Ministère De L'enseignement Supérieur Et De

La Recherche Scientifique

Université de Médéa

Faculté des Sciences et de la Technologie

MÉMOIRE DE FIN D'ETUDES

En Vue de l'Obtention du Diplôme De Master

En : Génie des Procédés

Option : Génie des Procédés Pharmaceutiques

THEME

Extraction caractérisation, et évaluation de L'activité biologique des flavonoïdes de Rosmarinus officinalis L

Etudié Par :

Meghsel Amina

Chikioua Nabila

Proposé Par :

Dr .Krea Mohamed

M^elle^ Megateli Sarah

Promotion 2011/2012

REMERCIEMENTS

Nous remercions Allah qui nous a aidées à mener à bien ce modeste travail.

Nous exprimons nos remerciements à promoteur Dr Krea.M, pour la confiance qu'il nous a témoignée et pour avoir proposé ce sujet, comme nous lui exprimons notre Reconnaissance pour avoir dirigé ce travail.

Nous remercions chaleureusement notre Co- promotrice Mlle Megateli Sarah, pour sa gentillesse, ses conseils et son aide, mais aussi pour sa disponibilité absolue.
Nous exprimons notre profonde reconnaissance aux membres du jury qui nous font l'honneur de participer à l'examen de ce travail.
Le présent travail a été réalisé au sein du Laboratoire Matériaux et environnement au niveau du laboratoire de recherche à l'université de Médéa, le laboratoire physico-chimique du hall technologique ainsi que le laboratoire physico-chimique de l'unité antibiotical de SAIDAL (Médéa) :
Nous remercions Mr Cherif T, Mme boullala S, Mr Boukhatem R, Mlle Kraouch M et Melle Bouaisa.N
Pour nous avoir facilité nos travaux et mettre à notre disposition les moyens nécessaire à notre travail.
Nous remercions vivement les gents de la faculté des sciences et de la technologie, sans oublier, Mr Nedjioui M. le chef de département de génie des procédés à l'université de Médéa.
Nous remercions profondément Mr Baílliche M et Mlle Bachene A pour sa précieuse aide.
Enfin nous remercions infiniment nos parents qui nous ont soutenues et encouragées jusqu'au bout.

DÉDICACES

Je dédié ce lapidaire travail à :

Mes très chers parents qui m'ont guidé durant les moments les plus pénibles de ce long chemin, ma mère qui a été à mes côtés et ma soutenu durant toute ma vie, et mon père qui a sacrifié toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis.

Merci mes parents.

À mes très chères sœurs "Fatima-Kenza"

et mon frère "Ayoub"

À toute ma famille sans exception.

À tous mes amis et mes collègues.

À mes enseignants et enseignantes et spécialement a mon promoteur Krea Mohamed et mon copromoteur M^elle Megateli Sarah.

À tous les étudiants et étudiantes du génie des procédés pharmaceutiques promotion 2011-2012.

Amina

DÉDICACES

Tout d'abord, je remercie Allah qui m'a donné le courage et la volonté pour être ce que je suis. Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes qui me sont chères :

- *Mes très chers parents "Khadidja"et"Missoum", qui m'ont guidée depuis mon enfance vers le chemin du savoir jusqu'à la dernière minute, et ce n'est que grâce à leur amour, encouragement et prières que j'ai pu réaliser un de mes rêves. Que le Dieu garde à mes cotés.*
- *A mes sœurs bien aimées :"Yasmine","Raouia", Zoubida","Noura" et "Thouria "qui m'ont aidée et soutenue, je souhaite que Dieu les protège, les aide dans leurs études et embellisse leur vies.*
- *A mes frères :"Mohamed","Mahdi","Moussa", "Mouloud" et sa petite fille" Rahaf", qui m'ont aidé et encouragé, je leur souhaite plein de bonheur et de joie dans leurs vies.*
- *A mes grands parents que j'aime beaucoup, je ne les oublierai jamais.*
- *A mes tantes surtout" Cherifa" et mes oncles.*
- *A mes sœurs, amies et très chères : "Asma","Souad","Hakima".*
- *A mon amie et binôme "Amina", on a partagé de beaux moments durant ces cinq années d'études.*
- *A mes amies :"Fatiha","Siham","Chahrazed", "Samira","Lamia", "Dalila","Soumia "et "Sarah", je leur souhaite beaucoup de joie dans leurs vies.*

Nabila

ملخص

الهدف المحدد لهذه الدراسة هو عزل و تحديدالفلافونويدات الموجودة فيإكليل الجبل . الفلافونويدات تم استخلاصها بطريقتين التسخين التقليدي و التسخين بالتحريض الكهرومغناطيسي حيث اظهرت هذه الاخيرة تحسن هام في مردود المستخلص الخام (17,381%)ونسب البوليفينول (29,868 مغ/ غ) و الفلافونويدات (17,30 مغ/ غ) مقابل التسخين التقليدي (مردود المستخلص الخام= 10.709% ، نسب البوليفينول19.232 مغ/ غ و الفلافونويدات9.221 مغ/ غ) . أظهرت التحاليل الكمية والنوعية بتقنية الكروماتوغرافيا فوق الطبقة الرقيقة وجود كمية معتبرة من نوع البوليفينول مثل فلافون وفلافونول(كيرسيتين، ابيغينين ولوتيولين).

تمت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا بطريقة نشرالاجار وكشفت أن مختلف مستخلصات إكليل الجبل لها تأثير على مجموعة متنوعة من البكتيريا من سلالات غرام + وغرام - (عصيات، الإشريكية القولونية، المكورات العنقودية الذهبية، المكورات العنقودية البشروية، الرزمية الصفراء) والخميرة من نوع الفطريات المبيضة.

الكلمات الرئيسية : إكليل الجبل،الفلافونويدات، استخلاص ، التسخين بالتحريض الكهرومغناطيسي، نشاط مضاد للبكتيريا.

RÉSUMÉ

L'objectif assigné à cette étude est d'isoler et d'identifier les flavonoïdes de *Rosmarinus officinalis* L. Les flavonoïdes sont extraits par deux méthodes : chauffage à reflux classique et celui assistée par induction magnétique.Ce dernier a montré une amélioration assez importante en terme de rendement de taux des flavonoïdes et des polyphénols (R=17.381% ; Tp=29.868 mg EA G/g ; Tf=17.30 mgEQ/g) en comparaison avec le procédé d'extraction par chauffage classique à reflux(R=10.709٪ ; Tp=19.232 mg EAG/g ; Tf=9.22.1mgEQ/g). L'analyse quantitative et qualitative par chromatographie sur couche mince a montré une richesse en composés phénolique de type flavone et flavonols (Quercétine, lutéoline et apigénine).

Une étude antimicrobienne à été effectué par la méthode de diffusion sur gélose et a révélé une action antibactérienne importante des différents extraits de romarin vis-à-vis aux différentes souches bactériennes de type gram +et gram – étudiées (*Bacillus subtilus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Sarcina lutea)* et une levure de type *Candida albicans.*

Mots clés *: Rosmarinus officinalis* L, Flavonoïdes, Extraction, induction magnétique, Activité Antibactérienne.

ABSTRACT

The objective assigne for this study is to isolate and identify flavonoids from *Rosmarinus officinalis* L. Flavonoids have been extracted by two methods refluxing classical heating and that assisted by electromagnetic induction which showed asignificant improvement in terms of yield and the rate of flavonoids and polyphenols compared (R=17.381٪ ;TP=29.868 mg EAG/g .Tf=17.30mgEQ/g to conventional heating extraction(R=10.709٪ ;TP=19.232 mgEA G/g ; Tf=9.221 mgEQ/g) .The quantitative and qualitative analysis by thin layer chromatography (TLC) showed a wealth of phenolic compounds flavone and flavonol (Quercetin, luteolin and apigenin).

Antimicrobial study was perform by the agar diffusion method and revealed significant antibacterial action of different extracts of rosemary against a variety of bacterial strains type gram + and gram - (*Bacillus subtilus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Sarcina lutea)* and a type of yeast *Candida albicans.*

Keywords*: Rosmarinus officinalis* L, Flavonoids, Extraction, electromagnetic induction, Antimicrobial Activity.

SOMMAIRE

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale.....1

I. LES FLAVONOÏDES..... 3

I.1 Introduction 3

I.1 Présentation générale des polyphénols 3

I.1.1 Que sont les polyphénols ? Où les trouve-t-on ? 3

I.1.2 Classification de polyphénols 4

I.1.3 Biosynthèse des composés phénoliques 4

I.1.4 Rôle physiologique des composés phénoliques..... 4

I.2 Les flavonoïdes 5

I.2.1 Généralités 5

I.2.2 Structure et classification..... 5

I.2.3 Localisation et distribution 7

I.2.4 Biosynthèse des flavonoïdes.....10

I.2.5 Biodisponibilité..... 11

I.2.6 Intérêts des flavonoïdes thérapeutiques 12

I.2.7 Les propriétés des flavonoïdes..... 12

I.3 Conclusion 17

II. ETUDE DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* L..... 18

II.1 Introduction 18

II.2 Historique..... 18

II.3 Systématique 18

II.4 Etymologie..... 19

II.5 Description morphologique 19
II.6 Habitat et culture 19
II.7 Composition chimique du romarin 20
II.8 Propriétés thérapeutiques du romarin 20
II.8.1 Activité antibactérienne 20
II.8.2 Activité antifongique 21
II.8.3 Activité antioxydante 21
II.8.4 Activité anticarcinogène 21
II.8.5 Activité anti-acétylcholinestérase 22
II.8.6 Activité anti -hyperglycémiante 22
II.8.7 Activité anti-hépatotoxique 22
II.9 Domaine d'utilisation de la plante 23
II.9.1 Cuisine 23
II.9.2 Industrie agro-alimentaire 23
II.9.3 Phytothérapie 24
II.9.4 Industrie cosmétique et parfumerie 24
III.EXTRACTION ET CARACTÉRISATION DES FLAVONOÏDES 25
III.1 Introduction 25
III.2 L'extraction 25
III.2.1 Définition 25
III.2.2 Extraction solide –liquide 26
III.2.3 Extraction liquide-liquide 28
III.2.4 Les méthodes d'extraction 29
III.3 Séparation et purification des flavonoïdes 34
III.3.1 Chromatographie sur colonne (C.C) 34
III.3.2 Chromatographie sur papier (C.P) 35
III.3.3 Chromatographie d'adsorption 35
III.3.4 Chromatographie sur couche mince (CCM) 35
III.4 Identification des flavonoïdes 37

III.4.1 Tests de coloration 37
III.4.2 Chromatographie sur couche mince préparative 38
III.4.3 Spectroscopie UV 39
III.4.4 Chromatographie liquide haute performance (HPLC) 43
III.4.5 Spectroscopie IR 44
III.4.6 La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) 45
III.4.7 La spectrométrie de masse (SM) 45
IV.MATÉRIELS ET MÉTHODES 46
IV.1 Objectif 46
IV.2 Matériel végétal 46
IV.2.1 Teneur en eau 46
IV.3 Extraction des flavonoïdes 47
IV.3.1 Extraction par chauffage classique à reflux 47
IV.3.2 Extraction assistée par induction magnétique 48
IV.3.3 Fractionnement de l'extrait brut 50
IV.4 Rendements en polyphénols 51
IV.5 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes des divers extraits 51
IV.5.1 Détermination de la teneur en composés phénoliques 51
IV.5.2 Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux 53
IV.6 Séparation et identification des flavonoïdes 54
IV.6.1 Analyses qualitatives par chromatographie sur couche mince 54
IV.6.2 Analyses quantitatives par chromatographie sur couche mince (préparative) 56
IV.7 Etude de l'activité antibactérienne 58
IV.7.1 Les souches microbiennes utilisées 58
IV.7.2 Protocole Expérimentale 60
V. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS 62
V.1 Teneur en eau 62
V.2 Extraction et dosage des polyphénols et des flavonoïdes 62
V.2.1 Extraction 62

V.2.2 Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes 63
V.2.3 Résultats 64
V.2.4 Discussion 65
V.2.5 Conclusion 67
V.3 Analyse et identification des flavonoïdes 67
V.3.1 Analyse des flavonoïdes par Chromatographie sur couche mince analytique 67
V.3.2 Identification structurale des flavonoïdes par CCM préparative 69
V.3.3 Discussion 79
V.3.4 Conclusion 81
V.4 Résultats d'activité antimicrobienne 81
V.4.1 Sensibilité des germes aux extraits du romarin 82
V.4.2 Discussion 83
V.4.3 Conclusion 84

Conclusion générale 85

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1 : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes 9
Tableau III-1: Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques. 36
Tableau III-2 : Relation entre Rf et la structure flavonique.....37
Tableau III-3 : Différentes bandes d'absorption de quelques classes de flavonoïdes40
Tableau III-4: Les déplacements observés dans la présence des réactifs ajoutés …..42
Tableau IV-1: Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de polyamide. 55
Tableau IV-2: Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice. ..55
Tableau V-1: Rendement et couleurs des différents extraits de *Rosmarinus officinalis* L.....63
Tableau V-2:Mise en évidence des flavonoïdes dans les différents extraits du romarin. 63
Tableau V-3 : Evolution de taux de polyphénols et de flavonoïdes en fonction de type d'extraction.....64
Tableau V-4: Résultats de la séparation par CCM des extraits de *Rosmarinus officinalis* obtenus par deux méthodes d'extraction. 68
Tableau V-5: Résultats du l'étude spectrale de spot 1, phase d'acétate d'éthyle.....69
Tableau V-6:Résultats du l'étude spectrale de spot 3, phase d'acétate d'éthyle.....70
Tableau V-7:Résultats du l'étude spectrale de spot 1,phase du butanol 71
Tableau V-8:Résultats du l'étude spectrale de spot 3, phase du butanol 72
Tableau V-9:Résultats du l'étude spectrale de spot 5, phase du butanol 73
Tableau V-10:Résultats du l'étude spectrale de spot 1, phase d'acétate d'éthyle.....74
Tableau V-11:Résultats du l'étude spectrale de spot 2, phase d'acétate d'éthyle.....75
Tableau V-12:Résultats du l'étude spectrale de spot 4, phase d'acétate d'éthyle.....76
Tableau V-13 : Résultats du l'étude spectrale de spot 1,phase du butanol 77
Tableau V-14:Résultats du l'étude spectrale de spot 2, phase du butanol. 77
Tableau V-15:Résultats du l'étude spectrale de spot 4, phase du butanol. 78
Tableau V-16 : Les différentes structures obtenues par les deux méthodes d'extraction.....80
Tableau V-17: Diamètre des zones d'inhibition pour les deux méthodes d'extraction. ..81

LISTE DES FIGURES

Figure I-1: La structure de base des flavonoïdes 5
Figure I-2: Les différents familles des flavonoïdes 7
Figure I-3:Voie de biosynthèse des flavonoïdes 11
Figure II-1: Rosmarinus officinalis L(a), au période de floraison(b). 19
Figure III-1 : Mécanisme d'extraction..... 28
Figure III-2: Dispositif expérimental d'un extracteur Soxhlet 30
Figure III-3: Principe de l'induction électromagnétique 34
Figure III-4 : schéma du développement chromatographique d'une plaque 36
Figure III-5 : CCM préparative 38
Figure III-6: Systèmes de filtration 39
Figure III-7: Spectre d'absorption d'un flavonoïde 39
Figure III-8 : Réaction des flavonoïdes après addition de NaOAc et $NaOAc+H_3BO_3$ 41
Figure III-9 : Chromatographie HPLC 44
Figure IV-1 : Montage de l'extraction assistée par chauffage classique à reflux. 48
Figure IV-2 : Montage de l'extraction assistée par induction magnétique. 49
Figure IV-3 : Fractionnement de l'extrait brut de *Rosmarinus officinalis* L. 51
Figure IV-4:Organigramme représentant le dosage des polyphénols totaux. 52
Figure IV-5:Organigramme représentant le dosage des flavonoïdes. 53
Figure IV-6 : Cuve de CCM en verre..... 56
Figure IV-7: Protocole des séries spectrales. 57
Figure IV-8 : *Escherichia coli,* bacille Gram negative 59
Figure IV-9 : *Bacillus subtilus* bacille Gram positif 59
Figure IV-10 : *Candida albicans* 60
Figure V-1: Teneur en eau de *Rosmarinus officinalis* L. 62
Figure V-2: Test des flavonoïdes. 63
Figure V-3:L'évolution de rendement, taux de polyphénols et de flavonoïdes en fonction des méthodes d'extraction..... 65
Figure V-4: CCM analytique représentative des flavonoïdes de *Rosmarinus officinalis* L. .. 68
Figure V-5: Evolution de diamètre d'inhibition de deux souches (*Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*) en fonction des méthodes d'extraction..... 82
Figure I-6: Evolution de diamètre d'inhibition de deux souches (*Staphylococcus aureus* et *épidermidis*) en fonction des méthodes d'extraction 82

Figure I-7: Evolution de diamètre d'inhibition de deux souches (*Sarcina lutea* et *Condida albican*) en fonction des méthodes d'extraction…… 83

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: l'acide désoxyribonucléique.

ATP *:* Adénosine triphosphate.

AlCl3 : chlorure d'aluminium.

AcOEt: acétate d'éthyle.

ButOH : butanol.

CCM : chromatographie couche mince.

EFS: extraction par fluide supercritique.

EP: d'éther de pétrole.

$FeCl_3$: chlorure ferrique.

GHZ: gigahertz.

HIV: Human Immunodeficience Virus.

H_3BO_3 : acide borique.

HCl : acide chloridrique.

Hex : hexane.

HPLC: chromatographie liquide haute performance.

IR : infra rouge.

LDL : lipoprotéine de basse densité.

MEC : méthyléthylecétone.

MeOH : méthanol.

mg EAT/g : milligramme équivalent Acide tannique pour 100g de matière végétale sèche.

mg EQ/g : milligramme équivalent quercétine pour 100g de matière végétale sèche.

NaOAc : acétate de sodium.

NaOH : hydroxyde de sodium.

ppm: Partie par million.

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise.

RMN : résonance magnétique nucléaire.

UV : Ultraviolet.

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques.Environ 25 -30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons) [1].

En dépit de cela, dans les dernières décennies, principalement en raison de l'avancée de la chimie de synthèse, la recherche sur les produits naturels dans l'industrie pharmaceutique a connu un lent déclin [2].Toutefois, des données récentes de l'industrie pharmaceutique montrent que, pour certaines maladies complexes, les produits naturels représentent toujours une source extrêmement précieuse pour la production de nouvelles entités chimiques, car ils représentent des structures privilégiées choisies par les mécanismes d'évolution sur une période de millions d'années[3,4].

Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400 000 espèces végétales connues ont été étudiées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents [5].

La diversité des espèces utilisées et des métabolites secondaires déjà isolés laisse présager de l'ampleur de ce qui reste à découvrir. On considère effectivement que moins de 10 % des espèces de végétaux supérieurs qui peuplent la planète ont été explorées pour leurs propriétés chimiques et biologiques [6].

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi eux: les composés phénoliques, les terpènes, les stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques [7,8].

Les procédés d'extraction des flavonoïdes sont de variétés très courantes qui donnent les extraits les plus naturels propres à la consommation. Ces différentes techniques satisfaisant aux caractéristiques physico-chimiques de ces derniers en apportant des performances quantitatives et qualitatives sur les extraits obtenus.

Ce travail s'inscrit dans ce contexte, et constitue une suite logique des travaux menés dans le laboratoire Matériaux et Environnement de l'université de Médéa. Il vise à :

- Extraire des flavonoïdes de *Rosmarinus officinalis* L par deux précèdes d'extraction : chauffage classique à reflux et induction magnétique.
- Séparer et identifier des composés isolés par plusieurs techniques chromatographiques et spectroscopiques (CCM, UV).
- Etudier l'activité antimicrobienne des flavonoïdes.

Les principales parties de ce travail constituant cinq chapitres, sont traitées comme suit :

- Le premier chapitre, est consacré à l'étude bibliographique des flavonoïdes, renferme une présentation de leurs différentes structures chimiques, leur biosynthèse ainsi que leur intérêt thérapeutique.
- Le deuxième chapitre représente les travaux antérieurs consacrés à la description botanique de la plante, aux propriétés biologiques de *Rosmarinus officinales* L.
- Dans le troisième chapitre, nous aborderons les méthodes d'extraction ainsi que les analyses qualitatives et quantitatives des flavonoïdes contenus dans nos plantes d'intérêt. Nous développerons également l'utilisation de la chromatographie et de la spectroscopie (CCM, UV) comme outils d'analyse.
- Dans la partie expérimentale, nous développerons dans le premier chapitre le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour l'extraction, le dosage colorimétrique des polyphénols et des flavonoïdes, l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes et finalement une étude de l'activité antimicrobienne. Le deuxième chapitre sera consacré aux résultats obtenus dans notre étude suivis d'une discussion.

A la lumière des résultats obtenus, une conclusion générale et différentes perspectives de recherche seront évoquées.

I. Les flavonoïdes

I.1 Introduction

Les plantes produisent un grand nombre de composés, dont, jusqu'à il n' y a pas très longtemps, on ne connaissait pas le rôle pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires.

Des découvertes récentes ont montré que bon nombre d'entre eux ont un rôle défensif pour les plantes. Ils ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie: en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie.

Ils se sont surtout illustrés en thérapeutique et dépassent 100 000 substances identifiées [9]. Parmi eux : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes.Ces composés se trouvent dans toutes les parties des plantes mais ils sont distribués selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une plante à l'autre.

I.1 Présentation générale des polyphénols

I.1.1 Que sont les polyphénols ? Où les trouve-t-on ?

Les polyphénols sont des molécules aromatiques synthétisées par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales; c'est pourquoi 80٪ des composés phénoliques sont essentiellement localisés dans les tissus épidermiques de la plante.

Ce sont des phytoconstituants, généralement des pigments, responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge....).Ils sont associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation [10].

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycle benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles [11].La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simple (acides phénoliques simples) vers les molécules plus hautement polymérisées (tanins condensés) [12].

I.1.2 Classification de polyphénols

Il existe de nombreuses classes de polyphénols qui sont [13]:

- Quinones
- Coumarines
- Phloroglucinols
- Acides-phénoliques
- Flavonoïdes
- Anthocyanes
- Tanins

I.1.3 Biosynthèse des composés phénoliques

Les polyphénols sont synthétisés par-deux voies biosynthétiques, celle :

- De l'acide shikimique
- Issue de l'acétate

De plus, la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes [14].

I.1.4 Rôle physiologique des composés phénoliques

Les polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur des polyphénols [15].

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel [12].

Les polyphénols, qui forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, sont divisés en plusieurs catégories : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des

polyphénols ; les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes ; les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes qui existent en nombres considérables [16].

I.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils font partie de la classe des polyphénols, principaux métabolites secondaires des plantes.

I.2.1 Généralités

Le nom *flavonoïde* est dérivé du mot « Flavus » en latin, qui signifie jaune. L'intérêt nutritionnel pour les flavonoides date de la découverte de la vitamine C par *Szent Gyorgyi* en1938 [17].

Ce sont des composés phénoliques des végétaux qui constituent un groupe d'une extrême diversité. Plusieurs milliers de molécules ont été identifiées à ce jour [18]. Ce sont des pigments quasi universels des végétaux presque toujours hydrosolubles [6].

I.2.2 Structure et classification

Les flavonoïdes constituent une classe de composés présentant une grande variété de structures. Il en découle un grand nombre de classe de flavonoïdes.

I.2.2.1 Structure

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B)qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C)[19].Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6[20]en formant une structure de type diphényle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule[21](Figure I-1).

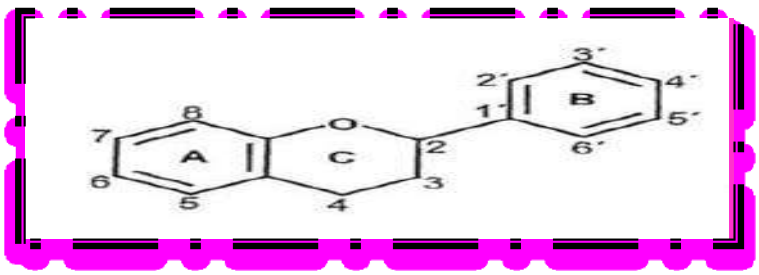


Figure I-1: La structure de base des flavonoïdes [16].

I.2.2.2 Classification

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique centrale, le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2,3(Figure I-2).

- Dans la position 2: le flavonoïde est appelé Flavane.
- Dans la position 4 de la flavane port un groupement carbonyl la flavane est appelé Flavanone.
- Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est nommé Flavone.
- Si le squelette est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle il est désigné par le nom de Flavonol.
- Dans la position3 : le flavonoïde est désigné par le terme Isoflavane [22].

