REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université de MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement



Mémoire de Fin d'Etudes

En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master(LMD)

On : Génie des Procédés

Option : ***Procédés Pharmaceutiques***

Thème

Etude Quantitative des Flavonoïdes de *Rosmarinus Officinalis L* et évaluation de leur activité biologique

Proposé et dirigé par :

- *Pr.Krea Mohamed*
- *M^me^Megateli Sarah*

Présenté et préparé par :

Blet Hadjer

***Promotion* 2014-2015**

Dédicace :

À mes très chers parents,

À mes frères et;

À mes sœurs

À toute ma famille et

À mes amies et collègues

Remerciements :

En premier lieu, je remercie Allah le Tout Puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

***J**e tiens à remercier infiniment mon encadreur le Professeur krea Mohamed de m'avoir accepté de m'encadrer et accueilli dans son laboratoire.*

***J**e tiens à remercier également ma promotrice Mme Megateli sarah pour sa disponibilité, son aide, ses conseils, et sa Confiance.*

***J**e voudrais exprimer ma gratitude aux examinateurs de ce mémoire qu'ils m'ont fait l'honneur en acceptant d'examiner ce travail.*

***M**es remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de prés ou de loin à la réalisation de ce travail. Je ne saurais remercier ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour la réalisation de certaines étapes de ce travail je cite spécialement à tous les membres des services physico-chimie et de microbiologie. Mr Taib, Mr Zouambia fouad et fatiha*

***J**e tiens également à remercier ma famille, en particulier mes parents qui m'ont toujours permis de choisir mon chemin. Vous avez toujours été présents, aussi bien par votre soutien moral ainsi que financier. Merci également à ma sœur keltoum qui me soutenus durant les phases difficiles.*

Je remercie mes collègues et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.



ملخص

يهدف هذا العمل لاستخراج مركبات الفلافونويد من إكليل الجبل المخزنية بثلاث تقنيات استخلاص النقع البارد ;التسخين التقليدي و بالتحريض الكهرومغناطيسي والمقارنة بين هذه الأساليب الثلاثة من حيث المردود الاجمالي المستخلص و على نسب البوليفينول والفلافونويدات.تقنية التحريض الكهرومغناطيسي حققت زيادة كبيرة قدرت ب **(R=25,1%**
Tp=169.610 مغ /غ ; **Tf=69.957** مغ /غ) مقارنة بالتقنيتين (التسخين التقليدي **R=15,58% ; غ / مغ**
Tp=167.325, Tf=63.772مغ/ غ النقع البارد **Tp=89.69; R=6,37%** مغ /غ ; **Tf=2,97 مغ/ غ).** تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام DPPH *كشف أن* مستخلص إكليل الجبل المخزنية المتحصل عليه بالحث المغناطيسي لديه أكبر قدر من الفعالية المضادة للأكسدة مع القيم IC_{50} تتراوح بين 0,00**779** **الى 0,0014 ميكروغرام / مل.** من ناحية اخرى أظهر النشاط المضادة للميكروبات(مضاد للبكتيريا و مضاد للفطريات) أن مستخلص إكليل الجبل التي حصل عليها بأساليب الاستخراج المختلفة تستجيب وجها لوجه على بعض سلالات الاختبار: *Candida albican ; Staphylococcus aureus;* ومقاومة سلالات *Escherichia coli* ، *Aspergilus ; Enterococcus faecalis Niger*

الكلمات الرئيسية :اكليل الجبل, , الفلافونويدات , البوليفينول, استخلاص , النقع البارد, التسخين التقليدي, التحريض الكهروميناطيسي, نشاط مضاد للأكسدة, نشاط مضاد للبكتيريا

Résumé :

Le présent travail a pour objectif d'extraire les flavonoïdes de *Rosmarinus Officinalis .L* par trois techniques d'extraction (macération à froid ; chauffage classique à reflux et par induction électromagnétique) tout on comparent entre ces trois procédés en terme de rendement d'extraction, taux des polyphénols et des flavonoïdes .L'extraction assistée par induction magnétique a montré une amélioration assez importante avec des valeurs de (**R=25,1%** ; **Tp=169.610**mg EA G/g ; **Tf=69.957**mgEQ/g) comparés aux deux autres techniques (chauffage classique **R=15,58%** ; **Tp=167.325**mg EA G/g ; **Tf=63.772**mgEQ/g; la macération **R=6,37**% ; **Tp=89.691**mg EA G/g ; **Tf=2,97**mgEQ/g). L'activité antioxydante à été déterminée par la méthode de DPPH révèle que l'extrait de *Rosmarinus Officinalis* obtenu par induction magnétique possède la plus grande efficacité antioxydante avec des valeurs de IC_{50} varient de 0 ,00**7792** à 0,00**1433** (µg/ml) . D'autre part, l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) a montrée que l'extrait de *Romarin* obtenu par les différentes méthodes d'extraction est efficaces vis-à-vis quelques souches testées : *Staphylococcus aureus ;Candida albican ;* et leur inefficacité contre les souches :*Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Aspergilus Niger*

Mots clés : *Rosmarinus officinalis* L, Flavonoïdes, polyphénols, Extraction, macération, chauffage classique ,induction magnétique, activité antioxydante, Activité Antibactérienne.

ABSTRACT:

The present work aims to extract flavonoids of Rosmarinus officinalis .L whith three extraction technique (cold maceration; refluxing classical heating; and whith electromagnetic induction) and compare between these three techniques in term of yield and the rate of flavonoids and polyphénols .extraction assisted by magnetic induction showed a fairly significant improvement with values of (**R=25,1%** ; **Tp=169.610**mg EA G/g ; **Tf=69.957**mgEQ/g) (classical heating **R=15,58%** ; **Tp=167.325**mg EA G/g ; **Tf=63.772**mgEQ/g; cold maceration **R=6,37**% ; **Tp=89.691**mg EA G/g ; **Tf=2,97**mgEQ/g).

antioxidant activity was determined by the method of DPPH reveals that Rosmarinus officinalis extract obtained by magnetic induction has the largest efficiency antioxidant with IC50 values range from 0,00**779** à 0,00**143** (µg/ml) . Secondly, the antimicrobial activity (antibacterial and antifungal) has shown that rosemary extract obtained by the different extraction methods is responsive vis-a-vis on some test strains: *Staphylococcus aureus, Candida albicans*; and the resistance of the strains: *Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Aspergillus Niger.*

Keywords*: Rosmarinus officinalis* L, Flavonoids, polyphénols ,Extraction, maceration; classical heating, electromagnetic induction, antioxidant activity ,Antimicrobial Activity.

Sommaire

Résumé

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des Abréviations

Introduction générale……..1

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR 1

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE 1

Université de MEDEA 1

Mémoire de Fin d'Etudes 1

Option : ***Procédés Pharmaceutiques*** 1

Thème 1

Proposé et dirigé par : **Présenté et préparé par :** 1

Promotion **2014-2015** 1

Dédicace : 2

À mes très chers parents, ... 2

Remerciements : 3

ملخص 4

Résumé : 4

ABSTRACT: 4

Sommaire 5

Résumé 5

Liste des Tableaux 9

Liste des Figures 10

Liste des abréviations 12

ABTS : azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfanate 12

ButOH : butanol 12

Introduction générale : 1

I. *Rosmarinus officinalis* : 3

I.1 Introduction : 3

I.2 Historique : 3

I.3 Étymologie: 4
I.4 Classification: 4
Règne : Plantes 4
Embranchement : Spermaphytes 4
I.5 Description botanique : 4
1 **2** 5
Figure I-2 : La plante *Rosmarinus officinalis* .L(1), au période de floraison(2) 5
I.6 Habitat : 5
I.7 Appellation : 5
Allemagne : *Rosmarin* 5
Angleterre : *rosemary, old man* 5
Espagne : *romero* 5
I.8 Variétés : 6
I.9 Composition chimique du Romarin : 7
Figure I-3 : Structure des acides phénoliques du *Rosmarinus officinalis. L* 7
Figure I-4 : Structure des flavones de Romarin 8
Tableau I-2 : Les constituants d'huile essentielle de Romarin 8
I.10 L'utilisation de la plante : 9
I.11 Propriétés biologiques et pharmacologique du Romarin : 10
I.12 Conclusion : 16
II. Les métabolites secondaires 17
II.1 Introduction : 17
II.2 Les polyphénols : 17
II.1.1 Classification : 18
Figure II-1 : Les différentes classes des polyphénols 18
Figure II-2 : Effet biologique des polyphénols [4] 19
II.3 Les flavonoïdes 19
Figure II-3: Structure chimique de base des flavonoïdes []. 20
Figure II-4 : Structures des différentes classes de flavonoïde []. 21
II.4 Les méthodes d'extraction des flavonoïdes : 23
Figure II-5: les étapes d'extraction solide liquide avec solvant 24
Figure II-6 : Extracteur soxhlet 29
Figure II-7 : Représentation graphique d'un champ électromagnétique [107]. 31
Figure II-9 : Diagramme de phase de CO_2 32

Figure II-10:Principe de chauffage par induction [] 34
- **Loi de l'induction :** 35
- **Loi de Lenz:** 35
- **Loi de Faraday:** 35

II.5 Les méthodes d'identification et d'analyse des composés phénoliques: 35
Le facteur Rf = A/B 36
Figure II-11 : Principe de chromatographie sur couche mince 36
III. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes 38
III.1 Introduction : 38
III.2 Intérêt biologique des flavonoïdes : 38
Etape (2) et (3) : propagation du radical 40
III.3 Les flavonoïdes et les radicaux libres : 41
III.4 Les techniques de mesure de l'oxydation : 41
III.5 Activité anticancéreuse des flavonoïdes : 44
III.6 L'activité anti-inflammatoire : 45
III.7 Propriétés antiallergiques : 45
III.8 Activité antimicrobienne 46
III.9 Autres propriétés des flavonoïdes : 51
IV. Matériel et Méthodes 52
IV.1 Objectif : 52
IV.2 Matériel végétal : 52
Figure IV-1:*Rosmarinus Officinalis. L* 53
IV.3 Extraction des flavonoïdes et des polyphénols : 53
Evaporation 54
Figure IV-3 : macération de *Rosmarinus Officinalis.L* 55
FigureIV-4: Montage de l'extraction assistée par chauffage classique à reflux. 56
Figure IV-6: fractionnement de l'extrait brut de *Rosmarinus officinalis.L* 58
Figure IV-7: L'évaporateur Rotatif. 59
IV.4 Rendements en polyphénols : 60
IV.5 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes : 60
Figure IV-8:Le mode opératoire déterminant la teneur en composés phénoliques 61
IV.6 Etude de l'activité antioxydante par (DPPH): 62
IV.7 Étude de l'activité antimicrobienne : 64
Tableau IV-1: Présentation des différentes souches bactériennes testées 64

V. Résultats et discussion : 66
V.1 Teneur en eau : 66
Figure V-1: Teneur en eau de *Rosmarinus officinalis*L 66
V.2 Calcul de Rendement d'extraction : 66
V.3 Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes 67
Tableau V-2 : Résultats des extraits à la cyanidine 67
Figure V-3:Résultat de la réaction à la cyanidine 67
Figure V-4: Résultat de dosage des polyphénols 68
Figure V-5: Résultat de dosage des flavonoïdes 68
V.4 Résultats de l'activité antioxydante: 71
V.5 Résultats de l'activité antimicrobienne : 74
Figure V-10 : Exemples de quelque antibiogramme des souches testées 75
ATCC: American Type Collective Cultures 75
L'échelle de mesure de l'activité antibactérienne : 75
1. Fortement inhibitrice, lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 20mm. 76
2. Moyennement inhibitrice lorsque : 14mm<D_Z<20mm. 76
3. Légèrement inhibitrice lorsque : 9mm< D_Z<14mm. 76
4. Non inhibitrice lorsque : D_Z<9mm. 76

Donc, les pouvoirs inhibiteurs de nos extraits de *Romarin* sont considérés moyennement inhibiteurs. 76
Conclusion générale 78
Références bibliographiques
Annexes

Liste des Tableaux

Tableau I-1 : quelque variété de *Romarin* et leur caractéristique : 6
Tableau I-2 : Les constituants d'huile essentielle de Romarin 8
Tableau IV-1: Présentation des différentes souches bactériennes testées 64
Tableau V-1: Rendement d'extraction des composés phénoliques de *Rosmarinus officinalis* L. 66
Tableau V-2 : Résultats des extraits à la cyanidine 67
Tableau V-3: Evolution de taux de flavonoïdes et de polyphénols en fonction de la méthode d'extraction 69
Tableau V-4:Activité antioxydante des extraits de *Romarin* et de témoin déterminés par le test au DPPH. 73
Tableau V-5: Diamètre des zones d'inhibition pour les trois méthodes d'extraction. 75

List des Figures

Figure I-1 : Aspects morphologiques du *Romarin* 4
Figure I-2 : La plante *Rosmarinus officinalis* .L(1), au période de floraison(2)..... 5
Figure I-3 : Structure des acides phénoliques du ***Rosmarinus officinalis. L*** 7
Figure I-4 : Structure des flavones de Romarin..... 8
Figure I-5 : Les structures de mono-terpènes majoritaires dans l'huile essentielle..... 9
Figure II-1 : Les différentes classes des polyphénols..... 18
Figure II-2 : Effet biologique des polyphénols 19
Figure II-3**:** Structure chimique de base des flavonoïdes 20
Figure II-4 **:** Structures des différentes classes de flavonoïde 21
Figure II-5: les étapes d'extraction solide liquide avec solvant 24
Figure II-6 : Extracteur soxhlet 29
Figure II-7 : Représentation graphique d'un champ électromagnétique 31
Figure II-8 : Transfert de chaleur sous chauffage classique et sous chauffage par microondes 31
Figure II-9 : Diagramme de phase de CO_2 32
Figure II-10:Principe de chauffage par induction 34
Figure II-11 : Principe de chromatographie sur couche mince..... 36
Figure III-1: Réaction d'un antioxydant avec le DPPH 42
Figure III-2: Complaxation du Quercétine avec l'ion Fer^2 au niveau de groupement catechol 43
Figure IV-1:*Rosmarinus Officinalis. L* 53
Figure IV-2 : Protocole expérimental d'extraction des polyphénols et flavonoïdes de *Rosmarinus Officinalis. L* 54
Figure IV-3 : macération de *Rosmarinus Officinalis.L* 55
FigureIV-4: Montage de l'extraction assistée par chauffage classique à reflux. 56
Figure IV-5:Montage d'induction électromagnétique. 57
Figure IV-6: fractionnement de l'extrait brut de *Rosmarinus officinalis.L* 58
Figure IV-7: L'évaporateur rotatif 59
Figure IV-8:Le mode opératoire déterminant la teneur en composés phénoliques 61
Figure IV-9:Protocole de Dosage des flavonoïdes par la réaction à la cyanédine 62
Figure IV-10: Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive 63
Figure IV-11 : Protocole Expérimental déterminant l'activité antiradicalaire des extraits. 63
Figure V-1: Teneur en eau de *Rosmarinus officinalis*L..... 66
Figure V-2:Rendement d'extraction de *Romarin* en fonction les méthodes d'extraction 67
Figure V-3:Résultat de la réaction à la cyanidine..... 67
Figure V-4: Résultat de dosage des polyphénols..... 68
Figure V-5: Résultat de dosage des flavonoïdes 68
Figure V-6:L'évolution Evolution de taux de flavonoïdes (Tf) et de polyphénols (Tp) en fonction de la méthode d'extraction 69
Figure V-7 : Taux d'inhibition de la phase éther de pétrole issue de 3 techniques en fonction de la concentration..... 72

Figure V-8 :Taux d'inhibition de la phase d'acétate d'éthyle issue de 3 techniques en fonction de la concentration..... 72
Figure V-9 : Taux d'inhibition de la phase butanol issue de 3 techniques en fonction de la concentration 72
Figure V-10 : Exemples de quelque antibiogramme des souches testées..... 75

Liste des abréviations

ABTS : azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfanate

AcOEt : d'acétate d'éthyle

ADN : l'acide désoxyribonucléique.

AlCl3 : chlorure d'aluminium

AMP : Adénosine Monophosphate

ATP : Adénosine triphosphate.

ATCC: American Type Culture Collection

BHT : Hydroxytoluène Butylé

ButOH : butanol
CI50 : Concentration d'Inhibition de 50 % de croissance.

DMBA : dimethylbenz(a)anthracène

DPPH : 1,1-Diphényl-2-picrylhdrazyle

EP: d'éther de pétrol

ERO: Espèces réactives oxygénées

HIV: Human Immunodeficience Virus.

HPLC : chromatographie liquide haute performance.

IgAs : immunoglobuline A sécrétoire

IR: infra rouge

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

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

PCL : photochimioluminescence.

PH : potentiel d'hydrogène

ppm: Partie par million.

UV : Ultraviolet.

SRAS: Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

TEAC :Trolox Equivalent Antioxydant Capacity

Introduction générale :

L'utilisation des végétaux par l'homme se confond avec l'histoire même de l'humanité, à la fois à des fins alimentaires, de lutte contre les maladies par constitution d'une médecine et d'une pharmacopée traditionnelles. Parmi tous les constituant chimiques des végétaux, les composés phénoliques, s'ils n'occupent qu'une place quantitative modeste (à l'exception de la lignine), ont de multiples propriétés qui ont de tout temps été recherchés par l'homme, d'abord de manière empirique et en suite selon une approche plus raisonné qui a bénéficié et bénéficie toujours des progrès de la science, en particulier dans les domaines analytiques et biotechnologique [1].

Actuellement plus de 80 % de la population africaine ont recours aux drogues faites essentiellement de matières végétales qui poussent autour de leur ville. En plus dans le monde, prés de 25% des prescriptions sont à base de plantes et 60 à 70% des médicaments antibactériens et anticancéreux sont des substances d'origine naturelle [2].

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser [3].

Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme source d'antioxydants, qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant [4] .Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes et antimicrobiennes comme les vitamines, les caroténoïdes et les polyphénols notamment les flavonoïdes.

Nous avons choisi le *Rosmarinus officinalis.L* de la famille de *Labiées* parmi les plantes médicinales qui est fréquemment employé dans notre pays à cause de ses propriétés aromatiques, anti-oxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques et anti-tumorales, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médicine traditionnelle [5].

Il nous a semblé donc, intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche.

Le but de cette étude vise à :

- Extraire des flavonoïdes de *Rosmarinus officinalis* L par trois précèdes d'extraction : Deux techniques conventionnelles (macération et chauffage classique à reflux) et une technique émergente (chauffage assisté par induction magnétique).
- Analyse quantitative des composée isolé par la technique spectroscopiques UV-visible
- Etudier l'activité antimicrobienne des flavonoïdes par la méthode de diffusion en milieu gélosé
- Etudes de l'activité antioxydante par le test de DPPH.

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

Partie théorique avec trois chapitres :

- **Le premier chapitre** : est consacré à l'étude bibliographique comprit une présentation générale de la plante *Rosmarinus Officinalis.L* et au propriété biologique.
- **Le deuxième chapitre** : représente une étude sur les métabolites secondaires et les méthodes extractives.
- **Le troisième chapitre** : pour objective d'étude les activités biologiques et intérêt pharmacologique des flavonoïdes.

Partie pratique englobe deux parties :

La première partie: consiste à développer le matériel et les méthodes analytiques utilisées pour l'extraction, le dosage colorimétrique des polyphénols et des flavonoïdes, l'analyse quantitative des flavonoïdes et finalement une étude biologique ou on détermine le pouvoir antioxydant des flavonoïdes extraites vis-à-vis du radical libre DPPH. Un test antibactérien et antifongique est également réalisé afin de déterminer l'efficacité des produits flavonique contre certains souches : *Escherichia coli, Staphylococcus aureus ;Candida albican Enterococcus faecalis et Aspergilus Niger* pouvant être pathogènes pour l'homme

La deuxième partie : sera consacré aux résultats obtenus dans notre étude suivis d'une discussion.

.

Chapitre I : Etude générale de l'espèce Rosmarinus Officinalis

I. *Rosmarinus officinalis* :

I.1 Introduction :

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments [6].

Pour se soigner, l'homme a longtemps eu recours à des remèdes traditionnels à base de plantes (tisanes, poudres, décoctions), administrés par frictions, inhalations, cataplasmes, massages ou encore par voie orale. Le nombre d'espèces de plantes à fleurs connues est évalué à plus de 400 000. On estime à environ 34 000 le nombre d'espèces encore inconnues à ce jour [7].

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plantes riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies.

Famille de Labiatea connue depuis l'oligocène, c'est l'une des familles les plus répandues dans le bassin méditerranéen et spécialement en Algérie. Elle comprend plus de 3300 espèces et environ 200 genres [8].

I.2 Historique :

Depuis l'antiquité, le *Romarin* est employé pour améliorer et stimuler la mémoire [8]. Encore aujourd'hui en Grèce, les étudiants en font brûler dans leurs chambres en période d'examens. Les anthropologues et les archéologues ont découvert que le *Romarin* a été employé comme vertus médicinales, culinaires et cosmétiques en Egypte, Mesopotamia, Chine et en Inde antiques [9].

L'utilisation du *Romarin* dans la parfumerie remonte au XIVe siècle. On prête alors à l'eau de Hongrie, premier parfum alcoolique recensé et constitué essentiellement de Romarin, des pouvoirs d'eau de jouvence. Toutefois, on lui prêtait des effets stimulants sur l'activité cérébrale, dès la Grèce antique. C'est pour cette raison que les intellectuels grecs ceignaient leur tête de couronnes de Romarin.

Utilisé par ailleurs de manière empirique, comme remède à un bon nombre de maux, le miel de Narbonne, issu du Romarin, trouvait une place de choix dans la pharmacopée marine au XVIIIe siècle. Plus près de nous, au XIXe siècle, le médecin et prêtre catholique allemand *Sebastian Kneipp*, qui contribua activement au développement de la phytothérapie, prescrivait, aux personnes âgées, des bains de Romarin. Elles pouvaient, ainsi, lutter contre bon nombre d'affections : faiblesse générale, fatigue des yeux, hypotonie, hypotension, hypercholestérolémie, cirrhoses, surmenages physique et intellectuel, avec perte de mémoire, troubles cardiaques d'origine nerveuse, syncopes, rhumatismes ou encore paralysies [10].

I.3 Étymologie:

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 (famille de lamiacées) [11]**.**

I.4 Classification:

Règne : Plantes

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotyledones

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *Rosmarinus officinalis L* [12].

