romarin inhibait significativement la division cellulaire dans toutes ces cellules. Selon Jardak et al. (2017), l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a présenté un effet cytotoxique variable sur les lignées cellulaires Hela et MCF-7, avec une activité plus prononcée contre les cellules Hela. ROEO inhibait fortement la prolifération des cellules Hela avec une valeur d'IC₅₀ de 0,011 µl/ml, tandis qu'à une concentration de 0,253 µl/ml, il inhibait 50 % de la prolifération des cellules MCF-7 (Jardak et al., 2017).

Les résultats montrent que les extraits aqueux et éthanoliques de *Rosmarinus tournofertii* testés sont génotoxiques. Les types les plus courants d'effets génotoxiques des aberrations chromosomiques observées étaient l'anaphase perturbation et les polypléïdes, suivis des ponts et les chromosomes retardataires, ainsi que d'autres aberrations moins fréquentes. Il est notable que l'augmentation du taux des aberrations chromosomiques est proportionnelle à l'accroissement des doses de *Rosmarinus tournofertii*. De même Slameňvá et al. (2002) ont montré que l'incubation préalable pendant 24 heures de cellules pulmonaires de hamster V79 avec un extrait de romarin à une concentration de 30 µg/ml a causé des dommages significatifs à l'ADN. Cela peut s'expliquer par de nombreux monoterpènes qui, en tant que substances lipophiles, peuvent traverser les membranes cellulaires et détruire des structures liées à des dommages membranaires, une perte d'ions, une réduction du potentiel membranaire, un effondrement de la pompe à protons et des changements dans l'ATP.

Selon Maistro et al (2010), La génotoxicité/mutagénicité de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a été étudiée sur les leucocytes sanguins périphériques de rongeurs ainsi que sur les cellules du foie et de la moelle osseuse. L'huile de romarin a induit une augmentation significative de la migration de l'ADN des cellules du foie et des leucocytes à toutes les trois doses dans le test du Comet, et à la dose la plus élevée (2000 mg/kg), elle a significativement augmenté le nombre de cellules micro-nucléées et les aberrations chromosomiques dans les cellules de la moelle osseuse, selon les tests des micronoyaux et des aberrations chromosomiques (Maistro et al., 2010).

Conclusion

Conclusion

Selon les résultats obtenus dans cette étude, *Rosmarinus tournefortii* est riche en polyphénols, flavonoïdes et tanins. Les extraits montrent une bonne activité antioxydante dans la capacité à piéger les radicaux libres (DPPH).

L'évaluation de la cytotoxicité des extraits aqueux et éthanoliques à l'aide du test d'*Allium cepa* montre que l'indice mitotique augmente avec la concentration. Cela indique que les extraits de feuilles de *Rosmarinus tournefortii* n'ont pas d'effet cytotoxique sur les cellules d'*Allium cepa*.

Les extraits aqueux et éthanoliques des feuilles de *Rosmarinus tournefortii* ont montré une forte génotoxicité à des concentrations élevées (0,75 et 1 mg/mL), indiquant que *Rosmarinus tournefortii* possède un effet génotoxique sur les cellules d'*A. cepa*.