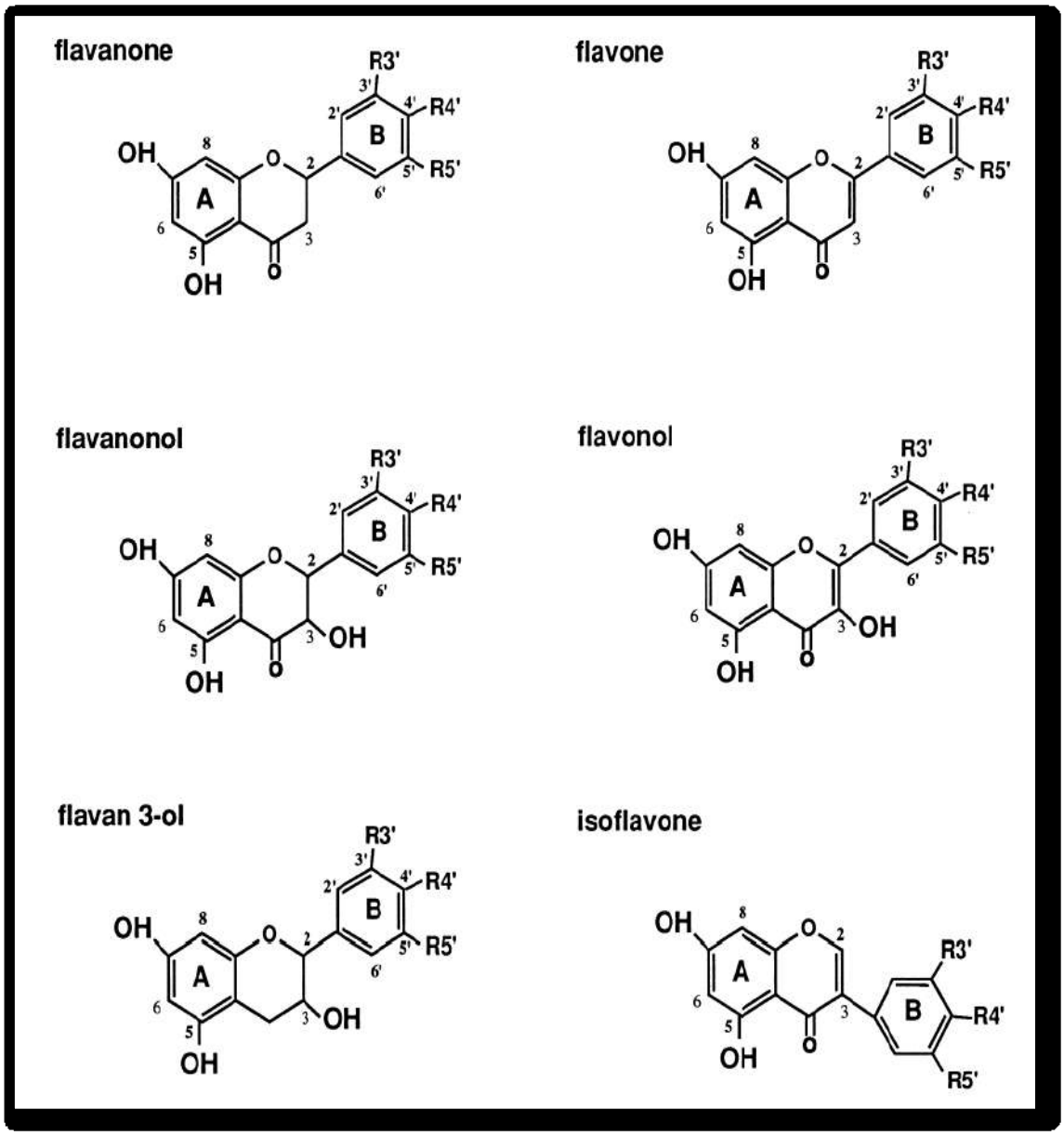


Figure I-2: Les différents familles des flavonoïdes [23].

I.2.3 Localisation et distribution

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants [24].D'une façon générale ,les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens[25],en effet, les anthocyanes et les flavonols sont largement distribués dans les fruits et

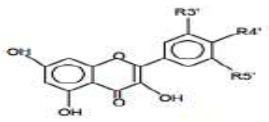
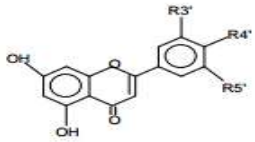
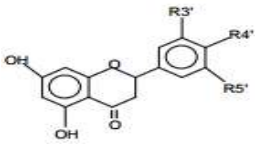
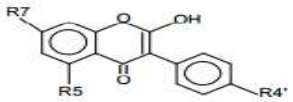
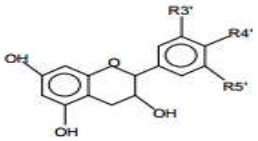
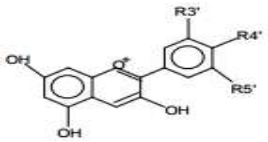
les légumes quand aux chalcones , considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes se retrouvent au niveau des pétales des fleurs.

Néanmoins, certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, c'est le cas des flavanones chez les agrumes et les isoflavones dans le soja [26]. Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles [27], la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique [28].

Les flavonoïdes se trouvent aussi chez les animaux, d'après Brewington et *al*, Lopez et Lindsay [29] ont isolé respectivement quinze et seize composés aromatiques à partir du lait de vache avec respectivement 6 et 5 composés importants dus principalement à la consommation des plantes par les herbivores. On trouve aussi la chrysine, la quercétine, de la galangine dans les propolis ; sécrétion des bourgeons de nombreux arbres (le bouleau, le sapin, le saule...) récoltés par les abeilles, ces insectes les fabriquent en modifiant la propolis par leurs enzymes salivaires. Les abeilles mettent en œuvre les propriétés antifongiques et antibactériennes des polyphénols pour aseptiser leurs ruches [20].

Le tableau I-1représente la distribution des principaux flavonoïdes dans certains aliments

Tableau I-1 : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes [19].

Flavonoïdes	Exemples	Aliments	Caractéristiques
Flavonols 	Qurcétine Kaempférol	Oignon,poireau,brocolis, pommes,chou frisé,vin rouge,thé.	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques.
Flavones 	Lutéoline Apigénine	Persil,céleri.	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques, les flavones se diffèrent des flavonols seulement par le manque d'un OH libre C3, ce qui affecte ainsi leur absorption aux UV ,les réactions de coloratipon.
Flavanonnes 	Naringénine Eriodicyol	Fruits du genre Citrus.	Sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3,le flavanone le plus abondant est la naringénine, isolée pour la prémière fois à partir des écorces de citrus.
Isoflavones 	Genisteine Daidzeine	Graines de soja et produits qui en dérivent.	Caractérisés par leut variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C3. Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée.
Flavan3-ols 	Catéchine Epicatéchine Epigallocatéchine	Vin rouge, thé noire, thévert,cacao,chocolat..	Flavan3-ols ainsi que flavan3,4diols sont tout les deux impliqués dans la biosynthèse de proanthocynidines (tanins condensés)par des condensations enzymatique et chimiques.
Anthoyanidines 	Cyanidine Delphénidine	Raisins, vin rouge,certaines variétés de céréales.	Représentent le groupe le plus important des substance colorées, ces pigments hydrosolubles contribuent à la coloration des angiospermes.

I.2.4 Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose.

Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose, mais par la voise du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en ρ-coumarate puis en ρ-coumaroyl-CoA.

Le ρ-coumaroyl-CoA et les 3malonyl-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone-isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone: la naringénine. Ce cycle s'hydrate en suite pour former les différentes classes de flavonoïdes [30]

(Figure I.3).

Des étapes ultérieures surtout de glycosylation et acylation amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle elles se trouvent *in vivo* [22].

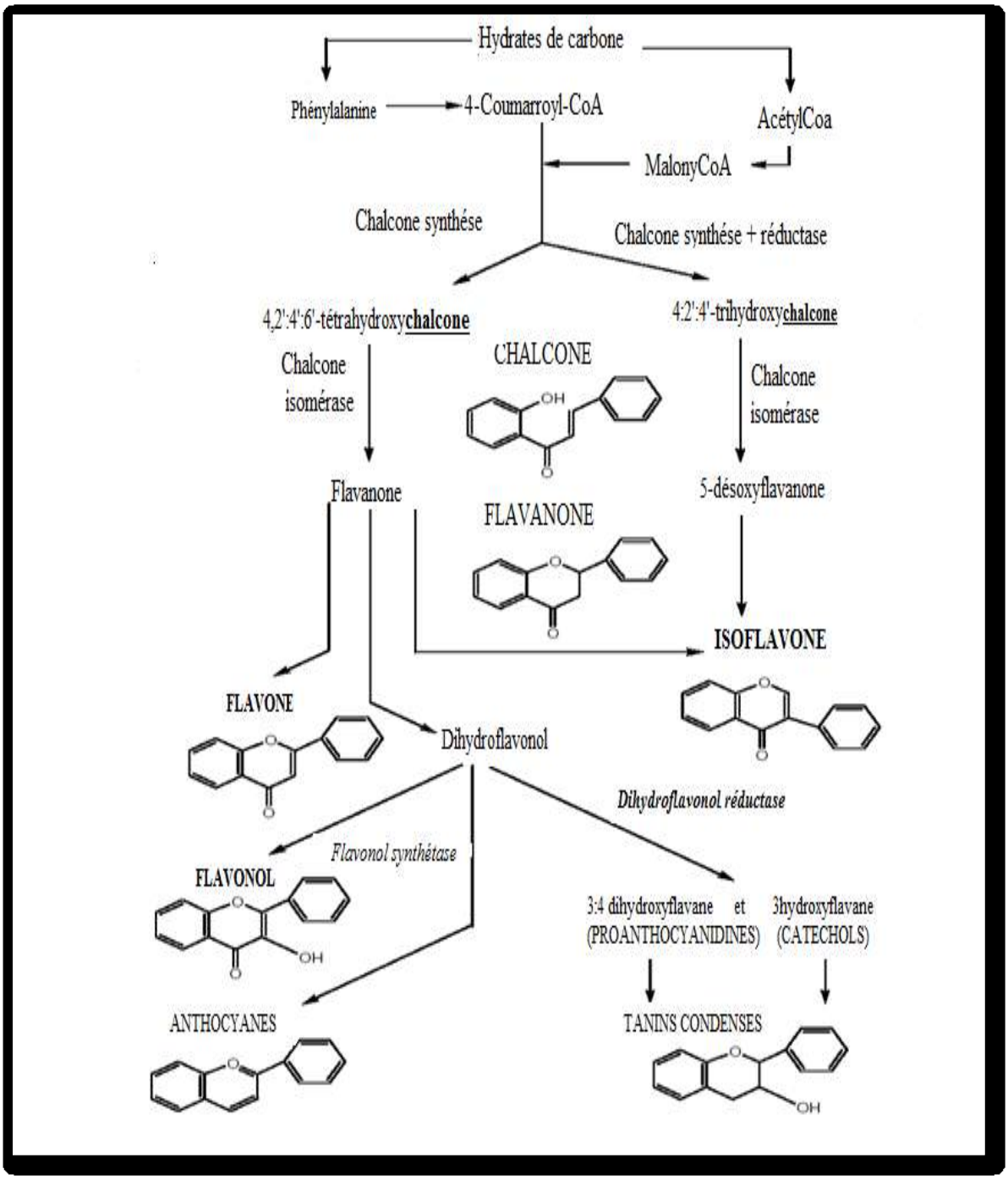


Figure I-3: Voie de biosynthèse des flavonoïdes [31].

I.2.5 Biodisponibilité

Les études de Vanessa et *al*. [32] montrent que la biodisponibilité dépend de trois facteurs essentiels :

La capacité de transport à travers la bordure en brosse des enthérocytes, l'intensité de la sécrétion intestinale des flavonoïdes conjugués vers la lumière intestinale et vers le sang et de la capacité de la sécrétion biliaire.

Les flavonoïdes présentent une fiable biodisponibilité avec une élimination lente qui diffère d'un flavonoïde à l'autre. En prenant comme exemple, la quercétine, le principal flavonoïde consommé par l'homme dans ses aliments (persil, oignon, myrtilles, cerises) [33], après 174min, un temps de demi-vie de distribution de 288 min et d'élimination de 1008 min [In vitro, le pouvoir antioxydant de nombreux flavonoïdes est supérieur à celui de la vitamine C et de la vitamine E [34].

I.2.6 Intérêts des flavonoïdes thérapeutiques

Parmi les nombreux avantages de la présence des flavonoïdes dans notre alimentation, on cite [35] :

- Inhibition des décharges de l'histamine, évitant ainsi la production des leucotriènes inflammatoires.
- Augmentation de la fluidité des membranes cellulaires.
- Réduction des réactions inflammatoires et des allergies.
- Rôle antiviraux, antitumoraux, anticancéreux.
- Renforcement du tonus et de l'élasticité des veines, surtout la diosmine et l'hespéridine qui améliorent la circulation périphérique, la résistance capillaire et la perméabilité vasculaire.
- Diminution des symptômes de ménopause comme les bouffées de chaleur et la sécheresse vaginale.

Ce rôle a été observé surtout pour les isoflavones du soja.

I.2.7 Les propriétés des flavonoïdes

I.2.7.1 Propriétés physico-chimiques des flavonoides

I.2.7.1.1 Solubilité

La solubilité des flavonoïdes dépend ; en grande partie, de la nature et du nombre de substituants : plus le nombre d'hydroxyles libres est élevé, plus ils sont solubles dans les solvants polaires et vise-versa [36].

Si en règle générale, les hétérosides sont solubles dans les alcools et l'eau, un certain nombre d'entre eux ont une solubilité peu marquée (rutoside, hespéridoside). Les génines(ou aglycones) sont soluble dans les solutions aqueuses d'hydroxydes alcalins [9].

I.2.7.1.2 Couleur et propriétés spectrales

Les flavonoïdes présentent une vaste gamme de couleurs. Cependant, certains sont incolores ; c'est le cas de flavonol, les flavan-3,4-diols, des flavanones, des flavanonols, des dihydrochalcones : ce sont les plus réduits. Quant aux anthocyanidines, elles se distinguent par une gamme de couleurs vives et variées allant du rose au violet-noir. Lorsque le nombre de substitution augmente dans les anthocyanidines, la coloration bleue devient plus intense (delphinidine), la methylation des groupes hydroxyles conduit au contraire au rouge (malvidine).

Pour les tons rouge, bleu et violet des anthocyanes (glycosides), d'autres facteurs interviennent ; le plus important est la formation de chélates avec les ions métalliques (Fe^{+3}, Al^{+3}, Cr^{+3}).La combinaison entre plusieurs types des flavonoïdes peut entrainer des changements importants de couleurs. Cette diversité de couleur fait que les flavonoïdes présentent des propriétés spectrales en UV et visibilité qui permettent de les distinguer [37].

I.2.7.2 Activités biologique des flavonoïdes

La plupart des flavonoïdes présentent des activités biologiques intéressantes telles que :

I.2.7.2.1 Activités antimicrobiennes

Les propriétés antimicrobiennes des flavonoïdes vis-à-vis de différents micro-organismes pathogènes ont été mises en évidence [38, 39, 40, 41].Les extraits de plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes ont été rapportés posséder une activité antimicrobienne [42, 43].Beaucoup de groupes de recherche ont isolé et identifié la structure des flavonoïdes qui possèdent l'activité antimicrobienne ou ont mesuré l'activité des flavonoïdes disponibles dans le commerce[44, 45, 46].

I.2.7.2.2 Activités antibactériennes

Les propriétés antibactériennes de propolis ont été attribuées à sa teneur élevée en flavonoïdes [47]. Sato et ses collaborateurs [48], ont démontré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *staphylococcus aureus*. Une étude plus récente a montré le pouvoir antibactérien d'un flavonoïde glycoside contre des souches de bactéries gram(+) et gram(-) [49], En raison de la capacité répandue des flavonoïdes d'inhibir la germination des spores pathogènes des plantes, on leur a proposé pour l'usage contre les microbes fongiques pathogènes de l'homme [50].Deux nouveaux flavonoïdes, un flavone et un flavanone,

respectivement isolés des fruits de *Terminalia bellerica* et de l'arbuste *Eysenhardtia texana* ont été montré comme posséder l'activité contre le microbe pathogène Opportuniste *Candida albicans*[51]. Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi* ont était rapportés exhibé une activité contre l'espèce *Aspergillus flavus*, une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez les patients Immunosuppressifs [52].

I.2.7.2.3 Activité antifongique

En raison de leur pouvoir inhibiteur de la germination des spores pathogènes des plantes, les flavonoïdes ont été proposés pour l'usage contre les microbes fongiques pathogènes de l'homme. Les flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi* possèdent une activité contre *Aspergillus flavus*, une espèce de mycète fréquente chez les patients Immunosuppressifs. Galangin, un flavonol généralement trouvé dans des échantillons de propolis a montré une activité inhibitrice contre *Aspergillus tamarii, Aspergillus flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* [53].

I.2.7.2.4 Activités antivirales

L'activité antivirale des flavonoïdes contre HIV peut être liée directement par leurs effets sur les enzymes responsables de sa réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 integrase) par ailleurs d'autres flavonoïdes montrait une activité antivirale contre le virus d'influenza, HIV-1, HIV-2. Quercétine, apigénine, catéchine et hesperédine sont parmi les flavonoïdes caractérisés par leurs propriétés antivirales contre onze types de virus [54].

Les flavonoïdes aglycones pourvus d'un groupement hydroxyle libre en C3 ont montré une bonne activité antivirale, les flavanes sont généralement plus efficaces que les flavones et les flavanones contre HIV-1et HIV-2 [55].

I.2.7.2.5 Activités antioxydantes

Les polyphénols et surtout les flavonoïdes sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macrot molécules [56]. En effet, les flavonoïdes sont des piégeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants générés en permanence par l'organisme humain ou formés en réponse à des agressions environnementales (tabagisme, polluants, infections)[57]. De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux tels que le cuivre et le fer qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres par les réactions de fenton et d'Haber-Weiss. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de l'oxydation des lipoprotéines de basse densité LDL [58], en effet, l'Homme ingère avec ses aliments environ 1 gramme de polyphénols

chaque jour, soit 10 fois plus que la vitamine C et 100 fois plus que les caroténoïdes ou de la vitamine E et l'on estime que les fruits et les légumes contribuent pour moitié à ces apports. Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas, parvenus aux niveaux des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité LDL, qui est l'un des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose [57].

I.2.7.2.6 Activité prooxydantes

Les flavonoïdes sont connus pour avoir des propriétés antioxydantes mais ils sont susceptibles d'avoir un effet prooxydant [59]. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'auto-oxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène [58].L'effet pro-oxydante de ces substance est le résultat de leur capacité à réduire les métaux comme le Fe^{+3} pour donner Fe^{+2} lequel réagira avec O_2 ou H_2O_2 avec génération d'initiateurs de l'oxydation. En définitive, certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides in vitro [59].

Cependant, le potentiel pro-oxydant de ces composés ne doit pas être négligé dans le mécanisme d'action des flavonoïdes.

I.2.7.2.7 Activités anti-inflammatoires

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T. Leur effet sur les lymphocytes B et T peut être variable : en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que la myricétine est active sue les lymphocytes B. L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine kinase C ou protéine tyrosine kinase) [60].Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes. La quercétine a un effet anti- inflammatoire en inhibant les enzymes de synthèse la cyclo-oxygénase (pour les postaglandines) et la li-oxygénase (pour les leucotriènes) des principaux médiateurs de l'inflammation [61].

I.2.7.2.8 Activités antiallergiques

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets antiallergiques. Ces effets sont attribués à leur influence sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca^{++}-dépendantes, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles [62].

I.2.7.2.9 Activités antidiabétiques

En raison de ses propriétés antioxydantes et de son long passé d'utilisation dans le traitement des désordres hépatiques, la Silymarine est utilisé pour décliner la glycémie chez des diabétiques [63]. D'autres études cliniques ont montré également l'efficacité de la Silymarine dans la régulation de la glycémie sanguine, qui descend d'une moyenne de 190mg/dl à 174mg/dl. Bien qu'une telle diminution des niveaux sanguins de sucre puisse augmenter le risque d'hypoglycémie [64].

I.2.7.2.10 Activités anti-tumorales

La plupart des flavonoïdes sont in vitro, antimutagènes ; quelques flavonols sont sur les mêmes modèles mutagènes et un petit nombre d'entre eux sont anti-cancérogènes et inhibiteur de la croissance des cellules tumorales in vitro [9].

Les effets anti-carcinogènes de la quercétine et d'autres flavonoïdes deviennent de plus en plus évidents [65].

I.2.7.2.11 Activités cardiovasculaires

Récemment, beaucoup d'études se sont concentrées sur les effets cardiovasculaires des flavonoïdes. Les rapports épidémiologiques ont démontré que les gens peuvent avoir une incidence plus limitée en maladies du cœur, s'ils ont une ingestion diététique élevée en flavonoïdes.

Parmi les 17 flavonoïdes examinés par Xu et ses collaborateurs [66], les agents de relaxation vasculaires les plus efficaces sont l'apigénine, lutéoline, kaempferol et la génisteine. Cette relaxation est attribuée à l'action directe des flavonoïdes sur le muscle lisse vasculaire.

I.2.7.2.12 Activité anticancérogènes

Récemment, une étude vise à évaluer l'effet hépatoprotecteur de plusieurs polyphénols, plus particulièrement des flavonoïdes sur les dommages causés à l'ADN des cellules

hépatiques par divers composés hépatotoxiques et carcinogènes (qui oxydent les bases, et cause la rupture des deux brins d'ADN).

La myricétine et la quercétine ont permis de diminuer la rupture des 2 brins d'ADN et le taux de pyrimidines oxydées, par contre ils n'ont aucun effet sur les purines oxydées. Les catéchines ont permis de limiter la rupture des deux brins d'ADN ainsi que l'oxydation des bases purines [67].

I.3 Conclusion

Il est indéniable que les flavonoïdes présentent d'importantes propriétés sur divers systèmes biologiques. Ces effets pourraient avoir des applications en thérapeutique. Mais toutes ces potentialités des flavonoïdes ne se sont pas encore concrétisées même si de nombreux travaux soutiennent l'utilisation possible de ces composés en thérapeutique.

Cependant, les dérivés de la rutine sont utilisés en thérapeutique pour améliorer la résistance capillaire. Les flavonoïdes sont les constituants habituels des vasculoprotecteurs et vei-notoniques utilisés en phlébologie. Par ailleurs, l'utilisation de plantes renfermant des flavonoïdes, seules ou en association, est en progression constante en raison :

- D'une demande croissante par les consommateurs de produits d'origine naturelle.
- De l'intérêt porté aux plantes alimentaires contenant cette classe de composés d'origine naturelle ayant des propriétés justifiant leur emploi dans la prophylaxie des maladies cardio-vasculaires et des cancers.

II. Etude de *Rosmarinus officinalis* L

II.1 Introduction

Les plantes, véritable usine chimique, ne cessent de nous épater encore et encore par la richesse des constituants qu'elles synthétisent que par les multiples utilisations qu'elles trouvent dans notre vie quotidienne. Cela nous fait ouvrir les yeux sur la terre, sur sa végétation et sur les possibilités médicinales car malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne l'homme n'a eu que les plantes pour le guérir et prévenir depuis la nuit des temps du fait que les plantes présentent des remèdes naturels bien acceptés par l'organisme.

La recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années et les laboratoires pharmaceutiques sont toujours prêts à l'élaboration de nouveaux composés actifs, à l'identification, à la caractérisation des molécules naturelles et à la mise au point des médicaments qui ont pour origine des substances naturelles et de s'inspirer de leurs structures moléculaires pour imaginer de nouveaux médicaments. Ces molécules que constitue le principe actif des plantes médicinales appartiennent majoritairement aux métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes et les huiles essentiels.

II.2 Historique

La plante *Rosmarinus officinalis* L est connue depuis l'antiquité, mais elle aurait au 16 ème siècle une renommée sans précédent, en Europe .D'après la petite histoire, la reine Isabelle de Hongrie aurait préparé elle même un élixir à base du romarin, grâce auquel elle aurait recouvrait santé (elle était malade) et vigueur, à l'âge de 70 ans [68].

Les anthropologues et les archéologues ont découvert que le romarin a été employé pour ses vertus médicinales, culinaires et cosmétiques en Egypte, Mesopotamia, Chine et en Inde antiques. Durant les épidémies de peste, cette plante était très populaire : on en faisait brûler des rameaux pour purifier l'air et on portait des sachets sur soi, que l'on respirait lorsqu'on passait dans les endroits touchés par cette terrible maladie.

Le romarin est sans doute une des plantes les plus populaires en Algérie, puisqu'il se rencontre dans tous les jardins et les parcs, en bordures odorantes dont les fleurs bleues, très intéressantes, s'épanouissent quasiment tout au long de l'année [69].

II.3 Systématique

La systématique adoptée est celle de Guy Gilly, [70].

Règne : Plantae

Sous-règne : Magnoliophyta

C**lasse :** Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : Rosmarinus

Espèse : Rosmarinus officinalis

II.4 Etymologie

Le nom latin rosmarinus est habituellement interprété, comme dérivé "ros" de la rosée et "marinus" d'appartenir à la mer, bien qu'elle se développe habituellement loin de la mer.

On a affirmé que cette interprétation est un produit d'étymologie traditionnelle, mais probablement le nom original est dérivé du grec "rhops" arbuste et "myron" baume [71].

II.5 Description morphologique

Arbuste, plante arbustive à port buissonnant. Hauteur pouvant dépasser 1m. Tige lignifiée intensément ramifiée à la base. Rameaux érigés parfaitement verticaux. Feuilles petites et étroites (Figure II-1(a)). Ayant l'aspect de petites aiguilles molles, dégageant une agréable odeur. Petites fleurs bleu-violet réparties le long des rameaux (Figure II-1 (b)) [72]



(a) **(b)**

Figure II-1: Rosmarinus officinalis L(a), au période de floraison(b).

II.6 Habitat et culture

Le romarin se cultive dans un endroit ensoleillé, dans un sol calcaire et bien drainé [73]. Bien que ce soit une plante aimant les climats chauds, il supporte les gelées si le sol ne conserve pas l'humidité. Idéalement, ce dernier doit avoir un pH compris entre 6.5 et 7.