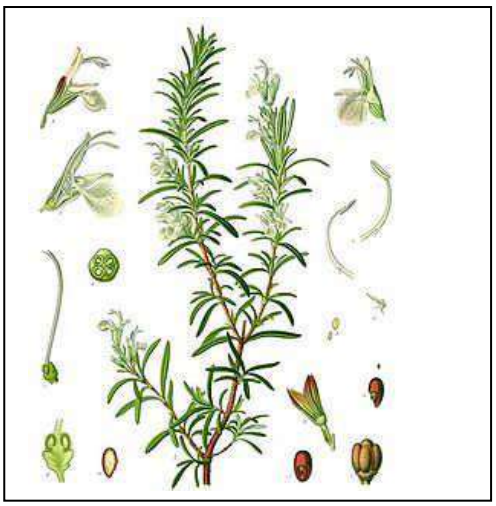


Figure I-1 : Aspects morphologiques du *Romarin* [13].

I.5 Description botanique :

Le *Romarin* est un arbrisseau de la famille des labiées, peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur, (voir Figure I-2) il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole,

- coriaces et beaucoup plus longues que larges,
- Aux bords légèrement enroulés,
- Vert sombre luisant sur le dessus,

- Blanchâtres en dessous.
- La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril– mai.
- La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches Rosmarinus officinalis albiflorus).
- Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base.

Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tétrakène (de couleur brune) [13].



1



2

Figure I-2 : La plante *Rosmarinus officinalis* .L(1), au période de floraison(2).

I.6 Habitat :

Le *Romarin* spontané qui pousse sur les cotes méditerranéennes, et le sud-ouest de l'Asie, est souvent cultivé dans les jardins comme clôture. Les Romarins affectionnent particulièrement les terrains calcareux, c'est pourquoi on le trouve essentiellement dans les garrigues maquis non loin de la mer [14].

I.7 Appellation :

Le Romarin est connu dans le monde selon ces appellations :

France : *Romarin*

Allemagne : *Rosmarin*

Angleterre : *rosemary, old man*

Espagne : *romero*

Italie : *rosmarino, taesmarino* [15].

En Algérie, le *Romarin* est l'une des sept espèces végétales excédant 50.000 hectares sur le territoire national [16]. Appellation régionales en Algérie ; en plus souvent

- Région de l'Est : *Eklil.*
- Région de l'Ouest *: Helhal*
- Région de centre : *Yazira*

I.8 Variétés :

On dénombre plus de 150 variétés de *Romarin* [17]. Elles se différencient par leur taille maximale (d'une dizaine de centimètres à 2 mètres), leur tenue (vertical ou rampant), la couleur de leurs fleurs (violettes, bleues, blanches, roses) et de leurs feuilles, (voir Tableau I-1)

Tableau I-1 : quelque variété de *Romarin* et leur caractéristique :

Variété	Nom	Caractéristiques
Rosmarinus officinalis Alba* ou *Albus	Romarin à fleurs blanches	Fleurs et bourgeons blancs.
Rosmarinus officinalis Athens Blue Spire	Romarin "Athens Blue Spire"	Feuillage dense, arôme puissant [18]
Rosmarinus officinalis Bennenden Blue	Romarin "Bennenden Blue"	Grandes fleurs bleu-ciel, feuilles étroites et foncées [10].
Rosmarinus officinalis Blaulippe	Romarin "Blaulippe"	Buisson compact, fleurs bleu tirant sur le violet. Sensible au froid.
Rosmarinus officinalis Gorizia	Romarin "Gorizia"	Grandes feuilles et grandes fleurs bleues. Saveur légèrement épicée rappelant le gingembre [18].
Rosmarinus officinalis Jackmann's Blue	Romarin "Jackmann's Blue"	Fleurs bleu ciel, retombant.
Rosmarinus officinalis Roseus	Romarin "Roseus"	Fleurs roses [10].
Rosmarinus officinalis Lavandulaceus	Romarin "Lavandulaceus"	Petite plante rampante, fleurs violettes.

I.9 Composition chimique du Romarin :

L'usage traditionnel de *Romarin* comme épice, ainsi que les propriétés antioxydantes de leurs feuilles à inciter plusieurs groupes de chercheurs à étudier la composition de la plante et les constituants responsables de cette activité.

I.9.1 Principes actifs :

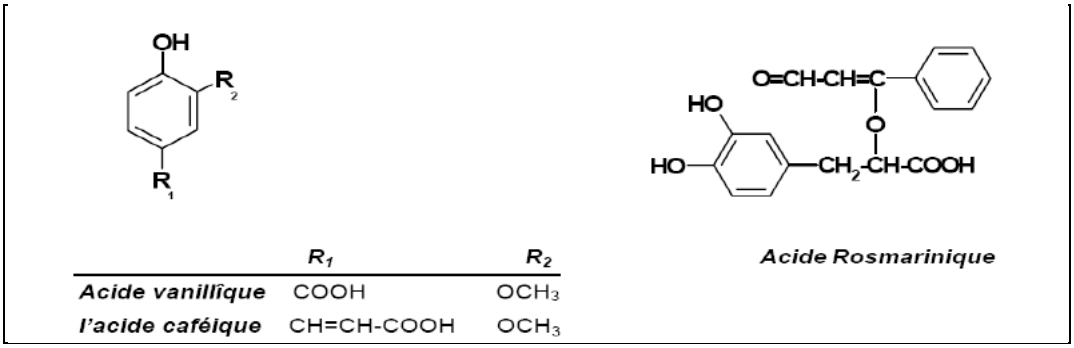
Les principaux constituants du *Romarin* responsables des différentes propriétés sont :

I.9.1.1 Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques constituant le Romarin sont: l'acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique [19 ;20]. Où les acides phénoliques présentent dans *le Romarin* et à des teneurs impotentes sont (voir Figure I-3)[21] :

L'acide Romarinique **l'acide caféique**

L'acide néo-chlorogénique **l'acide vanillique**



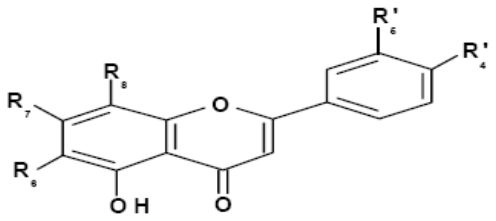
	R_1	R_2
Acide vanillique	COOH	OCH_3
l'acide caféique	CH=CH-COOH	OCH_3

Figure I-3 : Structure des acides phénoliques du *Rosmarinus officinalis. L*

I.9.1.2 Les flavonoïdes :

Plus de dix flavonoïdes sont isolés et identifiés dans le *Romarin.* La plupart d'entre eux sont des dérivés de flavone parmi eux en site : l'épigénie, genkwanine, et le 6-methoxy-genkwanine, ect(Figure I-4) [22].

Ces molécules sont identifiées et isolées par plusieurs auteurs [22].



	R6	R7	R8	R_4	R_5
Apigénine	H	OH	H	OH	H
Genkwanine	H	OCH_3	H	OH	H
6-méthoxy Genkwanine	OCH_3	OCH_3	H	H	OH
Genkwanine-4- métyl éther	H	OCH_3	H	OCH_3	OH
Lutéoline	H	OH	H	OH	OH
6- méthoxy-Lutéoline –méthyl éther	OCH_3	OCH_3	H	OH	OH
6- méthoxy-Lutéoline	OCH_3	OH	H	OH	OH
4-,5, 7, 8 tétera –OH-flavone	H	OH	OH	OH	H
6- méthoxyLutéoline 7-glucoside	OH	O-Gu	H	OH	OH

Figure I-4 : Structure des flavones de Romarin

I.9.1.3 *Huiles essentielles :*

Riche en dérivés terpéniques ; cinéol, bornéol, verbénone, esters, camphène et pinène.

L'huile essentielle de *Romarin* est un liquide incolore ou jaunatre dont l'audeur est fortement camphré, pénétrante de saveur très aromatique, les sommités fleuries fournissent plus de 10 à 25 ml/kg [23], le type algérienne renferme plus que cela [24] :

- 0.74% dans la plante sèche ;
- 0.1% dans les feuilles ;
- 1.4% dans les fleurs et rameux.

La teneur en l'huile essentielle dans le Romarin varie en fonction de l'origine géo-chimique de la plante .Plus de 50 composants mono-terpéniques rentrent dans la composition chimique d'huile essentielle de *Romarin* dont les constituants principaux sont (voir Tableau I-2) [26,29].

Tableau I-2 : Les constituants d'huile essentielle de Romarin

Constituant	1.8cinéol	Camphre	Pinène	bornéol libre et estérifié	Limonène
Teneur massique(%)	(15-50)	(15-25)	(19.6)	(10.0)	(3.6)

Un nombre des chercheurs s'intéresse à l'étude de la composition structurale d'huile essentielle de *Romarin* ainsi que son activité biologique (l'activité anti-microbienne et anti-oxydante) [25] :

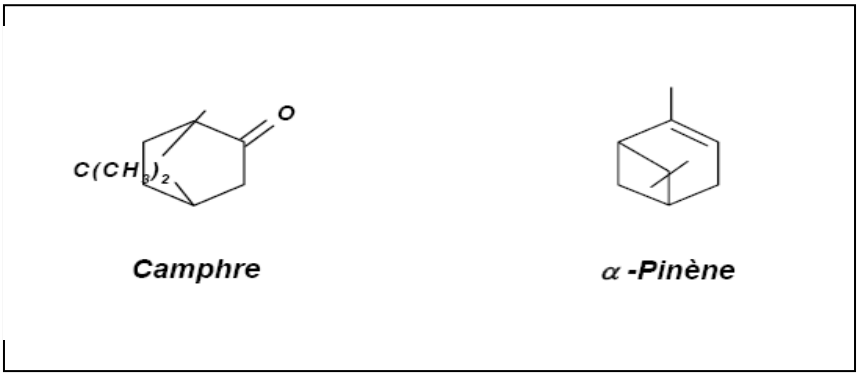


Figure I-5 : Les structures de mono-terpènes majoritaires dans l'huile essentielle de *Romarin*

I.10 L'utilisation de la plante :

I.10.1 Industrie agro-alimentaire :

Les extraits végétaux de *Romarin* présentent un pouvoir antioxydant important et peuvent être appliqués à la conservation des aliments et des huiles lipidiques [26], ces propriétés sont dues aux acides phénolyques (rosmarinique, caféique) [27].

I.10.1.1 Alimentaire :

Les deux , l'épice et l'huile sont largement utilisés en alimentation, l'épice est utilisée dans les aliments cuits, viande et produits de viande, condiment et assaisonnement, les aliments industriels, casse-croute, sauces et autres, avec les niveaux maximum utilisé est d'environ 0.41% (4.098ppm) dans les aliments cuits l'huile est utilisée dans les boissons, les diserts glacés, confiseries, aliment cuit, 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)[26].

I.10.1.2 Aliment diététique ; tisane herbalesm :

Des infusions, des poudres, extraites sec ou autres préparations galéniques pour usage interne et externe principalement contre les douleurs d'estomac [22].

I.10.2 Industrie cosmétique et parfumerie :

Au 19^{éme} siècle l'essence de *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 [26].

I.10.3 La thérapie :

Le Romarin était cité déjà aux médecines classique pour ses propriétés hépatotrope, diurétique et emménagogue qui sont dues aux présences des *flavonoïdes* à savoir des *glucosides* de la *lutoline*, de *l'apigénone*, et peut être de *méthyl-4'-genkwanine* en synergie avec les acides phénoliques [22,27].

Les feuilles de *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 utilisée comme stimulant externe pour l'accroissement sanguin fourni à la peau [26], c'est aussi un bon excitant de cuir chevelu [28].

On sait de long temps que le *Romarin* est cholagogue et choléretique, ces effets semblent en relation avec la présence de nombreux acides phénoliques signalés dans beaucoup de labiées (lit-vinenko, voir bugle, marrube), et qui sont ici les acides :cafiéque, chlorogénique, néochlorogénique, reosmrinique, ce dernier, de saveur astringente, constituant en un depside cafiéque et dihydrocafiéque[29].

Les déterpénes phénoliques présentant dans le *Romarin* tel que les acide carnosique et le carnosol ont des effets d'inhibition contre des virus de HIV-1 [30] et certain cancers et d'autres entrants dans cette fraction ont un effet carcinologique [31].

I.11 Propriétés biologiques et pharmacologique du Romarin :

Le *Romarin* est une herbe médicinale bien connue et considérablement évaluée, largement répandue dans les produits pharmaceutiques et la médecine traditionnelle. Elle est très appréciée pour ses propriétés aromatiques, anti-oxydantes, antimicrobiennes et anti-tumorales.

I.11.1 Activité antibactérienne :

Plusieurs auteurs ont rapporté que certains composés présents dans les extraits du *Romarin* possèdent des propriétés antibactériennes [32].

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 par *Tsai et al* [33]. Qui 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 suppression

de l'activité de la glucosyltransférase. Afin de chercher des nouveaux antiseptiques et des agents antimicrobiens, une autre étude a été élaborée pour examiner les effets antimicrobiens des extraits et des composés isolés de certaines plantes, sur l'ensemble de 29 bactéries et levures avec pertinence dermatologique. L'extrait obtenu par le dioxyde de carbone (CO_2) supercritique du *Romarin*, a présenté un large spectre antimicrobien. La croissance de 28 sur 29 germes a été empêchée par cet extrait. L'examinassions du Carnosol, acide carnosique, acide ursolique, a montré que seule l'acide carnosique a une activité antibactérienne [34].

Le test de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques 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, partiellement aux extraits méthanoliques et que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles différent selon les variations régionales et saisonnières [35].

Les deux souches de la levure *Saccharomyces* et la bactérie *Escherichia coli* se sont montrées sensibles vis-à-vis l'huile essentielle du *Romarin*, tandis que la bactérie *Staphylococcus epidermis* est résistante. L'huile a empêché également la réplication du plasmide métabolique (F'lac) d'*Escherichia coli* [36]. Une autre étude a révélé que les quatre souches d'*Escherichia coli O157:H7* sont sensibles à la totalité des huiles essentielles testées. L'activité d'huile essentielle du *Romarin* était appréciable [37]**.**

Les 3 extraits commerciaux du *Romarin* étaient actifs contre onze bactéries portées par les aliments [38]. Le *vibrio parahaemolyticus* porté par les fruits de mer infectés est inhibé par la suspension du Romarin à 30 C° [3]. La germination et la multiplication des cellules végétatives des spores bactériennes de *Clostridium botulinum 62A* et *Bacillus cereus T* est empêchée par l'ensemble des huiles essentielles testées, y compris celle du *Romarin* [39].

Les résultats *d'Abutbul* [40] viennent suggérer l'utilisation du *Romarin* comme traitement contre les maladies causées par le *Streptocoque iniae*, la bactérie qui cause des pertes économiques significatives dans l'industrie d'aquaculture dans le monde entier [40]**.**

I.11.2 Activité antifongique :

La biosynthèse de l'aflatoxine a été inhibée totalement par l'huile essentielle du *Romarin*, à une concentration de 450 ppm. Selon Rasooli et al les résultats indiquent

le potentiel de cette huile essentielle en tant que préservatif naturel contre *l'Aspergillus parasiticus* [41].

En utilisant la technique standard de diffusion sur gélose [42] pour évalué l'activité biologique de 11 huiles essentielles y compris celle du *Romarin*, 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.

I.11.3 Activité antivirale :

L'évaluation de l'activité antivirale de l'extrait commercial du *Romarin*, a indiqué qu'il ya une inhibition de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) aux concentrations très basses, qui ont était également cytotoxiques. Cependant, le carnosol a montré une activité anti-HIV à une concentration de 8µM qui n'était pas cytotoxique [43].

I.11.4 Activité ovicide :

L'huile essentielle du *Romarin* s'est avérée un agent ovicide contre trois espèces de moustique (*Anopheles stephensi, Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*) [44]. De même Gillij *et al.*, ont trouvé que cette huile présente une activité répulsive contre le moustique *Aedes aegypti* [45]. Dans le cadre de la protection des produits stockés, *Papachristos et Stamopoulos* ont trouvé que les œufs, les larves et les pupes d'*Acanthoscelides obtectus* sont sensibles aux vapeurs des huiles essentielles du *Romarin* [46].

I.11.5 Activité anti-oxydante :

L'activité anti-oxydante *du Romarin* est connue depuis environ 30 années [47]. En raison de ses propriétés anti-oxydantes, *le Romarin* est largement accepté en tant qu'une des épices qui a l'activité anti-oxydante la plus élevée [48]. 22 volontaires ont inhalé l'arome des huiles essentielles de la lavande et *du Romarin* pendant 5 minutes, par la suite les salives ont été rassemblées pour mesurer l'activité antiradicalaire salivaire en utilisant le test au DPPH, ainsi que les variations dans les taux des substances actives salivaires (cortisol, immunoglobuline A sécrétoire (IgAs), et α-amylase). Les valeurs de l'activité anti-radicalaire salivaire ont été augmentées, tandis que les taux du cortisol se sont diminués et aucun changement crucial n'a été noté pour les IgAs et l'α- amylase. Les résultats ont montré une corrélation inverse

significative entre les valeurs de l'activité anti-radicalaire et les taux de cortisol pour chaque concentration de stimulation *du Romarin* [49].

Dans une autre étude les propriétés anti-oxydantes et anti-radicalaires de 11 huiles essentielles, ont été examinées au moyen du test de blanchissement du β–carotène, le test au DPPH et l'analyse photochimioluminescence (PCL). Les résultats ont montré que l'huile essentielle *du Romarin* était parmi les huiles qui ont une activité importante [42]. La comparaison *in vitro* de l'activité anti-oxydante d'huile essentielle *du Romarin* avec celles de ses principaux composants (1,8-cinéole, α-pinène et β- pinène) au moyen de l'essai au DPPH et l'essai de blanchissement du β–carotène, a montré que l'huile essentielle était plus active que ses composants dans les deux modèles d'essai [48]**.**

Divers modèles d'essai expérimentaux ont été employé pour la caractérisation des propriétés anti-oxydantes des extraits aqueux, de quatre herbes appartenant à la famille de *Lamiacée* : *Origanum vulgaris, Rosmarinus officinalis, Salvia officinalis et Thymus vulgaris*.

Les extraits ont montré des degrés variables d'activité dans tous les essais utilisés [50]. Plusieurs auteurs ont étudié l'utilisation des extraits *du Romarin* comme antioxydants pour conserver les produits à base de viande [51 ;52 ;53], Les résultats obtenus font toujours l'objet de l'intéressante activité anti-oxydante de cette plante [47 ;54].

I.11.6 Effet anti-carcinogène:

Grâce à certains composants (carnosol, rosmaridiphénol, rosmanol et l'acide rosmarinique), *le Romarin* est considéré comme une thérapie contre le cancer [53]. Des études a démontré que l'extrait commercial *du Romarin* et le carnosol sont des inhibiteurs des tumeurs mammaires, provoquées par le dimethylbenz(a)anthracène (DMBA) chez les rats [55].

Slamenova et ces collaborateurs ont mentionné que l'exposition des cellules traitées par deux Types d'oxydants (le bleu de Méthylène excité par la lumière visible, et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)), aux différentes concentrations de l'extrait éthanolique *du Romarin* dilué dans le milieu de culture, a comme résultat une réduction de l'activité génotoxique de ces oxydants. De même l'effet anti-cancérogène a été étudié par Visanji et ses collaborateurs (2006). Ces auteurs ont constaté que le traitement des cellules de Caco-2 (des cellules issues d'un cancer du côlon), par le carnosol et l'acide carnosique a empêché l'incorporation de la thymidine-H3 d'une

manière dépendante de la dose. Cet effet a été associé par l'accumulation des cellules traitées dans la phase G2 / M du cycle cellulaire [56].

Le carnosol s'est avéré exercer son effet après pro-métaphase, tandis que l'acide carnosique a arrêté la multiplication des cellules avant la pro-métaphase.

I.11.7 Effet anti-acétylcholinestérase :

Des extraits aqueux et méthanoliques de 11 plantes utilisés dans la médecine traditionnelle Danoise pour l'amélioration de la mémoire, ont été examinés pour évaluer leur activité inhibitrice d'acétylcholinestérase en utilisant la méthode colorimétrique *d'Ellman*. L'extrait méthanolique *du Romarin* a montré une inhibition modérée (17 %) de l'enzyme à une concentration de 0.1 mg/ml [57].

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 [4].

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* [58].

I.11.8 Effet anti -hyperglycémiant :

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 anti-hyperglycémiante remarquable à une dose de 200 mg /kg [59].

I.11.9 Effet anti-hépatotoxique :

De nombreuses études ont été réalisées pour étudier l'effet anti-hépatotoxique du *Romarin*, ou Le travail 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) [60].

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) [61]. Des souris sont soumises à des rayonnements (γ) pour étudier l'effet radioprotecteur de l'extrait aqueux *du Romarin*. Chez le groupe expérimental, ils ont constaté une diminution de la peroxydation des lipides accompagnée 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 étaient 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 [62]**.**

I.11.10 Autres effets :

Les effets anti-nociceptifs de l'extrait ethanolique des pièces aériennes du Romarin, ont été étudiés par Gonzalez-Trujano et leur colaborateure [63] en employant différents modèles expérimentaux de la douleur. La comparaison des résultats obtenus avec ceux du tramadol et de l'acide acétylsalicylique a montré que, les extraits possèdent une activité anti-nociceptive et anti-inflammatoire très importante, ce qui renforce l'utilisation médicinale traditionnelle de cette plante [63].

L'extrait hydro-ethanolique *du Romarin* a diminué les lésions ulcératives produites par, l'indométhacine, l'éthanol et la réserpine chez les rats [64]**.** Les extraits aqueux *du Romarin* ont une activité diurétique et un effet considérable sur l'excrétion urinaire d'eau et des électrolytes (Na+, K + et Cl^-), à une dose de 8% [65].

I.12 Conclusion :

Selon cette étude bibliographique, on constate que l'espèce *Rosmarinus officinalis* est très riche en métabolites secondaires (flavonoïdes, polyphénols, huiles essentielles) et il est très connu pour ces propriétés biologiques et pharmacologique. Ce qui ouvre de larges perspectives à étudier et démontrer ces propriétés.

II. Les métabolites secondaires

II.1 Introduction :

Historiquement, les composés produits par les plantes ont été séparés en métabolites primaires et secondaires, par définition, les métabolites primaires sont des molécules qui existent dans toutes les cellules végétales et sont nécessaires à la vie de la plante. Les sucres simples , les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques sont des exemples de métabolite primaires .par comparaison, les métabolites secondaires ont une répartition limitée, dans la plante elle-même comme parmi les différentes espèces de végétaux .ils d'abord été considérés comme des produits de rebut, mais on sait maintenant que les métabolites secondaires sont importants pour la survie et la propagation des plantes qui les produisent, beaucoup fonctionnement comme signaux chimiques qui permettent à la plante de répondre aux contraintes de l'environnement, d'autres interviennent pour défendre leur producteur contre les herbivores, les pathogènes (organismes responsables de maladies) ou les compétiteurs. Certains assurent une protection contre les radiations solaires et d'autres encore facilitent la dispersion du pollen et des grains [66].