Il est possible d'utiliser *Rosmarinus tournefortii* dans diverses activités biologiques, notamment dans l'activité anticancéreuse, en particulier lorsque cet effet vise spécifiquement les cellules à différenciation incontrôlable.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1) Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 12131221.
- 2) Akroum, S. (2021). Activité antimicrobienne des extraits de *Rosmarinus officinalis* et *Zingiber officinale* sur les espèces du genre *Candida* et sur *Streptococcus pneumoniae*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 79(1), 6269.
- 3) Ali-Rachedi, F., Meraghni, S., Touaibia, N., & Mesbah, S. (2018). Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* L. *Bulletin De La Société Royale Des Sciences De Liège*, 13–21.
- 4) Allegra, A., Di Gioacchino, M., Tonacci, A., Musolino, C., & Gangemi, S. (2020). Immunopathology of SARS-COV-2 infection : Immune cells and mediators, prognostic factors, and Immune-Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4782.
- 5) Allegra, A., Tonacci, A., Pioggia, G., Musolino, C., & Gangemi, S. (2020). Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L.: Mechanisms of Action and Therapeutic Potentials. *Nutrients*, 12(6), 1739.
- 6) Aouad, R. F., Boufadi, M. Y., Adli, D. E. H., Moulai-Hacene, F., Kahloula, K., & Slimani, M. (2021). Chemical Composition and Protective Effect of *Rosmarinus officinalis* on Alcohol-Induced Serum Hepatic Changes and Liver Injury in Male Rats. *Pharmacognosy Journal*, 13(5), 12051215.
- 7) Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2).
- 8) Banti, C., & Hadjidakou, S. (2019). Evaluation of Genotoxicity by Micronucleus Assay in vitro and by *Allium cepa* Test in vivo. *Bio-protocol*, 9(14).
- 9) Mutagenicity: assays and applications. (2018). In Elsevier eBooks.
- 10) Benbelaid, F., Khadir, A., Bendahou, M., Zenati, F., Bellahsene, C., Muselli, A., & Costa, J. (2016). Antimicrobial activity of *Rosmarinus eriocalyx* essential oil and polyphenols : An endemic medicinal plant from Algeria. *Journal Of Coastal Life Medicine*, 4(1), 3944.
- 11) Bendeddouche, M. S., Benhassaini, H., Hazem, Z., & Romane, A. (2011). Essential Oil Analysis and Antibacterial Activity of *Rosmarinus tournefortii* from Algeria. *Natural Product Communications*, 6(10).
- 12) Bendif, H., Boudjeniba, M., Miara, M. D., Biqiku, L., Bramucci, M., Caprioli, G., Lupidi, G., Quassinti, L., Sagratini, G., Vitali, L. A., Vittori, S., & Maggi, F. (2017). *Rosmarinus eriocalyx*: An alternative to *Rosmarinus officinalis* as a source of antioxidant compounds. *Food Chemistry*, 218, 78–88.
- 13) Bendif, H., Miara, M. D., Kalboussi, Z., Grauzdytė, D., Povilaitis, D., Venskutonis, P. R., & Maggi, F. (2018b). Supercritical CO₂ extraction of *Rosmarinus eriocalyx* growing in Algeria : Chemical composition and antioxidant activity of extracts and their solid plant materials. *Industrial Crops And Products*, 111, 768774.

- 14) Benhacine Louiza et Sahil Nassima, 2016, Etude de la génotoxicité des extraits de *Pistacia lentiscus* par le test d'Ames, *Génétique Appliquée*, Université A. MIRA – Bejaia.46
- 15) Bensouici, C., Boudiar, T., Kashi, I., Bouhedjar, K., Boumechhour, A., Khatabi, L., & Larguet, H. (2019). Chemical characterization, antioxidant, anticholinesterase and alpha-glucosidase potentials of essential oil of *Rosmarinus tournefortii* de noé. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(2), 632–639
- 16) Chama, Z., Benchiha, N. N., Benabbou, A., Kanoun, K., Derkaoui, I., Arbi, H., & Lynda Klouche-Addou. (2022). Evaluation of the antibacterial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L and *Rosmarinus eriocalyx* from the region of Sidi Bel Abbes (Algeria). *International Journal of Minor Fruits, Medicinal and Aromatic Plants*, 8(2), 12–24.
- 17) Chung, S., Nguyen, V., Lin, Y. L., Kamen, L., & Song, A. (2017). Thaw-and-use target cells pre-labeled with calcein AM for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity assays. *Journal Of Immunological Methods*, 447, 3746.
- 18) Dégremont, C., & Cachot, J, 2009, La Génotoxicité, quel risque pour les espèces aquatiques. *Fascicules Seine-Aval*.
- 19) Dif, M. M., Benchiha, H., Mehdadi, Z., Benali-Toumi, F., Benyahia, M., & Bouterfas, K. (2015). Étude quantitative des polyphénols dans les différents organes de l'espèce *Papaver rhoeas* L. *Phytothérapie*, 13(5), 314–319.
- 20) Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102(1), 99-112.
- 21) Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177.
- 22) Gillissen, M., Yasuda, E., De Jong, G., Levie, S., Go, D., Spits, H., Van Helden, P., & Hazenberg, M. (2016). The modified FACS calcein AM retention assay : A high throughput flow cytometer based method to measure cytotoxicity. *Journal Of Immunological Methods*, 434, 1623.
- 23) Ibrahim, N., Abbas, H., El-Sayed, N. S., & Gad, H. A. (2022). *Rosmarinus officinalis* L. hexane extract : phytochemical analysis, nanoencapsulation, and in silico, in vitro, and in vivo anti-photoaging potential evaluation. *Scientific Reports*, 12(1)
- 24) Grewal, J., Kumar, V., Rawat, H., Gandhi, Y., Singh, R., Singh, A., Babu, G., Srikanth, N., & Mishra, S. K. (2022). Cytotoxic effect of plant extract-based nanoparticles on cancerous cells : a review. *Environmental Chemistry Letters*.
- 25) Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349.
- 26) Leme, D. M., & Marin-Morales, M. A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1), 71-81.