Une légère taille au printemps après sa floraison a essentiellement pour but de lui conserver une forme harmonieuse. Il ne doit pas être rabattu trop court ; une branche de bois mort sans bourgeons ni feuilles ne formera pas de nouveaux. Son feuillage persistant et sa tenue rend propice l'utilisation de certaines variétés touffues à une utilisation en topiaire.

Il se multiplie facilement à l'automne par bouturage ou marcottage ; plus difficilement en été par semis car sa germination est lente [74].

II.7 Composition chimique du romarin

❖ Acides phénols : principalement l'acide carnosique, acide vanillique, carnosol, acide rosmarinique…. Ils ont une grande action antimicrobienne qui change d'une variété à une autre du romarin.Ce qui témoigne du changement de la teneur en polyphénols [75].

❖ Flavonoïdes : Cette plante est très riche en flavonoïdes, dont 07 sont principaux : lutéoline, ériocitrine, hespiridine, diosmine, isoscutellarin7- 0- glucoside, hispidulin7- 0- glucoside, genkwanine.

Ces composés sont localisés dans les feuilles, les fleurs, les racines et les tiges. Leur concentration change durant l'évolution de la plante [76,77].

❖ L'huile essentielle : L'huile essentielle du romarin (1 à 2% dans la plante) contient : de l' α -pinène (7 à80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 38%), de l'eucalyptol (1 à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène. En plus de l'huile essentielle on trouve dans le romarin : 2 à 4% de dérivés triterpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol ; des lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadia, des acides phénoliques , des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque , des acides gras organiques : l'acide citrique , glycolique et glycérique , des stérols, de la choline, du mucilage [78]et de la résine[79].

II.8 Propriétés thérapeutiques du romarin

Cette plante est utilisée en médicine en raison de ces différentes propriétés :

II.8.1 Activité antibactérienne

Plusieurs auteurs ont rapporté que certains composés présents dans les extraits du romarin possèdent des propriétés antibactériennes. Les effets des extraits aqueux et méthanoliques du romarin, sur la croissance du *streptococcus sobrinus* et sur l'activité extracellulaire de l'enzyme glucosyltransférase ont été étudiés. Les résultats ont suggéré que les extraits du

romarin peuvent empêcher les lésions de la carie en inhibant la croissance du *streptococcus sobrinus* et peuvent aussi éliminer la plaque dentaire par la surpression de l'activité de la glucosyltransférase [80].

Celikats et *al* [81] ont testé l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques et des huiles essentielles du romarin, rassemblé de trois différentes régions et pendant quatre intervalles de l'année. Leurs résultats ont indiqué que les bactéries testées étaient sensibles aux huiles essentielles et partiellement aux extraits méthanoliques et que l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques différents selon les variations régionales et saisonnières [81].

II.8.2 Activité antifongique

La biosynthèse de l'aflatoxine a été inhibée totalement par l'huile essentielle du romarin, à une concentration de 450 ppm. Selon les auteurs les résultats indiquent le potentiel de cette huile essentielle en tant que préservatif naturel contre *l'Aspergillus parasiticus* [82].

Les résultats ont montré que la plupart de ces huiles ont une activité inhibitrice modérée contre les cinq levures (*Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lypolitica*) examinées [83].

II.8.3 Activité antioxydante

L'activité anti-oxydante du romarin est connue depuis environ 30 années [84]. En raison de ses propriétés anti-oxydantes, le romarin est largement accepté en tant qu'une des épices qui a l'activité antioxydante la plus élevée.

Un déséquilibre entre les antioxydants et espèces réactives de l'oxygène se traduit par le stress oxydatif, conduisant à des dommages cellulaires.

Le stress oxydatif a été lié au cancer, le vieillissement, l'athérosclérose, les lésions ischémiques, l'inflammation et des maladies neurodégénératives (Parkinson et d'Alzheimer).

Les flavonoïdes de romarin peuvent aider à fournir une protection contre ces maladies en contribuant, ainsi que des vitamines antioxydantes et des enzymes, du système de défense antioxydant total du corps humain. Des études épidémiologiques [85] ont montré que l'apport

en flavonoïdes est inversement lié à la mortalité par maladie coronarienne et de l'incidence des crises cardiaques.

II.8.4 Activité anticarcinogène

Grâce à certains composants (carnosol, rasmaridiphénol, rosmanol et l'acide rosmarinique), le romarin est considéré comme une thérapie contre le cancer. Certaines études montrent que

l'extrait commercial du romarin et le carnosol sont des inhibiteurs des tumeurs mammaires, provoquées par le dimethylbenz anthracène chez les rats [86].

II.8.5 Activité anti-acétylcholinestérase

L'activité anti-radicalaire, anti-oxydante et anti-acétylcholinestérase des huiles essentielles, des extraits d'éthanol et de l'eau bouillante de cinq plantes aromatiques sont évaluées. Toutes les plantes ont montré une activité anti-acétylcholinestérase modérée et la meilleure activité inhibitrice a été montrée par l'huile essentielle du romarin [87].

L'huile essentielle, les extraits de : l'éther de pétrole ; acétate d'éthyle ; chloroforme ; méthanol du romarin et l'acide rosmarinique ont été examinés *in vitro* à des concentrations de 0.2, 0.5, et 1 mg/ml pour évaluer leurs activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase. L'inhibition des deux enzymes était non significative aux concentrations 0.2 et 0.5 mg/ml. A la concentration 1 mg/ml la butyrylcholinestérase a été inhibée respectivement par l'acide rosmarinique, l'extrait méthanolique, l'huile essentielle et l'extrait d'éther de pétrole, tandis que l'acétylcholinestérase a été inhibée seulement par l'huile essentielle du romarin [87].

II.8.6 Activité anti -hyperglycémiante

Les observations après l'administration orale de différentes doses de l'extrait ethanolique du romarin, à 3 groupes de lapins (lapins ayant une glycémie normale, lapins ayant une hyperglycémie provoquée par l'administration orale du glucose, lapins diabétiques d'alloxane) ont clairement montré que cet extrait exerce une activité hypoglycémiante et antihypoglycémiante remarquable à une dose de 200 mg /kg [88].

II.8.7 Activité anti-hépatotoxique

De nombreuses études ont été réalisées pour étudier l'effet anti-hépatotoxique du romarin. Le travail de Sotelo-Felix *et al.* [89] a été concentré pour l'évaluation de l'efficacité de l'extrait méthanolique du romarin pour normaliser certains paramètres histologiques et biochimiques du foie, après l'ingestion d'un hépatotoxine le tétrachlorure de carbone (CCl4).

Les résultats ont indiqué que cet extrait a empêché la peroxydation lipidique, l'inflammation, la nécrose, normalisé les taux de la bilirubine, le glycogène et l'activité de l'alanine aminotransférase et enfin il a augmenté l'activité du glutathion S-transférase (GST).

De même, l'hépatotoxicité induite par l'Azathioprine (AZA) chez les rats, a été évaluée en surveillant la fonction du foie après l'administration orale des extraits aqueux de 3 plantes (*Hibiscus sabdariffa, Rosmarinus officinalis et Salvia officinalis*).

Les résultats ont montré une réduction des taux de l'alanine aminotransférase, de l'aspartate aminotransférase, du malonialdehyde et la disparition de l'effet inhibiteur d'AZA sur les activités de la catalase (CAT), du glutathion (GSH) et du superoxyde dismutase(SOD)

Des souris sont soumises à des rayonnements (γ) pour étudier l'effet radioprotectecteur de l'extrait aqueux du romarin. Chez le groupe expérimental ils ont constaté une diminution de la peroxydation des lipides, accompagné d'une augmentation de la concentration de l'GSH et que les variations des paramètres biochimiques (taux du glycogène, des protéines, de la phosphatase acide et alcaline, du Cholestérol) ont était peu significatives. Certaines valeurs ont regagné presque la normale vers le 30ème jour, tandis que chez le groupe témoin les valeurs normales n'ont été jamais atteintes.

Les résultats de l'étude élaborée par Singletary [90] a montré le potentiel de l'extrait diététique du romarin et du carnosol de stimuler *in vivo* les activités des enzymes du foie, la quinone réductase(QR) et le GST.

II.9 Domaine d'utilisation de la plante

II.9.1 Cuisine

Le romarin est un aromate apprécié, aux utilisations culinaires diverses. On l'emploie dans les ragoûts et les civets, les soupes, les marinades, sur les grillades sous forme de feuilles séchées. On s'en sert aussi pour parfumer les flans et les confitures. Mais, la crème de romarin reste de loin la forme la plus utilisée [91].

II.9.2 Industrie agro-alimentaire

Les extraits végétaux du romarin présentent un pouvoir antioxydant important et peuvent être appliqués à la conservation des aliments et des huiles lipidiques [92,93], ces propriétés sont dues aux acides polyphénoliques (rosmarinique, caféique) [93,94].

- **Alimentation**

L'épice et l'huiles du romarin sont largement utilisés en alimentation, l'épice est utilisé dans les boissons alcooliques, les aliments cuits, viande et produits de viande, condiment et assaisonnement, les aliments industriels, casse-croûte, sauces et autres, avec le niveau maximum utilisé est d'environ 0.41٪ (4.098ppm) dans les aliments cuits. L'huile est utilisé dans les boissons alcoolisées et non, les desserts glacés, confiseries, aliments cuits, gélatines

et pouding, viande et produits de viande, condiments et assaisonnement, entre autres, avec le niveau maximum utilisé est d'environ 0.003٪ (26.2ppm) [92].

- **Alimentation diététique, Tisanes herbales**

Des infusions, des poudres, extraites sec ou autres préparation galéniques pour usage interne et externe, principalement contre les douleurs d'estomac [92, 94].

II.9.3 Phytothérapie

- Le romarin était déjà cité en médecine arabe classique pour ses propriétés hépatotrope, diurétique et emménagogue qui sont dues aux présences des flavonoïdes à savoir des glucosides de la lutéoline, de l'apigénine, et peut être de méthyl4'-genkwanine en synergie avec les acides phénolique [94].
- Les feuilles du romarin sont utilisées dans la phytomédcine européen pour brûlures d'estomacs et thérapie d'appui, des maladies rhumatismales ; en usage externe pour les problèmes de circulation ; en bains, l'herbe est utilisé comme stimulant externe pour l'accroissement sanguin fourni à la peau [26], C'est aussi excitant de cuir chevelu [28].
- On sait de longue temps que le romarin est cholagogue et cholétérétique, ces effets semblent en relation avec la présence de nombreux acides phénoliques signalés dans beaucoup de labiées, et qui sont ici les acides : caféique, chlorogénique néochlorogénique, reosmarinique, ce dernier, de saveur astringente, consistant en un depside caféique et dihydrocaféique [26,95].
- Les ditrepènes phénoliques présentant dans romarin tel que l'acide carnosique et le carnosol ont des effets d'inhibition contre des virus de HIV-1 et certains cancers et d'autre entrants dans fraction ont un effets carcinologique [92, 95, 96].

II.9.4 Industrie cosmétique et parfumerie

Au 19ème siècle l'essence du romarin servait à la préparation de la très célèbre eau de Cologne de la reine de Hongrie. Aujourd'hui elle rentre dans la composition, de savonnerie, détergents, crèmes et la plupart des eaux de Cologne ; le taux d'utilisation maximum est rapporté à 1٪ dans la dernière catégorie [98].

III. Extraction et caractérisation des flavonoïdes

III.1 Introduction

L'homme a en effet découvert très tôt les bienfaits des végétaux et les premières techniques pour en retirer ce que l'on appelle aujourd'hui un "extrait". Ces premiers extraits étaient obtenus par extraction aqueuse essentiellement ou fermentation alcoolique et selon des procédés tels que l'infusion, la macération, la décoction. La simplicité de ces procédés, les outils, les matériaux [97].

Aujourd'hui les recherches dans le domaine de la chimie ont permis de développer des thématiques visant à mettre en œuvre des méthodes de plus en plus performantes, car cette industrie s'est intéressée au rendement et à la qualité des extraits.

Le mode d'extraction de flavonoïde dépend naturellement, de la nature et de l'eau contenue dans la matériel végétal ; et du type de substance que l'on veut isoler. Ces méthodes permettent de séparer les flavonoïdes selon leur structure et leur degré de polarisation.

Les extraits issus de l'extraction, sont toujours de composition très complexe et nécessité donc une séparation et une purification. Cela se fait généralement par plusieurs méthodes.

III.2 L'extraction

III.2.1 Définition

L'extraction est une technique de séparation en génie chimique. Cette technique utilise un moyen d'extraction pour séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de propriétés chimiques ou physiques [98]. Elle permet de solubiliser les métabolites de la matière végétale en laissant la matrice cellulaire insoluble. Les produits ainsi obtenus sont des mélanges complexes de métabolites sous forme de liquides, semi-solides ou sous forme de poudres après évaporation du solvant [99].

Quelle que soit la technique choisie pour effectuer l`extraction, on vise généralement les objectifs suivants :

- Faire usage du matériau de départ broyé à une granulométrie pratique et uniforme, non excessivement fine pour éviter toute incidence de colmatage.
- Utiliser des volumes de solvant minimaux.
- Transférer le maximum de molécules « cibles » du matériau solide vers le solvant.
- Assurer ce transfert d'une manière hautement spécifique, réduisant le besoin de toute ou purification additionnelle pour éliminer les molécules indésirables.
- Effectuer l'extraction dans un laps de temps (de contact) le plus court possible.
- Éviter de laisser une quantité excessive de solvant dans le résidu d`extraction.
- Accomplir ceci dans des conditions ambiantes ou nécessitant un minimum d`énergie thermique et mécanique [100].

III.2.2 Extraction solide –liquide

III.2.2.1 Principe

L'extraction solide-liquide est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire, de séparer, de dissoudre soit par immersion soit par percolation d'un liquide, un ou plusieurs composants (liquide ou solide) mélangés à un solide.

C'est une opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide, qui contient la matière à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction La complexité de la structure et la variabilité (avec les saisons, les récoltes, . . .) de la matière végétale ainsi que la large variété des composés à extraire (différents poids moléculaires, polarité, lien avec la structure, . . .) ont conduit à l'apparition d'une grande variété de technologies d'extraction [101].

III.2.2.2 Mécanisme d'extraction

L'extraction solide/liquide est réalisée par contact intime entre le solide et le solvant. Au cours de l'extraction, la concentration du soluté dans le solide varie sans interruption, ce qui explique un état non stationnaire de transfert de matière. Une série de processus successifs ont lieu traduisant l'interaction entre le solide contenant initialement le soluté, et le solvant effectuant la séparation ; ces processus concernent :

1. La diffusion du solvant au sein de la matrice solide,

2. La dissolution du soluté dans le solvant,

3. La diffusion du soluté dissous dans le solvant de la matrice solide vers la surface,

4. Le transfert par convection ou diffusion du soluté contenu dans la solution près du solvant vers la masse restante du solvant [102].

III.2.2.3 Facteurs influençant les performances de l'extraction

- **Taille des particules**

Tous les auteurs s'accordent sur l'effet généralement positif du broyage sur les opérations d'extraction. Le broyage du solide permet d'intensifier les phénomènes de transfert du solvant à travers l'augmentation de la surface spécifique (surface d'échange entre le solvant et le solide) mais également la réduction de la distance de pénétration dans le matériel.

En effet, à taux de solide donné, la surface de contact entre le solide et le liquide augmente lorsque la taille de la particule diminue à travers l'augmentation de la surface spécifique.

- **La nature du solvant**

Un solvant est définit comme étant une substance qui a le pouvoir de former avec d'autres substances une solution homogène .Un solvant d'extraction est choisi en fonction de :

- Ses propriétés physiques : densité, viscosité, point d'ébullition, chaleur spécifique, etc. déterminant les conditions de l'épuisement, vitesse d'écoulement et de filtration, conditions de distillation et de concentration, pertes par volatilisation, …,
- La nature des principes à dissoudre,
- Ses caractéristiques économiques et son prix de revient.

Le solvant doit être sélectif, posséder une grande capacité de dissolution, une température d'ébullition peu élevée, une faible viscosité et être, si possible, non toxique, ininflammable, et non explosif [102].

- **La température**

L'élévation de la température favorise généralement l'accroissement de la solubilité et de la diffusivité du soluté et la diminution de la viscosité de la solution. La température

opératoire est limitée par les risques d'extraire des composés nuisibles, par les risques de dégradation thermique du soluté et par la sécurité de l'installation (risque d'incendie).

- **Temps d'extraction**

Les quantités de substances extraites sont fonction du temps de séjour du matériel au sein du solvant (temps nécessaire à la pénétration du solvant à l'intérieur des vacuoles, dissolution du composé, etc).

Généralement, une élévation de la température traduisant l'agitation moléculaire permet de diminuer les temps de contact, et ce, sans diminution notable du rendement.

- **Degré d'agitation**

L'agitation mécanique des particules dans le solvant, qui permet leur maintien en suspension et l'homogénéisation du milieu, a un effet toujours favorable sur l'opération.

- **Humidité**

Lors de l'utilisation de solvants hydrophobes, la diffusivité est inversement proportionnelle à la teneur en eau du solide [103].

III.2.3 Extraction liquide-liquide

III.2.3.1 Principe

Le principe de base de l'extraction liquide-liquide est la différence de solubilités, dans des conditions d'équilibre, des composants d'un mélange entre deux phases liquides immiscibles ou partiellement miscibles. Le transfert d'un soluté d'une phase à l'autre aboutit, si le temps de contact est suffisant, à un état d'équilibre, pour lequel les compositions des phases sont constantes.

III.2.3.2 Mécanisme d'extraction

L'extraction proprement dite est réalisée par le contact intime de la solution contenant le soluté à extraire dissout dans le diluant et du solvant, puis suivie par la décantation des deux phases (Figure III-1).

On obtient ainsi une phase riche en soluté qu'on appelle EXTRAIT et une phase pauvre en soluté appelée RAFFINAT.

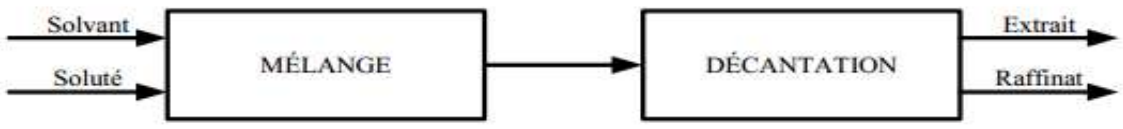


Figure III-1 : Mécanisme d'extraction.

L'extrait est ensuite traité de manière à séparer le soluté et le solvant, notamment par évaporation ou distillation. La nécessité de récupérer des solvants coûteux est très importante pour l'économie du procédé.

- **Coefficient de partage**

Le partage d'un soluté entre les deux phases liquides à l'équilibre est donnée par le coefficient de partage K. Cette grandeur se définit comme le rapport des teneurs respectives du soluté dans l'extrait et le raffinat, lorsque l'équilibre des teneurs en soluté des phases est réalisé.

$$\mathbf{k} = \frac{\textbf{Teneur en soluté dans l'extrait}}{\textbf{Teneur en soluté dans le raffinat}} = \frac{\mathbf{y}}{\mathbf{x}} \qquad \textbf{III-1}$$

Le coefficient de partage varie avec la nature du soluté et du solvant et généralement avec les teneurs en soluté d'un mélange donné. Il change aussi avec la température [104].

III.2.4 Les méthodes d'extraction

On peut classer les techniques d'extraction en deux grands groupes : les techniques « classiques » et les techniques «émergentes ».

III.2.4.1 Les techniques classiques

Les opérations de l'extraction classiques regroupent plusieurs méthodes différentes énumérées ci-après :

III.2.4.1.1 Extraction au Soxhlet

- **Principe**

L'extraction par Soxhlet, qui a été employé pendant longtemps, est une technique standard et la référence principale pour évaluer la performance d'autres méthodes d'extraction solide-liquide. L'extraction par Soxhlet est une technique générale et bien établie, et qui dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction, excepté dans le cas de l'extraction des composés thermolabiles.

Dans un système conventionnel de Soxhlet comme montré dans la Figure III-2, la matière végétale est placée dans une cartouche, et remplie de solvant frais condensé à partir d'un ballon

à distiller. Quand le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire la solution de la cartouche et la décharge de nouveau dans le ballon à distiller, portant les corps dissous extraits dans le liquide en bloc.

Dans le ballon, le corps dissous (soluté) est séparé du solvant par distillation. Le soluté reste dans le flacon et le solvant frais passe de nouveau dans le lit de solide. L'opération est répétée jusqu'à ce que l'extraction complète soit réalisée [7].

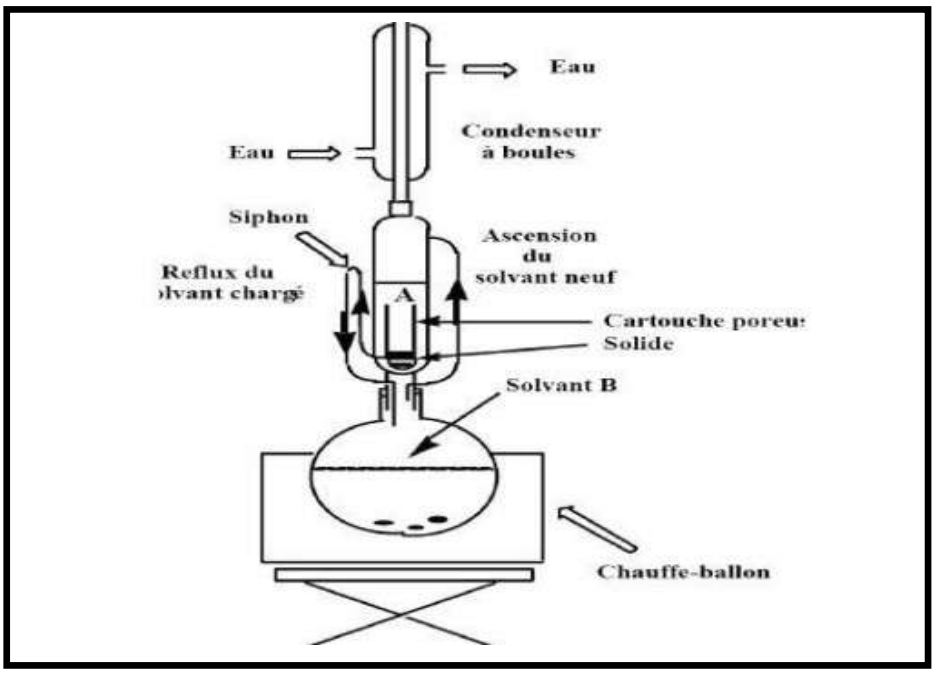


Figure III-2: Dispositif expérimental d'un extracteur Soxhlet [102].

III.2.4.1.2 L'Hydrodistillation

L' hydrodistillation est une expérience d'extraction. Elle consiste à extraire le principe actif d'une plante. Son principe consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau, ensuite l'ensemble est porté à ébullition sous pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures [105].

III.2.4.1.3 La macération

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante. La macération ne doit être confondue avec l'infusion ou la décoction[103].

III.2.4.1.4 L'infusion

C'est la mise en suspension d'un solide dans un liquide chaud ou l'arrosage du solide, par ce liquide afin de dissoudre les constituants utiles suivi du refroidissement du mélange.

III.2.4.1.5 La décoction

C'est l'opération dans laquelle le solide est mis à bouillir dans un liquide en vue d'extraire les parties solubles.

III.2.4.1.6 L'expression

Ou pressage Cette opération consiste à « faire sortir » un produit en exerçant une pression.

III.2.4.1.7 L'enfleurage

L'enfleurage à froid, le plus ancien des procédés, est aujourd'hui presque totalement abandonné. Il était principalement utilisé pour les fleurs fragiles (exemple : violette) qui ne supportent pas la chaleur. On dépose les fleurs sur des châssis de verre enduits de graisse. On laisse reposer : la graisse absorbe les molécules odorantes. On renouvelle les fleurs souvent jusqu'à saturation de la graisse [106].

III.2.4.1.8 La percolation

L'extraction est obtenue par passage lent et régulier d'un solvant au travers d'une poudre de drogue placée dans un percolateur. Les quantités de drogues et de solvants, la durée et le débit de l'écoulement, la température et l'agitation, la granulométrie de la drogue, le type d'appareil utilisé sont autant de paramètres de nature à influer sur l'extraction [106].

III.2.4.2 Les techniques émergentes

Parmi les différentes méthodes émergentes on peut citer :

III.2.4.2.1 Extraction assistée par ultrasons

Cette technique est apparue en 1950, avec des équipements de taille de laboratoire. Elle représente une adaptation de l'hydro distillation ou de l'extraction par solvant organique. En effet la matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant, et dans le même temps, elle est soumise à l'action des ultrasons. Cette technique et été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique [107].

III.2.4.2.2 Extraction assistée par micro-ondes

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ces procédés, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte clos dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entrainés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classique condensation, refroidissement, et décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé [108].

III.2.4.2.3 Extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique (SFE) est une technique alternative dont le but est à la fois de réduire l'utilisation de solvants organiques et d'augmenter le rendement d'extraction.