Les métabolites secondaires sont souvent synthétisés dans une partie de la plante et stockés dans une autre, en outre, leur concentration dans la plante varie souvent dans de grandes proportions au cours d'une période de 24heures.

Il y a trois classes principales de métabolites secondaires chez les plantes : les alcaloïdes, les terpénoïdes et les substances phénoliques [66].

II.2 Les polyphénols :

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires végétaux. Ils englobent une vaste gamme des composés qui possèdent tous un groupement hydroxyle (-OH) attaché à un cycle aromatique presque toutes les plantes et l'on sait qu'ils s'accumulent dans toutes les parties de l'organisme (racines, tiges, feuilles, fleurs, et fruits). Bien qu'ils soient le groupe de plus étudié de métabolites secondaires, la fonction de beaucoup de produits phénoliques reste encore inconnue [66].

La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement

polymérisées (tanins condensés) Actuellement, plus de 8000 structures phénoliques sont identifiées [67].

II.1.1 Classification :

Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes :

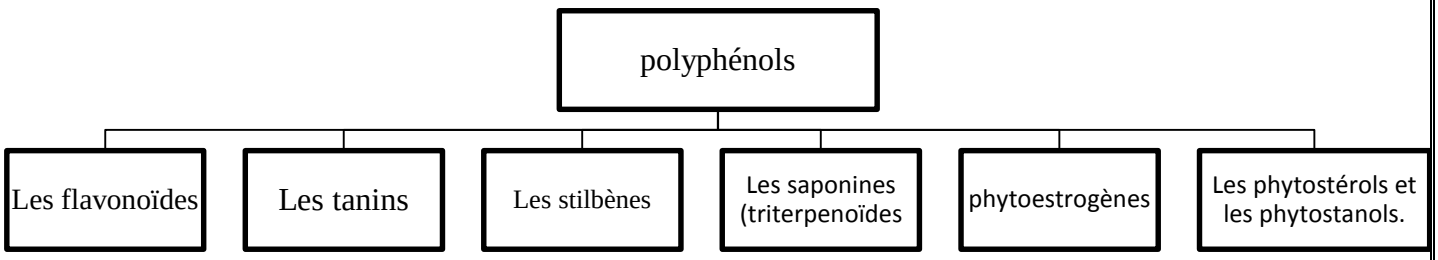


Figure II-1 : Les différentes classes des polyphénols

Bien qu'ils ne soient pas des polyphénols, on ajoute ordinairement à cette liste les isothiocyanates, qui dérivent de l'hydrolyse des glucosinolates [68].

II.2.1 Biosynthèse :

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques :

- celle de l'acide shikimique
- celle 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 deux Voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes [69].

II.2.2 Effet biologique des polyphénols :

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (voir Figure II-2)[70].

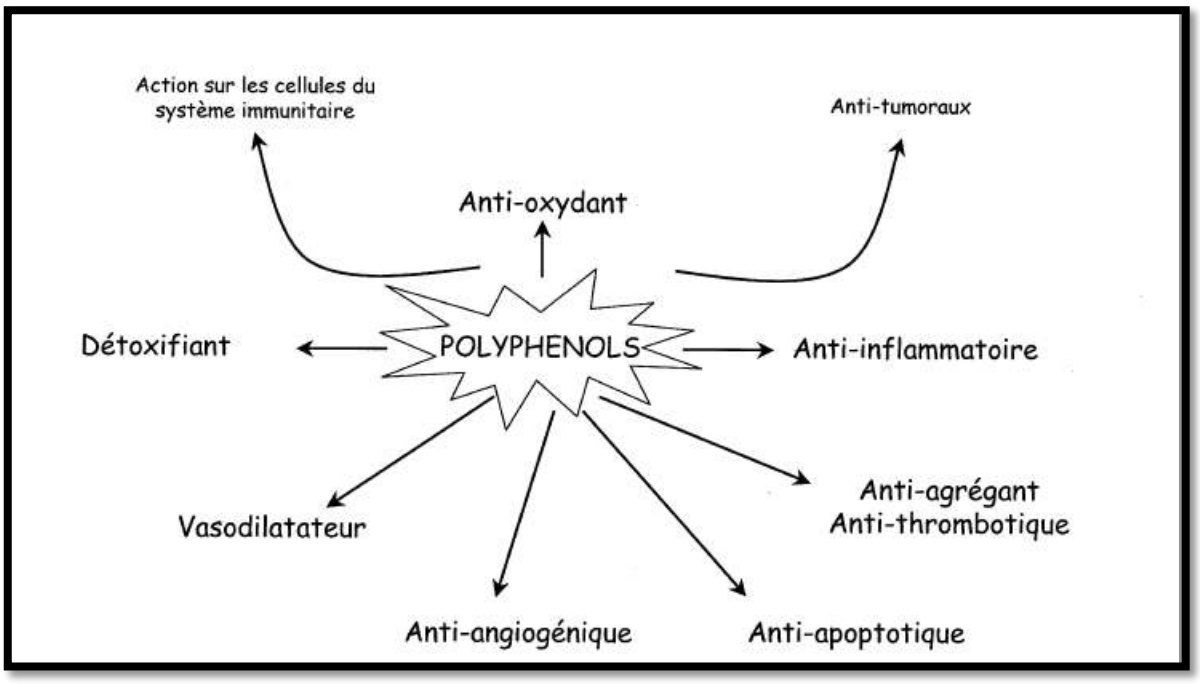


Figure II-2 : Effet biologique des polyphénols **[4]**

II.3 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles [71].

Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. Du point de vue structural, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées [72].

II.3.1 Historique

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E.Chervreul en 1814, mais n'ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P (P étant la première lettre du mot perméabilité). En raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes [73].

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées [74 ;75], Prés de 4000 flavonoïdes ont été décrits [76]

II.3.2 Etymologie:

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange [77], cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde aété plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) [78 ;75].

II.3.3 Structure chimique et classification :

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) [79] représenter au Figure II-3.Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 [80]. 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 [81].

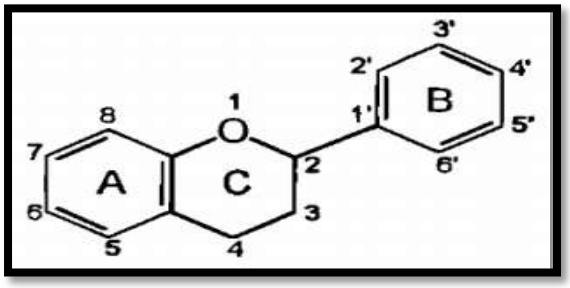


Figure II-3: Structure chimique de base des flavonoïdes [82].

Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation de noyau pyraniquecentral (voir Figure II-4) [83].

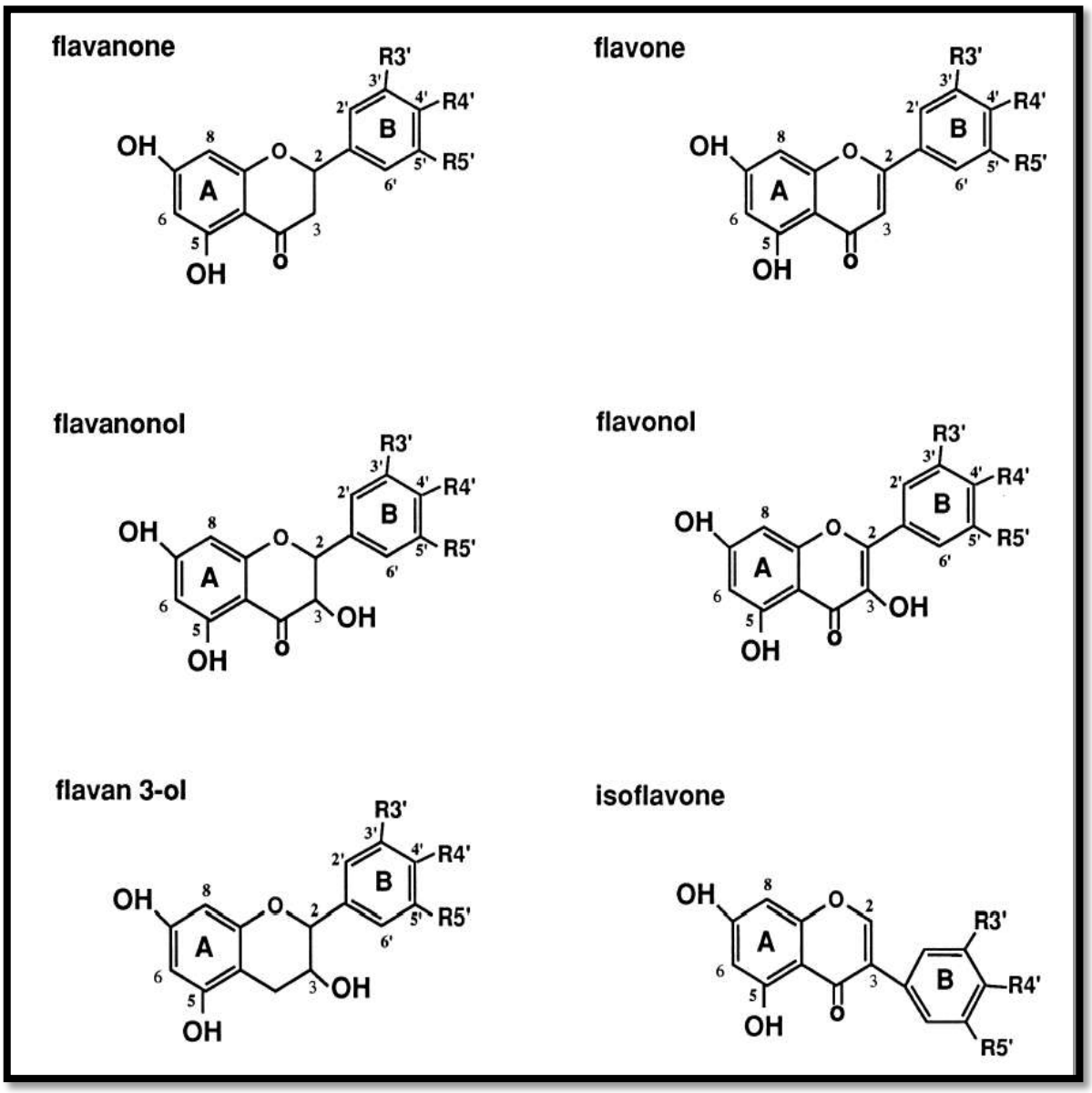


Figure II-4 : Structures des différentes classes de flavonoïde [84].

II.3.4 Localisation et distribution des flavonoïdes dans la plante :

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. On signale environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporé dans la biosynthèse flavonique. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes sont omniprésents dans les organes aériens jeunes où ils sont localisés dans les tissus superficiels [85].

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule

foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles [86].

II.3.5 Propriétés physico-chimique des flavonoïdes :

II.3.5.1 Solubilité :

Les génines sont pour la plupart, solubles dans les solvants organiques apolaires. Les hétérosides peuvent être extraits, le plus souvent à chaud, par de l'acétone ou par des alcools additionnés d'eau. Il est possible de procéder ensuite à une évaporation sous vide et lorsque le milieu ne contient plus que de l'eau, de mettre en œuvre une série d'extractions liquide-liquide par des solvants non miscibles à l'eau [68].

Si les aglycones sont les cibles, une hydrolyse chimique est habituellement effectuée avec de l'acide chlorhydrique ou l'acide formique à des températures élevées, l'hydrolyse enzymatique est également employée [87].

L'hydrolyse acide, destinée à rompre les liaisons C-O-C qui interviennent dans les hétérosides, est conduite en milieu HCl à différentes concentrations pendant un temps qui peut varier de quelques minutes à 1heure, au bain-marie à 100°C. La résistance des différentes liaisons à hydrolyser n'est pas la même ; d'une façon générale, les anthocyanines résistent mieux à l'hydrolyse que les hétérosides des flavonols et des flavones. Il faut tenir compte de ces faits, car dans le cas d'hydrolyse incomplète, on observe sur le même chromatographe des aglycones et des hétérosides. [88].

Dans les solutions hydrolysées ainsi obtenues, on extrait les aglycones apparues à l'aide de solvants non miscibles (éther, acétate d'éthyle, alcool isoamylique); il est donc nécessaire d'opérer à partir d'une solution aqueuse [89].

II.3.5.2 Biodisponibilité des flavonoïdes:

D'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que leur absorption est faible et implique des mécanismes encore mal connus. Seuls les aglycones, doivent subir l'hydrolyse de leur liaison osidique par l'action de la microflore intestinale pour leur permettre d'être absorbés au niveau du côlon. Les principaux sites de métabolisme sont la flore intestinale et le foie. Les métabolites glucuro- et sulfo-conjugués des flavonoïdes absorbés sont

éliminés principalement par la bile, l'excrétion urinaire ne représentant que 3 à 6 % de l'élimination totale [90].

II.4 Les méthodes d'extraction des flavonoïdes :

II.4.1 Généralité :

Le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilités des composés d'un mélange dans un solvant. Le mélange peut être solide ou liquide et le solvant liquide ou fluide supercritique.

Historiquement, l'extraction solide-liquide est une opération très ancienne. L'homme a toujours cherché à exploiter les ressources naturelles dont il dispose. Cette opération était utilisée dans la préparation de produits alimentaires, pharmaceutiques, drogues, teintures ou parfums où elle prend des dénominations différentes. De la percolation à l'infusion en passant par la macération ou la concoction, chaque terme évoque une mise en œuvre domestique d'un procédé d'extraction solide-liquide, dont le solvant est généralement de l'eau ou de l'alcool [91].

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 [92].

Dans le but d'améliorer les opérations d'extraction des flavonoïdes, il est considéré comme indispensable l'analyse fondamentale des interactions solide/liquide et tout particulièrement des phénomènes de transfert entre le solide et le solvant/solution liquide. Cette approche nous permettra de définir des procédés d'intensification de transfert pour aboutir à l'isolation optimale des molécules divers formant les flavonoïdes qui représente un remède précieux.

II.4.2 Extraction Solide-Liquide :

L'extraction solide-liquide constitue la première opération de séparation de plusieurs filières des transformations (extraits de fruits, boissons alcoolisées, sucrerie, etc.). Elle constitue la charnière au niveau de laquelle, les industries alimentaires prennent le relais du domaine agricole.

II.4.2.1 Principe :

L'extraction solide-liquide se définit comme une opération de séparation d'un ou plusieurs constituants solide ou liquide contenu dans un corps solide par solubilisation dans un fluide. Ce fluide, appelé généralement solvant, peut être un liquide, un gaz (vapeur d'eau) ou un fluides supercritiques.

Pour la thermodynamique, le corps solide est un mélange homogène à l'équilibre c'est-à-dire qu'en l'absence d'une perturbation extérieure, il ne subira aucune modification. Par opposition au traitement d'un mélange hétérogène qui peut être fractionné par filtration, décantation ou centrifugation, par exemple.

II.4.2.2 Le mécanisme d'extraction :

En extraction solide-liquide, cette perturbation consiste en un échange d'énergie thermique et mécanique avec l'extérieure, couplé à l'apport d'un tiers corps, le solvant. Suite à cette perturbation, le solide ne sera plus en équilibre et le système solide + solvant évoluera vers un nouvel équilibre par transfert de masse. Tout l'art de l'extraction est la connaissance des paramètres influant sur la nature et la cinétique de ce transfert de masse du solide vers le solvant.

Sur la base de cette définition, on peut établir le schéma général de l'extraction solide/liquide (Figure II-5) [93] .

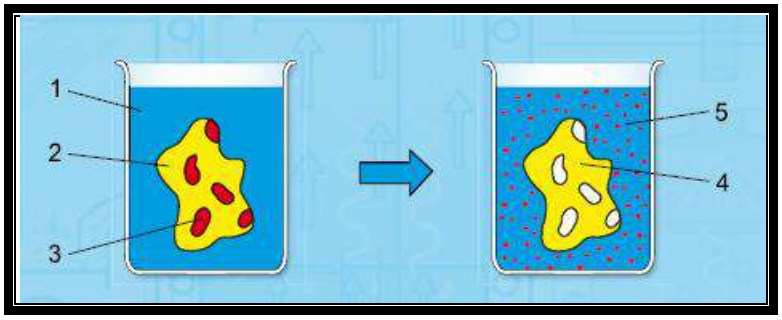


Figure II-5: les étapes d'extraction solide liquide avec solvant

Ces étapes incluent :

1. la pénétration du solvant dans la matrice végétale solide ;
2. la matière solide
3. les molécules actives dans la matière solide
4. le déplacement des solutés par rapport à la matrice solide ;

5. solvant avec soluté dessous.

II.4.3 Les facteurs influençant l'extraction solide-liquide :

L'extraction solide-liquide est influencée par différents facteurs ont cite :

II.4.3.1 Nature et l'état de solide :

Les matrices végétales ont une structure complexe formée par des cellules, des espaces intercellulaires, capillaires et pores. Les principes actifs peuvent être présents à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules végétales. Dans le premier cas, les parois cellulaires intactes et les membranes adhérentes constituent une résistance majeure à la diffusion. Elles affectent la perméabilité de solutés : les petites molécules passent avec une vitesse plus élevée que celles ayant des dimensions plus importantes conduisant à un transfert sélectif. La perméabilité des parois cellulaires et des membranes est élevée et la sélectivité diminuée par la dénaturation induite par la chaleur. De plus, les parois cellulaires formant la majorité de tissus de soutenance et certaines cellules de gestion sont réduisent le passage de principes actifs. Pour une meilleure extraction, la matrice végétale est broyée sachant qu'au moins théoriquement la durée d'extraction varie inversement avec le carré de la dimension du solide. Une fois que la taille de particules diminue, les ruptures extérieures de cellules constituent une Proportion plus importante du volume total du solide et les caractéristiques de l'extraction par unité de masse changent [94].

II.4.3.2 Nature du solvant et pH :

Le choix du solvant d'extraction est fonction de ses propriétés physiques, de la nature des solutés à extraire et de son coût. Le solvant doit être sélectif, posséder une grande capacité de dissolution, une température d'ébullition peu élevée, une viscosité faible [95] .Il doit être non toxique, ininflammable et non explosif, disponible et peu coûteux. Pour ces nombreuses raisons, l'eau, l'éthanol et l'hexane sont les solvants les plus utilisés dans les industries agro-alimentaires [96].

Pour la plupart des solvants, le pH intervient au niveau de la dissolution des composés solubles. Pour l'eau, il peut jouer un rôle dans la solubilisation de la fraction hydrolysable. Il agit également sur les hydrolyses chimiques et enzymatiques. Enfin, le pH peut être mis à profit pour apporter à l'extraction une certaine sélectivité.

II.4.3.3 Température :

L'influence de la température sur les performances de l'opération n'est pas facile à évaluer, car elle agit sur tous les phénomènes intervenant dans l'extraction. D'une manière générale et de façon simpliste, l'élévation de la température permet généralement l'accroissement de la solubilité et de la diffusivité du soluté et la diminution de la viscosité de la solution.

II.4.3.4 Niveau d'agitation :

L'agitation mécanique des particules dans le solvant a un effet favorable sur les performances de l'extraction solide-liquide. En effet, une agitation suffisante permet de maintenir en suspension les particules et d'assurer l'homogénéisation du milieu. Elle permet également de réduire la résistance au transfert de solutés au niveau de la couche limite et d'augmenter ainsi le coefficient de transfert. La vitesse d'agitation sera donc fonction de la taille et de la masse du solide contenant les solutés à extraire. Dans le cas de l'extraction des produits végétaux, une agitation continue favorise les chocs entre les différentes particules. Ceci va provoquer l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer alors leur contenu cellulaire dans le solvant [92].

II.4.3.5 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 [97].

II.4.3.6 Humidité :

Lors de l'utilisation de solvants hydrophobes, la diffusivité est inversement proportionnelle à la teneur en eau du solide [98].

II.4.4 Les méthodes d'extraction des métabolites secondaires :

Le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilités des composés d'un mélange dans un solvant. Le mélange peut être solide ou liquide et le solvant liquide ou fluide supercritique. Dans notre travail, nous nous intéressons aux procédés d'extraction à partir d'un système solide, la plante.

Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits de haute valeur ajoutée présents dans les plantes. Ces techniques peuvent être dites *conventionnelles* (utilisées depuis longtemps) et *nouvelles* (développées plus récemment) [99].

II.4.4.1 Les méthodes conventionnelles

Parmi les techniques conventionnelles, de l'extraction solide-liquide on cite :

II.4.4.1.1 La macération :

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée. Cette technique est basée sur la solubilité de composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction, etc. La macération commence avec le choix d'un solvant d'extraction adéquat. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales le processus continue avec la solubilisation de composés bioactifs qui vont migrer de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de Partage de concentration soit atteint [100].

II.4.4.1.2 La percolation:

Consiste à laisser couler un solvant généralement chaud sur un lit de solide afin de dissoudre les composants solubles qui y sont contenus [28].

II.4.4.1.3 La décoction:

C'est l'opération dans laquelle le solide est mis à bouillir dans un liquide en vue d'extraire les parties solubles [28].

II.4.4.1.4 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 [28].

II.4.4.1.5 La digestion :

Est une macération à chaud utilisée particulièrement en pharmacie et en parfumerie [28].

II.4.4.1.6 L'élution :

Consiste à enlever un soluté fixé à la surface d'un solide par simple contact avec un solvant, elle est employée dans les méthodes d'analyse [98].

II.4.4.1.7 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 [101].

L'entrainement à la vapeur (hydrodistillation) est une technique largement utilisée. L'avantage de cette technique réside en l'abaissement de la température de distillation; les composés sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur décomposition [102].

II.4.4.1.8 Extraction par soxhlet :

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première.

Le schéma d'un appareil Soxhlet est représenté sur la Figure II-6 Il est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au-dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant.