- 27) Liu, X., Rodeheaver, D. P., White, J. C., Wright, A. M., Walker, L. M., Zhang, F., & Shannon, S. (2018b). A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. *Regulatory Toxicology And Pharmacology*, 97, 2432.
- 28) López-Romero, D., Izquierdo-Vega, J. A., Morales-González, J. A., Madrigal-Bujaidar, E., Chamorro-Cevallos, G., Sánchez-Gutiérrez, M., Betanzos-Cabrera, G., AlvarezGonzalez, I., Morales-González, Á., & Madrigal-Santillán, E. (2018).
- 29) Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 2 : Plants, vegetables, and natural resin. *Nutrients*, 10(12), 1954. doi: 10.3390/nu10121954 Lovkova, M.Y., Buzuk, G.N., Sokolova, S.M., & Kliment'eva, N. I. (2001). Chemical features of medicinal plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37, 229-237.
- 30) Luan, Y., & Honma, M. (2021b). Genotoxicity testing and recent advances. *Genome Instability & Disease*, 3(1), 1–21
- 31) Maistro, E., Mota, S., Lima, E., Bernardes, B., & Goulart, F. (2010). Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) essential oil in mammalian cells in vivo. *Genetics And Molecular Research*, 9(4), 2120-2129.
- 32) Martini M.C., 2011. Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. Ed. Lavoisier, p.358
- 33) McGaw, L. J., Elgorashi, E. E., & Eloff, J. N. (2014). Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. Dans *Toxicological Survey of African Medicinal Plants* (p. 181–233). Elsevier.
- 34) Menaceur, F., Hazzit, M., Mouhouche, F., Mohammedi, H., Baaliouamer, A., & Benchabane, A. (2016). Phytochemical Screening and Biological Activities of Essential Oils from Leaves of Two Algerian Lamiaceae Plants on *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775). *Journal Of Essential Oil-bearing Plants*, 19(4), 806-819.
- 35) Mota, T. F. M., Sampaio, A. R., Vasconcelos, M. W., & de Castilhos Ghisi, N. (2022). Allium cepa test vs. insecticides : A scientometric and meta-analytical review. *Environmental Science and tPollution Research*, 29(28), 42678-42691. doi: 10.1007/s11356-021 15953-5
- 36) Nedjimi, B., Beladel, B., Guit, B., Alghem, L. H., Zouranen, B., & Slamene, H. (2015). Determination of some chemical elements in *Rosmarinus tournefortii* de Noé using instrumental neutron activation analysis. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(1), 34–37.
- 37) Outaleb, T., Yekkour, A., Hazzit, M., Zitouni, A., & Sabaou, N. (2020). Phytochemical profiling, antioxidant and antimicrobial effectiveness of *Rosmarinus tournefortii* De Noe extracts issued from different regions of Algeria. *Journal Of Essential Oil Research*, 32(3), 247-259.
- 38) Rahbardar, M. G., & Hosseinzadeh, H. (2020). Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its active constituents on nervous system disorders. *PubMed*, 23(9), 11001112.
- 39) Ribeiro-Santos, R., Carvalho-Costa, D., Cavaleiro, C., Costa, H., Albuquerque, T., Castilho, M., Ramos, F., De Melo, N. R., & Sanches-Silva, A. (2015). A novel insight on an ancient aromatic

- plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Trends In Food Science & Technology, 45(2), 355368.
- 40) Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S., & Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S., & Mikov, M. (2014). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. BMC Complementary And Alternative Medicine, 14(1).
- 41) Rasgele, P. G., Özer, H., & Kirankaya, S. G. (2023). In Vivo Genotoxicity Testing of Bentazone Herbicide in *Danio rerio* Erythrocytes Using the Micronucleus and Nuclear Abnormality Assays. Water, Air and Soil Pollution/Water, Air & Soil Pollution, 235(1).
- 42) Rašković, A., Milanović, I., Pavlović, N., Čebović, T., Vukmirović, S., & Mikov, M. (2014). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. BMC Complementary And Alternative Medicine, 14(1)
- 43) Rasanian, N., & Sharan, D. (2023). A comprehensive review on the anti-diabetic properties of various flavonoids. Advances in Traditional Medicine.
- 44) Ren, N., Atyah, M., Chen, W., & Zhou, C. (2017). The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications. Journal of Translational Medicine, 15(1).
- 45) Santos, P. a. S. R., Avanço, G. B., Nerilo, S. B., Marcelino, R. I. A., Janeiro, V., Valadares, M. C., & Machinski, M. (2016). Assessment of cytotoxic activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis*L.), turmeric (*Curcuma longa*L.), and ginger (*Zingiber officinale*R.) essential oils in cervical cancer cells (HELA). the Scientific World Journal/TheScientificWorldjournal, 2016, 1–8.
- 46) Shafodino, F. S., Lusilao, J. M., & Mwapagha, L. M. (2023). Preparation of medicinally active extracts and phytochemical characterisation of phytoconstituents from medicinal plants. Natural Product Research, 111.
- 47) Singh, D., Mittal, N., Verma, S., Singh, A., & Siddiqui, M. H. (2023). Applications of some advanced sequencing, analytical, and computational approaches in medicinal plant research : a review. Molecular Biology Reports, 51(1).
- 48) Slameňová, D., Kubošková, K., Horváthová, E., & Robichová, S. (2002). Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in mammalian cells treated with H₂O₂ or visible light-excited Methylene Blue. Cancer Letters, 177(2), 145–153.
- 49) Sv, R. (2017b). Genotoxicity: Mechanisms, testing guidelines and methods. Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 1(5).
- 50) Turković, A. H., Durgo, K., Čučković, F., Ledenko, I., Krizmanić, T., Martinić, A., Cebin, A. V., Komes, D., & Milić, M. (2023). Reduction of oral pathogens and oxidative damage in the CAL 27 cell line by *Rosmarinus officinalis* L. and *Taraxacum officinale* Web. extracts. Journal of Ethnopharmacology, 316, 116761.
- 51) Üstündağ, Ü., Macar, O., Macar, T. K., Yalçın, E., & Çavuşoğlu, K. (2023). Effect of *Melissa officinalis* L. leaf extract on manganese-induced cyto-genotoxicity on *Allium cepa* L. Scientific Reports, 13(1)., Ü., Macar, O., Macar, T. K., Yalçın, E., &

- 52) Çavuşoğlu, K. (2023). Effect of *Melissa officinalis* L. leaf extract on manganese-induced cytotoxicity on *Allium cepa* L. Scientific Reports, 13(1).
- 53) Wang, T. Y., Li, Q., & Bi, K. S. (2018b). Bioactive flavonoids in medicinal plants : Structure, activity and biological fate. Asian Journal Of Pharmaceutical Sciences,
- 54) Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E., & Vardar-Sukan, F. (2010). Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. Plant Foods for Human Nutrition, 65(2), 158–163.
- 55) Macar, O., Macar, T. K., Yalçın, E., & Çavuşoğlu, K. (2023). Effect of *Melissa officinalis* L. leaf extract on manganese-induced cyto-genotoxicity on *Allium cepa* L. Scientific Reports, 13(1).