Le point critique d'une substance pure est défini comme le plus haut point de température et de pression auquel la substance est à l'état d'équilibre liquide-vapeur. Au-dessus de ce point, un fluide se forme et cet état est appelé l'état supercritique. Ainsi le fluide supercritique possède les caractéristiques à la fois du gaz et du liquide. Le fluide supercritique peut dissoudre une large variété de composés organiques et son pouvoir de solvant peut être modifié autour de son point critique en faisant varier légèrement la température ou la pression. Ce fluide possède des propriétés supérieures de transfert de masse en vertu de sa faible viscosité, sa faible tension de surface et de son fort coefficient de diffusion. Il peut pénétrer les micropores des matériaux [109].

III.2.4.2.4 Extraction assisté par induction électromagnétique

La part d'électricité entrant dans la consommation totale nette d'énergie des industries chimiques est de 42%, car elle est utilisée essentiellement pour la force motrice et pour l'électrolyse aqueuse.

D'une manière générale, l'industrie chimique évoluera d'autant plus vers les solutions électriques qu'elle y trouvera:

- Des techniques fiables, donc des frais d'entretien réduits.
- Une finesse de régulation.
- Des effets positifs sur l'environnement.
- Des adaptations simples pour les procédés déjà en place [110].

Dans ce sens, la conquête de nouveaux marchés a lancé l'induction dans des secteurs nouveaux et, en particulier, vers la chimie et vers le grand public. Grâce à l'apparition de composants de commutation plus rapide, des utilisations à plus haute fréquence ont pu être développées pour des matériaux non métalliques. Ces dernières années ont donc vu émerger des applications nouvelles présentant un fort caractère innovant [111].

Le chauffage par induction est une technique électrothermique permettant de chauffer des matériaux conducteurs d'électricité, sans contact matériel avec une source électrique [112].

- **Principe**

Tout conducteur appelé alors inducteur parcouru par un courant périodique crée un champ magnétique, lui aussi périodique, qui engendre des courants induits (dits de Foucault) dans un autre conducteur placé dans ce champ comme il est illustré dans la Figure III-3. Ce courant induit produit alors de la chaleur par effet Joule dans le conducteur où il a pris naissance [113].

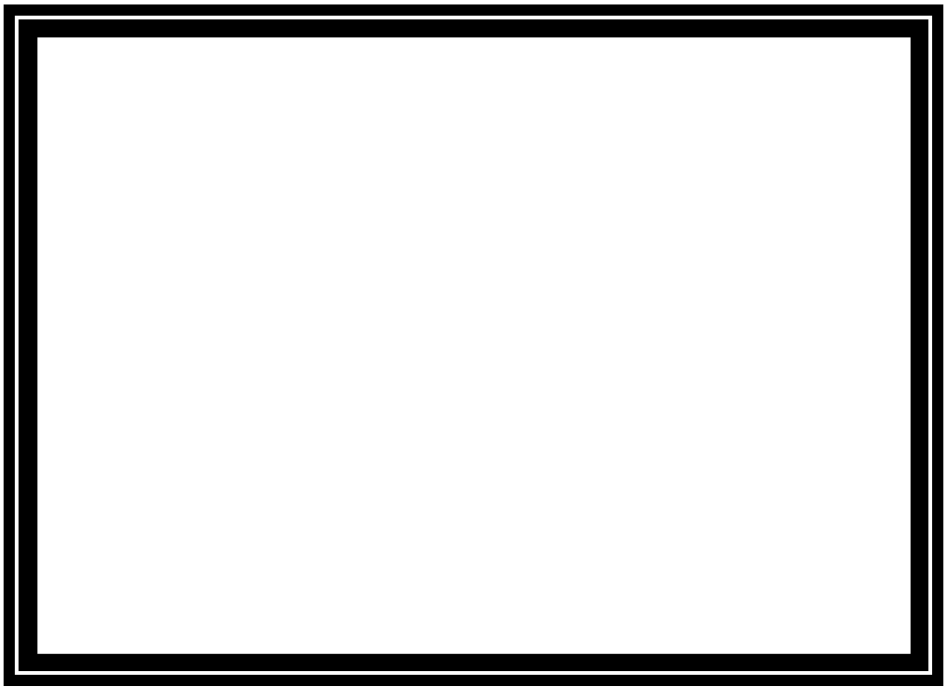


Figure III-3: Principe de l'induction électromagnétique [113].

A l'inverse des systèmes de chauffage à fluide caloporteur, le chauffage par induction, en imposant non pas une température de surface, mais un flux d'énergie, permet un meilleur respect des écarts thermiques tolérables entre la paroi et le produit.

Pour aboutir à un fonctionnement industriel, un réacteur chauffé par induction doit associer un système d'inducteurs, un système de refroidissement, et une cuve réalisée dans un matériau compatible avec les réactifs employés [10].

Parmi les techniques d'extraction décrites précédemment, plusieurs aboutissent à l'obtention d'un extrait brut dissous dans un certain volume de solvant. Plusieurs méthodes permettent de séparer les composés de ces extraits selon leur structure et leur degré de polymérisation.

III.3 Séparation et purification des flavonoïdes

Les extraits issus de l'extraction, sont toujours de composition chimique très complexe et nécessite donc séparation et une purification. Plusieurs techniques sont utilisées, soit individuellement, soit combinées.

III.3.1 Chromatographie sur colonne (C.C)

Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme gel de silice, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants

comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités importantes de mélanges complexes .

L'élution peut se faire sous forme isocratique ou sous forme d'un gradient. En principe, la phase mobile est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour la CCM analytique. Toutefois, l'élution peut-être accélérée grâce à l'addition progressive de solvant de plus en plus polaire par rapport à la phase initiale [114].

III.3.2 Chromatographie sur papier (C.P)

Il s'agit de la méthode chromatographique la plus ancienne permettant de séparer des mélanges complexes de composés polaires, comme les glycosides.

Encore aujourd'hui, malgré l'avènement de technique de purification de pointe ,la chromatographie sur papier reste couramment employée, en raison de son faible coût, de sa facilité d'utilisation et de son efficacité de séparation. La CP sert à la fois de technique d'analyse et de méthode de purification des composés présents dans un extrait végétal[115].

III.3.3 Chromatographie d'adsorption

La chromatographie d'adsorption est une opération physique de séparation des mélanges, celle-ci permet une élimination d'une substance par une autre de la phase gazeuse ou liquide, dans laquelle elle se trouve. Généralement utilisée pour la séparation des colorants, des protéines, des alcaloïdes etc [116].

III.3.4 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode facile à mettre en œuvre. Elle donne l'avantage de nécessiter peu de matériel et de fournir des résultats facilement interprétables et toujours très reproductibles [111].

A l'origine, la CCM a été utilisée pour la séparation des substances colorées (d 'ou son nom).Aujourd'hui, elle est considérée comme une méthode puissante pour les analyses qualitatives et quantitatives. Aussi, permet-elle de suivre l'évolution d'une réaction et de tester la pureté d'un solvant.

III.3.4.1 Principe de la CCM

La séparation des constituants du dépôt se fait à l'aide de deux phases : une phase mobile qui est un solvant ou un mélange de solvants et une phase stationnaire qui est un adsorbant maintenu sur une plaque de verre ou de plastique rigide.

L'échantillon à analyser doit se trouver dans un solvant volatil .Le dépôt se fait alors sur une extrémité de la phase stationnaire.

Les constituants de l'échantillon sont alors élués (entraînés) par la phase mobile qui monte par capillarité vers le haut de la plaque **(**Figure III-4**)** [117].

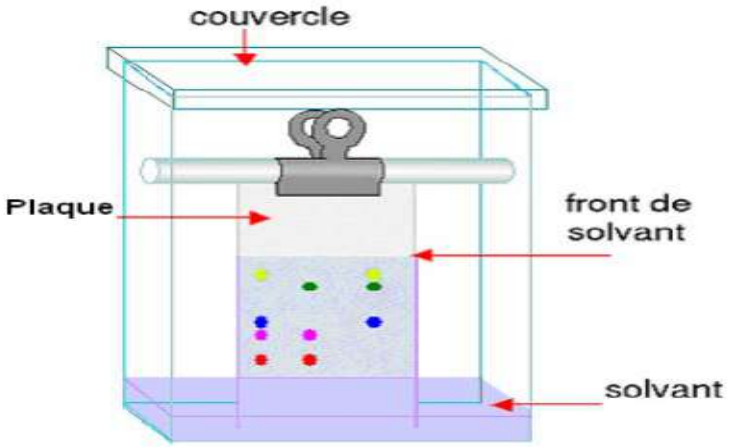


Figure III-4 : schéma du développement chromatographique d'une plaque [117].

III.3.4.2 La fluorescence sous lumière de Wood

L'absorption des substances flavoniques sous lumière de Wood à la longueur d'onde de 365nm donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique. Le

Tableau III-1montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [118].

Tableau III-1: Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques.

La fluorescence	Les structures possibles
Violette noire	Flavones avec 5-OH Flavonol avec 3-OR ,5-OH, 4'-OH Chalcones.
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH libre en5. Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH.
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH et avec ou sans 5-OH.
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH

III.3.4.3 Facteur de retardement (Rf)

❖ **Relation : structure –Rf**

Les indications que peuvent apporter ces deux propriétés constituent pour tout photochimiste qui s'intéresse aux structures des flavonoïdes un atout considérable.

En effet, alors que la fluorescence permet de distinguer un flavone d'un flavonol, les valeurs des Rf effectués sur des systèmes chromatographiques spécifiques ou conventionnels peuvent si elles sont bien utilisées, apporter beaucoup d'indications. Ce dernier point permet effectivement de classer les composés à analyser selon la nature des substituant présents sur ces squelettes **(**Tableau III-2**)** [119].

La valeur de Rf est définie comme suit :

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant}} \qquad \textbf{III-2}$$

Tableau III-2 : Relation entre R_f et la structure flavonique.

Structure flavonique	Rf (Rapport frontal)
Augmentation des OH	-Diminution du Rf dans un solvant lipophile
Glycosylation	-Rf augmente dans un solvant aqueux -Rf augmente dans un solvant alcoolique
Hydroxyles méthyles	-Rf augmente dans un solvant alcoolique
Méthylation d'un OH en C5	-Rf augmente dans un solvant alcoolique
Hétérosides de flavones avec 3-OH	-Rf nul dans l'eau

III.4 Identification des flavonoïdes

L'identification des flavonoides est réalisée à l'aide de tests de coloration et des autres méthodes (UV, IR, RMN,…..).

III.4.1 Tests de coloration

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques qui répondent positivement au test au chlorure ferrique (FeCl3) et au test de Shinoda. [120].

III.4.1.1 Test au chlorure ferrique (FeCl3)

A une solution alcoolique de produit, on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique. La présence des phénols se manifeste par un changement de coloration qui vire au vert.

III.4.1.2 Test de Shinoda

En présence de quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) concentré, l'extrait alcoolique contenant des produits de la classe des flavonoïdes donne immédiatement une coloration rouge ou pourpre

III.4.2 Chromatographie sur couche mince préparative

La CCM préparative est une technique chromatographique utilisée dans la séparation et l'isolement de divers métabolites présents dans un mélange peu ou pas complexe. Elle dérive de la chromatographie sur couche mince mais dans ce cas, les zones de silice correspondants aux taches sont récupérées de la plaque contrairement à la CCM analytique(figure III.4). A cette différence s'ajoutela quantité d'échantillons appliquée sur la plaque chromatographique (20mg à 40mg) ainsi que l'épaisseur de la couche du gel de silice sur la plaque **(**Figure III-5**)** [101].

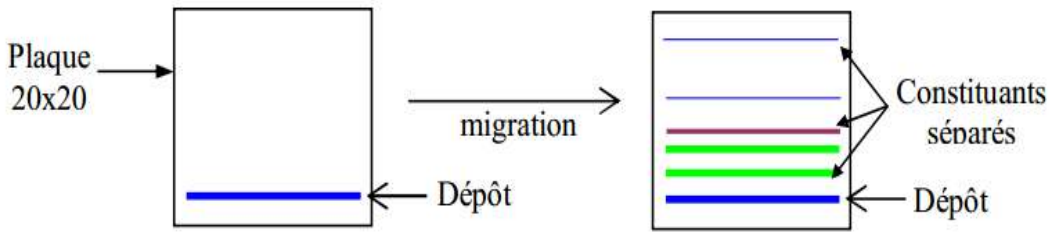


Figure III-5 : CCM préparative [98].

III.4.2.1 Filtration des solutions du gel

La filtration des solutions méthanoliques des parties du gel grattées permet de séparer les polyphénols de ces dernières sur lesquelles elles se sont absorbées lors de la migration du système solvant. Les solutions de gel sont mises dans des seringues reliées à des filtres.

Ces derniers retiennent le gel en laissant passer le méthanol chargé des polyphénols séparés. Les solutions méthanoliques obtenues alors sont prêtes pour les séries spectrales (identification spectrale) (Figure III-6) [18].

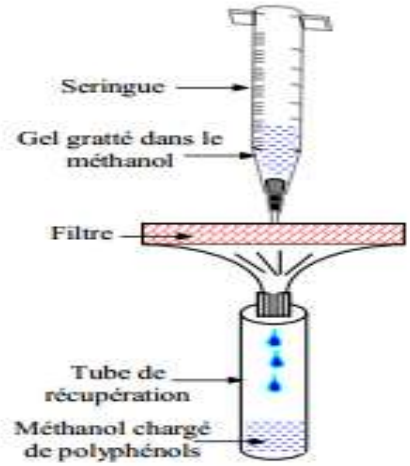


Figure III-6: Systèmes de filtration [112].

III.4.3 Spectroscopie UV

C'est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques. Elle est basée essentiellement sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales, la bande I et la bande II [121].

Ces deux bandes représentent les absorptions dans le proche UV, des chromophores composant le squelette flavonique. Ainsi que, la bande I présentant un maximum d'absorption entre 300 et 400nm, est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C2-C3) et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structura les du cycle B et l'hétérocycle C .La bande II, présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [122](Figure III-7).

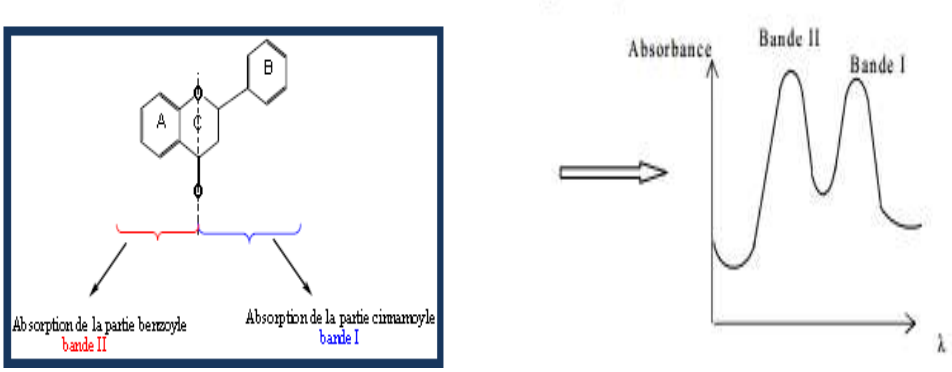


Figure III-7: Spectre d'absorption d'un flavonoïde [122].

Tableau III-3 : Différentes bandes d'absorption de quelques classes de flavonoïdes [123].

Bande 1(λ_{max} en nm)	*Bande 2(λ_{max} en nm)*	*Classe de flavonoides*
310-330	250-280	Flavones
330-360	250-280	Flanonols
-310-330	245-295	Isoflavones
300-330	275-295	Flavones et isoflavones
340-390	230-270	Chalcones
380-430	230-270	Aurones
465-500	270-280	Anthocyanides,

Le maximum d'absorption d'une telle ou telle bande dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles ou méthoxyles sur le squelette flavonique. L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacé le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosyles fait déplacé ce maximum vers des longueurs d'onde plus courtes [124].

III.4.3.1 Absorption en présence des réactifs

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tels que NaOH, AlCl3, AlCl3+HCl, NaOAc et NaOAc+H3BO3. Ces réactifs réagissent avec les groupements hydroxyles par formation de sels et de complexes qui se traduiront sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique [125].

- **En présence de NaOAc + H3BO3**

L'acétate de sodium NaOAc est une base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule 3, 7 et 4'. [44] Elle provoque un effet bathochrome de 5 à 20 nm, sur la bande II qui signale la présence d'un hydroxyle libre en 7.

L'addition d'acide borique en présence de l'acétate de sodium provoque un déplacement bathochrome de la bande I avec 12 à 13 n.m indique un système ortho dihydroxyle [126] (Figure III-8).

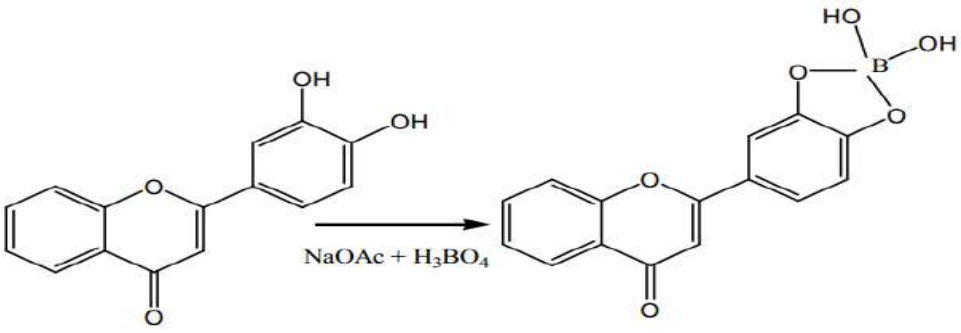


Figure III-8 : Réaction des flavonoïdes après addition de NaOAc et NaOAc+H_3BO_3 [126].

❖ **En présence de $AlCl_3$et $AlCl_3$ + HCl**

La présence (ou absence) de système ortho dihydroxyle dans les flavonoïdes peut être déduit à partir de l'analyse de leur spectre dans le méthanol avant et après l'addition de chlorure d'aluminium et l'acide chlorhydrique.

Dans ces cas la formation d'un complexe stable entre la fonction carbonyle et l'hydroxyle en 5 (ou en 3) et d'un complexe fabile avec le système Ortho dihydroxyle sur les cycles A ou B.

L'utilisation d'AlCl3 pour la détection de groupement ortho dihydroxylé, se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre méthanolique neutre.

L'addition de HCl permet de s'assurer de la stabilité du complexe formé. La présence d'un système orthodihydroxyle est observée, sur le spectre obtenu avec le $AlCl_3$ acidifié par un déplacement hypsochrome de la bande I de 30 à 40 nm par rapport au spectre de $AlCl_3$.

Un déplacement hypsochrome de la bande I de 20 nm est significatif d'une Flavone tri –substitué sur le noyau B.

D'autre part, le spectre obtenue avec AlCl3+HCl donne un déplacement bathochrome de la bande I de 60 nm, ce qui indique la présence de OH libre en 3, et éventuellement en 5, un déplacement de cette bande de 35 à 55 nm signifié que l'hydroxyle en position 5 est libre .[127].

❖ **Présence de NaOH**

NaOH ou (NaOMe), une base forte, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes I et II. Cet effet est plus important sur la bande I. Les flavonoïdes très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif, particulièrement pour les flavonols ayant un hydroxyle libre en4'.

Ce déplacement bathochrome suivi d'une variation de l'intensité lumineuse de la bande I renseigne sur le nombre et la position des hydroxyles libres[128].L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm par rapport au spectre MeOH, indique l'existence d'un OH libre en 7.

Cependant, l'effet de NaOH sur les flavones et les flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et / ou4' et 7.

Dans le cas des isoflavones hydroxylées sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est ortho-dihydroxylée en3'et4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps [129].

Tableau III-4: Les déplacements observés dans la présence des réactifs ajoutés [127].

Réactif	**Déplacement (nm)**		**Interprétation**
	Bande I	**Bande II**	
MeOH	304-280 352-385 328-357	250-280 250-280 250-280	Flavone Flavonol OR en 3
NaOH	+45 à 65 1. stabilité d'intensité/MeOH 2. diminution d'intensité		OH en 4'OR en 4' et OH en 3
	L'intensité diminue avec le temps (décomposition)		3',4' OH ou ortho-di- OH sur A ou Ortho di OH sur B
	Nouvelle bande/MeOH entre 320à335		OH en 7
NaOAc		+5 à +20 Déplacement diminue en présence d'un substituent en 6 ou 8	OH en 7
		Pas de déplacement très	OR en 7

		faible	
		Spectre qui se décompose avec le temps	5, 6, 7-tri OH ou 5, 7, 8-tri OH
NaOAc+ $H3BO_3$	+12à+36		Ortho di OH sur B
$AlCl_3$	Une seule bande entre 420-430		Ortho di OH sur B avec 5-OH
MeOH/ $AlCl_3$ + HCl	+17à+20		5-OH avec une oxygénation en 6
	+35à+55		5-OH et 3-OMe
	+50à+60		OH en 3 avec ou sans OH en 5
$AlCl_3$ /($AlCl_3$+HCl)	-20 à -40 avec sommet où épaulement entre (350-360)		Ortho di OH sur B
	-20à-50		Ortho di OH sur A et Ortho di OH sur B ou tri-OH sur B

(/) : Par rapport (+) : effet bathochrome(-): effet hypsochrome

III.4.4 Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Mise au point vers 1967 par Huker et Hulsman, la chromatographie liquide à haute pression a rapidement fait une concurrence presque déloyale à la chromatographie en phase gazeuse. En effet, alors que la chromatographie en phase gazeuse ne s'applique qu'aux composés volatils, la chromatographie liquide à haute pression n'est pas limitée par cette contrainte et peut séparer pratiquement tous les mélanges, peu importe la volatilité des composés.

III.4.4.1 Principe

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelée phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie (les "grains" sont de très petite taille). Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. En effet, pour un même volume de phase stationnaire la surface d'échange augmente si les "grains" qui la composent sont de diamètre plus petit. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier), le seuil de détection est également plus bas (des pics étroits et hauts sont plus faciles à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas).

- La chromatographie liquide à haute pression s'effectue avec un appareil commercial, dont les principales composantes sont vendues en modules séparés, ou incorporées dans le chromatographe, tel qu'il est illustré dans la Figure III-9.

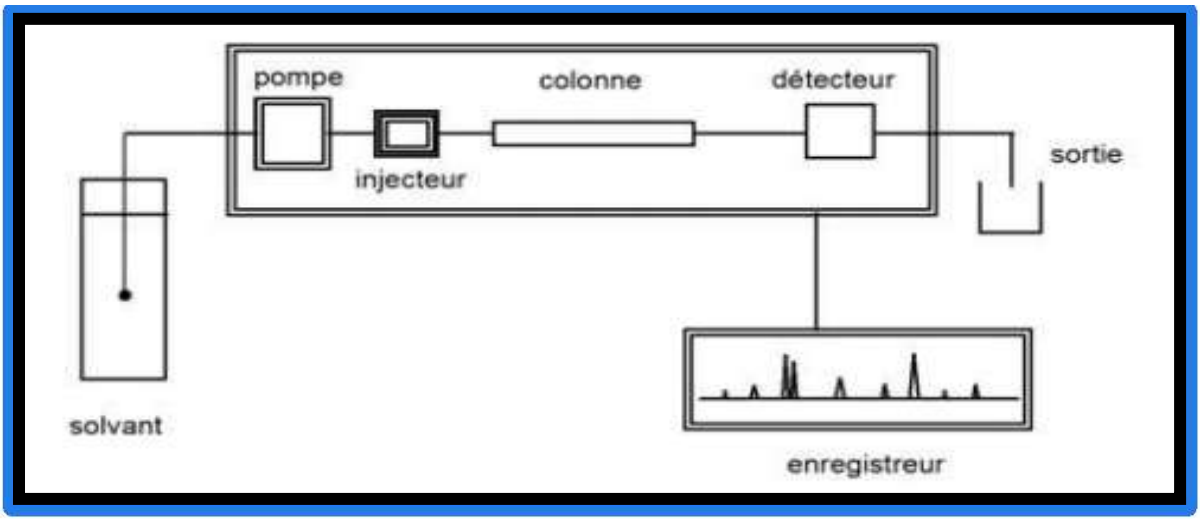


Figure III-9 : Chromatographie HPLC [130].

III.4.5 Spectroscopie IR

Les spectres IR fournissent des informations sur les groupements fonctionnels présents dans une molécule lorsqu'on examine leurs fréquences de vibration caractéristiques. L'information capitale qui ressort de cette technique pour l'étude des flavonoïdes est la détection des groupements hydroxyles et carbonyles. En effet, la plupart des flavones hydroxylés, des isoflavones, des chalcones ou dihydrochalcones ont présenté une large bande d'absorption entre 3300-3600 cm-1 due à la présence d'un groupement dihydroxyle.

De plus une bande intense d'absorption caractéristique des groupements carbonyles chez les flavonoïdes est observée autour de 1680 cm-1 et diminue jusqu'à 1620 cm-1, lorsque le groupement hydroxyle est chelaté avec le groupement C=O. A partir du spectre IR des flavonoïdes, une bande d'absorption est observée autour de 1600 cm-1 caractéristique des doubles liaisons aromatiques [131].

III.4.6 La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire est un phénomène qui apparaît lorsque les noyaux de certains atomes, immergés dans un champ magnétique uniforme B0, sont exposés à un autre champ magnétique variable Be. La RMN est utilisée pour étudier les propriétés physiques, chimiques et biologiques de la matière organique.

Dans le cas des flavonoïdes, c'est une technique qui permet de connaître :

- Le nombre de sucres liés à l'aglycone et la nature de leur liaison (A ou B).
- La liaison et le nombre de substituant méthoxyles sur le squelette flavonique [132].