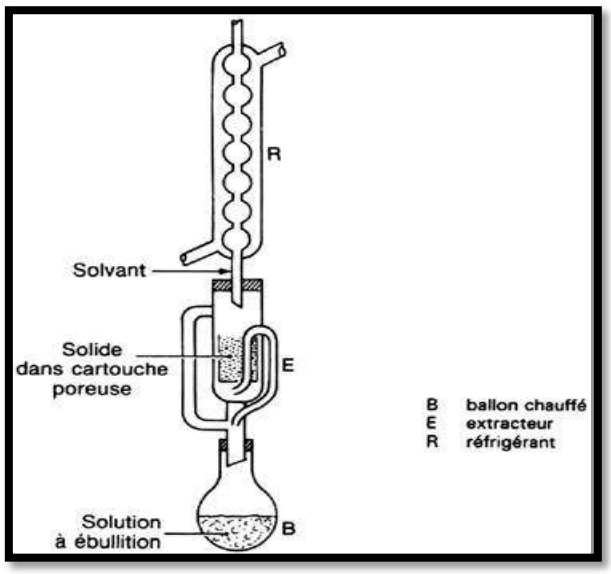


Figure II-6 : Extracteur soxhlet

Le ballon étant chauffé, le liquide est amené à l'ébullition, les vapeurs du solvant passent par le tube de distillation et rentrent dans le réfrigérant pour être liquéfiées. Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au niveau du sommet du tube-siphon, suivi par le retour dans le ballon du liquide de l'extracteur accompagné de substances extraites. Ainsi le solvant dans le ballon s'enrichit progressivement en composants solubles. L'extraction continue jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche. Les avantages du Soxhlet sont les suivants : l'échantillon entre rapidement en contact avec une portion fraiche de solvant, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. Cette méthode ne nécessite pas de filtration après extraction. Le Soxhlet est indépendant de la matrice végétale [103].

Les inconvénients les plus significatifs de cette méthode par comparaison avec les autres techniques conventionnelles sont : la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée, ce qui conduit non seulement à des pertes économiques, mais pose aussi des problèmes sur le plan environnemental. Les échantillons étant portés à haute température pendant une période relativement longue, le risque de thermodestruction de certains composés n'est pas à négliger si la matière végétale contient des composés thermolabiles [103].

II.4.4.2 Les techniques nouvelles :

Dans la catégorie « techniques nouvelles » on peut citer :

II.4.4.2.1 Extraction assistée par ultrasons :

Les ultrasons sont des ondes mécaniques ayant une fréquence supérieure à celle audible par les êtres humains, ce qui peut assurer une meilleure pénétration du solvant dans le matériel végétal et améliorer le transfert de matière.

L'effet des ultrasons sur un fluide est dû à l'action de la pression acoustique et hydrostatique sur le milieu. A basse intensité, la pression acoustique induit un mouvement à l'intérieur du fluide. Pendant la phase d'expansion d'un cycle, à des intensités élevées, la pression locale diminue sous la pression de vapeur de liquide causant l'augmentation de bulles créées à partir de noyaux gazeux existant dans le fluide (Figure II-6 : Extracteur soxhlet). Cette augmentation génère des pressions de transition négatives et produit de nouvelles cavités par l'effet de tension sur le fluide. Au moment de la dimension critique, les bulles implosent pendant le cycle de compression. Ce processus de compression-raréfaction des molécules du milieu et le collapse de bulles est appelé « cavitation » [104 ;105].

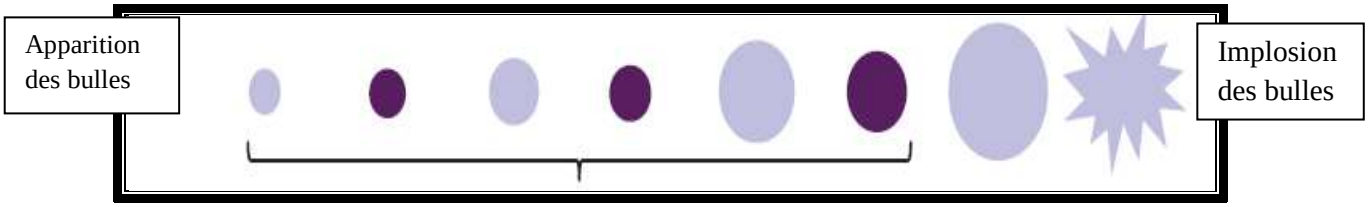


Figure. II-6:Génération des bulles de cavitation par l'action des ultrasons [106]

II.4.4.2.2 Extraction par Micro-ondes :

Découvertes mathématiquement par Maxwell et vérifiées expérimentalement par Hertz les microondes sont des radiations électromagnétiques de haute fréquence allant de 300 MHz à 300 GHz avec des longueurs d'onde entre 1 m et 1 mm [107] constituées d'un champ électrique et d'un champ magnétique perpendiculaires (Figure II-7).

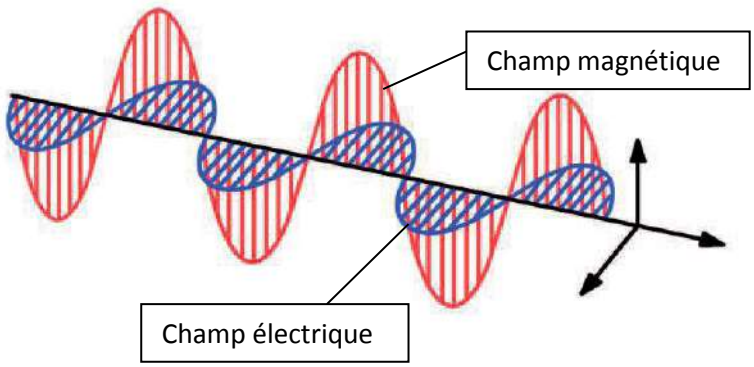


Figure II-7 : Représentation graphique d'un champ électromagnétique [107].

Dans le cas de l'extraction conventionnelle, au moment du chauffage, l'énergie thermique est transférée de l'extérieur vers l'intérieur de l'échantillon par conduction et convection alors que lors de l'extraction assistée par microondes le chauffage se fait en volume de l'intérieur vers l'extérieur (Figure II-8).

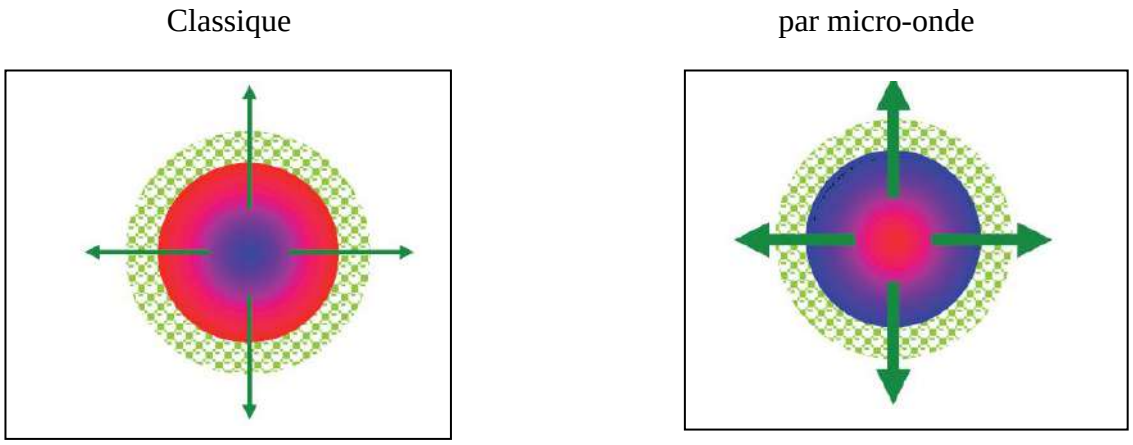


Figure II-8 : Transfert de chaleur sous chauffage classique et sous chauffage par microondes [108].

II.4.4.2.3 Extraction par les fluides supercritiques :

Ce phénomène a été mis en évidence expérimentalement pour la première fois par le Baron Charles Cagniard de la Tour (1822) [109].Le domaine supercritique est défini quand la température et la pression de la substance dépassent leurs valeurs

critiques. Les fluides supercritiques ont des caractéristiques physico-chimiques intermédiaires entre celles des gaz et des liquides. En les comparants avec les solvants liquides, les fluides supercritiques présentent les avantages principaux suivants:

- Le pouvoir solvant des fluides supercritiques est très flexible et dépend de leur masse volumique, c.-à-d. qu'il est ajustable en modifiant la température et/ou la pression.
- La tension superficielle des fluides supercritiques est très faible, ils ont une diffusivité élevée et une viscosité faible, ce qui favorise le transfert de matière et permet une pénétration facile dans les pores d'une matrice solide [110].

➢ **Diagramme de phase d'un corps pur :**

Sur le diagramme de phases d'un corps pur, le point critique est définie par sa température et sa pression critique et prend des valeurs particulières pour chaque substance [109]. L'exemple d'un diagramme de phases (dioxyde de carbone) est présenté sur la Figure II-9.

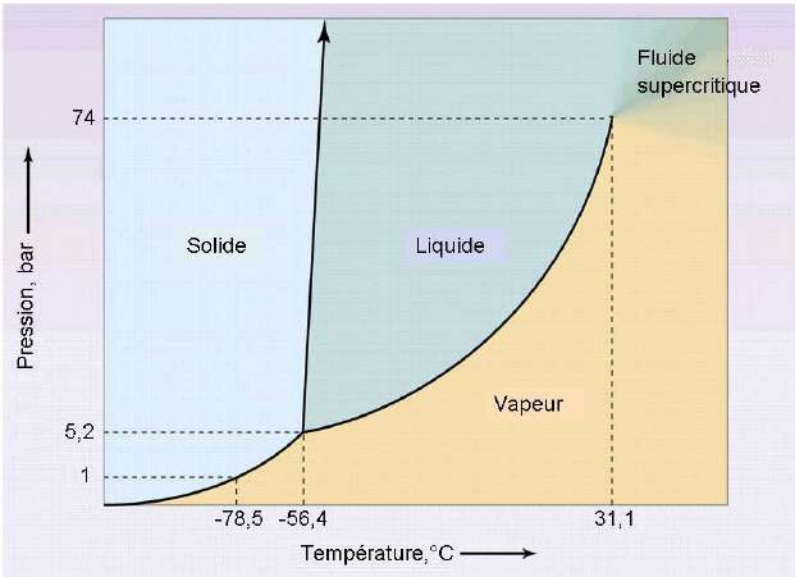


Figure II-9 : Diagramme de phase de CO_2

Le choix des fluides supercritiques est très important, le dioxyde de carbone supercritique est le plus communément utilisé [111] en raison de son domaine de température et pression critiques (31°C - 304 K et 7.3 MPa), de ses propriétés inertes et ininflammables, de sa faible toxicité et réactivité, et de sa haute pureté à faible coût

II.4.4.2.4 Extraction par solvant accélérée :

L'extraction accélérée par solvants (Accelerated Solvent Extraction – ASE ®) est une technique brevetée de la société DIONEX qui utilise les solvants conventionnels à des températures (50 – 200 °C) et des pressions 100 – 150 bar) élevées. La pression est maintenue assez élevée pour maintenir le solvant à l'état liquide à température élevée. Pendant l'ASE, le solvant reste toujours en dessous de ses conditions critiques [110]. Les avantages de cette technique devant les techniques conventionnelles sont les suivants : on évite les échauffements locaux et on consomme de plus petites quantités de solvant en comparaison à l'extraction par Soxhlet et par batch avec agitation. Ses inconvénients sont liés à sa non sélectivité, ce qui impose des procédures supplémentaires de nettoyage des extraits [112].Les températures opératoires élevées peuvent mener à une dégradation des solutés thermolabiles [112].

II.4.4.2.5 Extraction par induction magnétique :

Le secteur de la chimie est responsable de 30% de la consommation énergétique industrielle. L'énergie est une composante importante de la chimie, et dans certains cas, elle peut même être considérée comme une matière première. On retrouve effectivement l'électricité dans toutes les opérations mécaniques, les pompes, les circulateurs, les agitateurs, les compresseurs, les engins de convoyage et de conditionnement des produits. C'est ainsi que l'électricité met au service des industriels ses qualités dans la production de chaleur, que ce soit pour le chauffage des réacteurs de chimie fine et des procédés de chimie de base, la stérilisation des produits ou le traçage de canalisations.

Jusqu'à présent, l'industrie chimique utilisait majoritairement la vapeur comme vecteur de l'énergie thermique, le chauffage électrique des procédés tend lui aussi à se généraliser, apportant des progrès significatifs en termes de qualité, de sécurité et de protection de l'environnement. L'évolution des technologies durant ces dernières années a notamment permis de faire du réacteur chauffé par induction un outil particulièrement performant de la chimie[113].

- **Principe :**

Le chauffage par induction est une application très directe à la fois de la loi de l'induction (*loi de Lenz*) et de l'effet Joule [114] (Figure II-10**).** 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. Ce courant induit produit alors de la chaleur par effet Joule dans le conducteur où il a pris naissance [113].

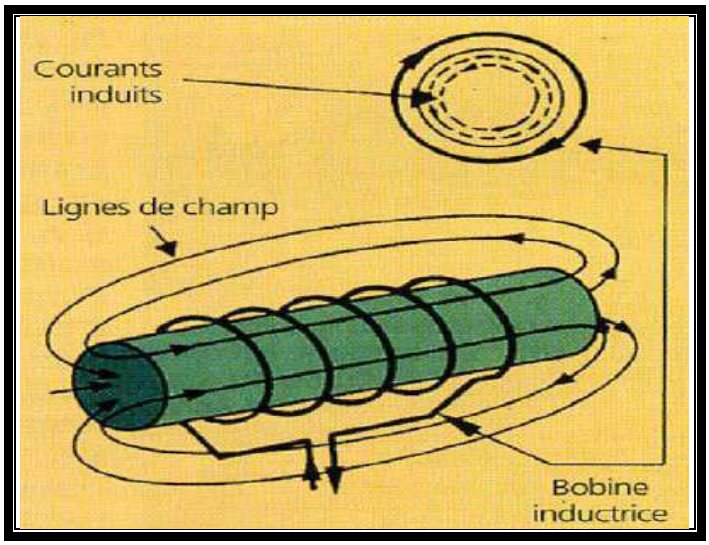


Figure II-10: Principe de chauffage par induction **[115]**

Les performances de l'induction dépendent des paramètres suivants :

· Disposition géométrique des inducteurs ainsi que des pièces à chauffer

· La fréquence d'alimentation

· Les propriétés magnétiques, électriques et thermiques des pièces à chauffer.

· La technologie de l'inducteur.

Les caractéristiques du chauffage par induction en font une technique très particulière. La chaleur est créée au sein même du matériau à chauffer, ce qui évite tous les problèmes liés aux fluides intermédiaires que l'on rencontre avec la plupart des autres systèmes. La faible inertie thermique du chauffage par induction entraîne une très grande souplesse dans le fonctionnement. La densité de puissance peut être très élevée, d'où la possibilité d'obtenir une rapidité de chauffe peu commune [32].

➢ **Loi de l'induction :**

- **Loi de Lenz:**

Le sens du courant induit est tel que le champ magnétique qu'il crée tend à s'opposer à la variation du flux qui lui a donné naissance [116].

- **Loi de Faraday:**

La loi de *Faraday* permet de rendre compte des phénomènes macroscopiques d'induction électromagnétique .La forme intégrale, historique, de la loi de Lenz-Faraday était au départ empirique. Un circuit soumis à un flux magnétique Φ (issu d'un champ magnétique B**)** variable est le siège d'une force électromotrice ε (mesurée en convention génératrice) telleque :

$$\boldsymbol{\varepsilon = -\frac{d\varphi}{dt}} \qquad \text{II-1}$$

le signe « - » présent dans cette loi est dû au fait que l'induction produit des effets qui s'opposent à leurs causes. Un exemple de cette loi est donné par les courants de Foucault [117].

II.5 Les méthodes d'identification et d'analyse des composés phénoliques:

Les extraits issus de l'extraction de matière végétale sont toujours de composition chimique très complexe et nécessite donc une séparation et une purification. Plusieurs techniques sont utilisées, soit individuellement, soit combinées pour facilité la caractérisation et les délectations de ces composés ainsi nous permis une identification plus aisée. Ces méthodes offrent souvent la possibilité de remonter à la structure géométrique des molécules et de leurs assemblages et de connaître leur composition isotopique [118].

II.5.1 La chromatographie sur papier :

Cette technique a été appliquée pour la première fois par Bath-Smith en 1948 pour la séparation des flavonoïdes. En 1950, Bath-Smith et Westall ont mesuré les valeurs de Rf (rapport frontal) de 36 flavones dans deux systèmes de solvants. Beaucoup de raisons appuient l'utilisation de la chromatographie sur papier dans la recherche de composés flavonoïdiques : La couleur naturelle de la plupart de ces composés dans la lumière visible permet la distinction entre anthocyanes et les

pigments profondément colorés. La lumière ultraviolette révèle la plupart des autres flavonoïdes [119].

II.5.2 Chromatographie sur couche mince (CCM) :

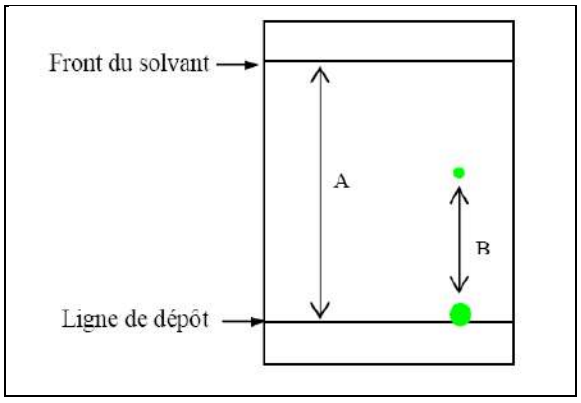
La chromatographie sur couche mince est une méthode facile à mettre en œuvre. Elle donne l'avantage de nécessiter peu de matériel et de fournir des résultats facilement interprétables et toujours très reproductibles [120]. A l'origine, la CCM a été utilisée pour la séparation des substances colorées. Aujourd'hui, elle est considérée comme une méthode puissante pour les analyses qualitatives et quantitatives [121].

II.5.2.1 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.
- Une phase stationnaire qui est un adsorbant maintenu sur une plaque de verre ou de plastique rigide.

Les constituants de l'échantillon sont alors élués (entraînés) par la phase mobile qui monte par capillarité vers le haut de la plaque [120].



Le facteur Rf = A/B

Figure II-11 : Principe de chromatographie sur couche mince

II.5.3 Chromatographie liquide haute performance (HPLC) :

En raison de sa polyvalence et du vaste domaine de ses applications, la chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC) est actuellement la plus utilisée de toutes les techniques de séparation. Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse :

• des composés thermosensibles

• des composés très polaires

• ainsi que des composés de masses molaires élevées.

Un appareil d'HPLC comprend différents modules : un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des élutions graduées, un injecteur, une Colonne, un détecteur et un système d'acquisition de données [122].

La phase solide (ou stationnaire) est contenue dans une colonne en verre ou en acier. Pour une colonne de diamètre donné, la hauteur de phase efficace pour une bonne séparation est fonction de la taille de l'échantillon Après l'injection de l'échantillon à séparer au niveau du sommet du gel, l'élution peut se faire soit de manière isocratique (un seul solvant, une succession de solvant pur ou mélange de solvants) soit par un gradient de polarité. Chaque composé élué peut être caractérisé par le volume de solvant nécessaire pour le sortir de la colonne : c'est le volume d'élution, par le temps de rétention [123].

II.5.4 Spectrophotométrie ultraviolette (UV) :

La bande d'absorption UV stricte s'étend de 185 nm à 400 nm, alors que celle du visible va de 400 nm à 800 nm. Cependant, habituellement, on étend la bande UV de 185 nm à 800 nm [124] La spectrophotométrie ultra violette présente une importance particulière dans la détermination des structures flavonoïdiques. Le spectre UV de la plupart des flavonoïdes consiste à deux maxima d'absorption majeurs : l'un appartient dans la région 240-285 nm (bande II) dû à l'absorption du noyau benzoyle A et l'autre dans la région 300 – 400 nm (bande I) dû à l'absorption du noyau cinnamoyl B [123].

II.5.5 Spectre infrarouge (IR) :

La bande d'absorption IR s'étend de 4000 cm^{-1} à 500 cm^{-1}[124]. Les mesures IR permettent d'identifier certaines fonctions fondamentales comme les noyaux aromatiques, les carbonyles, les hydroxyles,…[47].

III. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes

III.1 Introduction :

La découverte de l'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes, la classe la plus importante des polyphénols, remonte tout de même à la découverte de la vitamine C, il avait déjà été observé que les symptômes hémorragiques du scorbut expérimental, conséquence de la fragilité des vaisseaux sanguins, étaient guéris par des extraits de jus de citron et revanche l'utilisation de l'acide ascorbique seul était moins efficaces. Dans les aliments, il y a donc une substance qui agit en synergie avec la vitamine C, et qui en augmente l'efficacité [125]. L'analyse chimique a montré que la fraction active est de nature flavonoïdes.

Il est actuellement admis que l'effet biologique des polyphénols et des flavonoïdes dépassent la simple protection anti-oxydante. Certaines de ces molécules auraient des propriétés anti-inflammatoires, antivirales, anti- carcinogènes ; elles sont susceptibles de modifier les activités de nombreuses enzymes, et peuvent même effectuer les mécanismes de la division cellulaire, les recherches concernant ces polyphénols constituent l'un des derniers champs vierges de la nutrition et suscitent un grand intérêt [1].

III.2 Intérêt biologique des flavonoïdes :

Les flavonoïdes présentent de nombreuses activités : antioxydant, anti-inflammatoire, inhibiteur d'enzymes et prévention des maladies cardiovasculaires des corps gras. La principale propriété initialement reconnue est d'être « vieno-active » ; c'est-à-dire d'être capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance. Chez l'animal ; il peut réduire les signes d'une hipovitaminose C expérimental. Cette propriété a valu, pendant un temps, le nom de « vitamine P » [1].

Actuellement en s'intéresse surtout aux interactions des flavonoïdes avec les radicaux et à ses conséquences possibles en terme de prévention, dans la mesure où ces micronutriments sont apportés en quantité notable par les fruits et les légumes. Beaucoup des travaux s'efforcent également de cerner, in vitro, l'activité de ces molécules sur les molécules et les systèmes implique dans la réponse immunitaire et inflammation [1].

III.2.1 Activité anti-oxydante :

Les plantes représentent une source très riche et renouvelable d'antioxydants naturels. Les antioxydants naturels d'origine flavonoïdes, représente un exemple d'antioxydant pouvant être une bonne alternative aux antioxydants de synthèse, car il est présent dans plusieurs plantes.

III.2.1.1 *Définition :*

- **L'antioxydant** : comme sont nom l'indique est une substance chimique synthétique ou naturelle qui empêche ou inhibe les réactions d'oxydation de type radicalaire. [14] Ces derniers, naturellement présents dans l'organisme, sont parfois fabriqués en excès par nos cellules, notamment sous l'effet de la pollution, du tabac, des rayons UV... Cela peut alors engendrer le vieillissement prématuré des cellules et le développement de certaines maladies.

L'utilisation des antioxydants dans l'industrie cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire est nécessaire à la conservation des corps gras qui entre comme ingrédient dans la préparation [7].