III.4.7 La spectrométrie de masse (SM)

Cette technique permet la détermination du pic moléculaire qui donne globalement le nombre et la nature des substituant hydroxyles ou méthoxyles, ainsi que la détermination du poids moléculaire des aglycones et leur nombre [132].Il existe plusieurs analyses en spectrométrie de masse : l'ionisation par impact électronique ; l'ionisation par impact électronique à haute résolution et *the Fast Atom* Bombardement [133].

IV. Matériels et méthodes

IV.1 Objectif

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes établie au niveau du laboratoire Matériaux et Environnement de l'université de Médéa. Il nous a semblé donc, intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche pour :

- Extraire des flavonoïdes de *Rosmarinus officinalis* L par deux précèdes d'extraction : chauffage classique à reflux et induction magnétique.
- Séparer et identifier des composés isolés par plusieurs techniques chromatographiques et spectroscopiques (CCM, UV).
- Etudier l'activité antimicrobienne des flavonoïdes.

IV.2 Matériel végétal

La matière végétale *Rosmarinus officinalis* L a été récoltée durant le mois d'avril 2012 dans la région de « Benchicao »à Médéa. Les parties aériennes récoltées du romarin, ont été séchées pendant trois jours à l'air libre, puis conservées dans des sacs propres à l'abri de la lumière jusqu'au moment de l'utilisation. Ainsi, pour un échantillonnage le plus homogène que possible, les tiges feuilletées ont été divisées en petits morceaux.

Notons qu'avant le séchage, une certaine quantité de la plante a été récupérée pour la mesure du taux d'humidité.

IV.2.1 Teneur en eau

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans la matière végétale. Le contenu en humidité des plantes a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve à 105°C ± 5°C [134].

La différence entre $\mathbf{M_0}$ et **M** représente la quantité d'eau contenue initialement dans l'échantillon utilisé. Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{H}(\%) = \left[\frac{\mathbf{Mo-M}}{\mathbf{Mo}}\right] * \mathbf{100} \qquad \text{IV-1}$$

H(٪) → taux d'humidité exprimé en pourcentage;

$\mathbf{M_0}$→poids de l'échantillon à l'état frais en g;

M→ Poids de l'échantillon après séchage en g ;

IV.3 Extraction des flavonoïdes

Cette étape consiste à extraire des flavonoïdes contenus dans les parties aériennes de la plante en utilisant deux techniques d'extractions, le chauffage classique à reflux et le chauffage par induction électromagnétique, a pour but d'effectuer une comparaison entre les deux techniques en terme de rendement d'extraction, le taux de polyphénols et taux des flavonoïdes ,composition chimique et effets biologiques.

Les paramètres d'extractions (le rapport solide / solution extractive et la durée d'extraction) sont issus d'une synthèse bibliographique [**Erreur ! Signet non défini.**].

IV.3.1 Extraction par chauffage classique à reflux

IV.3.1.1 Matériels

- Ballon monocol (500ml)
- Réfrigérant
- Chauffe ballon
- Potence, pince, noix
- Balance analytique

IV.3.1.2 Réactifs

- Eau distillée

IV.3.1.3 Description du montage

- Le ballon monocol en verre borosilicate de 500ml à l'intérieur du quelle on immerge la matière végétale et l'eau (Figure IV-1).
- Le réfrigérant à eau permettant de condenser les vapeurs sortantes du ballon.

- Le chauffe ballon en soie de verre crochetée à la main pour résister à des températures allant jusqu'à 450°C dont le chauffage est électrique permettant de transmettre la chaleur au ballon.



Figure IV-1 : Montage de l'extraction assistée par chauffage classique à reflux.

IV.3.1.4 Préparation de l'extrait brut

Les flavonoïdes sont extraits par la méthode de chauffage classique à reflux.150 g de matière végétale sèche ont été introduits dans un ballon monocol et additionnés de 200ml d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition grâce à un chauffe-ballon pendant 6 heures. Les vapeurs saturées en molécules aromatiques sont ensuite condencées dans un réfrigérant placé sur le ballon après avoir graissé l'extrémité de rodage, une pince a été desserrée afin de maintenir le réfrigérant en position verticale

IV.3.2 Extraction assistée par induction magnétique

IV.3.2.1 Matériels

- ❖ Réacteur en inox (2500ml)
- ❖ Plaque à induction (SAMSUNG, Réf : 157737DDQ100108)
- ❖ Réfrigérant
- ❖ Balance analytique

IV.3.2.2 Réactifs

- Eau distillée

IV.3.2.3 Description du montage

- La matière végétale et l'eau sont introduites dans le réacteur en inox dans le matériau le plus compatible avec ce type de chauffage, permettant un excellent couplage entre la plaque inductive et l'enveloppe en acier magnétique (Figure IV-2).
- Le réfrigérant permet la condensation des vapeurs dégagées.
- La plaque chauffante à induction magnétique construite en vitrocéramique qui ne s'échauffe que par conduction thermique avec le réacteur en acier inoxydable servant à chauffer les solutions contenues à l'intérieur du réacteur, en assurant une parfaite maîtrise des niveaux de température pour éviter le risque de surchauffe des réactifs à traiter.
- L'agitation est produite par les lignes de champ magnétique des courants induits lors du chauffage par induction et par le phénomène d'ébullition.



Figure IV-2 : Montage de l'extraction assistée par induction magnétique.

IV.3.2.4 Préparation de l'extrait brut

On immerge 150gde matière végétale sèche dans 200ml d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition grâce à la plaque du chauffage à induction magnétique, le niveau de puissance est égale à 7 et la durée d'extraction est de 2 heures.

- Après chaque opération d'extraction (chauffage classique à reflux ou induction magnétique) l'ensemble (matière végétale, eau distillée) est filtré sur papier Whatman dans le but d'éliminer les résidus en récupérant seulement l'extrait.

IV.3.3 Fractionnement de l'extrait brut

Cette étape permet de séparer les polyphénols selon leur structure et leur degré de polarité ; en les affrontant avec des solvants organiques de polarité croissante.

IV.3.3.1 Affrontement par l'éther de pétrole

Permet d'extraire les impuretés (composés non phénoliques). Surtout les lipides qui risquent de compliquer les épreuves chromatographiques (Figure IV-3).

IV.3.3.2 Affrontement par l'acétate d'éthyle

C'est un solvant qui entraine les aglycones, les mono-o-glycosides et partiellement les di-o-glycosides.

IV.3.3.3 Affrontement par le n-butanol

Ce solvant va entrainer essentiellement le reste des di-o-glycosides, les tri-glycosides et les C-glycosides.

Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter. La phase aqueuse et le solvant (V/V) sont mélangés énergiquement en laissant sortir à chaque fois les gaz produits.

Après un repos de trois heures, on récupère séparément la phase aqueuse et la phase chargée de molécules spécifiques.

Pour chaque solvant (chaque partition), on refait deux fois cette opération pour assurer un entraînement optimal de nos molécules spécifiques(les flavonoïdes).

Après la série de partition une étape d'évaporation à sec a été procédée dont l'objectif principal c'est l'élimination des solvants et la récupération des extraits sec.

La séparation du solvant de l'extrait est réalisée dans un évaporateur rotatif. Dans cet appareil on réalise une évaporation sous vide en utilisant une pompe à vide et une vanne de contrôle, pendant l'évaporation le ballon est mis en rotation et plongé dans un bain liquide chauffé. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon collecteur de condensat.

La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande permettant donc d'effectuer une évaporation rapide. L'abaissement de la pression permet d'évaporer le solvant à température réduite pour éviter la dégradation thermique des composés.

Sachant que les partitions évaporées sont par la suite récupérées dans 5 ml de méthanol afin d'éliminer les résidus collés dans les parois du ballon collecteur.



Figure IV-3 : Fractionnement de l'extrait brut de *Rosmarinus officinalis* L.

IV.4 Rendements en polyphénols

Le poids des fractions d'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein et le poids du ballon vide.

Le rendement en polyphénols et en flavonoïdes Rf est défini comme étant le rapport entre la masse des fractions d'extrait sec de flavonoïdes (m_F) obtenue et la masse du matériel végétal sec à traiter (m_{MV}).

Il est exprimé en pourcentage par la relation suivante :

$$\mathbf{Rf\ (\%) = (m_F/m_{MV})*100} \qquad \mathbf{IV\text{-}2}$$

IV.5 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes des divers extraits

IV.5.1 Détermination de la teneur en composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques des différents extraits de *Rosmarinus officinalis* L a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu [135] qui est basée sur la réduction en milieux alcalin de la mixture phosphotungstique (WO42-)phosphomolybdique (MoO42-) de réactif de Folin par les groupement oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon [136].

La Figure IV-4 résume le mode opératoire déterminant la teneur en composés phénoliques :

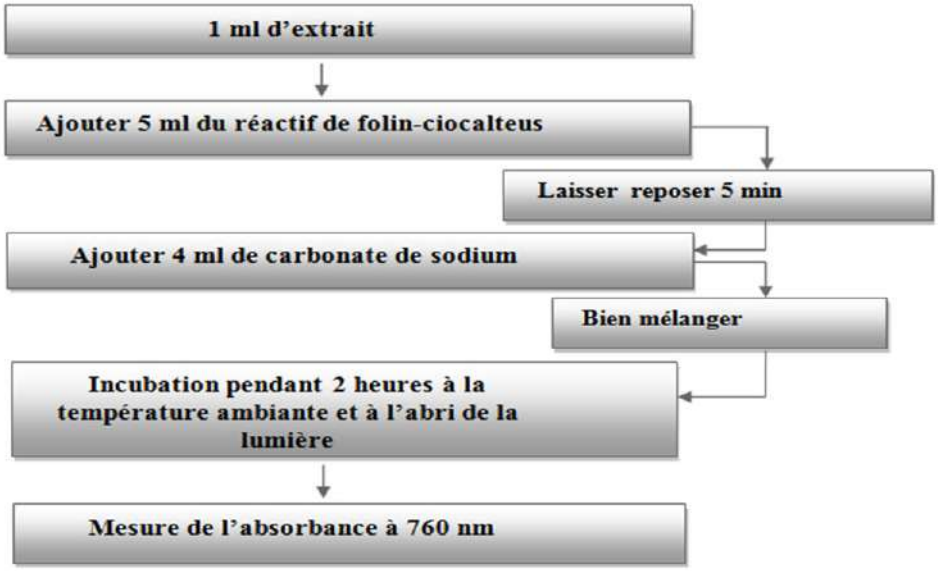


Figure IV-4: Organigramme représentant le dosage des polyphénols totaux.

La formule suivante a été utilisée pour calculer les teneurs en composés phénoliques totaux exprimés en mg Equivalent d'Acide Gallique (EAG) pour 100 g de matière végétale sèche de départ :

$$Tp=\frac{V\times C\times D}{m} \qquad \text{IV-3}$$

Tp : Taux des polyphénols (mg Equivalent Acide gallique pour 100g de matière végétale sèche);

V : Volume d'échantillon (ml);

C : Concentration de l'échantillon lue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml);

D : Facteur de dilution égale à 300;

m: Masse de matière sèche (g);

Sachant que la concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (5-200µg/ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg).

IV.5.2 Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

IV.5.2.1 Mise en évidence des flavonoïdes

La réaction à la cyanidine est une réaction de caractérisation préliminaire qualitative des flavonoïdes. La présence d'une coloration allant de l'orange au rouge pourpre après ajout de quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré et quelques copeaux de tournures de magnésium

IV.5.2.2 Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes contenus dans les extraits du romarin sont estimés par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl3) [137].

La Figure IV-5 représentant le protocole expérimentale déterminant le teneur en flavonoïdes :

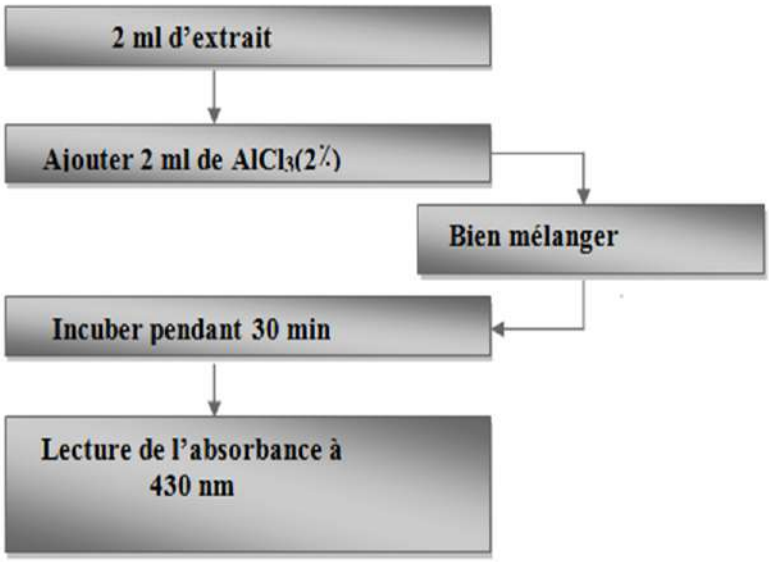


Figure IV-5:Organigramme représentant le dosage des flavonoïdes.

La formule suivante a été utilisée pour calculer les teneurs en flavonoïdes exprimés en mg Equivalent Quercétine pour 100 g de matière végétale sèche :

$$Tf = \frac{V \times C \times D}{m} \quad \text{IV-4}$$

T*f* : Taux des flavonoïdes (mg Equivalent Quercétine pour 100g de matière végétale sèche);

V : Volume d'échantillon (ml);

C : Concentration de l'échantillon lue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml);

D : Facteur de dilution égale à 20;

m : Masse de matière sèche (g);

IV.6 Séparation et identification des flavonoïdes

Dans cette division de la partie expérimentale on s'intéresse à :

- Séparer les flavonoïdes extraits par une méthode chromatographique qualitative (CCM analytique)
- Purifier et identifier les composés majoritaires présents dans les extraits de *Rosmarinus officinalis* L.

IV.6.1 Analyses qualitatives par chromatographie sur couche mince

IV.6.1.1 Principe

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile [138,139].

IV.6.1.2 Protocole expérimentale

❖ **Préparation de la phase stationnaire:** La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques pré-étalées de gel de silice et sur des plaques de polyamide (DC6).

❖ **Préparation de la phase mobile :** La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques. Pour cela, différents systèmes solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations (Tableau IV-1, Tableau IV-2).

Tableau IV-1 : Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de polyamide [138, 140, 141, 142, 143].

	Systèmes solvant	Proportions
Systèmes Essayés	Tol/MEC/EtOH	(2/1/1)(v/v/v)
	Tol/MEC/EtOH/EP	(2/1/1/1)(v/v/v/v)
	MeOH/H_2O/A acétique	(18/1/1)(v/v/v)
	MeOH/H_2O/A acétique	(95/5/5)(v/v/v)
	Tol/MeOH/EtOH	(4/3/3)(v/v/v)
	Tol/EtOH/MeOH	(4/3/3)(v/v/v)
	Tol/MEC/EtOH	(2/1/1)(v/v/v)
	H_2O/MEC/MeOH/Acétylcétone	(12/3/3/1)(v/v/v/v)

Tableau IV-1: Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice [8, 144, 10].

	Systèmes solvant	Proportions
Systèmes essayés	Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/H_2O	(100/11/11/27)(v/v/v/v
	Acétate d'éthyle/MeOH/H_2O	(100/13.5/10)(v/v/v)
	Butanol/acide acétique/H_2O	(4/1/5)(v/v/v)

❖ **Le dépôt:** le dépôt se fait avec des tubes capillaires en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire et linéairement. Chaque phase doit être déposée en solution diluée dans le méthanol, on peut effectuer plusieurs dépôts successifs du même analyte en même endroit, cette pratique permet de concentrer l'analyte.

❖ **Développement des plaques:** chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entrainé par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque (Figure IV-6).



Figure IV-6 : Cuve de CCM en verre.

❖ **Révélation:** la révélation se fait aux UV: qui permet de mettre en évidence sous forme des taches des substances qui absorbent les UV entre 254 nm et 365 nm [145].

IV.6.2 Analyses quantitatives par chromatographie sur couche mince (préparative)

Conservant toujours les mêmes systèmes solvants (Acétate d'éthyle/MeOH/H_2O), on prépare pour chaque phase 5 plaques de gel de silice (20 x20 cm). Ceci afin de récupérer de grandes quantités de flavonoïdes pour les études spectrales.

Après grattage des spots et filtration, on obtient des solutions méthanoliques(5 ml chacune) dont les couleurs varient du transparent au jaune vert passant par le jaune.

L'étude spectrale de ces solutions nous permet d'apprécier la pureté de ces échantillons.

IV.6.2.1 Analyse spectrale UV-Visible

Cette série de mesures spectrophotométriques en ajoutant des réactifs ionisants ou chélatant permet principalement de préciser la présence ou l'absence des substitutions sur le squelette flavonoïque de base (Figure IV-5).

❖ **Première série:**

- On tire le spectre de la solution méthanolique obtenu après grattage du gel et filtration.
- On ajoute à cette solution contenue dans la cuve du spectrophotomètre une pincée de NaOAc et on mélange.
- Toujours à cette même cuve, on ajoute 2 gouttes d'une solution d'acide borique (H_3BO_3) à 5٪.

❖ **Deuxième série:**

- On prend un échantillon de la même solution méthanolique initiale et on détermine le spectre d'absorption.
- On ajoute à cette solution 5 gouttes d'une solution méthanolique d'$AlCl_3$à 5 ٪.
- On ajoute encore une goutte d'une solution HCl 2 fois normale.

❖ **Troisième série:**

- On détermine le spectre toujours de la même solution flavonoïque.

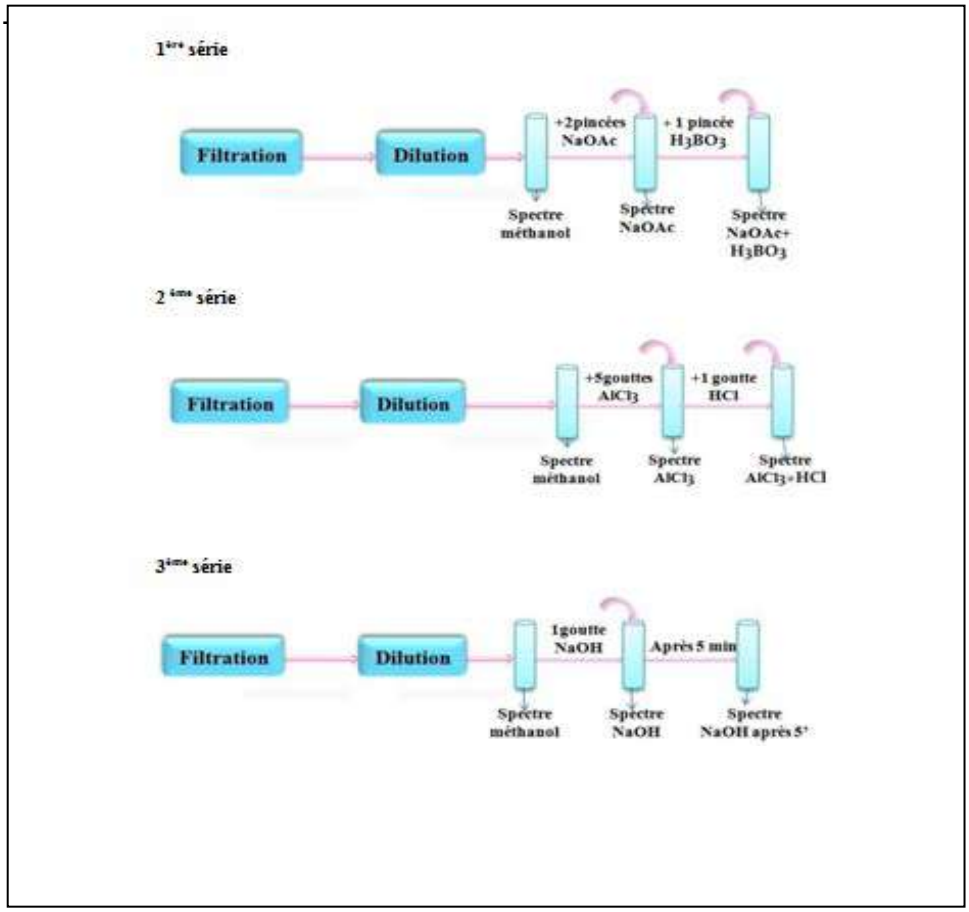


Figure IV-7: Protocole des séries spectrales.

IV.7 Etude de l'activité antibactérienne

D'après la littérature [146], les composés phénoliques sont doués d'un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. À partir de là, on a testé nos produits isolés et extraits de *Rosmarinus officinalis* en présence de différentes souches bactériennes, pour mettre en évidence et évaluer leurs propriétés antibactériennes.

Cette étude biologique a été effectuée au niveau du laboratoire de microbiologie au sein du complexe antibiotical de Saidal-Médéa.

IV.7.1 Les souches microbiennes utilisées

La sensibilité des microorganismes peut varier selon le germe testé, car un extrait obtenu à partir d'une plante médicinale peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou n'avoir aucun effet [147]. Les souches bactériennes utilisées dans notre étude sont fournies par le laboratoire de microbiologie au niveau de Saidal.

- ✓ ***Staphylococcus aureus* :**

Staphylococcus aureus est une cocci à Gram positif appartenant à la famille des *Micrococcaceae*, aérobie - anaérobie facultatif, catalase positive, fermentant le glucose, halophile, cultivant sur milieux ordinaires [148], possédant une coagulase qui le distingue des autres espèces de staphylocoques et est responsable de sa pathogénicité. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales et est très répandu chez l'homme et les animaux à sang chaud [149].

Chez l'homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses et des zones cutanées humides [148, 149].

- ✓ ***Staphylococcus épidermidis* :**

Staphylococcus épidermidis est un cocci à Gram positif, appartenant à la famille des *Micrococcaceae*, catalase positive, fermentant le glucose, halophile, cultivant sur milieux ordinaires et faisant partie du groupe des staphylocoques à coagulase négative, commensal de la peau de l'homme, germe opportuniste, essentiellement responsable d'infections nosocomiales [148, 149].

✓ ***Escherichia coli :***

Escherichia coli est un coccobacille à gram négatif, aéro-anaérofacultatif, apparentant à la famille des *Enterobacteriaceae*, catalase positive, cultivant sur milieux ordinaires. C'est l'espèce dominante de la flore normale du tube digestif. Habituellement commensal mais pouvant devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers [148].



Figure IV-8 : *Escherichia coli,* bacille Gram negative [150].

✓ ***Bacillus subtilus* :**

Bacillus subtilus est un bacille droit à extrémités arrondies, Gram positif, appartient à la famille des *Bacillaceae,* sporulé, aérobies stricte catalase positive. Cette bactérie n'est pas considérée comme pathogène pour l'Homme, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire [149].

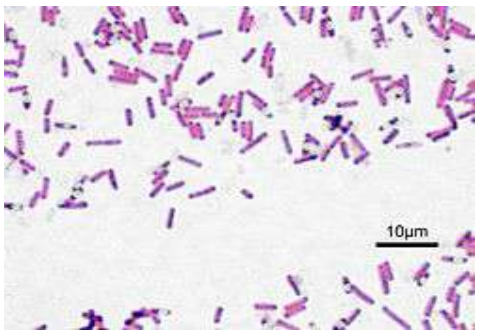


Figure IV-9 : *Bacillus subtilus* bacille Gram positif [151].

✓ ***Sarcina lutea***

Sarcina lutea est un genre de bactéries cocci, Gram-positifs, appartient à la famille des Clostridiaceae . Un synthétiseur de cellulose microbienne, ils ont un agencement de cellule parallélépipédique. Plusieurs membres du genre sont flore humaine et peut être trouvé dans la peau et le gros intestin.

✓ ***Condida albicans* :**

Candida albicans est une levure appartenant à la famille des *Saccharomycetaceae,* généralement commensal saprophyte de la peau et des muqueuse des l'Homme mais pouvant être pathogène opportuniste à l'origine d'infections fongiques ou même de candidémies. *Candida albicans* cultive sur gélose au sang cuit ou gélose Sabouraud et présente un dimorphisme caractérisé par la transition entre la forme levure et la forme moisissure. La forme levure est la forme saprophyte. En quantité "normale" elle vit en symbiose avec l'organisme, en excès, elle devient nocive par imperméabilisation des parois intestinales. La forme moisissure (mycélienne) est la forme parasite pathogène. Elle est capable de traverser la muqueuse digestive et de passer dans la circulation lymphatique et sanguine [149].



Figure IV-10 : *Candida albicans* [152].

IV.7.2 Protocole Expérimental

➢ **Milieux de culture:**

Selon les souches microbiennes testées nous avons utilisé les milieux de culture suivants:

- Gélose de soja tryptique(G.S) pour les bactéries(Cf.AnnexeII).
- Agar de Sabouraud pour les levures(Cf.AnnexeII).

➢ **Préparations des extraits :**

Notre travail a porté sur l'étude de l'activité antimicrobienne de troi extraits à savoir : la phase éther de pétrole, la phase acétate d'éthyle et la phase n-butanol.

- **Préparation des disques:**

Des disques de 9 mm de diamètre sont découpés sur du papier Wattman et autoclavés pendant 20 minutes à 120°C Les disques sont trempés ensuite dans les principes actifs considérés.

- **L'ensemencement:**

L'ensemencement est réalisé par inondation sur boîtes pétries sur une épaisseur de 4 mm contenant la gélose de soja tryptique pour les bactéries et milieu d'agar de Sabouraud pour les levures.

- **Dépôt des disques et incubation:**

A l'aide d'une pince stérile, les disques sont imprégnés par 10µl de chaque extrait.

Les disques sont ensuite placés sur les géloses puis pressés afin de s'assurer de leur application. Les boîtes sont alors incubées à 37°C pendant 18à 24 h. La durée d'incubation est prolongée pour les levures et moisissures.

- **Témoin:**

Pour vérifier la bonne mise au point de cette méthode, on prépare des disques témoins imprégnés de méthanol et on les applique sur les boites de pétri ensemencées par les différents microorganismes.

- **Lecture :**

Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés à l'aide d'un appareil de la lecture des zones d'inhibition(Cf.AnnexeII). Les manipulations sont répétées 3 fois pour s'assurer du bon déroulement de la méthode.

V. Résultats et discussions

V.1 Teneur en eau

Les résultats de cette analyse (Figure V-1) ont révélé un teneur en eau de70.03%. Cela signifie que plus de la moitié du poids du romarin fraîche est constituée d'eau.

La teneur en eau du romarin est rapprochée à celle obtenue par Athamen **[**153**] (**67.00%) et Fekhar (72.9%) [155].

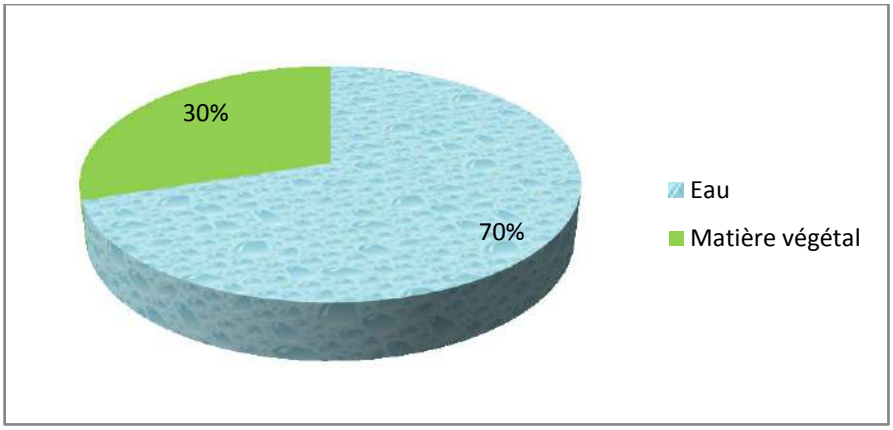


Figure V-1: Teneur en eau de *Rosmarinus officinalis* L.

V.2 Extraction et dosage des polyphénols et des flavonoïdes

V.2.1 Extraction

Les premières étapes de l'extraction ont conduit à l'obtention d'un extrait brut liquide et de coloration marron.

Les extraits secs dérivés de l'extrait brut du romarin récupérés après évaporation à sec et sous pression réduite renfermant des flavonoïdes et des composés phénoliques, ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant. Le rendement des différents extraits a été déterminé par rapport à 100g de matériel végétal sec ; rendu en morceaux ; subissant les deux méthodes d'extraction (chauffage classique, chauffage par induction magnétique).

Les résultats de rendement et les caractéristiques organoleptiques (couleur) des différents extraits obtenus par deux procédés d'extraction sont reportés dans le Tableau V-1.

Tableau V-1: Rendement et couleurs des différents extraits de *Rosmarinus officinalis* L.

Méthodes d'extraction	Extrait	Couleur	Rendement(%)
Chauffage à reflux	**EP**	Marron très clair	0.959
	AcOEt	Vert	2.970
	ButOH	Jaune	6.780
Induction magnétique	**EP**	Marron très clair	1.514
	AcOEt	Vert	5.266
	ButOH	Jaune	10.601

V.2.2 Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

V.2.2.1 Mise en évidence des flavonoïdes

Le test de recherche des flavonoïdes dans différents extraits (EP, AcOEt et ButOH) a donné des réactions positives ce qui témoigne de la présence des flavonoïdes, par contre l'extrait d'éther de pétrole a donné une réaction négative.

Les résultats de cette étude sont reportés dans le Tableau V-2.

Tableau V-2:Mise en évidence des flavonoïdes dans les différents extraits du romarin.

Extrait	Réaction à la cyanidi	Couleur
EP	-	Jaune
AcOEt	+	Orange
ButOH	+	Rouge brique



Figure V-2: Test des flavonoïdes.

L'intensité de la couleur (Figure V-2) indique que les extraits obtenus avec les solvants les plus polaires sont les plus riches en flavonoïdes.

V.2.2.2 Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes

L'étude quantitative des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* au moyen des dosages spectrophotométriques, avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols et des flavonoïdes.

L'étude quantitative des extraits méthanoliques de *Rosmarinus officinalis* au moyen des dosages spectrophotométriques, avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols et des flavonoïdes. Deux méthodes de dosages ont été mises on évidence pour cet objectif, une est la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu qui est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols en utilisant l'acide gallique comme standard [154](Cf.AnnexeII), l'autre méthode est celle du trichlorure d'Aluminium ($AlCl_3$), réalisée pour la détermination de la teneur des flavonoïdes en utilisant comme standard la quercétine (Cf. Annexe I).
Les résultats expérimentaux de dosage des polyphénols et des flavonoïdes sont regroupés dans le Tableau V-3 et représentés par la Figure V-3.

Tableau V-3 : Evolution de taux de polyphénols et de flavonoïdes en fonction de type d'extraction.

Méthodes d'extraction	Extrait	T*p* *(mg EAG/g)*	T*f* (mg EQ/g)
Chauffage classique à reflux	**EP**	3.184	1.137
	AcOEt	9.810	4.574
	ButOH	6.238	3.510
Induction magnétique	**EP**	6.592	3.155
	AcOEt	12.178	7.982
	ButOH	11.098	6.164

V.2.3 Résultats

Dans notre étude nous avons procédé à deux méthodes d'extraction afin de comparer les rendements ainsi les différents taux de polyphénols et de flavonoïdes obtenus par ces deux méthodes pour chaque extrait.

La Figure V-3 représente les différents résultats obtenus concernant les deux méthodes d'extraction.

Une différence entre les rendements des deux méthodes a été notée : les rendements étaient compris entre 0.959 et 6.78% pour le chauffage à reflux et de 1.514 et 10.601 % pour l'autre méthode d'extraction.

Le chauffage à reflux a donné des taux de polyphénols allant de 3.184 à 6.238 mg EAG/g quand au chauffage par induction magnétique, les taux de polyphénols allaient de 6.592 à 11.098 mg EAG/g.

Concernant les flavonoïdes on a noté des taux allant de 1.137 à 3.510 mg EQ/g pour le chauffage à reflux et de 3.155 à 6.164 mg EQ/g pour le chauffage par induction magnétique.

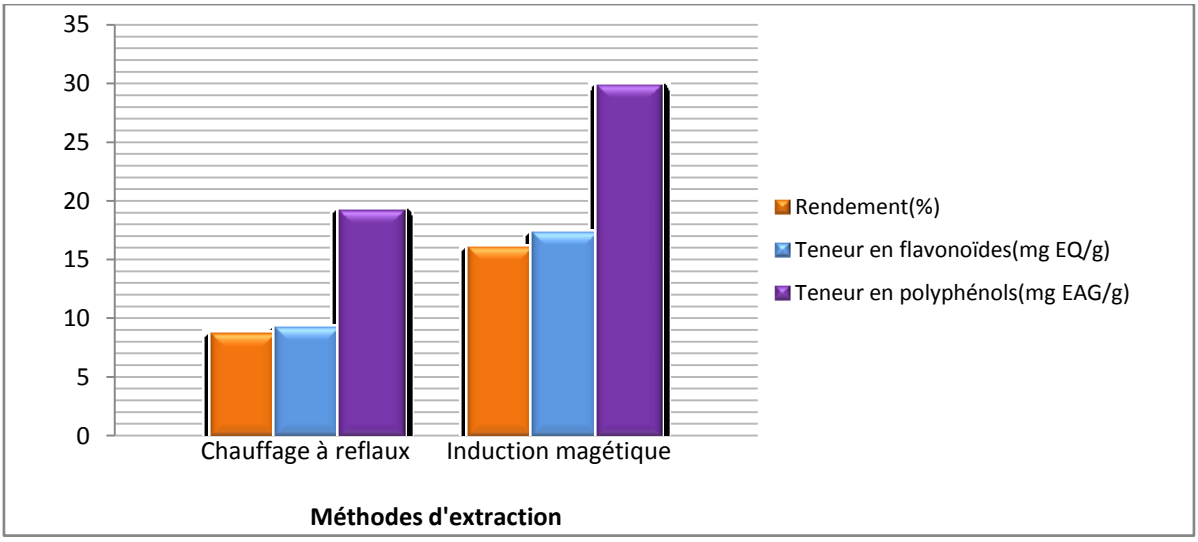


Figure V-3:L'évolution de rendement, taux de polyphénols et de flavonoïdes en fonction des méthodes d'extraction.

V.2.4 Discussion

D'après les résultats des tableaux : Tableau V-1, Tableau V-3et la Figure V-3 représentant l'évolution de rendement et le taux des polyphénols et des flavonoïdes en fonction de méthode d'extraction on constate que :

- Du point de vue rentabilité en poids, l'extrait de butanol a donné les proportions les plus élevées en comparaison avec les extraits d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle pour les deux méthodes d'extractions ; cela peut s'expliquer par le fait que l'EP et l'AcOEt sont des solvants organiques très volatils.
- L'extrait d'AcOEt de *Rosmarinus officinalis* représente la teneur la plus élevée en polyphénols et en flavonoïde (Tp=9.810mgEAG/g , Tf=4.574mgEQ/g pour le chauffage à reflux et Tp=12.178mgEAG/g ,Tf=7.982mgEQ/g pour l'induction magnétique) par rapport à celle obtenue par l'Ext-ButOH (Tp=6.238mgEAG/g,

Tf=3.510 mgEQ/g pour le chauffage à reflux et Tp=11.098 mgEAG/g , Tf=6.164 mg EQ/g pour le chauffage à induction) et celle obtenue par l'Ext-EP (Tp=3.184mgEAG/g, Tf=1.137mgEQ/g pour le chauffage à reflux et Tp=6.592mgEAG/g, Tf=3.155 mg EQ/g pour le chauffage par induction).Cette différence dépend certainement de la nature et des caractéristiques physico-chimiques des solvants utilisés et notament leur polarité.En effet,la solubilité des substances contenues dans la matière végétale dans un solvant donné dépend de ses propriétés. Il s'ensuit que les rendements d'extraction et la composition des extraits varient d'un solvant à l'autre .

- La somme des pourcentages des trois extraits obtenus par induction magnétique durant un temps de 2 heures est de l'ordre 17.301%, par contre le système de chauffage classique révèle un rendement de l'ordre de 10.709% pour un temps d'extraction de 6 heures. Des observations similaires ont été obtenues pour l'évolution de taux des polyphénols et de flavonoïdes en fonction de méthodes d'extraction :
  - Induction magnétique : Tp=29.868mg EAG/g, Tf = 17.30mg EQ/g.
  - Chauffage classique : Tp =19.232mg EAG/g, Tf = 9.221mg EQ/g.
- Cette différence est certainement lié au mode de chauffage, sachant que le chauffage par induction permet l'homogénéité et la rapidité du chauffage, grâce à son principe de produire la chaleur au sein du matériau à chauffer, d'autre part contrairement au chauffage conventionnel dans lequel le solvant devant extraire la matière végétale peut arriver à saturation et perdre progressivement sa capacité d'extraire au cours du temps, le chauffage par induction pourrait contribuer à la fragilité et la rupture des parois cellulaire.
- Ces résultats sont presque conformes aux travaux de Arabi et Fekhar [155], dont ils ont estimé T*f* = 26.89mg EQ/g pour l'extrait sec du romarin sur lequel ils travaillaient.
- La quantité des composés phénoliques des extraits éthanoliques des plantes étudiées dépend essentiellement : de leur origine, la variété, la saison de culture, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante et la durée de conservation [159].
- En outre, Tsai *et al*[156]., ont également trouvé que l'extrait méthanolique du romarin contient 60.7 ± 1.1 mg EC/g. Les teneurs rapportées par Ho et Tsai sont très élevées par rapport à nos résultats, cette différence trouve probablement son explication dans la différence du standard utilisé pour le dosage des flavonoïdes.

V.2.5 Conclusion

En comparent avec le chauffage classique, le procédé du chauffage par induction magnétique, c'est une technologie émergente permettant une :

- ✓ Amélioration du rendement d'extraction.
- ✓ Augmentation considérable du taux des polyphénols et des flavonoïdes.
- ✓ Réduction de temps d'extraction.

V.3 Analyse et identification des flavonoïdes

Pour avoir les empreintes flavoniques de nos extraits,et avoir une idée sur leurs composition chimique,une chromatographie analytique sur couche mince à été réalisée suivie par une CCM préapartive.

V.3.1 Analyse des flavonoïdes par Chromatographie sur couche mince analytique

Pour une caractérisation partielle des différents extraits de *Rosmarinus officinales* L obtenus par deux techniques extractives (chauffage classique à reflux et extraction par induction magnétique), une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée sur une plaque de gel de silice et de polyamide DC6 avec différents systèmes de solvants.

Le système solvant Acétate d'éthyle/MeOH/H_2O (100/13.5/10) (v/v/v) avec une plaque de gel de silice ,nous a permis d'avoir une bonne séparation des constituants et une visibilité acceptable des spots.

Sous lumière UV à 254 nm, les différentes taches de produits ont été délimitées. Les couleurs des spots et leur Rf, nous ont permis de révélé la présence des flavones et des flavonols (TableauV-4).

Les extraits d'acétate d'éthyle et de n-butanol de *Rosmarinus officinalis* obtenus par induction magnétique ont montré après observation à l'UV (254 nm) et révélation par le réactif de vanilline sulfurique une richesse en constituants chimiques par rapport à ceux obtenus par chauffage classique à reflux.

A 254 nm, la majorité des spots apparaissent en violet, marron et jaune. Après révélation par la vanilline sulfurique, la majorité des spots apparaissent en violet, signalons la présence des spots de couleur rose et verte.

Tableau V-4: Résultats de la séparation par CCM des extraits de *Rosmarinus officinalis* obtenus par deux méthodes d'extraction.

	Gel de silice								
	Système : [ACOEt/MeOH/H_2O] [100/13/5/10]								
Extraits	**EP**			**AcOEt**			**ButOH**		
Méthodes d'extraction	***Spots***	***Rf***	***Fluorescence***	***Spots***	***Rf***	***Fluorescenc***	***Spot***	***Rf***	***Fluorescence***
Induction magnétique	1 2 3 4 5	0.12 0.27 0.38 0.44 0.53	Violet- Violet++ Violet+++ Violet+ Violet-	1 2 3 4 5 6 7 8	0.15 0.32 0.37 0.51 0.72 0.86 0.89 0.96	Violet- Violet+ Violet++ Violet+ Marron Violet Marron+ Violet+++	1 2 3 4 5 6 7 8	0.11 0.14 0.20 0.27 0.31 0.37 0.44 0.51	Violet- Violet- Viole- Violet++ Violet++ Marron++ Violet+ Violet+
Chauffage classique à reflux	1 2 3	0.15 0.23 0.42	Jaune Jaune Marron	1 2 3 4 5	0.11 0.20 0.36 0.44 0.5	Violet-- Violet- Violet+++ Violet++ Violet+++	1 2 3 4	0.37 0.86 0.89 0.98	Violet+++ Marron Violet- Violet- Violet-

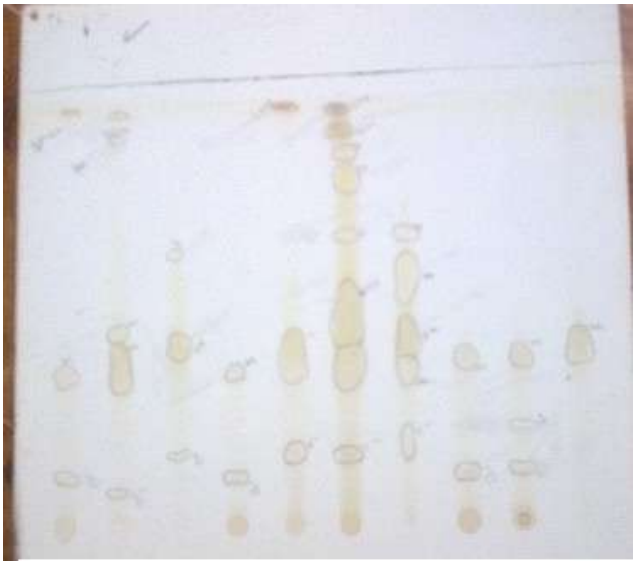


Figure V-4: CCM analytique représentative des flavonoïdes de *Rosmarinus officinalis* L.

La CCM nous a permis de contrôler la qualité de nos différents extraits, même si elle n'est suffisante pour identifier un constituant précis, elle nous a permis d'obtenir des

renseignements utiles sur les éléments constitutifs de nos extraits (fluorescence, coloration, rapport frontal...).

V.3.2 Identification structurale des flavonoïdes par CCM préparative

Dans le domaine UV-visible, les solutions méthanoliques de la phase éther de pétrole donnent pour la majorité des spectres obtenus pour les deux procédés d'extraction des pics non distincts (Figure-1) (Cf. Annexe III), témoignant de l'impureté des solutions flavonoïques et peut même la saleté de cette phase qui peut contenir des restes de lipide, boues et résine. Ceci permet d'en déduire que cette phase contient des flavonoïdes en faible quantité.

Les solutions méthanolique de la phase acétate d'éthyle et de la phase du butanol se sont révélées pour la plupart des solutions flavonoïques donnant deux pics caractéristiques dans le domaine [250-400nm]. Les spots des pics étant plus distincts (donc plus pur).

Après avoir tiré tous les spectres méthanoliques de ces trois phases, on décide de réaliser la série spectrale pour ceux qui se révèlent plus nets et en quantité suffisante.

Remarque : les spectres réalisés après l'ajout du $AlCl_3$ et l'HCl ne sont pas pris en considération, du fait que l'$AlCl_3$ utilisé est non anhydre donnant les mêmes spectres que les solutions initiales. Notre analyse repose donc sur les informations apportées par la première et la troisième série seulement.

V.3.2.1 L'analyse spectrale des fractions isolées Par le procédé du chauffage classique à reflux

D'après l'utilisation de tableau III-4, on peut identifier les différentes structures des flavonoïdes du romarin.

V.3.2.1.1 Phase d'acétate d'éthyle

a) Spot 1 :

Les résultats de la série spectrale de ce spot **(**Figure-2) (Cf .Annexe III) sont représentés dans le Tableau V-5:

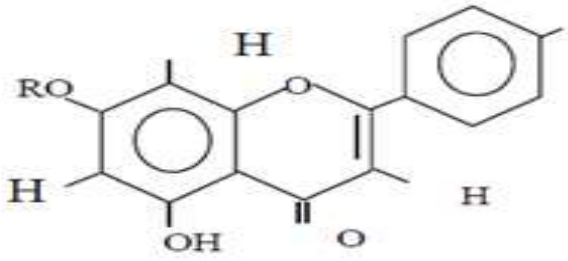
Tableau V-5: Résultats du l'étude spectrale de spot 1, phase d'acétate d'éthyle

Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	271,05	329,98
NaOH	319,68	387,94
NaOAc	270,97	332,02
$NaOAc/H_3BO_3$	270,70	328,04

Dans le méthanol, on a une bande I à 271 nm et une bande II à 329 nm indiquant une flavone monosubstitué. Le spectre avec le NaOH donne un effet bathochrome et hyperchrome stable témoignant d'un OH en 4' et de l'absence d'ortho di-OH

L'addition du NaOAc donne une bande I au léger déplacement indiquant un OR en7.

L'ajout du H_3BO_3 ne donne pas de déplacement, donc pas d'ortho di-OH. Ces résultats sont en faveur d'une **apigénine.**



b) Spot 3 :

Les résultats de la série spectrale de ce spot (Figure-3) (Cf. Annexe III) sont représentés dans leTableau V-6 :

Tableau V-6:Résultats du l'étude spectrale de spot 3, phase d'acétate d'éthyle

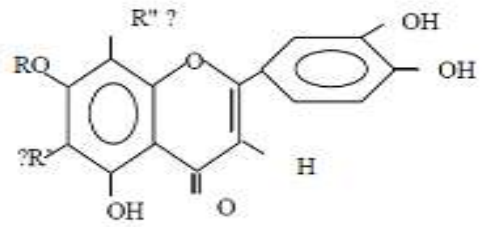
Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	288,22	324,12
NaOH	328,52	374,34
NaOAc	288,87	325,93
NaOAc/H_3BO_3	290,04	340,96

La solution méthanolique de ce composé donne une bande I à 324 nm et une bande II à 288 nm indiquant une flavone au noyau A polysubstitué.

Un 4'OH est confirmé par le déplacement bathochrome de la bande I (+50 nm) après l'addition du NaOH.

Le NaOAc une fois ajouté au méthanol, ne produit aucun effet sur les deux bandes affirmant un OR en 7, et le H_3BO_3 produit un effet bathochrome de deux bande I (+16 nm) indiquant la présence de deux OH adjacent sur le noyau B.

On suppose donc cette structure :



V.3.2.1.2 Phase du butanol

a) Spot 1 :

Les résultats de la série spectrale de spot 1 de la phase du butanol sont représentés dans la Figure-4 (Cf. Annexe III) et données dans le Tableau V-7.

Tableau V-7:Résultats du l'étude spectrale de spot 1 phase du butanol

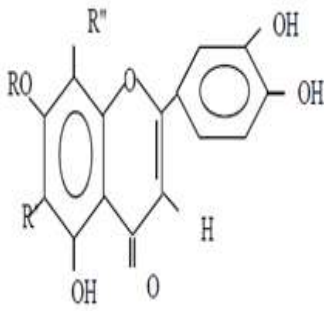
Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	270	333
NaOH	336	381
NaOAc	270	339
NaOAc/H_3BO_3	270	339

Le spectre méthanolique nous donne deux bandes uniques respectivement à 270 nm et 333 nm. Toutes deux caractéristiques d'une flavone au noyau A polysubstitué.

L'addition du NaOH donne un effet bathochrome de la bande II, sans apparition de bande entre 320 nm et 335 nm indiquant l'absence d'OH en C3' et C4' et la présence d'un OR en C7.

L'ajout du NaOAc ne provoque pas d'effet bathochrome de la bande II comparée au spectre méthanolique : on a un OR en 7. Puis l'addition du H_3BO_3 donne un déplacement bathochrome (5nm) indiquant la présence d'un ortho di-OH en 3' et 4'.

On suppose donc une schématisation de la molécule comme suit :



Le OH en 3 est confirmé par la fluorescence violette sous UV. Cette structure milite pour une **lutéoline**; molécule très répandue chez *Rosmarinus officinalis* [77]

b) Spot 3 :

Les résultats de la série spectrale de ce spot (Figure-5) (Cf. Annexe III) sont représentés dans le Tableau V-8.

Tableau V-8:Résultats du l'étude spectrale de spot 3, phase du butanol

Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	265	337
NaOH	271	390
NaOAc	264	350
NaOAc/H_3BO_3	264	351

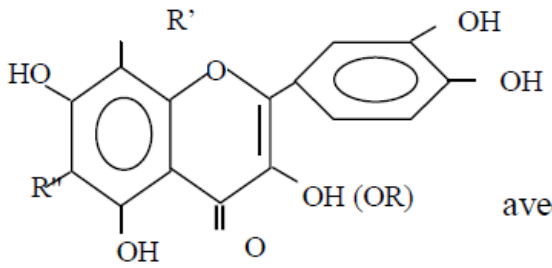
La bande I à 390nm et la bande II à 265 ainsi que la fluorescence marron de ce spot sous UV, nous informent qu'il s'agit d'une flavanol. Et il est fort possible qu'on ait un sucre en 3 vu que le Rf est de 0,86 dans le système ACOEt/MeOH/H_2O [100/13/5/10].

Le NaOH provoque un déplacement bathochrome très important de la bande I (+53nm) indiquant la présence d'un OH en 4'.

L'addition du NaOH provoque un déplacement hypsochrome de la bande II confirme le OH en 7.

Le H_3BO_3 avec le NaOAc donnent un effet bathochrome de la bande I informant de la présence d'un ortho di-OH en 3' et 4'.

On suppose donc cette structure :



avec R' et R'' = OH.

c) Spot 5 :

Les résultats de la série spectrale de spot 5 de la phase bu butanol sont représentés dans la Figure-6 (Cf. Annexe III) et données dans le Tableau V-9.

Tableau V-9:Résultats du l'étude spectrale de spot 5, phase du butanol

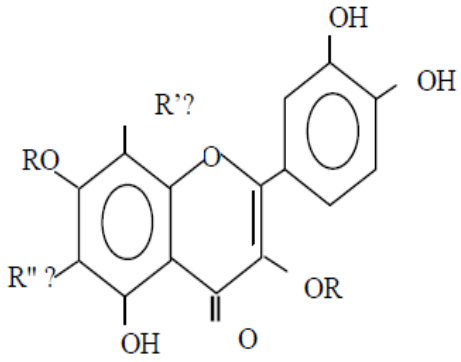
Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	270	330
NaOH	267	388
NaOAc	304	338
NaOAc/H_3BO_3	264	351

Le spectre de cette phase nous donne dans le méthanol une bande II à 270nm indiquant que la noyau A est polysubstitué. La bande I à 330nm et la fluorescence jaune light sous UV laisse opter pour une flavanol 3-OR [122].