- **L'oxydation :** est une réaction chimique au cours de laquelle une substance perd des électrons au profit d'une autre substance (appelée oxydant). C'est souvent l'oxygène qui joue le rôle de l'oxydant [126].

III.2.1.2 Mécanisme d'oxydation *:*

Dans l'oxydation d'un corps gras, en contact avec l'oxygène de l'air ou inclus dans nos membranes biologiques, intervient un type particulier des intermédiaires réactionnels à courte duré de vie les « radicaux libres ».

Il est admis que les acides gras polyinsaturés sont oxydés en présence des radicaux libres et d'un cation métallique (Fe^{2+} ou Cu^{2+}) dans les équations ci-dessous. LH désigne un acide gras polyinsaturé, $X^{\cdot}$ un radical libre. $L^{\cdot}$ un radical alkyl dérivant de l'abstraction de $H^{\cdot}$ par le radical libre $X^{\cdot}$, $LOO^{\cdot}$ Le radical peroxyle, LOOH hydropéroxyde, et $LO^{\cdot}$ Le radical alkoxyle

On décrit l'oxydation purement chimique d'un corps gras (peroxydation) en plusieurs étapes

Etape (1) : initiation de la peroxydation lipidique.

$LH + X^{\cdot} = L^{\cdot} + HX$ III-1

Etape (2) et (3) : propagation du radical

$L^{\cdot} + O_2 = LOO^{\cdot}$ III-2

$LOO^{\cdot} + LH = LOOH + L^{\cdot}$ III-3

Etape (4) : terminaison et apparition des composés responsables des gouts et odeur de rance par rupture des liaisons O-O.

$LOOH + Fe^{2+} = LO^{\cdot} + OH^{-} + Fe^{3+}$ III-4

III.2.1.2.1 Stress oxydant :

III.2.1.2.2 Les radicaux libres :

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, neutres ou chargés qui possèdent un électron non approprié, dit aussi un « électron célibataire », cet électron leur confère des propriétés physico-chimiques particulières.

- Les radicaux libres sont instables et ont tendance à rechercher un état plus stable en recouvrant un nombre pair d'électrons. La durée de vie des radicaux libres est très courte.
- Une réaction en chêne s'établit quand une nouvelle espèce radicalaire est formée

Les radicaux libres les plus importants sont ceux qui proviennent de l'oxygène dissout dans l'eau, et de la peroxydation des corps gras [3].

III.2.1.2.3 Origine et danger des radicaux libre :

La production des radicaux libres chez les organismes vivants est un phénomène normal, régulier par les biais dans des divers processus chimiques ou enzymatiques de détoxification, en effet l'organisme possède ses propres moyens de défonce lui permettant de lutter contre les radicaux libres. Quand ce système de protection perd de sont efficacité (mutation, inactivation d'enzyme, carence en vitamines) ou quant le nombre des radicaux libres (pollution, alimentation) augmente de manière importante, ils servaient un stresse oxydant, celui-ci peut déclencher une suite d'événements moléculaires et cellulaires dont les conséquences sont multiples : réponse inflammatoire, modulation et la prolifération et de la différenciation cellulaire, et même mort cellulaire. Ainsi, il est à présent reconnu que le stresse oxydant est un

facteur d'inflammation, de mutagenèse et qu'il peut jouer un rôle dans le développement de nombreux cancers. Il est également impliqué dans d'autres maladies comme la maladie d'Alzheimer, les troubles cardio-vasculaires, les accidents cérébro-vasculaires [3].

III.2.1.3 Les systèmes de défense contre l'oxydation :

Le système de défense de l'organisme vivant repose principalement sur l'action d'enzymes cytolosiques (catalase, glutathion peroxydase) dont l'effet protecteur et complété par celui de différents réducteurs des structures lipoprotéiques (carotinoides, lycopéne, ubicinol) et de cytosol (acide ascorbique, glutation réduite) dans le cas d'un stresse oxydant, se système de défense est inapte à lutter contre les radicaux libres, lors de l'augmentation, dans tous le cas , une solution consiste à renforcer le système antioxydant en fournissant à l'organisme des molécules antioxydantes par voie nutritionnelle [4].

III.3 Les flavonoïdes et les radicaux libres :

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans le processus de régulation de stresse oxydant [127 ;73]: par capture directe des radicaux, par chélation des métaux de transition comme le fer (empêchant la réaction de fenton) et par inhibition de l'activité de certain enzyme responsable de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une bonne stabilisation de leur forme radicalaire, c'est pour quoi les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont très souvent exprimées en terme de potentielle antiradicalaire. De nombreuses étude ont montré que l'activité antioxydante des flavonoïdes est essentiellement liée à leur capacité à piéger les espèces [128].

III.4 Les techniques de mesure de l'oxydation :

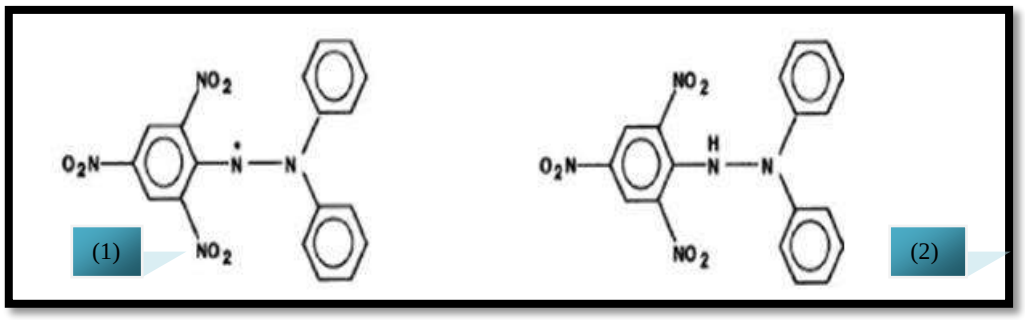
III.4.1 Méthode spectrométrique :

Le pouvoir antioxydant des composés est le plus souvent évalué par les biais par une méthode spectrométrique de référence [129 ;130]. Il s'agit de mesurer la capacité d'un composé à piéger le radical 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfanate) $ABTS'^{+}$ et de la comparer à celle d'un antioxydant de référence, le trolox (6-hydroxy-2,5.7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acide) (analogue de la vitamine E mais soluble dans l'eau). Cette méthode a permis de comparer le pouvoir antioxydant de différents flavonoïdes [131 ;132]. Celui-ci et exprimé selon indice TEAC (Trolox

Equivalent Antioxydant Capacity). Plus l'indice TEAC est élevé plus le composé possède une activité antioxydante importante. A titre d'exemple, le Quercétine fait partie des flavonoïdes présentant l'indice TEAC le plus élevé (4,7) [133].

III.4.2 Méthode de DPPH :

D'autre méthode Basées sur le même principe existent. On peut, par exemple, citer la méthode DPPH [134]. Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhdrazyle) radical libre stable possède une couleur violet intense solution (maximum d'absorbance à une longueur d'onde de (517 nm) et virant au jaune lorsqu'il est capturé par un antioxydant.



(1) DPPH· Radical libre. (2)DPPH-H forme réduite

DPPH· +AH = DPPH-H+A **III-5**

Figure III-1: Réaction d'un antioxydant avec le DPPH [135].

III.4.3 Interaction avec les cations métalliques (méthode FRAP) :

Les ions métalliques présents dans l'organisme, comme le fer ou le cuivre, peuvent être à l'origine de la production des radicaux hydroxyles tés réactifs à partir de l'espèce moins réactive H_2O_2 ; via la réaction de fenton [136].

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^{\cdot} + Fe^{3+} \quad \text{III-6}$$

Les flavonoïdes sont connus pour leur capacité à former des complexes stables avec les ions métalliques ils sont donc capable d'inhiber la réaction des fentons et de limités la production d'ERO [137].

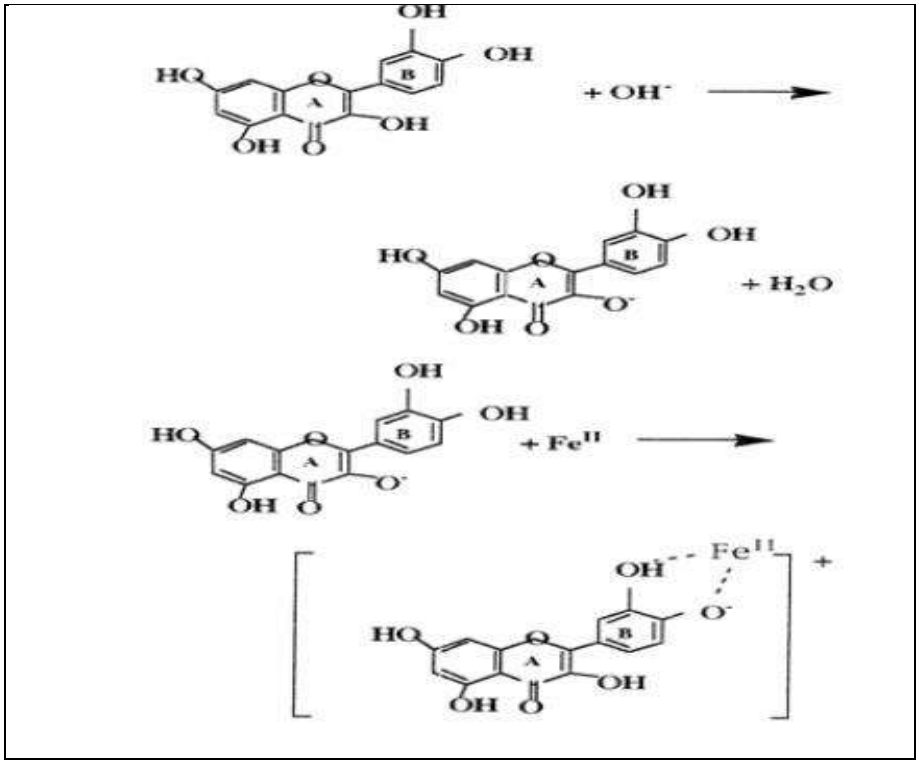


Figure III-2: Complaxation du Quercétine avec l'ion Fer^2 au niveau de groupement catechol [138].

III.4.4 Test de blanchissement du β- carotène

Dans cette analyse la capacité anti-oxydante est déterminée par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et les hydro-peroxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique [139].Qui attaquent simultanément le β -carotène et ayant comme résultat le blanchissement du β -carotène et la disparition de sa couleur jaune [140]**.**

L'émulsion de β-carotène /acide linoléique est préparée par solubilisation de 0,5 mg de β-carotène dans 1 ml du chloroforme, 25µl de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont additionnés, le chloroforme est complètement évaporé à 40°C avec le rotavapor, par la suite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement.

Un volume de 100 ou 150 µl de solution d'extraits ou d'antioxydant de référence (BHT) à 1mg/ml sont additionnés à 2,5 ml de l'émulsion précédente. Les tubes sont chauffés à 50°C dans un bain-marie. Le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égal de méthanol.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 490 nm à des intervalles de 15 minutes pendant 2 heures, jusqu'à ce que la couleur du **β**-carotène disparaisse. L'activité anti-oxydante des extraits est calculée selon l'équation suivant :

$$\boldsymbol{AA = 100 \times [1 - (AE_0 - AE_{120})/(AC_0 - AC_{120})]} \qquad \text{III-7}$$

AE0 : Absorbance à 490 nm d'échantillons testés à *t* = 0 min.

AE120 : Absorbance à 490 nm d'échantillons testés à *t* = 120 min.

AC0 : Absorbance à 490 nm du contrôle à *t* = 0 min.

AC120 : Absorbance à 490 nm du contrôle à *t* = 120 min

III.5 Activité anticancéreuse des flavonoïdes :

Selon les dernières observations de fonds mondial de la recherche contre le cancer publié en 2007, on estime que 30% de tous les cancers sont directement relié à la nature de régime alimentaire de ces individus. Ce pourcentage peut même atteindre 70% dans le cas de cancer gastro-intestinal [3].

Des études sur la composition chimique de certains fruits et légumes ont montrer que la richesse de ces plantes en certain métabolites tel que les flavonoïdes et à l'origine de leur efficacité dans la prévention et le traitement de cancer. In vitro, les flavonoïdes sont considérés comme des agents antiprolifératifs et cytotoxiques vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Certaines autres études menées sur des animaux ainsi que des études épidémiologiques se sont intéressées à évaluer le pouvoir anticancéreux des flavonoïdes in vivo [3**Error! Bookmark not defined.**].

La consommation de flavones et d'isoflavones diminuent le risque de la mort pour les femmes atteintes d'un cancer de sein post ménopausique. La Quercétine et d'aliments riches en flavonoïdes comme l'oignon et le raisin blanc empêchent la réapparition du cancer du poumon pour les gens qui ont été attient par ce cancer pour une première fois [141].

III.5.1 Mode d'action anticancéreux des flavonoïdes :

Les radicaux libres peuvent s'attaquer aux vitaux de cellule (lipides, protéine, ADN), et par conséquent être une cause de cancer. Les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les radicaux libres intervenant dans l'activation des

pro-carcinogène en carcinogène créant les lésions de l'ADN amplifiant ainsi les signaux de poldérisation inhibant des gènes suppresseurs de tumeur [142].

La carcinogène est un processus multi-étape avec une accumulation et altération génétique et différentes stratégies peuvent être envisagées pour prévenir, ralentir ou inverser ce processus. Des travaux ont montré que les flavonoïdes pouvaient agir sur déférant voies reliées à l'apparition de cancer telle que bio-activation des carcinogènes, signalisation cellulaire, régulation du cycle cellulaire, l'angiogenèse et l'inflammation [143 ;73].

Le mécanisme d'action anti-tumoral des flavonoïdes est variable et dépend de la structure chimique de ces molécules induisant les propriétés biologiques et des mécanismes d'action différents [144]. Les principaux modes d'action de ces métabolites sur les cellules eucaryotes sont d'écrits ci-dessous :

- L'activité antioxydante
- L'inhibition de l'induction de proto-oncogène
- Inhibition du cycle cellulaire

III.6 L'activité anti-inflammatoire :

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 [145].

L'acide arachidonique peut être métabolisé par la voie de la lipooxygénase pour aboutir à la formation de leucotriènes et par la voie de la cylooxygénase pour produire des thromboxanes et des prostaglandines, molécules fortement impliquées dans le processus inflammatoire [146]. Plusieurs flavonoïdes (le crisiliol et la baicaléine) sont de puissants inhibiteurs de la 5- lipoxygénase et donc la production des leucotriénes [147].

III.7 Propriétés antiallergiques :

Ces effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiestérase et ATPase Ca^{2+} dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca^{2+} dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a

montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme [146].

III.8 Activité antimicrobienne

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéo-muqueux. Pour résister à ces micro-organismes de nombreux moyens sont mis en jeu. En distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise [148].

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes [149].

III.8.1 Définition :

- **Antimicrobien :** désigne toute substance utilisée pour détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens, antiviraux, antifongiques et antiparasitaires [150].
- **Microbe :** c'est l'appellation courante des micro-organismes, c'est à dire des organismes très petits, visibles uniquement au microscope. Le plus souvent ce mot est utilisé pour désigner les vecteurs de maladies ou d'infections que sont certains micro-organismes :

- les champignons sont les vecteurs de pneumonies fongiques, de mycoses et d'allergies...
- les bactéries_peuvent provoquer des intoxications alimentaires, des infections respiratoires, urinaires...
- les virus_sont à l'origine de la grippe, du rhume, de l'hépatite, de l'herpès, du SRAS, la grippe aviaire, la varicelle, la mononucléose, le VIH... [151].

III.8.2 L'activité antibactérienne :

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires procaryotes, caractérisés par une absence de noyau et d'organites. La plupart des bactéries possèdent une paroi glucidique, le peptidoglycane. Il existe cependant de nombreuses espèces pathogènes à l'origine de beaucoup de maladies infectieuses comme le choléra, la syphilis, la tuberculose…[152] .

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigenine, kaempferol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) [153].

Les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs in vitro de l'ADN gyrase [145].

III.8.3 L'activité antifongique :

Comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. le tanin posséde une activité antifongique démontré notamment contre les souches fongiques : *Aspergillus niger*, *Penicillium species*, *Colletotrichum graminicola* [154].

III.8.4 L'activité antivirale :

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de L'infection virale des cellules en culture, une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral :

- Au niveau de l'adsorption du virus sur la cellule hôte
- Au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte
- Au niveau la de réplication du virus et la synthèse des protéines virales
- Au niveau de l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte

L'activité antivirale des flavonoïdes contre HIV peut être liée directement par leurs effets sur les enzymes responsables de son réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1

integrase) par railleurs d'autres flavonoïdes montraient une activité antivirale contre le virus D'influenza, HIV-1, HIV-2[155]. Quercétine, apigénine, catéchine et hesperédine sont parmi les flavonoïdes caractérisés par leurs propriétés antivirales contre onze Types de virus. 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-1 et HIV-2 [156].

III.8.5 Les méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne :

Tester un agent antimicrobien débute souvent par une évaluation destinée à vérifier si les Agents sont efficaces et à quelle concentration. On utilise des microorganismes pathogènes « Modèles comme témoin d'efficacité d'un traitement : *Micobacteryum tuberculosis*, *Clostridium botulinum*, parfois *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, parfois même des virus, Parmi les tests le plus courants, on distingue : le coefficient phénol, méthode de porte germe et la concentration minimale inhibitrice.

III.8.5.1 Test de l'activité antibactérienne *:*

III.8.5.1.4 Coefficient phénol :

Il s'agit de comparer l'activité d'un antiseptique avec celle du phénol en présence d'un germe test. Le coefficient phénol est égal au rapport entre la dilution du désinfectant et celle du phénol, dans des conditions opératoires données. La validité de ce test est, cependant de portée limitée, car elle n'est applicable que sur les composés ayant le même mécanisme d'action que le phénol. De plus les conditions de son application : test sur une culture bactérienne pure à une température et pendant un temps déterminé, limite sa signification [157].

III.8.5.1.5 Diffusion dans le milieu gélosé :

- Le test antibactérien consiste à cultiver diverses bactéries avec les échantillons et à mesurer l'absorbance développée dans le temps pour ainsi quantifier leur croissance et déterminer une concentration minimale inhibitrice (CMI) ou une concentration minimale bactéricide (CMB). Deux incubations et deux lectures d'absorbance peuvent être nécessaire pour discriminer les bactéricides des

bactériostatiques. Chaque activité antibactérienne est comparée à l'activité de certains antibiotiques utilisés en clinique [158].

- Il est aussi possible de faire un test antibactérien sur disque. Ce test consiste à mettre l'échantillon testé sur un disque de papier buvard que l'on pose sur une gélose inoculée de la bactérie. Durant la période d'incubation, l'antibiotique diffuse dans le gélose à partir des disques selon un gradient de concentration jusqu'à une limite de distance ou de concentration est le plus faible. Après l'incubation, la mesure du halo autour du disque est effectuée à l'aide d'un vernier [158]. Ce type de test est couramment utilisé dans la détermination de la sensibilité des bactéries pathogènes aux antibiotiques.

III.8.5.1.6 Méthode de porte germe :

La porte germe est constituée d'une bandelette de papier filtre. Il est immergé dans une Culture de germe test. En général, séché vingt-quatre heures à 37°C, il est mis en contact avec le désinfectant pendant des durées croissantes. La survie ou la destruction du germe est mise en évidence par immersion du papier préalablement séché dans un bouillon nutritif et par essai de culture [159].

III.8.5.2 Test de l'activité antifongique :

Le test antifongique consiste à mettre la levure en contact avec l'échantillon testé et mesurer l'absorbance développée dans le temps pour ainsi quantifier leur croissance et déterminer une concentration active. Chaque activité antifongique est comparée à un antifongique connu. En résumé, les échantillons à différentes concentrations sont mis en plaque avec les levures. Les plaques sont incubées, après quoi l'absorbance de chaque puits est passé au lecture de plaque Varioskan (spectrophotomètre capable de lire l'absorbance ; la luminescence et la fluorescence de microplaques) [158].

III.8.5.3 Test de l'activité antiviral :

Le principe consiste à incuber les virus dans différentes conditions avec les échantillons à tester. Chaque activité antivirale est comparée à des antiviraux connus et utilisés en clinique. En résumé, les échantillons à différentes concentrations sont mis en plaque avec les virus. Les plaques sont colorées et les plages de lyse sont ensuite comptées. S'il s'agit par exemple de virus de l'influenza, les plaques sont traitées à la résazurine pour mesurer l'activité métabolique des cellules hôtes. Leur

fluorescence est mesurée par un lecteur de plaque (spectrophotomètre capable de lire l'absorbance ; la luminescence et la fluorescence de microplaques) [158].

III.8.6 Les conditions affectant l'efficacité des agents antimicrobiens :

La destruction des microorganismes et l'inhibition du développement microbien ne sont pas des choses simples, car l'efficacité d'un agent antimicrobien est affectée par au moins six Facteurs qui sont :

- **La taille de la population**

Du fait qu'une fraction égale d'une population microbienne est tuée pendant chaque Intervalle, il faut plus de temps pour détruire une population plus petite.

- **La concentration ou l'intensité d'un agent antimicrobien**

Souvent mais pas toujours, plus un agent chimique est concentré ou plus un agent Physique est intense, plus les micro-organismes sont détruits rapidement.

Généralement, l'effet de la concentration ou de l'intensité sur l'efficacité n'est pas Linéaire. Parfois, un agent est plus efficace à faible concentration, par exemple, l'éthanol à 70% est plus efficace que l'éthanol à 95%, car son activité s'accroît en présence d'eau. La durée d'exposition, plus une population est longtemps exposée à un agent antimicrobien, plus nombreux sont les organismes tués [160].

III.8.7 Mode d'action d'agent antimicrobien :

Les antimicrobiens chimiques agissent selon divers mécanismes soit par :

Altération soit par :

- (oxydation, hydrolyse, coagulation) des protéines ou dénaturation (perte d'activité) des enzymes. Les alcools coagulent les protéines. Les agents oxydants, les métaux lourds oxydent ou se combinent avec les groupements SH des enzymes
- (hydrolyse, oxydation) des acides nucléiques, activité mutagène. Des Colorants (violet de Gentiane) inactivent les acides nucléiques.
- Hydrolyse de l'enveloppe cellulaire (paroi, membrane). Il s'agit une altération de la paroi qui conduit à une destruction cellulaire sous d'effet de la pression osmotique (lysozyme) ou de la perturbation de la perméabilité cellulaire (agents liposolubles : phénol, savon, …)

Action sur d'autres grandes fonctions métaboliques comme la respiration (inhibée par le cyanure, l'azide, etc.), les activités de synthèse, etc [159].