Les effets bathochrome et hyperchrome de la bande I et la stabilité du spectre en présence du NaOH sont en faveur d'un OH libre en 4'.

L'ajout du NaOAc nous donne un faible déplacement la bande II informant de la présence d'un OR en 7. Le NaOAc additionné de H_3BO_3 montre un déplacement bathochromique de la bande I comparé au spectre méthanolique témoignant de la présence d'un ortho di-OH en 3' et 4'.

On suppose donc que cette molécule à la structure suivante :



Vu que le noyau A est polysubstitué, au moins l'un de R' et R" est présent, sinon les deux. Mais la structure de base reste celle d'une **quercétine** connue chez cette plante [157].

V.3.2.2 L'analyse spectrale des fractions isolées Par le procédé d'induction magnétique

V.3.2.2.1 Phase d'acétate d'éthyle

a) Spot 1 :

Les résultats de la série spectrale de ce spot (Figure-7) (Cf. Annexe III) sont reportés dans le Tableau V-10.

Tableau V-10:Résultats du l'étude spectrale de spot 1, phase d'acétate d'éthyle

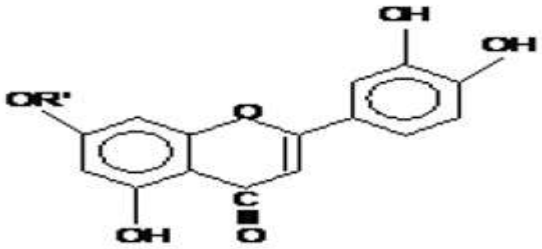
Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	289	334
NaOH	320	373
NaOAc	290	Non précis
NaOAc/H_3BO_3	290	344

Le spectre méthanol de cette fraction donne deux pics, avec un maximum d'absorption à 334 nm pour la bande I et 289nm pour la bande II ainsi que la fluorescence violette de la molécule 1 sous UV à 365 nm nous laissent opter pour un flavone dont le noyau A est polysubstitué.

L'addition de NaOH se traduit par un effet bathochromique et hyperchromique de la bande I sans apparition de pic entre 320-335 nm, ces critères indiquent la présence d'un OH libre en C4' et une substitution en C7 respectivement.

Le très faible déplacement que donne le spectre NaOAc affirme la présence d'une substitution en C7. Le spectre NaOAc+ H_3BO_3 marque un déplacement de (+10 nm), cette caractéristique est significative à la présence d'un groupe ortho di OH en C3' C4' sur le cycle

B.Tous les critères discutés précédemment nous mènent à proposer la structure représentée ci-dessous pour la molécule 2, on peut supposer que c'est un lutéoline 7 OR'.



b) Spot 2 :

Les résultats de la série spectrale de spot 2 de la phase d'acétate d'éthyle sont représentés dans la Figure-8(Cf. Annexe III) et données dans leTableau V-11.

Tableau V-11:Résultats du l'étude spectrale de spot 2, phase d'acétate d'éthyle

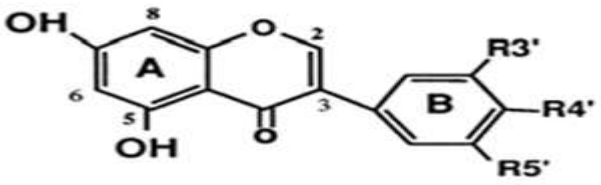
Solvants utilisés	**Bande II (nm)**	**Bande I (nm)**
MeOH	276	327
NaOH	321	380
NaOAc	Décomposition du spectre avec le temps	
NaOAc/H_3BO_3		

La bande I à 327nm et la bande II à 274, nous informent qu'il s'agit d'un Isoflavone.

Le NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I (+40nm) indiquant la présence d'un OH en 4'.

L'addition du NaOAc provoque une décomposition de la bande I et II en fonction de temps indiquant la présence ortho di-OH en 6 et 7 ou en 7 et 8 [1

On suppose la structure de base d'un **Isoflavone** suivante avec un OH en C7 ou bien en C8 :



c) Spot 4 :

La série spectrale de ce spot (Figure-9) (Cf. Annexe III) nous donne les résultats suivants qui sont représentés dans le Tableau V-12.

Tableau V-12:Résultats du l'étude spectrale de spot 4, phase d'acétate d'éthyle

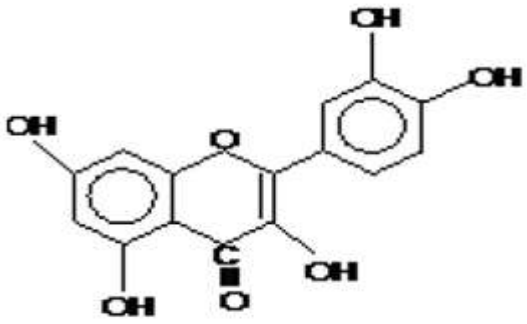
Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	268	382
NaOH	326	382
NaOAc	326	385
NaOAc/H_3BO_3	326	385

Le spectre méthanolique nous donne deux maximums d'absorption l'un correspond à la bande I (382 nm) et l'autre est celui de la bande II (268 nm), ces caractéristiques sont en faveur de la présence d'un flavonol au noyau A polysubstitué.

L'addition de NaOH donne un effet bathochromique de la bande I, avec apparition de pic entre 320-335 nm, signifiant la présence d'un OH libre en C4', et un autre OH libre en C7 respectivement.

L'addition de NaOAc provoque un effet bathochromique (+54nm) de la bande II cela confirme la présence d'OH libre en C7, puis l'ajout du H3BO3 donne un déplacement bathochromique traduisant la présence d'un groupe ortho di OH en C3' et C4'.

On suppose que cette molécule est la **quercétine** :



V.3.2.2.2 Phase du butanol

a) Spot 1:

Les résultats de la série spectrale de ce spot **(**Figure-10) (Cf. Annexe III) sont représentés dans le Tableau V -13.

Tableau V-13 : Résultats du l'étude spectrale de spot 1, phase du butanol

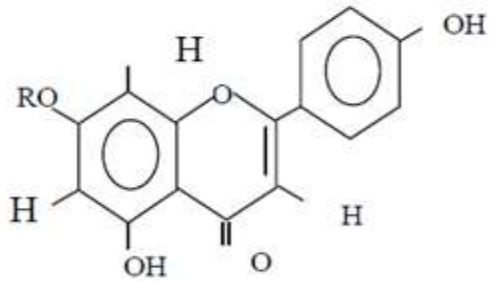
Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	270	332
NaOH	322	386
NaOAc	270	332
NaOAc/H_3BO_3	269	334

Dans le méthanol on a une bande I à 332nm et une bande II à 270nm indiquant une flavone monosubstitué en B [158].

Le spectre avec le NaOH donne un effet bathochrome et hyperchrome stable témoignant d'un OH en C4' et de l'absence d'ortho di-OH.

L'addition du NaOAc donne une bande I au léger déplacement hypsochromique indiquant un OR en C7. L'ajout du H_3BO_3 ne donne pas de déplacement, donc pas d'ortho di-OH.

Ces résultats sont en faveur d'une **apigénine** [157]



b) Spot 2 :

Les résultats de la série spectrale de spot 1 de la phase du butanol sont représentés dans la Figure-11(Cf. Annexe III) et données dans le Tableau V-14.

Tableau V-14:Résultats du l'étude spectrale de spot 2, phase du butanol.

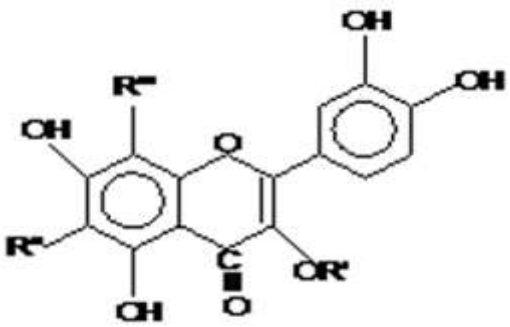
Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	284	330
NaOH	320	372
NaOAc	284	329
NaOAc/H_3BO_3	285	328

Le maximum d'absorption de la bande I se situe à 330.5 nm, celui de la bande II est à 280 nm, et la fluorescence bleue violette sont en faveur d'un flavonol (3OR) au noyau polysubstitué.

L'effet bathochromique (+52nm) combiné à l'effet hyperchromique de la bande I après addition de NaOH nous informent sur la présence d'un 4'OH.

Le NaOAc, une fois ajouté, provoque un déplacement bathochromique important de la bande II cela veut dire que notre molécule dispose d'un OH libre en C7, l'addition de H_3BO_3résulte d'un effet bathochromique de (+16,5 nm) de la bande I indiquant la présence d'un groupement ortho di OH en C3' C4'.

On suppose que cette molécule correspond au **Quercétine 3OR'**



c) Spot 4 :

La série spectrale de ce spot (Figure-12) (Cf. Annexe III) nous donne les résultats suivants qui sont représentés dans le Tableau V-15.

Tableau V-15:Résultats du l'étude spectrale de spot 4, phase du butanol.

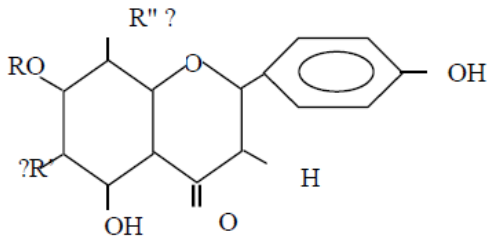
Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	272	328
NaOH	328	381
NaOAc	272	329
NaOAc/H_3BO_3	270	328

La bande I à 328nm et la bande II à 272nm sont en faveur d'une flavone au noyau A polysubstitué.

L'effet bathochromique (+52nm) combiné à l'effet hyperchromique de la bande I après l'addition du NaOH informe d'un 4'-OH.

Le NaOAc et le H_3BO_3, une fois ajoutés, ne provoquent pas d'effet bathochrome des bandes I et II. C'est-à-dire que notre molécule a un OR en 7 et ne contient pas d'ortho di-OH sur le noyau B.

Vu ces caractéristique on peut supposer cette structure :

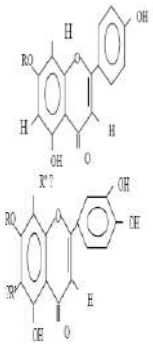
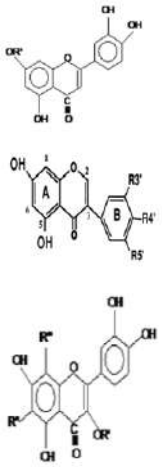
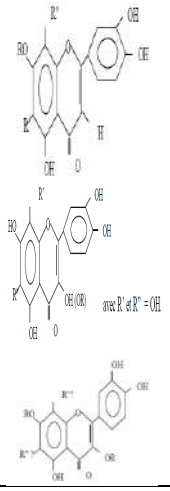
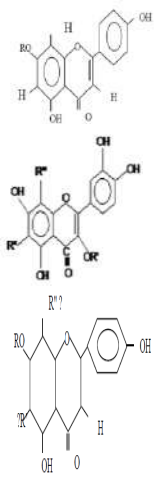


V.3.3 Discussion

Les différentes structures possibles et obtenues du *Rosmarinus officinalis* par les deux procédés d'extractions sont résumés dans le Tableau V-16.

Il est utile de noter que ces résultats nécessitent une confirmation par d'autres méthodes d'analyse plus précise.

Tableau V-16 : Les différentes structures obtenues par les deux méthodes d'extraction.

Méthodes d'extraction	Chauffage classique à reflux		Induction magnétique	
Extraite	Nom de composée	Structure	Nom de composée	Structure
AcOEt	**Apigénine**		**Lutéoline 7 OR'** **Isoflavone** **Quercétine**	
ButOH			**Apigénine** **Quercetin 3 OR'**	

D'après les résultats obtenues lors de la réalisation de la CCM analytique, CCM préparative et l'étude spectrales des différents extraits de *Rosmarinus officinalis*, nous avons constaté une certaines différences entre les extraits obtenus par le procédé de chauffage classique à reflux par rapport a ceux obtenus par le procède de chauffage par induction magnétique, ces dernies son plus riches en flavonoïdes de type flavone et flavonols.

De façon générale ; les composés principaux trouvés dans les différents extrais méthanoliques sont : l'apigénine et la quercétine.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Zeghed [159] et Akroum [160].En contre partie, nos résultats viennent confortés ceux de Athamena et al [157] qui ont revélé l'absence de la quercétine dans les extraits méthanoïques obtenus par le procédé de macération.

Les différences trouvées peuvent être attribuées aux plusieurs facteurs tels que les facteurs inhérents (variété, conditions ambiantes, facteurs écologiques, variations saisonnières), les méthodes d'extraction, préparation de l'extrait, solvant utilisé et finalement l'organe de la plante utilisé.

V.3.4 Conclusion

Les analyses qualitatives et quantitatives des extraits du *Rosmarinus officinalis* effectuées par la chromatographie sur couche mince de gel de silice, ont montré sous UV la présence d'une multitude de variétés de composés phénoliques de type flavone et flavonol dans les extraits obtenus par deux procédés d'extraction ; chauffage classique et induction électromagnétique.

V.4 Résultats d'activité antimicrobienne

La méthode des disques a pour but d'étudier l'activité antimicrobienne des substances naturelles. Les résultats expérimentaux sont regroupés dans le Tableau V-17et présentés par les figures: (Figure V-5, Figure V-6 et Figure V-7).

Tableau V-17: Diamètre des zones d'inhibition pour les deux méthodes d'extraction.

Méthodes d'extraction	**Souches** / **Extrait**	*Bacillus Subtilis* (ATCC 10536)	*Escherichia Coli*(ATCC 6633)	*Sarcina Lutea* (Institut Pasteur)	*Staphylococc aureus* (ATCC 2973	*Staphylococcus Epidermidis* (ATCC 12228)	*Candida Albicans* (ATCC 10231)
Chauffage classique à reflux	**EP**	11.4	14.8	_	_	_	_
	AcOEt	12.8	12.8	11.3	10.8	15.4	_
	ButOH	14.2	15.8	12.6	12.6	12.2	14
Induction magnétique	**EP**	_	13.2	10.8	_	10.6	11.2
	AcOEt	11.5	14.1	11.9	12.7	12.3	11
	ButOH	12.2	17.3	12	13.7	12	13.7

ATCC: American Type Collective Cultures

V.4.1 Sensibilité des germes aux extraits du romarin

L'étude de l'activité d'inhibition des extraits du romarin a été effectuée par la méthode des disques. Les résultats des tests effectués permettent de faire l'identification de l'activité antibactérienne des extraits du romarin.

- Si la souche est sensible, une zone d'inhibition circulaire se forme, c'est à dire que le développement des bactéries au niveau de la zone de diffusion de l'échantillon est inactif.
- Si la souche est résistante, le diamètre de cette zone d'inhibition est négligeable, c'est-à-dire que les bactéries n'ont pas été inhibées par la diffusion de l'échantillon.

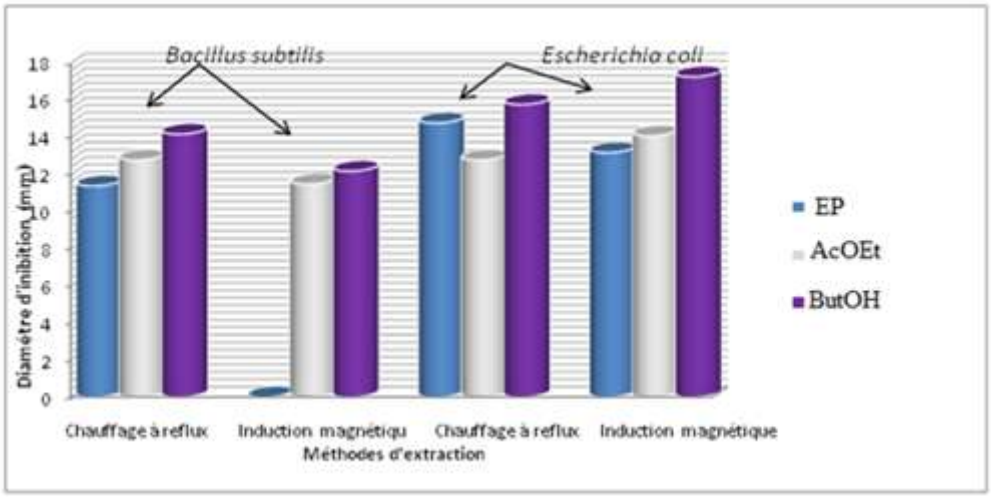


Figure V-5: Evolution de diamètre d'inhibition de deux souches (*Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*) en fonction des méthodes d'extraction.

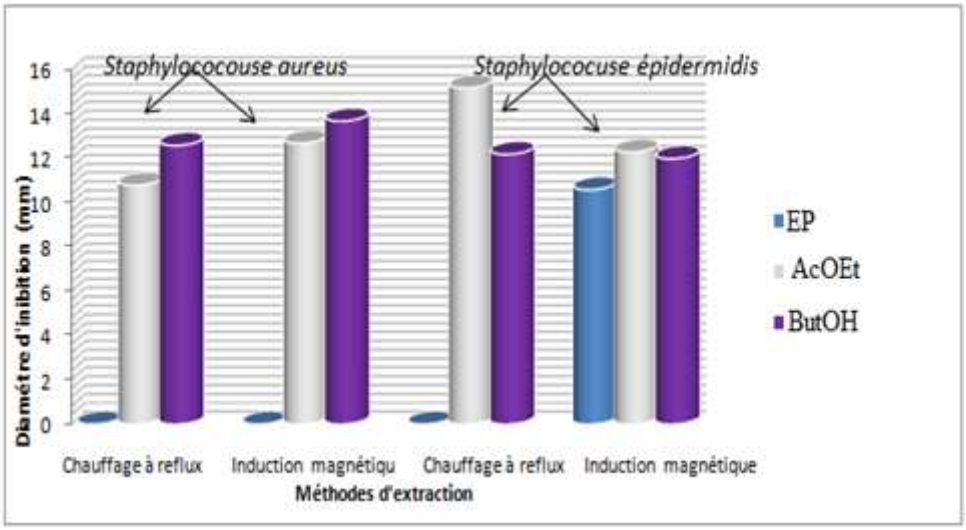


Figure V-6: Evolution de diamètre d'inhibition de deux souches (*Staphylococcus aureus* et *épidermidis*) en fonction des méthodes d'extraction.

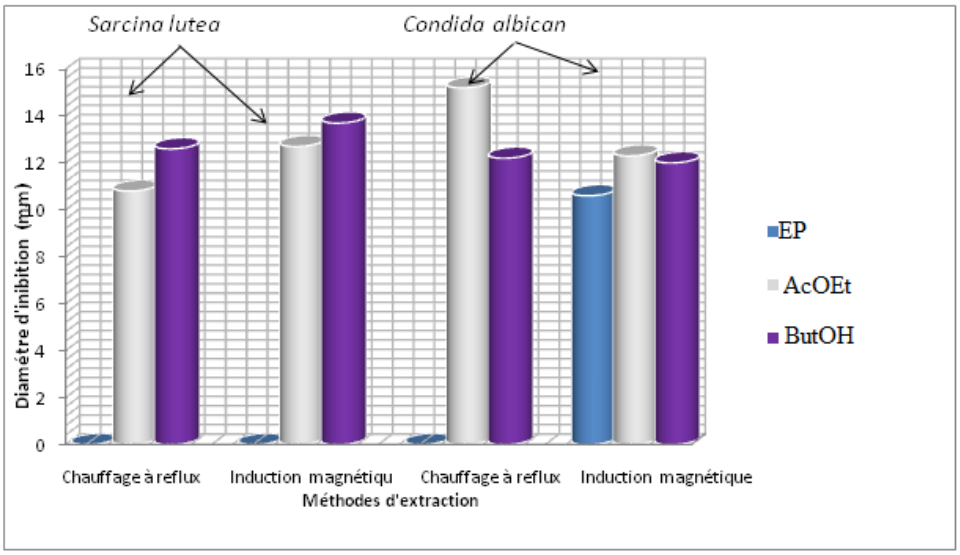


Figure V-7: Evolution de diamètre d'inhibition de deux souches (*Sarcina lutea* et *Condida albican*) en fonction des méthodes d'extraction.

V.4.2 Discussion

D'après le Tableau V-17 et les Figures (Figure V-6, Figure V-7 et Figure V-8) représentant l'évolution de diamètre des zones d'inhibition en fonction des méthodes d'extraction on constate que :

- La plupart des extraits de *Rosmarinus officinalis* L ont révélé une activité antibactérienne sur les souches testées et ce par les deux méthodes d'extraction à l'exception de l'EP qui était inactif sur *Sarcina lutea, Staphylococcus aureus, Staphylococcus épidermidis,* (chauffage par reflux) et *Bacillus subtilus, Satphylococcus aureus* (chauffage par induction). Les diamètres d'inhibition varient de 10mm à17mm. Le plus grand diamètre d'inhibition est obtenu avec *Escherichia coli* (17.3mm) pour l'extrait n-butanol par induction magnétique et (15.8mm) pour le même extrait par chauffage à reflux. Le plus faible diamètre d'inhibition est obtenu avec *Staphylococcus épidermidis* (10.6 mm) pour l'extrait éther par induction magnétique et (10.8 mm) pour le même extrait par chauffage classique à reflux. Ainsi, les résultats obtenus montrent que les flavonoïdes possèdent une activité antibactérienne aussi bien sur les bactéries à Gram positif que celles à Gram négatif.
- Tous les extraits utilisés par induction magnétique ont présenté une activité antifongique à l'égard de *Candida albicans.* Le plus grand diamètre d'inhibition (13.7mm) a été enregistré avec le ButOH et le plus petit (11mm) avec l'AcOEt. Le chauffage par

reflux n'a donné de résultats interprétables qu'avec le ButOH avec un diamètre d'inhibition égale à 14mm. Ces résultats suggèrent que les flavonoïdes présentent une activité antifongique contre cette levure, agent principal d'infections fongiques.

V.4.3 Conclusion

D'après les résultats de cette expérience, on arrive à la conclusion que les flavonoïdes et les composés de nature phénolique à groupes hydroxyle libres sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs [161]. La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes.

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait[43].Pour cela, la comparaison cas par cas de l'activité antimicrobienne de plusieurs extraits, en se basant sur le dosage d'un seul constituant actif (flavonoïdes dans notre cas), nous semble inutile.

Nos extrais ont été tous trouvé contenir une quantité de flavonoïde plus ou moins importante, donc on peut dire que l'activité antimicrobienne de ces extraits est due, au moins partiellement, à la présence de ce type de composés chimiques actifs dans leur composition.

CONCLUSION GÉNÉRALE

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Dans cette optique, le but principal de notre travail est d'isoler et d'identifier les métabolites secondaires de type flavonoïde de *Rosmarinus officinalis* L.

L'extraction des composés phénoliques par le procédé de chauffage par induction magnétique a prouvé une efficacité par rapport au chauffage classique à reflux en terme de rendement, teneur en composes polyphénoliques et teneur en flavonoïdes.

Les analyses qualitatives effectuées par la chromatographie sur couche mince de gel de silice, ont montré sous UV la présence d'une multitude de variétés des composés phénoliques, ces derniers sont par la suite isolés par des différentes techniques chromatographiques de séparation dont leur structure a été élucidée par une étude directe au spectrophotomètre UV-Vis. Il ressort de ces analyses que la plante *Rosmarinus officinalis* L est riche en flavonoïdes de types flavone et flavonols tel que : **apigénine, quercétine et lutéoline.**Mais ses analyses qualitatives confirme l'insufisance de cette méthode pour une identification précise de la structure, d'où la nécessité d'utilisation des autres analyses complémentaire (HPLC, RMN).

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur différentes souches bactériennes, par la méthode de diffusion sur milieu solide. Les résultats biologiques obtenus tout au long de ce test ont montré que : les extraits du romarin ont présenté une activité antibactérienne vis-à vis un certain nombre de bactéries.

Les perspectives de recherche futures sont les suivantes :

- Poursuivre l'étude phytochimique de l'espèce " *Rosmarinus officinalis* L ", afin d'isoler d'autres métabolites secondaires contenus dans les extraits.
- Etudier d'autres activités de ces métabolites (antimicrobienne) afin de confirmer ou d'infirmer l'activité biologique attribuée à cette espèce.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Boldi A.M., 2004, Libraries from natural product-like scaffolds, Current Opinion in Chemical Biology 8: 281 - 286

[2] Clardy J., Walsh C., 2004. Lessons from natural molecules. Nature 432: 729-837.

[3] Koehn F. E., Carter G.T., 2005. The envolving role of natural products in drug discovery. Nature Review Drug Discovery 4: 206 - 220.

[4] Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. Journal of Natural Products 66: 1022 - 1037.

[5] Hostettmann, K., Potteray, O. and Wolfender, J.L. (1998), the potental of higher plants as a source of new drugs. Chimie, 52, 10-17.4

[6] Bruneton, J. , , Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentation Lavoisier, Paris, 915.p, 1993

[7] Tyler, V.E., Brady, L.R., Robbers, J.E. (1881), Pharmacognosy. Lea &Febiger, Philadelphia, 520.p.

[8] Guignard .J.L., 1996, Biochimie végétale. Mason, Paris, 255. p.