III.9 Autres propriétés des flavonoïdes :

- Protection des plantes contre les radiations UV
- Défense de la plante contre les infections bactériennes et virales
- Agissent comme des pigments ou des co-pigments
- Modulation de la distribution d'auxine
- Fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire
- Régulation de l'élongation des tiges
- Interviennent dans la maturité des fruits
- Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores [161].

IV. Matériel et Méthodes

IV.1 Objectif :

L'extraction des flavonoïdes à partir de *Rosmarinus officinalis*. L a été réalisée par trois techniques d'extraction : macération à froid, chauffage classique à reflux et extraction assistée par induction électromagnétique en vue d'effectuer une comparaison entre les trois techniques en terme de :

- Rendement d'extraction
- Teneur en polyphénols et en flavonoïdes
- Effet biologique (pouvoir antioxydant et antimicrobien).

Les études expérimentales *in vitro* à été effectué au niveau des structures suivantes :

- Laboratoire universitaire de biologie, Hall technologique, Université de Médéa.
- Laboratoire de la wilaya, Direction de Santé Publique (*DSP*), Médéa.
- Laboratoire d'analyses physico-chimiques de l'unité « *ANTIBIOTICAL* » du groupe *SAIDAL*, Médéa.

Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé est présenté dans le suivant :

Type	Equipement	Verrerie	Réactif
Matériel non biologique	– Chauffe ballon – Plaque chauffante – Etuve – Spectrophotomètre UV-VISIBLE.	– Ballon 1000 ml – Réfrigèrent – Ampoule à décompter – Tubes en verre – Pipettes graduées – Réacteur en acier	-Eau distillé -NaCl -éthanol

IV.2 Matériel végétal :

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de *Rosmarinus Officinalis. L* (Figure IV-1) les feuilles ont été récoltées en mois d'avril 2015 de la région de ksar El Boukharie du Médéa. Après un séchage de 3 jours à une température ambiante et à l'abri de la lumière, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, le matériel végétal est broyé grossièrement dans un moulin électrique.

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

Ainsi, pour un échantillonnage le plus homogène que possible, les tiges feuilletées ont été divisées en morceaux de longueur moyenne de 5cm.

IV.2.1 Détermination de la Teneur en eau :

La teneur d'eau des espèces végétales étudiées est déterminé selon la pharmacopée européenne à partir d'une masse d'un échantillon de masse M_0 de matière végétale introduite dans un creuset en porcelaine taré, puis séchée dans une étuve à 105^0 C jusqu'au poids constant M, après refroidissement dans un dessiccateur, le creuset est pesé.

La différence entreM_0 et M représente la quantité d'eau contenue initialement dans l'échantillon utilisé.

Le taux d'humidité est estimé par la formule suivante :

$$H(\%) = [\frac{M_0 - M}{M_0}] \times 100 \qquad \text{IV-1}$$

$H(\%)$: Teneur en eau;

M_0 : Poids de l'échantillon à l'état frais en g;

M : Poids de l'échantillon après séchage en g.



Figure IV-1:*Rosmarinus Officinalis. L*

IV.3 Extraction des flavonoïdes et des polyphénols :

Afin d`atteindre nos objectifs, nous avons utilisé différents protocoles et méthodes expérimentales comprenant deux grandes phases :

- Extraction solide-liquide réalisé par deux techniques classiques (macération à froid et chauffage à reflux) et une technique moderne (chauffage par induction magnétique)
- Extraction liquide-liquide se fait avec trois solvants de polarité croissante éther de pétrole ; acétate d'éthyle et le n-butanol
- Le protocole général d'extraction est représenté dans la figure ci-dessous.

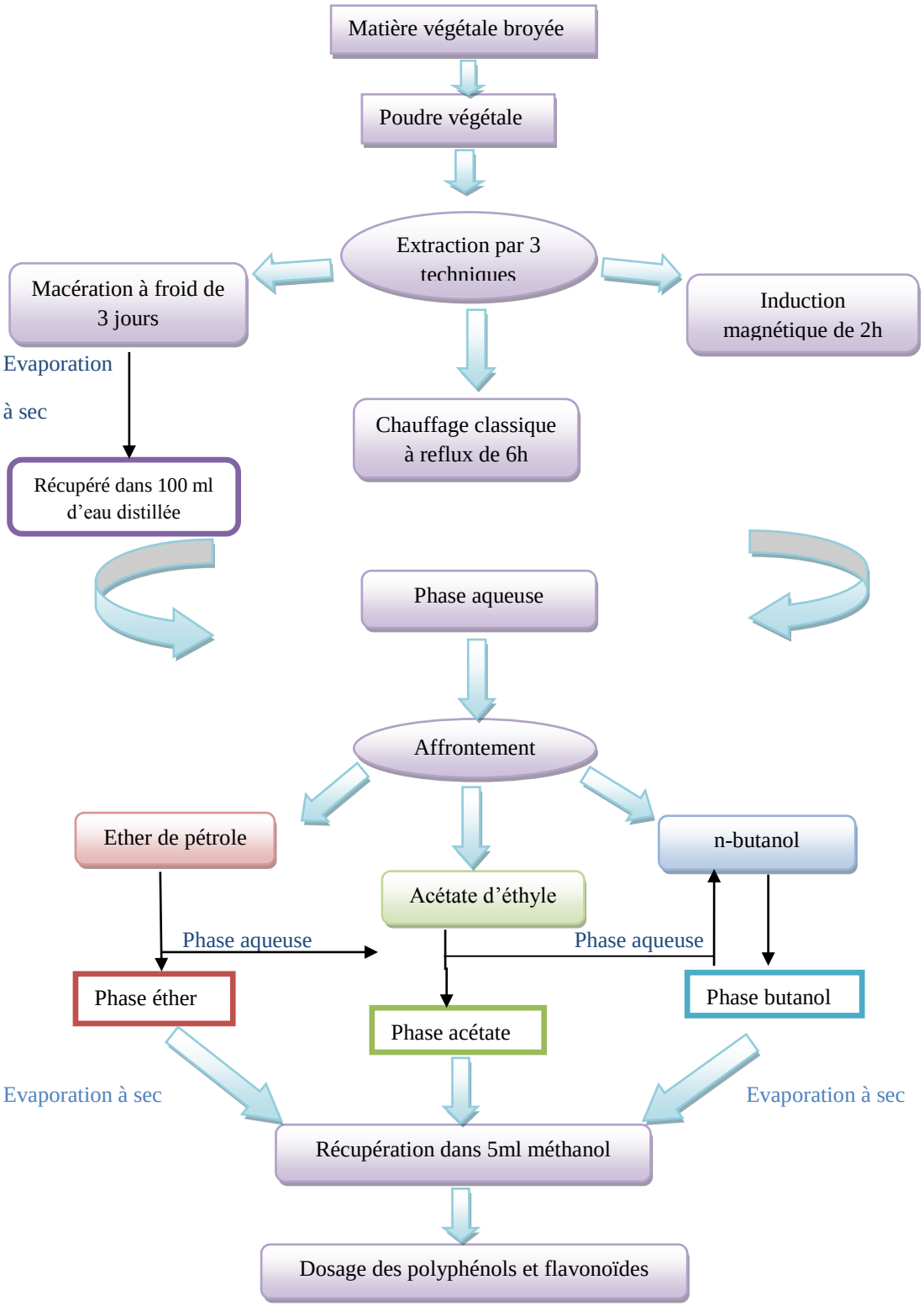


Figure IV-2 : Protocole expérimental d'extraction des polyphénols et flavonoïdes de *Rosmarinus Officinalis. L*

IV.3.1 Extraction par macération :

IV.3.1.1 Préparation de l'extrait brut :

Suivant le protocole d'extraction décrit par *Merghem et al* [162], le matériel végétal broyé (100 g) est soumis à une extraction par macération dans le mélange éthanol / eau (30/70 : v/v) pendant 72 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures et agitation de temps en temps. Les macéras sont réunis puis ils sont filtrés sur un papier filtre. Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris dans 100ml d'eau distillée bouillante (l'intérêt de l'utilisation de l'eau distillée bouillante c'est pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation).



Figure IV-3 : macération de *Rosmarinus Officinalis.L*

IV.3.2 Extraction par chauffage classique à reflux:

IV.3.2.1 Description de montage :

- La matière végétale et l'eau distillée sont introduites à l'intérieur du ballon monocol en verre borosilicate de 1000ml,
- Le réfrigérant à eau permettant de condenser les vapeurs sortantes du ballon,
- La 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 (Voir FigureIV-4).



FigureIV-4: Montage de l'extraction assistée par chauffage classique à reflux.

IV.3.2.2 Préparation de l'extrait brut :

- 60g de matière végétale sèche divisée grossièrement par un moulin électrique ont été introduits dans un ballon monocol et additionnés de 200ml d'eau distillée et quelques grains de pierre pence afin d'éviter tout risque de surchauffe locale au cours de l'extraction.
- L'ensemble est porté à l'ébullition grâce à un chauffe-ballon pendant 6 heures.
- Les vapeurs saturées en molécules aromatiques sont ensuite condensées 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.3.3 Extraction par induction electromagnétique :

Selon les travaux faits par *Fhekar et al* [163]. Les paramètres optimaux d'extraction assistée par induction magnétique sont :

- ✓ Niveau de puissance de la plaque d'induction égale à 7.
- ✓ Temps de l'opération du chauffage égale à 2 heures
- ✓ La masse de la matière végétale égale à 150g
- ✓ Le rapport NaCl/ solution extractive 3,75g/300ml

IV.3.3.1 Description du montage

- L'eau et la matière végétale sont introduites dans un réacteur de 2500 ml 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-5**)** .Cependant, la forme cylindrique allongée servant à un meilleur respect des écarts thermiques tolérables.
- Le réfrigérant permet la condensation des vapeurs d'eau.
- La plaque chauffante à induction magnétique construite en vitrocéramique qui ne s'échauffe que par induction électromagnétique avec 9 niveaux de puissance chacun correspondant à une température précise.
- Le réacteur en acier inoxydable servant à chauffer les solutions contenues à l'intérieur de réacteur, en assurant une parfaite maîtrise des niveaux de température pour éviter le risque de surchauffe des réactifs à traiter.



Figure IV-5: Montage d'induction électromagnétique.

IV.3.3.2 Préparation de l'extrait brut :

On immerge 150gde matière végétale sèche grossièrement divisée dans 300ml d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition grâce à la plaque du chauffage à induction magnétique, le niveau de puissance est égal à 7 équivalant à 100°C pour avoir une ébullition douce pendant une durée d'extraction de 2 heures.

IV.3.3.3 Extraction par induction electromagnétique en présence de NaCl :

Nous nous sommes intéressés à étudier l'influence de la teneur de la solution conductrice sur le rendement et effet biologiques (antioxydant et antimicrobienne) sur l'extrait issu de l'extraction par induction magnétique.

On introduit une masse de 3.75g de NaCl avec une masse végétale de *Rosmarinus officinalis* de 150g et 300 ml d'eau distillée dans un réacteur en inox au le montage d'écrit ci-dessus.

IV.3.4 Fractionnement de l'extrait brut :

Après une opération de filtration, on récupère la phase limpide issue de trois méthodes d'extraction (macération, chauffage classique et par induction magnétique) qui va épuiser successivement par 3 solvants de polarité croissante :

IV.3.4.1 Affrontement par éther de pétrole :

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

IV.3.4.2 Affrontement par acétate d'éthyle :

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

IV.3.4.3 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 sont agités énergétiquement laissés au repos pendant 3heure.

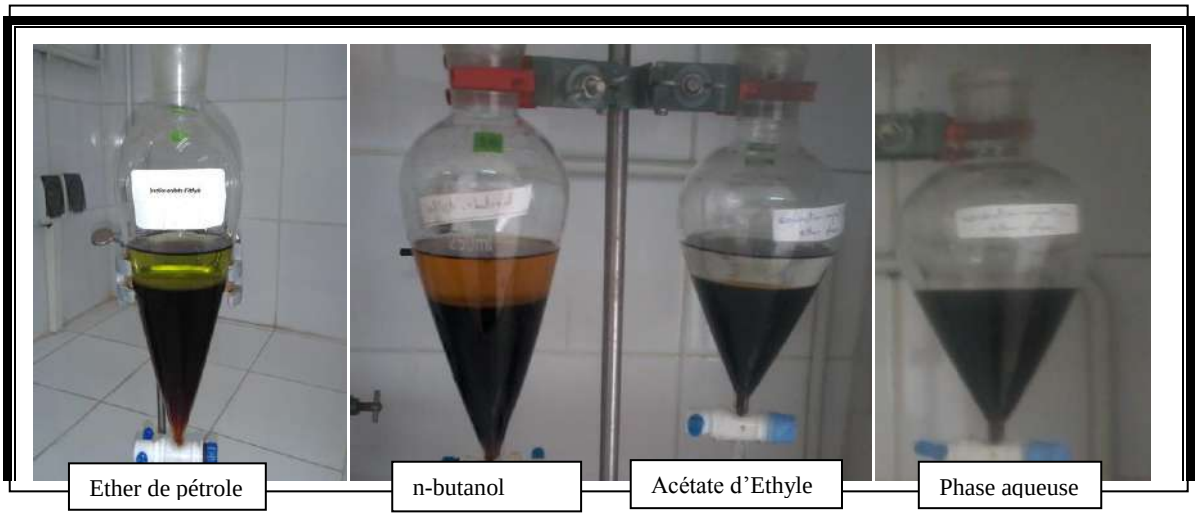


Figure IV-6: fractionnement de l'extrait brut de *Rosmarinus officinalis.L*

La phase aqueuse qui est au fond de l'ampoule et la phase chargée de molécules spécifiques sont récupérées séparément, pour chaque solvant on refait deux fois cette opération pour assurer un entraînement optimal de nos molécules spécifiques (les flavonoïdes).

Les différentes phases récupérées (éther de pétrole, acétate d'éthyle, le n-Butanol, et la phase eau résiduelle) sont évaporés à sec afin d'éliminer les solvants utilisés et la récupération des extraits secs.

L'évaporation est réalisée sous vide dans un évaporateur rotatif. Ou 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 et renouvelée permettant donc d'effectuer une évaporation rapide. L'abaissement de la pression permet d'évaporer le solvant à température réduite évitant ainsi la dégradation thermique des composés (Figure IV-7).

Puis les fractions évaporées sont reprises dans 5ml de méthanol, les extraits obtenus sont stockés à une température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.



Figure IV-7: L'évaporateur Rotatif.

IV.4 Rendements en polyphénols :

Les fractions des extraits sec sont obtenues après un séchage à sec par un rotavapor ou la masse et déterminées par la différence entre la masse de ballon plein et le poids de ballon vide .

Le rendement en polyphénols R_f 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 :

$$\boldsymbol{R_f}(\%) = \left(\frac{\boldsymbol{mF}}{\boldsymbol{mMV}}\right) \times \mathbf{100} \qquad \text{IV-2}$$

IV.5 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes :

IV.5.1 Dosage des polyphénols :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu selon la méthode cité par *Wong et al* [164].

IV.5.2 Principe :

La teneur phénolique totale dans les différents extraits de *Rosmarinus Officinali.L* est déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Ciocalteu. Cet essai est basé principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique et phosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue [165].

IV.5.3 Protocole de travail :

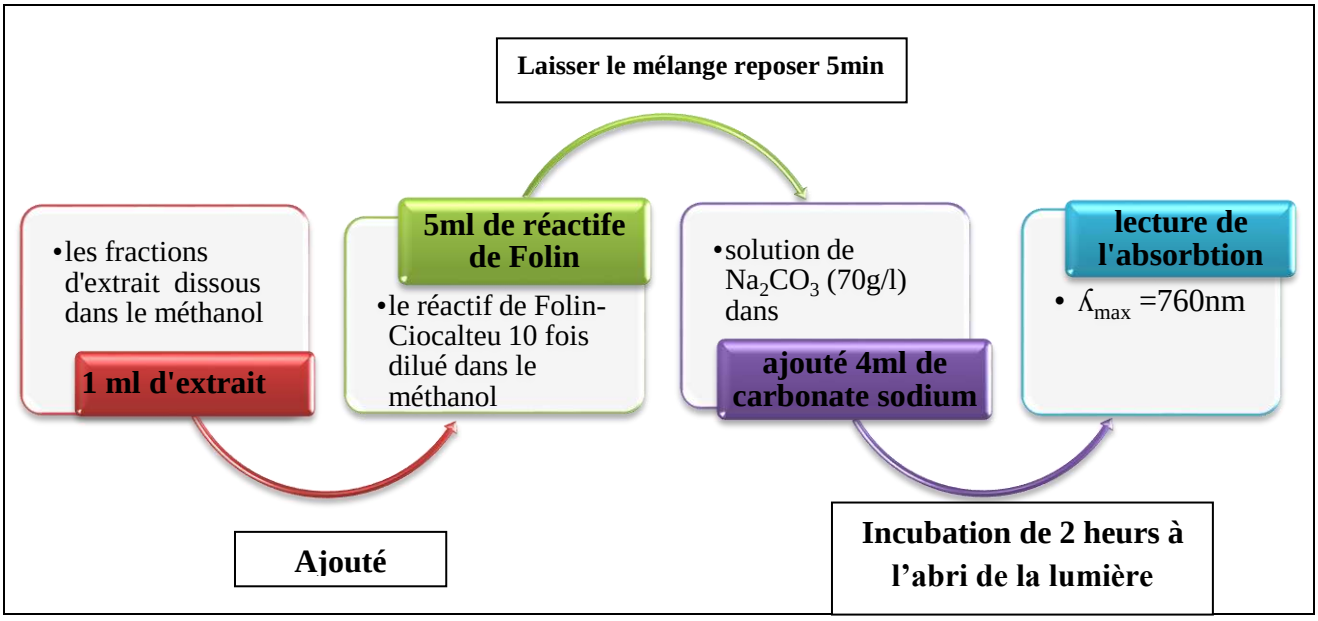


Figure IV-8: Le mode opératoire déterminant la teneur en composés phénoliques

Les teneurs en composés phénoliques totaux dans les différents extraits exprimés en mg Equivalent d'Acide Gallique (EAG) pour 100(g) de matière végétale sèche de départ suivant la formule ci-dessous :

$$Tp = \frac{V \times C \times D}{m \times 1000} \qquad \text{IV-3}$$

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 (10mg/ml)

IV.5.4 Dosage des flavonoïdes :

IV.5.4.1 Test préliminaire :

La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par un test simple et rapide par la réaction à la cyanidine.(La réaction de *Shibata).* Les flavonoïdes sont responsables d'un dégagement d'hydrogène et de

l'apparition d'une coloration allant de l'orangé au rouge pourpre, en présence d'acide chlorhydrique concentré et de magnésium.

Ce test consiste à mettre 2 ml de chaque extrait dans un tube, d'additionné quelques fragments de magnésium et quelques gouttes d'HCl.

IV.5.4.2 Dosage des flavonoïdes par un moyen spectrophotométrique :

Pour estimer la quantité des flavonoïdes dans nos extraits on utilise la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) cité par *Djeridane et al* [166].

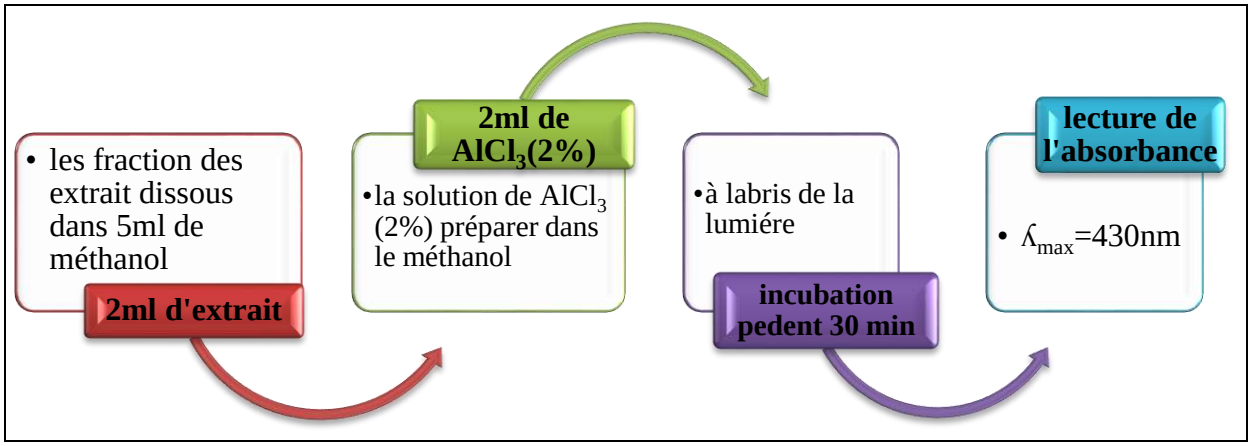


Figure IV-9: Protocole de Dosage des flavonoïdes par la réaction à la cyanédine

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

$$T_f = \frac{c \times v \times d}{m \times 1000} \qquad \text{IV-4}$$

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 Etude de l'activité antioxydante par (DPPH):

Les antioxydants naturels sont présents dans l'alimentation ; pour la plupart se sont des composés phénoliques qui possèdent au moins un noyau aromatique, contenant un ou plusieurs substituant, en effet cette propriété antioxydante est en relation directe avec la structure de ces molécules [167].

Dans le but d'évaluer le pouvoir antioxydant de nos fractions d'extrait (EP,**AcOEt, ButOH**) la technique au radical libre stable DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) avec une bande maximum d'absorption entre 515-528 nm a été employée.

Dans cet technique, les antioxydants réduit et décolore le radical DPPH en un composé Jaune Le diphenylpicryl hydrazine. L'ampleur de la réaction dépendra de la capacité des antioxydants de donner l'hydrogènes (voir Figure IV-10) [168].

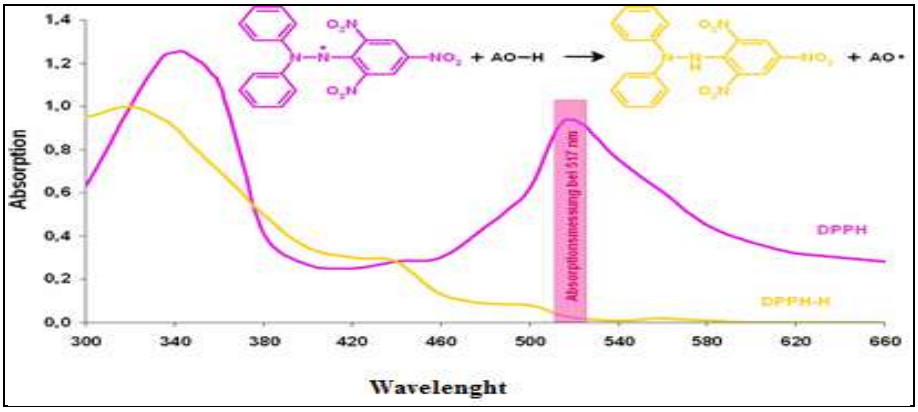


Figure IV-10: Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive [169].

Ce test est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants [170] **.**

Pour cette raison nous avons suivi le protocole expérimental décrit par ***Lopes-Lutz et al*** [171].

IV.6.1 Protocole de travail :

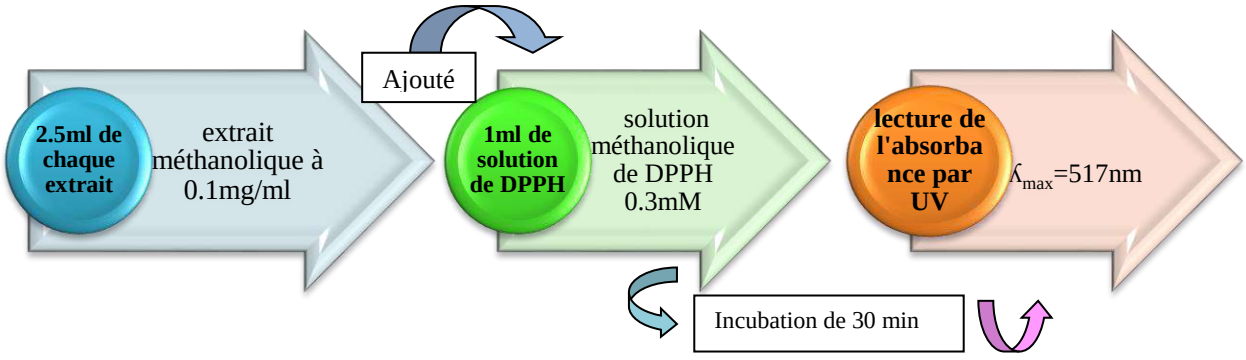


Figure IV-11 : Protocole Expérimental déterminant l'activité antiradicalaire des extraits.

Les résultats peuvent être exprimés en tant que : pourcentage de l'activité antiradicalaire ou en pourcentage de DPPH restant ou peuvent également être exprimés en utilisant le paramètre IC_{50}, qui est défini comme la concentration du substrat qui cause une perte de 50% de l'activité de DPPH [170].

Pour calculer pourcentage de l'activité antiradicalaire de DPPH en utilisant la formule suivante :

$$\mathbf{I\%} = [\mathbf{1} - (\boldsymbol{AbsEchantillon} - \boldsymbol{AbsControlnégaatif})] \times \mathbf{100} \qquad \text{IV-5}$$

IV.7 Étude de l'activité antimicrobienne :

IV.7.1 L'activité antibactérienne et antifongique :

Le test de susceptibilité a été effectué selon la méthode de diffusion des disques ou antibiogramme et antifongigramme standard [172].

L'activité antibactérienne et antifongique de nos produits est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits flavonique à tester vis-à-vis aux germes pathogènes utilisés.

Le support microbienne est composé de bactéries de référence fournies par le laboratoire de microbiologie de Saidal : *Escherichia coliATCC10536*, *Staphylococcus aureusATCC6538,Candida albican ATCC10231*et *Enterococcus faecalis; Aspergillus Niger*. Elles ont été isolées de produits pathologiques provenant de laboratoire de bactériologie de l'hôpital de Médéa (Tableau IV-1).

IV.7.1.1 L'activité antifongique :

Deux souche microbiennes ont été utilisés (une levure : *candida albican ATCC* et un champignon : *Aspergillus Niger*)

Tableau IV-1: Présentation des différentes souches bactériennes testées

Les souches	La famille	Etat frais	Gram
Escherichia coli	*Entérobactériaceae*	bacille	Gram negatif
Staphylococcus aureus	*Staphylococcaceae*	coques	gram positifs
Enterococcus faecalis	*Enterococcaceae*	bacille	Gram positif
candida albican	*Saccharomycetaceae*	*Saccharomycetes*	Levure
Aspergillus Niger	*Trichocomaceae*	*Eurotiomycetes*	Champignon

IV.7.2 Méthode de travail :

IV.7.2.1 Repiquage des espèces bactériennes :

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

IV.7.2.2 Préparation de l'inoculum :

Des colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans 10 ml d'eau physiologique .

IV.7.2.3 Préparation des disques :

Des disques de papier Wathman de 9 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage), sont chargés de l'extrait naturel à tester, des disques imprégnés de méthanol sont également utilisés qui vont servir de témoin négatif.

Les boîtes sont alors incubées à 37°C pendant 18à 24 h. La durée d'incubation est prolongée pour les levures et les champignons.

IV.7.2.4 Préparation des milieux de culture :

La gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boites de pétrie stériles. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm répartie uniformément dans les boites. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

IV.7.2.5 Ensemencement :

Des boites de pétrie stériles préalablement coulées, sont ensemencées par étalage à l'aide d'un écouvillon stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une tapie homogène des bactéries.

A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.

V. Résultats et discussion :

V.1 Teneur en eau :

Les résultats d'analyses de teneur en eau des feuilles fraîches de *Rosmarinus officinalis* ont montré une teneur égale à 64.5% ; Ce résultat est proche de celui obtenu par *Athamena* (67.0%) [68].

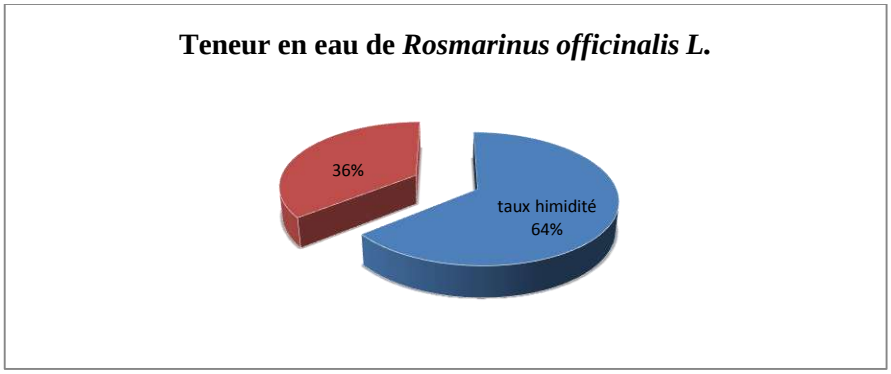


Figure V-1: Teneur en eau de *Rosmarinus officinalis*L

Les valeurs de taux d'humidité signifient que la majorité du poids de la plante fraîche est constituée d'eau.

V.2 Calcul de Rendement d'extraction :

Les résultats de rendement d'extraction des composés phénoliques par les différentes méthodes d'extraction sont regroupés dans le Tableau V-1.

Tableau V-1: Rendement d'extraction des composés phénoliques de *Rosmarinus officinalis* L.

Méthode d'extraction	Phases	Rendement (%)
Macération	EP **AcOEt** **ButOH**	**1,14** **2,38** **2,85**
Chauffage classique	EP **AcOEt** **ButOH**	**3,1** **4,75** **7,93**
Induction magnétique	EP **AcOEt** **ButOH**	**3,8** **9** **12, 3**
Induction avec NaCl	EP **AcOEt** **ButOH**	**3,81** **9,4** **13**

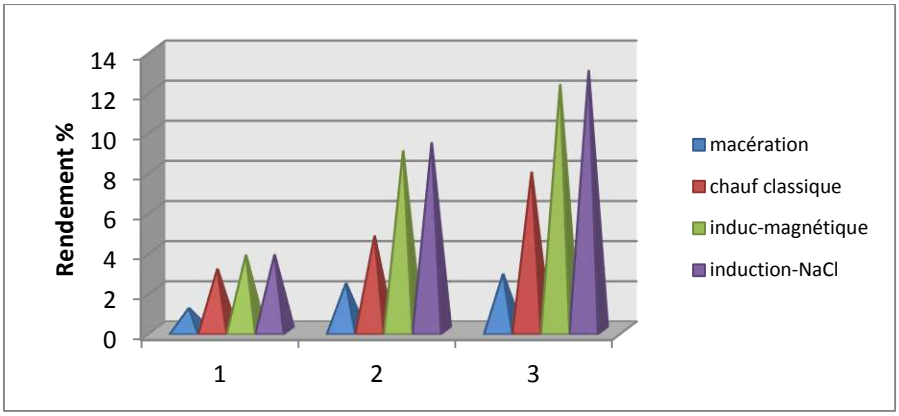


Figure V-2: Rendement d'extraction de *Romarin* en fonction les méthodes d'extraction

V.3 Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

V.3.1 Mise en évidence des flavonoïdes :

La présence des flavonoïdes dans les extraits est indiquée par le virement de la couleur vers l'orange ou le rouge brique [173].

Le test préliminaire de présence des flavonoïdes dans différente fraction d'extrait de rosmarinus (AcOEt, ButOH) a donné des résultats positive, par contre la fraction extrait par éther de pétrole donne un résultat négatif. Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau V-2.

Tableau V-2 : Résultats des extraits à la cyanidine

La fraction extraite	Réaction à la cyanidine	Couleur
EP	-	Jaune très clair
AcOEt	+	Rouge
ButOH	+	Rouge foncé

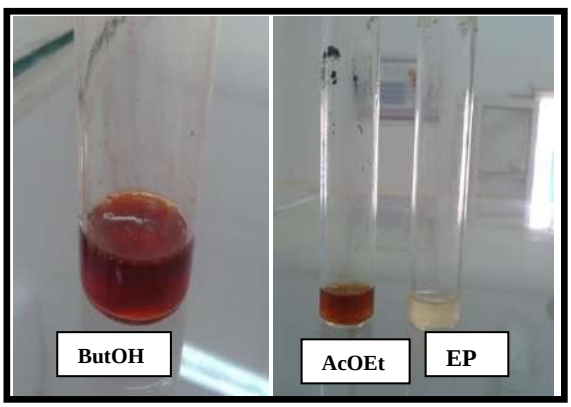


Figure V-3:Résultat de la réaction à la cyanidine

L'intensité de la couleur rouge indique la richesse du romarin en flavonoïdes, ce test préliminaire nous a confirmé la présence des flavonoïdes dans les extraits de *Romarin* Figure V-3**.**

V.3.2 Teneur en polyphénols et en flavonoïdes :

Le contenu des composés phénoliques dans les fractions extraites de *Rosmarinus officinalis* a été déterminé par la méthode de *Folin ciocalteu*, au moyen des dosages spectrophotométriques en utilisant l'acide gallique comme standard.

La quantité des composés phénoliques des extraits méthanoliques de la plante étudiée dépend essentiellement de : leur origine [174], la variété, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la durée de conservation [175].

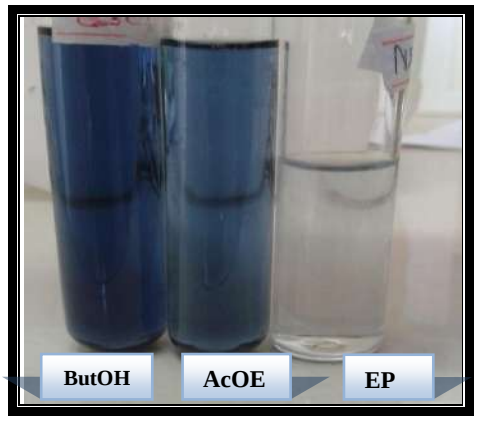


Figure V-4: Résultat de dosage des polyphénols

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d'$AlCl_3$ en utilisant comme standard la Quercétine, les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg EQ/mg d'extrait.

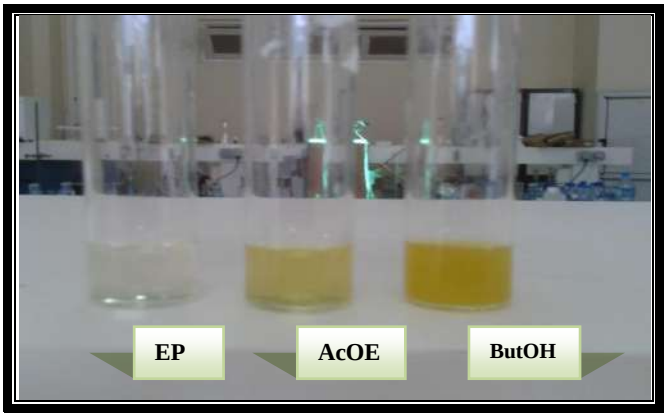


Figure V-5: Résultat de dosage des flavonoïdes

Les résultats du dosage quantitatif des polyphénols et flavonoïdes totaux extraite par les trois méthodes d'extraction (macération ; chauffage classique ; induction magnétique) sont représentés dans le Tableau V-3 et illustrés par la Figure V-6.

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

Méthode d'extraction	Fraction	T_P(mg EAG/g)	T_f(mg EQ/g)
Macération à froid	**EP**	18.017	0,34
	AcOEt	20.897	0,99
	ButOH	50.177	1,64
		89.691	**2,97**
Chauffage classique à reflux	**EP**	27.45	1.150
	AcOEt	67.2	28.17
	ButOH	72.675	34.452
		167.325	**63.772**
Induction magnétique	**EP**	20.4	2.899
	AcOEt	72.643	33.164
	ButOH	76.577	33.894
		169.610	**69.957**
Induction magnétique avec NaCl	**EP**	13.628	10.036
	AcOEt	74.117	34.166
	ButOH	97.345	38.532
		185.279	**82.734**

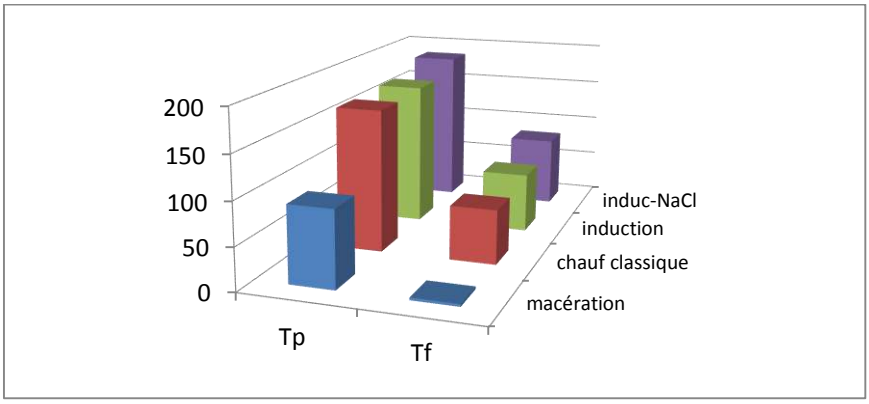


Figure V-6:L'évolution Evolution de taux de flavonoïdes (Tf) et de polyphénols (Tp) en fonction de la méthode d'extraction

V.3.3 Discussion :

D'après les résultats de Tableau V-3 représentant l'évolution du taux de flavonoïdes en fonction du solvant d'extraction on constate que :

Les résultats obtenus pour les trois méthodes d'extractions utilisées montrent que l'extrait butanolique représente les proportions les plus élevées en comparaison avec les extraits d'acétate d'éthyle et éther de pétrole avec l'ordre **ButOH>AcOEt>EP.**

Cette différence dépend certainement des caractéristiques physico-chimiques de solvant et notamment de leur polarité. En effet, la solubilité des substances contenues dans la matière végétale dans un solvant donné dépend de ces propriétés.

L'analyse des résultats expérimentaux prouve que l'extrait issu de l'extraction assisté par induction magnétique avec et sans l'ajout de solution saline NaCl est plus riche en composés phénoliques (**169.610 (mg EAG/g)185.279(mg EAG/g)** respectivement et en flavonoïdes(**69.957 (mg EQ/g)** et **82.734 (mg EQ/g**) respectivement ,par rapport les autres extraits obtenus par les méthodes conventionnels (macération à froid et chauffage classique à reflux) dans un temps de 2h.

Nos résultats viennent corroborer à ceux de *Ho et al* [176]**,** où l'extrait méthanolique du romarin était riche en polyphénols (127 ± 3 mg EAG/g) et pauvre en flavonoïdes (20.1 ± 1.30 mg EC/g).

En outre, *Tsai et al* [177] ont également trouvé que l'extrait méthanolique du romarin contient 60.7 ± 1.1 mg EQ/g. Les teneurs rapportées par ***Ho*** et ***Tsai*** sont très proches à nos résultats obtenus par les deux méthodes induction magnétique et chauffage classique à reflux mais ils sont loin des résultats obtenus par la méthode assistée par macération à froid.

L'efficacité des trois techniques d'extractions utilisées dans ce travail est lié au mode de chauffage, sachant que le chauffage par induction magnétique permet l'homogénéité et la rapidité du chauffage, grâce à son principe de produire la chaleur au sein du matériau à chauffer, contrairement au chauffage classique à reflux et le procédé de macération à froid dans lequel le solvant devant extraire la matière végétale peut arriver à saturation et perdre progressivement sa capacité d'extraire au cours du temps.

L'effet de NaCl sur le taux des polyphénols et les flavonoïdes à été noté : le taux des polyphénols $\mathbf{T_p}$ et des flavonoïdes $\mathbf{T_f}$ obtenus par induction magnétique avec NaCl

été 1 fois plus par rapport au taux des $\mathbf{T_p}$ et $\mathbf{T_f}$ obtenus par la même technique sans l'ajout de NaCl.

V.3.4 Conclusion :

La comparaison entre les techniques d'extraction utilisées a montré que le chauffage par induction magnétique offre :

- Amélioration du rendement d'extraction
- Richesse en polyphénols et en flavonoïdes
- Réduction de temps d'extraction grâce à son principe de produire la chaleur au sein du matériau à chauffer.
- La faible concentration de NaCl favorise l'extraction.

V.4 Résultats de l'activité antioxydante:

L'inhibition du DPPH radicalaire a été évaluée pour chaque fraction d'extrait (**EP ; AcOEt ; ButOH**) et pour chaque méthode d'extraction (macération ; chauffage classique à reflux et induction magnétique). Les résultats obtenus sont présentés dans le .

Tableau V-4.

Une valeur faible d'IC_{50} indique une activité antioxydante forte. Le pourcentage d'inhibition (I%) pour chaque extrait méthanolique a été calculé. La valeur d'IC_{50}, la concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire, a été déterminés graphiquement ,dont l'abscisse représente les différentes concentrations d'extraits préparés et l'ordonné l'activité anti-oxydante en pourcentage.

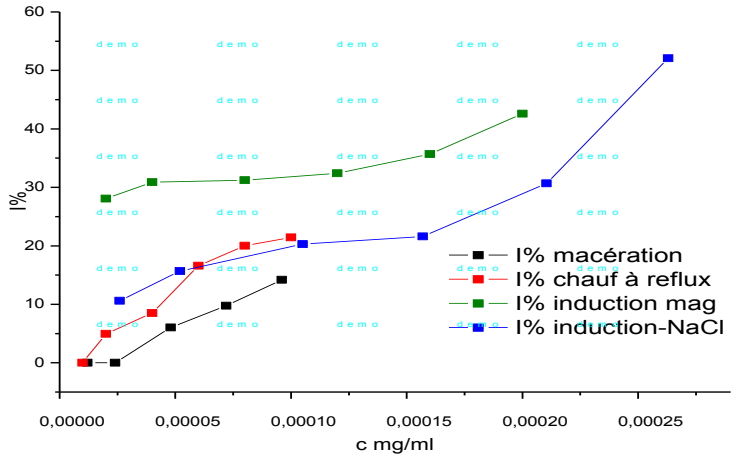


Figure V-7 : Taux d'inhibition de la phase éther de pétrole issue de 3 techniques en fonction de la concentration

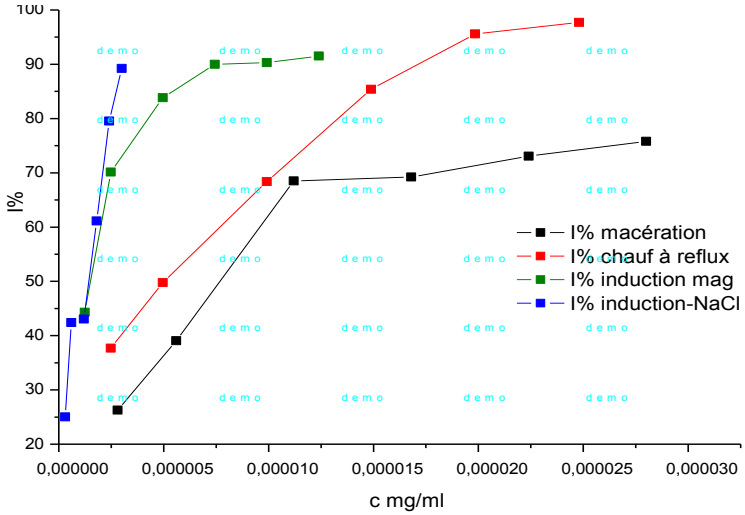


Figure V-8 : Taux d'inhibition de la phase d'acétate d'éthyle issue de 3 techniques en fonction de la concentration

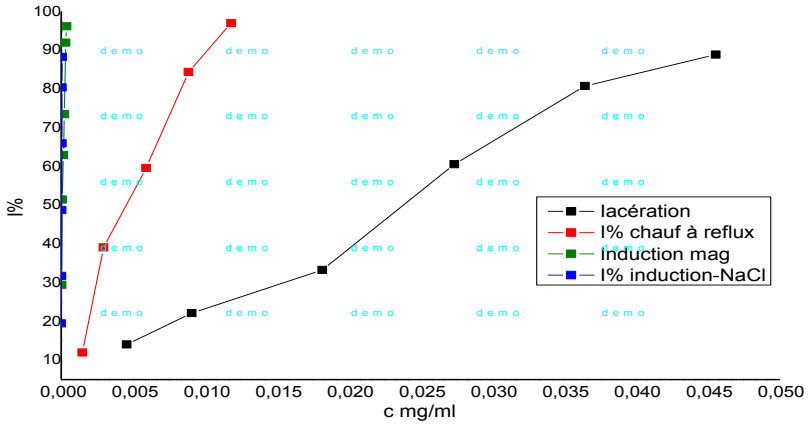


Figure V-9 : Taux d'inhibition de la phase butanol issue de 3 techniques en fonction de la concentration

Le Tableau représente les taux d'inhibition maximaux ainsi les valeurs d'IC_{50} trouvés pour chaque méthode d'extraction.