[9] Qureshi. N., Porter. J. W., 1981, In Biosynthesis of isoprenoid Compounds; Porter. J. W., Spurgeon. S. L. Eds ; Wile y : New York, Vol 1, pp 47-94

[10] Tohge T, Ohme M, Takagi M, Yamazaki M, Saito K., 2005,Enhanced radical scavenging activity of genetically modified Arabidopsis seeds. Biotechnol. Lett. ; 27 (5): 297-303.

[11] Urquiaga I., Leighton F., 2000, Plant polyphenol antioxidants and oxidativestress. Biological Research., 33(2) : 55-64.

[12] Macheix J J., Fleuriet A. et Jay–Allemand C., 2005, Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.

[13] Touafek. O., Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud Algériens., Thèse de Doctorat Constantine, Algérie, 2010.

[14] Martin S., Andriantsitohaina R., 2002, Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de cardiologie et d'angéiologie. 51:304-315.

[15] Lugasi A., Hóvàri J., Sàgi K. V. et Bitó L.,2003, The role of antioxidant phytnutrients in the prevention of diseases. Acta Biologigica Szegediensiss. 47(1-4), 119-125.

[16] Dacosta, E. Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 2003 ,317p.

[17] Szent-Györgyi A., 1938, Therapeutic properties of vitamins, Presse Medicale 46 (995): 1893-1971.

[18] Alan L., Miller N. D. , 1996., Antioxidant flavonoids : Structure, function and clinical usage. Alt Med Rev, 1(2): 103-111.

[19] W-Erdman J., Balentine J .D., Arab L., Burrowes J.,2007,Flavonoids and heart health : Proceeding ofthe ILSI North America flavonoids workshop, Washington. Journal of Nutrition., 137 (3 supp 1) : 718 s-737 s.

[20] Emerenciano V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T. et Ferriro M. J. P. ,2007, Self organisating maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoïd data. Journal of brazilian chemical society., 18(5) : 891-899.

[21] Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R., 2001. , Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian journal of pharmacology., 33 :2-16.

[22] Bouakaz, I., Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*, Mémoire de magister. Batna-Algérie-,2006,

[23] Gamet-Payrastre, L., Manenti, S., Gratacap, M.P., Tulliez, J., Chap, H., Payrastre, B.,1999,Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3- kinase. General Pharmacology. 32: 279-286.

[24] Hutzler P., Fishbach R., HellerW., Jungblut T. P.,Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenböck G. et Schnitzler J. P., 1998,Tissue localisation of phenolic compounds in plants by confocal laser scaning microscopy. Journal of experimental botany., 49(323) : 953-965.

[25] Verhoeyen M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., De Vos C. H. R. et Colliver S., 2002,Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoïd biosynthesis pathway. Journal of experimental botany., 53(377) : 209 -210.

[26] Lahouel M., Interaction flavonoides-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat, Constantine-Algérie-,2005.

[27] Pincemail J., Meurisse M., Imet R. L. et Defraigne J. O., 1999, Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. vaisseaux, cœur, poumons., 4 (4).

[28] Boudet A. M., L'usine chimique. 9 ème conférence de l'université de tous les savoirs. France, 2000, p1-16.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[29] Besle J. M., Lamaison J. L., Pradel P., Fraisse D., Viala D. et Martin B., 2004, Les flavonoïdes des fourrages au lait. Rencontres Recherches Ruminants., 11 : 67-70.

[30] Lhuillier, A., Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : Agauria salicifolia Hook.f ex Oliver, Agauria polyphylla Baker (Ericaceae), Tambourissatrichophylla Baker (Monimiaceae) et Embelia concinna Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse, 2007.

[31] Milane, H., 2004 , La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg.

[32] Vessal M, Hemmati M, Vasie M., 2003. Antidiabetic effects of quercetinin streptozocin-induced diabetic rats. CompBiochem Physiol C Toxicol Pharmacol ,135:357–64

[33] Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O., Regerat F., 1996. Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. Méd. Nut. 32 (1) : 17-27.

[34] Elicoh-Middleton Jr. Chithan K., Theoharis C. , 2000. Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. Pharmacology and Experimental therapeutics, 4(52): 673-751.

[35] Nutranews : Science, nutrition, prévention et santé. Déc. 2005. (site).Chimio prévention naturelle du cancer. A. Bouchy.

[36] HARBORNE, J. B., MABRY, T.J. and MABRY, H. ,1975, The flavonoides, Tome I,Tome II, CHAPMAN and HALL, London

[37] Richter .G, Métabolisme des végétaux. Physiologies et Biochimie, Romandes,1993, 322-323

[38] Jassim S.A., Naji M.A. ,2003, Novell antiviral agents: a medicinal plant perspective. Appl. Microbiol. 95(3) : 412-27

[39] Taguri T., Tanaka T., Kouno I. ,2004, Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. Biol. Pharm. Bull. 27(12) : 1965-1969.

[40] Takahashi T, Kokubo R, Sakaino M .,2004, Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from Eucalyptus maculata. Lett. Appl. Microbiol. 39(1) : 60-4.

[41] Yadava R.N., Tiwari L. ,2005, A potential antiviral flavone glycoside from the seeds of Butea monosperma.O. Kuntze. J. Asian. Nat. Prod. Res. 7(2): 185-188.

[42] Tereschuk M. L., Riera M.V., Castro G.R., Abdala L. R.,1997, Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of Tagetes minuta. J. Ethnopharmacol. 56 : 227–232.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[43] Essawi T. et Srour M.,2000, Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. J. Ethnopharm. 70: 343-349.

[44] Sakar M.K., Engelshowe R., Tamer A.U. ,1992 , Isolation and antimicrobial activity of flavonoids from Prunus spinosa L. flowers. Hacettepe Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi.12 : 59-63.

[45] Kono K., Tatara I., Takeda S., Arakawa K., Hara Y. (1994) Antibacterial activity of epigallocatechin gallate against methicillin-resistant Staphylococcus aureus . Kansenshogaku Zasshi. 68 : 1518–1522

[46] Verma D. K., Singh S. K., Tripathi V. (1997) A rare antibacterial flavone glycoside from Lantana camara. Indian Drugs. 34: 32–35.

[47] Grange J. M., Davey R. W. (1990) Antibacterial properties of propolis. J. R. Soc. Med. 83 : 159–160.Guillén M. D., Manzanos M. J. ,1998 , Study of the composition of the different parts of a Spanish Thymus VulgarisL. plqnt. Food chemistry. 63(3) : 373-383.

[48] Sato M., Tsuchiya H., Takase I., Kureshiro H., Tanigaki S., Iinuma M. (1995) Antibacterial activity of flavanone isolated from Sophora exigua against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and its combination with antibiotics. Phytother Res. 9 : 509-512.

[49] Harikrishna D., Appa Rao A. V. N., Prabhakar M. C. ,2004 , Pharmacological investigation of a flavonoïd glycoside. Indian. J. Pharmacol. 36 : 244-250.

[50] Harborne J. B., Williams C. A. ,2000 , advances in flavonoïd research since 1992. Phytochimistry. 55: 481-504

[51] Valsaraj R., Pushpangadan P., Smitt U. W ., et al. ,1997 , New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from Terminalia bellerica. J. Nat. Prod. 60: 739-742.

[52] Zheng W. F., Tan R. X., Yang L., Liu Z. L. ,1996, Two flavones from Artemisia giraldii and their antimicrobial activity. Planta. Med.62 :160-162.

[53] Akroum.S., Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba L*. Thèse de Magister ,université de Constantine,2006.

[54] Bylka W., Mathawska I. et Pilewski N. A. ,2004,Natural flavonoïd as antimicrobial agents. Journal of the American Nutraceutical Association., 7(2) : 24-26.

[55] Tapas A. R., Sakarkar D. M. et Kakde R. B. ,2008, Flavonoïd as nutraceuticals. Topical journal of pharmaceutical research., 7(3) : 1089-1099.

[56] Van Acker S., Tromp M., Haenen G. R. M. M., van der Vijgh W., Bast A., 1995, Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical. Biochem. Biophy. Res. Co. 214(3) :755-9.

[57] Bousseria M.S,2009."Effets anti et pro-oxydants de la vitamine E sur le profile en acides gras chez les rats ayant ingéré de l'huile oxydée ".Mémoire de DES en biologie, option biochimie.51p

[58] Laughton M.J. , Halliwell B., Evans P.J., Hoult J. , Robin S., 1989 ,Antioxydant and pro-oxydant actions of the plant phenolics quercétine, gossypol and myricetin. Biochem. Pharmacol.38 (17): 2859-2865.

[59] Kessler M., Ubeau G., Jung L., 2002, Anti-and pro-oxydant activit y of rutine and quercétine derivatives. J. Pharm. Pharmacol. , 55 : 1-11.

[60] Mookerjee B. K., Lee T. P., Logue G. P., Lippes H. A. , Middleton E., 1986, The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. Prog. Clin. Biolo.Res. 213 : 511-20.

[61] Middleton E. J., Drzewiecki G., 1984, Flavonoïd inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. Biochem. Pharmacol. 33(21): 3333-8.

[62] Yamamura S., Ozawa K., Ohtani K., et al. ,1998, Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from Mentha spicata. Phytochemistry. 48(1) : 131-136

[63] Document technique N°1 station national d'essais de semences. Liste alphabétique des principales espèces de plante cultuvées et des mauvaises herbes.Noms latins et noms communs français.2emeEd Geues ,1984.

[64] Nutranews. , 2003, Information et actualité santé, nutrition, prévention du vieillissement –htm.

[65] Tieppo, J., Vercelino, R., Dias, A.S., Silva Vaz, M.F., Silveira, T.R., Marroni, C.A., Marroni, N.P., Henriques, J.A.P., Picada, J.N. ,2007, Evaluation of the protective effects of quercétine in the hepatopulmonary syndrome. Food and Chemical Toxicology. 45: 1140-1146.

[66] Xu, Y.C., Leung, S.W.S., Yeung, D.K.Y., Hu, L.H., Chen, G.H., Che, C.M., Man, R.Y.K., 2007, Structure- activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. Phytochemistry. 68: 1179 -1188.

[67] Delgado M.E., Haza A.I., Arranz N., Garcia A., et Morales P., 2008,Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. Européen journal of nutrition., 47(8) : 479- 490.

[68] Baba Aissa F ," Encyclopédie des plantes utiles ", Ed : Librairie Moderne -Alger, 1999, P 171-173.

[69] Beniston NT, Ws, "« Fleur d'Algie", Enterprise national du livre ,3emeEd 18823/98, ; 2000 ,p48-30.

[70] Gilly G ," les plants aromatiques et les huiles essentielles à Grasse : botanique, culture, chimie, production ", L'Harmatan. Paris,2005 ,p 35-42-52.

[71] Heinrich, M., Kufer., J., Leonti., M., Pardo-de-Santayana, M.,2006,"Ethnobotany and ethnopharmacology- Interdisciplinary links with the historical sciences", J Ethnopharmacol,107:157-160.

[72] Didier M., Jean-Marie , " les plants comestibles",Paris,2007, P28.

[73] René A," Cultivez les plantes sauvages et comestibles ", Paris,2008,p45.

[74] Massaoudi S,"250 plantes médicinales ", Tunisie,2005 ,P163-164.

[75] Moreno S, Scheyer T, Romano CS. Nojnov R, 2006,"Antioxydant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphénols composition", Free Rad Res40(2),223-31.

[76] Del Bano MJ, L, Castillo J, 2004,"Flavonoïd distribution during the development of leaves, flower, stems and roots od Rosmarinus officinalis. Postulation of a biosynthetic pathway", J Agric Food, 32(16),4987-92.

[77] Okamura N, Haraguchi H, Hashimoto S, Yagi A, 1994,"Flavonoïds in Rosmarinus officinalis leaves Phytochem",37(5),463-6.

[78] Bellakhdar. J,"La pharmacopée marocaine traditionnelle", Ibis Press, Paris, 764 p, 1997.

[79] Beloued, A, "Plantes médicinales d'Algérie", 2ème Edition, Office des publications universitaires, Alger, 1998.

[80]Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou ,P .,Blekas, G., Georgakis, S A.,2007, " Effect of rosemary extract, chitosan and α-tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored et 4°C", Meat science, 76: 172-181.

[81] Celiktas. O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C,2007,"Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations", Food Chem,100: 553-559.

[82] Rasooli, I., Fakoor, M.H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., Rezaei, M.B,2008, "Antimycotoxigenic characteristics of Rosmarinus officinalis and Trachyspermum copticum L", essential oils. International J of Food Microbiology .122:135-139.

[83] Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R, 2005, "Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidatants, antiradicals and antimicrobials in Foods", Food Chem. 91:621-32.

[84] Nassu, R.T., Guaroldo Goncalves, L.A., Azevedo Pereira da Silva, M. A., Beserra, F.J.,2003, " Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant", Meat Science. 63:43-49.

[85] http:// lpi. Oregonstate.edu/f-w00/flavonoïde html, date de dernière consultation le 24/05/2012.

[86] Atik bekkara, F., Bousmaha, L., Tabeb bendiab, S.A., Boti, J.B., Casanova J., 2007,"Composition chimique de l'huile essentielle de Rosmarinus officinalis L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen". Biologie& Santé. 7: 6-11.

[87] Adsersen, A., Gauguin, B., Gudiksen, L., Jager, A k. , 2006,"Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetyl cholinesterase inhibitory activity". J Ethnopharmacol 107: 418-422.

[88] Bakirel, T., Bakirel, U., Ustuner Keles, o., Gunes Ulgen, S., Yardibi, H., 2008, "In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus officinalis) in allaxan-diabetic rabbits". J Ethnopharmacol. 116:64-73.

[89] Sotelo-Felix, J.I ., Martinez-Fong, D., Muriel, P., Santillan, R.L., Catillo, D., Yahuaca P., 2002,"Evaluation of the effectiveness of Rosmarinus officinalis(Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat", J Ethnopharmacology. 81: 145-154.

[90] Amin, A., Hamza, A. A. , 2005,"Hepatoprotectiva effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats". Life Sciences. 77: 266-278.

[91] Rodzko. V., Abécédaire de phytothérapie. Ed Dunod, Paris,1999.

[92] Albert. Y. Leung, Steven Foster, *Encyclopidia of Common Naturel Ingradients Used In Foods, Drugs, and Cosmetic,* 2ème édition, 1996,Awrley-interscience publication, P445.

[93] Zoubeidi. C., *Etude des antioxydants dans le Rosmarinus Officinalis. Labiatea.,* Thèse de Magister., Ouargla. Algérie., 2004

[94] F.Piozzi ., J., Phytochemestry., 1996.,Vol: 6,P 125,146.

[95] Deans et al, *Chimical Composition, Antbactérial, and Antioxidantive Activity of Laurel, Soge, rosmary, Oregano and Coriander Essential Oils. J. Essent Oil Res.*1998, 10,P618.

[96] Karin Schwrz and Waldemar Ternes , *Isolation and Formation of Other Phenolic Diterpeens, Z, Lebenson unter frsch,* ,1992, Vol 195, P99.

[97]Luicita lagunez Rivera "*Etude de l'extraction de Métabolites Secondaires de différentes Matiéres Végétales en réacteurs chauffée par induction thermomagnétique Directe*", Thèse de Doctorat INP Toulouse.2006

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[98]Mouas S, Lachenani A," *Extraction et caractérisation de l'huile essentielle des graines de Cominum cyminum L induction électromagnétique*", PFE, Université de Médéa, 2010.

[99] Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G. and Rakesh D.D.,2008, Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy

[100]Pinelo M., Rubilar M., Jerez M., Sineiro J. and Nuinifez M.J. ,2005, Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 53(6): 2111-2117.

[101] Leybros J., Fremeux P. *Extraction solide-liquide - Aspects théoriques*. Techniques de l'Ingénieur (traité Génie des procédé), J 2780

[102]Ben Amor.B."Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes Actifs; Texturisation par détente instantanée contrôlée DIC", Thèse de Doctorat, Toulouse, 2005.

[103] MellatIkram "Contribution *à l'extraction et l'étude de l'huile essentielle d'Eucalyptus*" (PFE) Université de Médéa .1997.

[104] www.industries des precedes. Perso. Sfr.fr/Cour/extrliqliq/pdf . date de dernière conciliation 12.09.2012.

[105] Crouzet. J, Arômes alimentaires. Techniques de d'ingénieur, F 4 100, Paris, 1996.

[106] Boussetta N., Lanoisellé J.-L., Bedel-Cloutour C. and Vorobiev E. ,2009, Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments. Journal of Food Engineering 95(1): 192 -198.

[107] Besombes. C" Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques" .Applications généralisées. Thése de doctorat. Université de la Rochelles,2008

[108] HEMWIMON S., Pavasant p.& SHOTIPRUX A.(2007). Microware-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of Morinda citrofolia. Separation and Purification Technology.54.44-50.

[109]Wang L. and Weller C.L. ,2006, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science &Technology 17(6): 300-312.

[110] Lucas .J "Induction Conduction électrique dans l'industrie". Ed Electra; Paris 1996.

[111]Gérard D, "Chauffage par induction électromagnétique : technologie", technique de l'ingéni Rudnev V, "Hand book of induction heating", Ed CRS, 2003.eur D5963, 2000

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[112]Fache P., Nuns J., Tuaz F. "Le chauffage des liquides fortement conducteurs de l'électricité : l'induction directe, une solution qui ignore l'encrassement et la corrosion ",Congrès, UNIPEDE, Barcelona 1995

[113]Luicita lagunez Rivera, "Etude de l'extraction de Métabolites Secondaires de différentes Matières Végétales en réacteurs chauffée par induction thermomagnétique Directe", thèse de doctorat INP toulouse.2006.

[114] Ribereau-Gay ou, J.B. (1968). The phenolic compounds of vegetals, Edition Dunod, Paris.

[115] Ikan R : Natural products. A laboratory guide. Academic Press ; London, New York and San Fransisco.

[116] Jelly M.R. (1997). Le charbon actif en grain dans le traitement des eaux résiduaires et des eaux potables et sa régénération .Information chimique n° 166.

[117] Delmeyda W. 2001. Méthodes analytiques en chimie instrumentale (site).chromatographie sur couche mince.

[118]Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas ,M.B. (1970), The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York, Heidelberg. 254.

[119] Yaou A. ,2001, Contribution à l'étude des composés flavonique d'une labiée. Le Teucrium polinum. Thèse de magistère Thése de Magister ; Université Constantine.

[120]Kouam F. S. « Contribution à l'étude chimique de deux plantes médicinales du Cameroun : Alchornea cordifolia et Dorstenia mannii et hémisynthèse de quelques flavanones » Université de Yaoundé I 2000, Doctorat de troisième cycle, pp. 52-67.

[121]Jurd, L. and Horowitz, R. (1962), Spectral properties of flavonoïd compounds, pergamonpress, Oxford, 107-2055.

[122] Markham, K. R. (1982), Technique of flavonoids identification, Academic press, London.

[123] Grayer R. J., "Plant phenolics". 1989, (Eds. Harbone J. B.), In Flavonoids, San Diego, Academic Press, 283-323.

[124] Markham, K.R. and Mabry, T.J. (1968), Phytochemistry, 7, pp. 1197.

[125] J. L. RIOS, S. MAÑEZ, M. PAYA, and M. J. ALCARAZ, Antioxidant activity of flavonoids from Sideritis javalambrensis, Phytochemistry, 1992, 31, p 1947.

[126] BACON, J.D. and MABRY, T. A., UV Spectral procedures for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavanols. (1976), Rev. Latinoamer, Quim, 7, 83-86.

[127] F. SHAHIDI, and P. K. J. P. D. WANASUNDARA, Phenolic antioxidants, Crit. Rev. Food Sci. Nutr, 1992, 32 (1), p 67.

[128] Mansour, R.M. A., Abdalla, M. F, and Salah, N. A. M, (1988) Quercetine-3.7disulfte form Centaurea alexandrine.. Bull. Chem .Soc. Ethiop., 2(1) : 45-46

[129] GONNET J.F.,1989. Apport de la biologie micromoléculaire (flavonoïdes) à la compréhension de la structure et du fonctionnement de l'espèce allogame *Centaurea montana* (Composées) et de l'espèce autogame *Chaerophyllum aureum* (Ombellifères) au sien de deux groupements subalpins : prairie et mégaphobiaie, Thèse Doctorat d'Etat, Université Claude-Bernard-Lyon I, Lyon, 266 p.

[130] Boukhelkhal, A , Benhadjer , S . "Extraction de l'huile essentielle de Ruta chalepensis L en utilisant le procédé de chauffage par induction magnétique». Mémoire d'ingénieur d'état. Médéa,2009.

[131]Awouafack M. D, «Phytochemical studies of three Camreroonian medicinal plants: Eriosema glomerata, Crotalaria lachnophora (Fabaceae) and Crinum humile(Amaryllidaceae), chemical transformations and antimicrobial activities of some isolated compounds » Université de Dschang 2009, Doctorat Ph. D Degree en chimie organique, pp. 28-68.

[132] Boutiti A; ETUDEPHYTOCHIMIQUE DEL'ESPECE Globularia alypum L Thése de Magister ; Université Constantine 2004.

[133] Es-Safi., Kerhoas N.,Einhorn J., Ducrot.(2005). Contribution a l'étude des tannins d'Eucalyptus. International journal of mass spectrometry. 247: 93-100.

[134] Twidwell E.K., Wagner J.J et Thiex Nancy. J; 2002 «Use a Microwave Over to determine moisture content of Forager" Ex Ex 8077.p2.

[135] Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. ,2007, Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Foodchemistry*. 102: 771-776.

[136] Georgé, S. Brat, P. Amiot, J.M., 2005, Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and food Chemistry.* 53: 1370-1373.

[137] Ayoola G. A., Ipav S. S., Solidiya M. O., Adepoju-Bello A. A., Coker H. A. B. et

Odugbemi T. O., 2008, Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* oliv (Guttiferae).*International journal of healthresearch*,**1** (2) : 81-93.

[138] Ekoumou C., 2003, Etude *phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite*. Thèse de Doctorat de l'université de Bamako.

[139] Debete Judith M., Etude *phytochimique et pharmacologique de Cassia nigricans Vahl (Caesalpiniaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad*. Thèse de Doctorat de l'université de Bamako, 2005.

[140] Mehibel M., Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante des polyphénols extraits de Rosmarinus officinalis set Quercus suber de la région de Jijel. Mémoire de magistère de l'université de Jijel, 2006.

[141] Kaabouche Z., Cours et exercices de chromatographie. Ed Dar el fadjr.p109, 2007.

[142] Bhat S. V., Nagasampagi B. A. et Sivakumar S. M. , Chemistry of natural products, Ed Springer, p592, 2007.

[143] Aurangzeb H. et Muhammed Nawaz T. 2005. Flavonoids from the leaves of Impaciens bicolor. Turkish journal of chemistry. 29: 65-70.

[144] Maleš Z., Medić-ŠarićM. et Bucar F.,1998;Flavonoids of Guiera senegalensisJ F GMEL–Thin layer chromatography and numerical methods. CROATICA CHEMICA ACTACCACAA., 71(1) : 69-79.

[145] Latifou L., *Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes beninoises*. Thèse de Doctorat de l'université Louis Pasteur de Strasbourg. 2005.

[146] Pibiri.M, 2006, Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'HE. Thèse de Doctorat, larousse, Canada,177.

[147] Hermal. C., 1993, Activités bactériostatique de sept émulsions d'huile essentielles et deux associations d'émulsions des huiles essentielles, Faculté de pharmacie, Université de Montpellier, 1,87.

[148] Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R., 2007, «bactériologie médicale: techniques usuelles».Edition Masson, 573p. Prescot L.M., Harley J.P. et Klein D.A., 2003, «Microbiologie». Edition De Boeck, 2ème édition, 1173p

[149] Prescot L.M., Harley J.P. et Klein D.A., 2003, «Microbiologie». Edition De Boeck, 2ème édition, 1173p

[150] Ari et Sezonov., 2008." Biologie et génétique d'Escherichia coli »édition Belin.381p

[151] www.pasteur.fr/*Bacillus*; date de dernier consultation(22-09-2012) .

[152] www.pasteur.fr/*Candida albicans;* date de dernier consultation (22-09-2012).

[153] Athamen.S, *ETUDE QUANTITATIVE DES FLAVONOIDES DES GRAINES DE Cuminum cyminum ET LES FEUILLES DE Rosmarinus officinalis ET L'EVALUATIONDE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE* .Thèse de Magister, Université de Batna,2009.

[154]Maisuthisakul, P., Pasuk, S., Ritthiruangdej, P. ;2008, Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J Food Composition and Analysis*.21: 229-240.

[155] Arabi.M, Fekhar.N., Extraction des metabolites secondaires {Flavonoides} de *Rosmarinus officinalis* L par le procédé du chauffage par induction magnétique.Thèse de Master, unéversité de Médéa, 2011.

[156] Tsai, P., Tsai, T., Ho, S. (2007) *In vitro* inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chem*. (in press).

[157]Del Bano MJ, Lorento J, Castillo J. , 2004,Flavonoïd distribution during the development of leaves, flower, stems and roots od Rosmarinusofficinalis. Postulation of a biosynthetic pathway. J Agric Food: 32(16):4987-92.

[158] Voirin B.,1983,Spectral differenciation of 5hydroxy-3-methoxyflavones with mono-4', di3',4'or3',4',5' substituted B rings. Phytochem.22.p:2107-2115.

[159] Zeghad.N, Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne,Mémoire de Magister,Universite de Constantine,2009.

[160] Akroum.S, Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba L*.,These de Magister ,universite de constantine,2006.

[161] Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., Mata R. ,1992, Screening for antimicrobial activity of crudedrug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. J. Ethnopharmacology. 35 :275-283.