Tableau V-4: Activité antioxydante des extraits de *Romarin* et de témoin déterminés par le test au DPPH**.**

La méthode	La fraction	IC_{50}/DPPH (µg/ml)	Taux d'inhibition Max (%)	[c] d'inhibition max (µg /ml)
Macération	**EP** **AcOEt** **ButOH**	/ 0,00779 23,987	18,74 75,8 88,94	0,1 0,028 46,00
Chauffage classique à reflux	**EP** **AcOEt** **ButOH**	/ 0,00485 4.5390	21,44 97,7 97,107	0,12 0,025 12,00
Induction magnétique	**EP** **AcOEt** **ButOH**	/ 0,00150 0,0714	42,6 91,5 96,27	0,20 0,012 0,38
Induction magnétique aves NaCl	**EP** **AcOEt** **ButOH**	**0,2580** **0,00143** **0,0350**	52,09 89,25 88,37	0,20 0,003 0,073
Témoin	Acide ascorbique	**5,700**		

V.4.1 Discussion

D'après les résultats de l'activité antioxydante trouvés par le test de DPPH des différents extraits de *Romarin* et ce de témoin (acide ascorbique), on remarque que :

- tous les extraits testés ainsi que l'acide ascorbique pris comme référence sont des anti-radicalaires.
- l'activité antioxydante de la faction **AcOEt** à montré une concentration d'IC_{50} la plus faible varient de 0,00**77** à 0,00143(µg /ml) suivie parla phase de butanol puis la phase de l'éther de pétrol.
- la fraction éther de pétrol, extrait les impuretés (composés non phénoliques) et surtout les lipides, ce qui explique la faible l'activité antioxydant mais non pas nulle peut être due à des trace des flavonoïdes.

- D'une manière générale les résultats des extraits de *Romarin* révèle une activité antiradicalaire plus importante à celle d'acide ascorbique (**5,7** µg /ml)
- La comparaison entre les méthodes d'extraction utilisées montre que l'extrait obtenu par induction magnétique sans et avec l'ajout NaCl représente des valeurs de IC50 la plus faible donc de très bon antioxydant naturel. L'ordre d'efficacité des méthodes d'extraction est le suivant : ***induction-M &NaCl>induction-M>chauffage-R>macération***

Les résultats sont en accord avec ceux obtenus par de nombreux chercheure à titre d'exemple *Ribereau- Gayon* [178],*Gulçin I* [179].Ces derniers ont constaté que La propriété antiradicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure, en particulier à la présence des groupements (OH) hautement réducteurs et au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques .

V.4.2 Conclusion :

A la lumière des résultats obtenus, on constate que l'activité anti-radicalaire des extraits est relativement dépendante de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes extraite. Et aussi en fonction de la méthode d'extraction utilisée, où le chauffage par induction magnétique offre des extraits de très bon pouvoir antioxydant naturel.

V.5 Résultats de l'activité antimicrobienne :

L'activité antibactérienne des extraits méthanolique de *Romarin* est testée vis-à-vis de trois souches bactériennes et deux souches fongiques via la méthode de diffusion sur l'agar.

Les résultats de diamètre des zones d'inhibition de nos extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction sont regroupés dans le Tableau V-5.

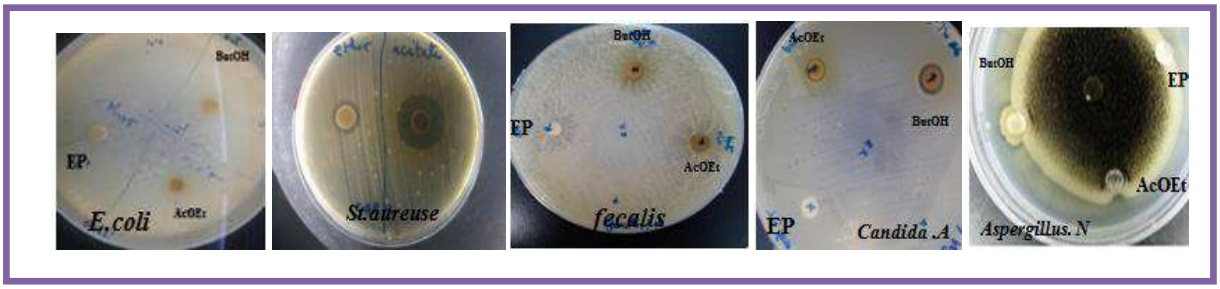


Figure V-10 : Exemples de quelque antibiogramme des souches testées

Tableau V-5: Diamètre des zones d'inhibition pour les trois méthodes d'extraction.

Méthode d'extraction	Les souches	**EP**	**AcOEt**	**ButOH**
Macération à froid	*E.coli ATCC*	{-}	{-}	{-}
	Staph.aureuseATCC	{-}	12mm	14mm
	E.faecalis	{-}	{-}	{-}
	C.allbican ATCC	{-}	{-}	13mm
	Aspergillus.N	{-}	{-}	{-}
Chauffage Classique à reflux	*E.coliATCC*	{-}	{-}	{-}
	Staph.aureuseATCC	{-}	13mm	15mm
	E.faecalis	{-}	{-}	{-}
	C.allbicanATCC	{-}	{-}	{-}
	Aspergillus.N	{-}	{-}	{-}
Induction Magnétique	*E.coliATCC*	{-}	{-}	{-}
	Staph.aureuseATCC	{-}	14mm	17mm
	E.faecalis	{-}	{-}	{-}
	C.allbicanATCCAspergillus.N	{-}	{-}	13mm
		{-}	{-}	{-}
Induction Magnétique avec NaCl	*E.coliATCC*	{-}	{-}	{-}
	Staph.aureuseATCC	+14mm	+ 22mm	+ 24mm
	E.faecalis	{-}	{-}	{-}
	C.allbicanATCC	{-}	{-}	+ 14mm
	Aspergillus.N	{-}	{-}	{-}

ATCC: American Type Collective Cultures

L'échelle de mesure de l'activité antibactérienne :

1. Fortement inhibitrice, lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 20mm.
2. Moyennement inhibitrice lorsque : 14mm<D_Z<20mm.
3. Légèrement inhibitrice lorsque : 9mm< D_Z<14mm.
4. Non inhibitrice lorsque : D_Z<9mm.

Donc, les pouvoirs inhibiteurs de nos extraits de *Romarin* sont considérés moyennement inhibiteurs.

V.5.2 Discussion :

Les résultats de diamètre des zones d'inhibition de nos extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction révèlent que :

- La souche bactérienne *Escherichia coli* ATCC possède un potentiel de résistance très élevé contre nos 3 extraits du romarin. Ces résultats semblable à celle trouver par *Athamena et al* [6].
- *Staphylococcus aureus ATCC* possède une sensibilité considérable vis-à-vis la fraction AcOEt et n-ButOH avec une zone d'inhibition varie entre 14-24mm, où le diamètre le plus élevé est obtenu pour un extrait issu de l'induction magnétique avec l'ajout de NaCl dans le milieu extractif.
- *Candida albican ATCC* révèle une sensibilité seulement conte l'extrait n-ButOH avec une zone d'inhibition entre 13-15mm pour un extrait obtenu par le procède de Macération et induction magnétique.
- Les résultats d'antibiogramme de la souche *E.faecalise* montre la résistance de cette souche à tous 3 extrait ou on observe l'absence de la zone d'inhibition autour les disques.
- Le test fait sur *Aspergillus Niger* montre une résistance de cette dernier sur nos extrait ou on observe une absence de la zone d'inhibition autour des disques, voir la (FigureV-10).

- l'EP qui était inactif sur toutes les souches sauf sur *Staphylococcus aureus* pour un extrait obtenu par induction magnétique avec NaCl, du fait que l'ether de pétrole extraire que les impuretés et les lipides, qui rendre cette phase pauvre en composés actives sur le plan antimicrobien.

V.5.3 Conclusion :

D'après les résultats de cette expérience, on constate que les extraits méthanoliques de *Rosmarinus Officinalis .L* possèdent une activité antibactérienne contre une seule souche utilisé dans ce test qui est *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition important de 24mm obtenus par la méthode d'induction magnétique avec NaCl. L'absence de cette activité contre *E.faecalis ; Aspergilus.N et E.coli.*

Par contre le test antifongique, montre une efficacité sur la souche fongique *Candida albicans* seulement avec la fraction ButOH pour tous nos extraits.

Nos résultats viennent confortés ceux de *Shan* [180] qui ont trouvé que l'extrait méthanolique du romarin est révélé actif contre le *Staphylococcus aureus* et inactif contre *Escherichia coli*.

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.

Cowan supposait que les flavonoïdes dépourvus des groupements hydroxyles libres ont plus d'activité antimicrobienne par rapport à ceux qui en sont pourvus, ce qui conduit à une augmentation de leur affinité chimique aux lipides membranaires, donc on peut supposer que la cible microbienne de ces flavonoïdes testés est la membrane cytoplasmique [181].

Conclusion générale

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Dans le présent travail, nous sommes intéressés à comparer l'effets antibactérien et antioxydant des différents extraits du *Rosmarinus Officinalis.l* issus de deux méthodes d'extraction conventionnelles (macération à froid ; chauffage classique à reflux) et une technique innovante (chauffage par induction magnétique).

L'extraction des flavonoïdes et les polyphénols à parti de *Romarin* par la technique d'induction magnétique a donné un rendement meilleur : de **25,1%** avec un taux des polyphénols de T_P **=169.610 (mg EAG/g)** et un taux des flavonoïdes de **T_f=69.957 (mg EQ/g)** ainsi que l'extraction assistée par induction avec l'ajout de la solution conductrice NaCl a donné un rendement encore plus de **26.21%** et T_P=**185.279(mg EAG/g)** et **T_f=82.734(mg EQ/g)** par rapport au chauffage classique avec un rendement de **15.78%** et T_P=**167.325(mg EAG/g)** et **T_f= 63.772(mg EQ/g).**et la macération à froid qui a donné un rendement de **6.37%** et T_P=**89.691(mg EAG/g) ; T_f=2,97 (mg EQ/g).**

- L'évaluation des effets biologiques de nos extrait méthanoliques de *Romarin* révéle que :
  - Activité antioxydante :
- Tous les extraits de romarin testés par la méthode de DPPH sont considérés comme de très bonnes agents anti-radicalaires par rapport l'acide ascorbique qui est pris comme référence.
- Les fractions issues par induction magnétique avec NaCl montre une activité anti-oxydante importante avec des IC_{50} les plus faibles : **0,00143** µg/ml pour la fraction d'acétate, 0,0350 µg/ml pour la fraction de butanol puis une valeur de **0,258** µg /ml pour la fraction d'éther de pétrol.
  - Activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) :
- L'extrait de *Romarin* obtenue par les différentes méthodes d'extraction est sensible vis-à-vis quelques souches testées : *Staphylococcus aureus ;Candida albican ; et* la résistant contre les souches :*Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Aspergilus Niger.*

A l'issu de ce travail, nous pouvons conclure que les flavonoïdes de *Romarin* sont des agents antioxydants et antimicrobiennes qui peuvent être une alternative aux agents chimiques.

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.

De nouvelles perspectives expérimentales peuvent être envisagées par une l'étude phytochimique de l'espèce " *Rosmarinus officinalis* L ", afin d'isoler d'autres métabolites secondaires contenus dans les extraits.

Des études plus poussée de la composition chimique par chromatographie qui devrait nous permettre d'identifier clairement les molécules impliquées dans l'effet antibactérien, et antioxydant, et d'avancer vers une meilleure connaissance du (des) mécanisme(s) moléculaire(s) intervenant dans les effets biologiques observés.

Références bibliographiques

[1] **Jean-Jacques M, A. Fleuriet,C.Jay-Allemand** (2005) « *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique* » chapitre 5 p.121

[2]**Diallo A-M**. (2005). « *Etude des plantes médicinales de niafunke (region Tombouctou)Phytochimie et pharmacologie de Maerua crassifolia Forsk. (Capparidacée) ».Thèse de Doctorat. Université de Bamako*. p 125

[3] **Yano, Y., Satomi, M ., Oikawa, H**.(2006) « *Antimicrobial effect of spices and herbs on Vibrio parahaemolyticus. » International J Food Microbiology*. **111**: 6-11.

[4] **Mata, A.T., Proenc, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Araujo,M.E.M.** (2007) «*Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. » Food Chem*. **103**: 778-786.

[5] **Atik bekkara, F., Bousmaha, L., Taleb 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.

[6] **Maurice N**. Ed. (1997). « *L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle »*. Lavoisier, Paris, p12-14.

[7] **hadj selem.j ,** (2009). «*Extraction, caractérisation, identification des activités biologiques des flavonoïdes de netraria retusa et synthèse des dérivés acyles de ces molécules par vois enzymatique »*. Thèse de doctorat,

[8] **j. brineton**, (1999). « *pharmacognosie phytpcimie-plante médicinal »*, 3^{éme} édition

[9] **Stefanovits-Banyai, E., Tulok, M.H., Hegedus, A., Renner, C., Szollosi Varga, I.** (2003) . « *Antioxidant effect of various rosemary (Rosmarinus officinalis L.) clones+. Acta Biologica» Szegediensis*. " **47**:111-113.

[10] **www.Wikipedia, (avril/2015)**

[11]**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.

[12] **Quezel, P., Santa, S.** (1963). « *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales»*. Tome II. C.N.R.S. (Ed). Paris, 565p.

[13] **http://fr.wikipedia.org/wiki/Romarin,(mai/2015)**.

[14] **zoubeidi.c**, (2004). «*etudes des antioxydant dans rosmarinus officinalis. Labiatea»*.mémoire de magister, université de Ouargla.

[15] **Hoefler.C,** (1994) «*Contribution à l'étude pharmacologique des extraits de Rosmarinus Officinalis L., et notamment des jeunes pousses : activités cholérétiques, anti-hépatotoxiques, anti-inflammatoires et diurétiques* ». Thèse de Doctorat, université de METZ, France.

[16] **O.P.U. NT.WS.benston**, «*fleur algérienne*».p-54

[17] http://zipcodezoo.com/Plants/r/Rosmarinus_officinalis_lavandulaceus/ [archive], (mai/2015)

[18] **Rush C**, (2010). «*Growers Catalog »* .

[19] **Muchuweti M., Kativu E., Mupure C. H., Chidewe C., Ndhlala A. R. et Benhura M. A.N**. (2007). «*Phenolic composition and antioxidant propreties of some species »*. *American journal of food technolgy*., **2** (5) : 414-420.

[20] **Pérez M. B.,Calderón N. L. et Croci C. A**. (2007). «*Radiation–induced enhancement of antioxidant activity in extracts of Rosmary »* (*Rosmarinus officinalis L). Food chemistry*., **104** :585-592

[21] **M. culvier et al**, (1996). «*sage and rosmary phenolique antioxydants,Jaocs»*.,vol 73.N° 5.

[22] **F. Piozzi, j**.(1994). «*phytochemestry »*,.vol 3.p-125.

[23] **j. brineton**,(1992). «*pharmacognosie, phytpcimie-plante medicinal*».2éme edition.

[24] **boukhalfa**,(1995). «*Apport des couplages CPG/MS et CPG/IR dans l'analyse des mélange naturel complexes exemple huiles essentielles de romarin»*, USTHB. Thèse de Doctorat.

[25] **RS farag et al**,(1989). «*Activity antioxidant of pics essential oils, flavor fragr, »* j 1998, 13, P-235

[26] **Albert.Y Leung, S. Foster** (1996). «*Encyclopedia of common natural ingredients used in foods, Drugs, and Cosmetics*. *»* 2éme edition, aweley-interscience publication, p 445.;

[27] **muzon .O** , (1999). «*Antioxidant activity of rosmary»*. 50 (50), p -355.

[28] **F. Piozzi, j**.(1996). «*phytochemestry»*,.vol 6.p-146.

[29] **Deans**, (1998). «*Chemical composition , antibacterial and antioxidant activity of laurel, sage , rosmary, oregano and coriander essential oil, Essent, oil res*»,10,p-618.

[30] **paris et al,**(1993). «*Effect of carnosolic acid product »*, vol 56, n°8, p-1426.

[31] **karin schwarz and waldemar ternes**, (1992). «*isolation and formation of other phenolic diterpens,z, lebenson unter frsch, »* vol 195,P-99

[32] **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 at 4 °C. » Meat Science*. **76**: 172-181.

[33] **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).

[34] **Weckesser, S., Engel, K., Simon-Haarhaus, B., Wittmer, A., Pelz, K., Schempp C.M.** «*Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. » Phytomedicine*. (in press).

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

[36] **Schelz Z., Molnar J, Hohmann J.** (2006) «*Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. » Fitoterapia*. **77**: 279-285.

[37] **Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., Roura, S.I.** (2005) « *Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. »LWT*. **38**: 565-570.
[38] Fernandez-Lopez, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Perez-Alvarez, J.A., Kuri, V. (2005) «*Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. » Meat Science*. **69**: 371-380.

[39] **Chaibi, A., Ababouch, L.H., Belasri, K., Boucetta, S., Busta, F.F.** (1997) «*Inhibition of germination and vegetative growth of Bacillus cereusT and Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *»Food Microbiology*. **14**:161-174.

[40] **Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O., Zilberg, D.** (2004) «*Use of Rosmarinus officinalis as a treatment against Streptococcus iniae in tilapia* (*Oreochromis sp.*). *» Aquaculture*. **238**: 97-105.

[41] **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.

[42] **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 antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods*. » *Food Chem*. **91**: 621-632.

[43] **Aruoma, O. I., Spencer, J. P. E., Rossi, R., Aeschbach, R., Khan, A., Mahmood, N., Munoz, A., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B.** (1996). « *An Evaluation of the Antioxidant and Antiviral Action of Extracts of Rosemary and Provencal Herbs. » Food and Chemical Toxicology*. **34**: 449-456.

[44] **Prajapati, V., Tripathi, A.K., Aggarwal, K.K., Khanuja, S.P.S.** (2005) «*Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against Anopheles stephensi, Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus. » Bioresource Technology*. **96**: 1749-1757.

[45] **Gillij, Y.G., Gleiser, R.M., Zygadlo, J.A.** (2007) «*Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. » Bioresource Technology*. (in press).

[46] **Papachristos, D.P., Stamopoulos, D.C**. (2002) «*Toxicity of vapours of three essential oils to the immature stages of Acanthoscelides obtectus (Say) (Coleoptera: Bruchidae). »J Stored Products Research*. **38**: 365-373.

[47] **Nassu, R.T., Guaraldo 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.

[48] **Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G., Fu, Y.J.** (2008) «*Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components. » Food* Chem. **108**: 1019-1022.

[49 **] Atsumi, T., Tonosaki, K.** (2007) «*Smelling lavender and rosemary increases free radical scavenging activity and decreases cortisol level in saliva. »Psychiatry Research*. **150**: 89-96.

[50] **Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, M.J**. (2003) «*Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. » Food Chem*. **83**: 255-262.

[51]**Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W**. (2006) «*The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and Color during storage of ground beef »*. Meat Science. **73**: 413-421.,

[52] **Nogala-Kalucka, M., Korczak, J., Dratwia, M .,Lampart-Szczapa, E., Siger, A., Buchowski,M.**(2005) «*Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary Extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests».Food Chem*. **93**: 227-235.

[53] **Sebranek, J.G., Sewalt, V.J.H., Robbins, K.L., Houser, T.A.** (2005) « *Comparison of a natural Rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage*. »Meat Science.**69**: 289-296.

[54] ; **Balentine, C.W., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Duong, D.Q., Pohlman, F.W.** (2006) «*The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. » Meat Science.* **73**: 413-421.

[55] **Singletary, K., MacDonald, C., Wallig, M.** (1996a) «*Inhibition by rosemary and carnosol of 7,12- dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. »Cancer Letters*. **104**: 43-48.

[56] **Slamenova, D., Kuboskova, K., Horvathova, E., Robichova, S.** (2002) «*Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and FPGsensitive sites in mammalian cells treated with H_2O_2 or visible light-excited Methylene Blue»*.*Cancer Letters*.**177**: 145-153.

[57] **Adsersen, A., Gauguin, B., Gudiksen, L., Jager, A K.** (2006) «*Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. » J Ethnopharmacol. **104**: 418-422.*

[58] **Orhan, I., Aslan, S., Kartal, M., Sener, B., Husnu Can Baser, K**. (2008) «*Inhibitory effect of Turkish Rosmarinus officinalis L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes» Food Chem.**108**: 663-668.*

[59] **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 alloxan-diabetic rabbits» J Ethnopharmacol. **116**: 64-73.

[60] **Sotelo-Felix, J.I., Martinez-Fong, D., Muriel, P., Santillan, R.L., Castillo, 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.

[61] **Amin, A., Hamza, A.A.** (2005) . «*Hepatoprotective effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats.» Life Sciences*.**77**: 266-278.

[62] **Soyal, D., Jindal, A., Singh, I., Goyal, P.K**. (2007) «*Modulation of radiation-induced biochemical alterations in mice by rosemary (Rosemarinus officinalis) extract.»Phytomedicine*.**14**: 701-705.

[63]**Gonzalez-Trujano, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M., Lopez-Munoz, F.J.** (2007) « *Evaluation of the antinociceptive effect of Rosmarinus officinalis L. using three different experimental models in rodents»*.*J Ethnopharmacol*. **111**: 476-482.

[64] **Correa Dias, P.C., Foglio, M.A., Possenti, A., De Carvalho, J.E**. (2000) «*Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of Rosmarinus officinalis L. » J Ethnopharmacol*. **69**: 57-62.

[65] **Haloui, M., Louedec, L., Michel, J.B, Lyoussi, B**. (2000) «*Experimental diuretic effects of Rosmarinus officinalis and Centaurium erythraea.* **"** *J Ethnopharmacology*. **71**: 465-472.

[66] **Peter H. Raven, F.Evert, E.Echhorn**., 1ére Ed (2003). « *biologievégétale*. -p 32.

[67]**Urquiaga I. N. E. S. et Leighton F. E. D. E.***(*2000) «*Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative* Stress». *Biol. Res*; 33: 55-64.

[68] **Athamena .S,**(2009), «*Etude quantitatives des flavonoïdes des grains de Cuminumcyminum et lesfeuilles de Rosmarinusofficinalis et l'évaluation de l'activité biologique*». Thèse de Magister ,Université de Batna.

[69] **Martin S.**, **Andriantsitohaina R**. (2002) . «*Mécanismes de la protection cardiaque et vasculairedes polyphénols au niveau de l'endothélium.Annales de cardiologie et d'angéiologie*». **51**:304-315.

[70] **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.

[71] **Ferradj. A**,(2011) « *activité antioxydant et anti-inflammatoire des extrait alcooliques et aqueux des feuilles et des baies Pistacialentiscus*».thèse de magister, Université Ferhat abbas-Setif

[72] **Harborne J.B., and Williams C.A**. (2000). «*Advances in flavonoid research since 1992 Phytochemistry.»* 55: 481-504.

[73] **Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Van Norren K. et Van Leeuwen P. A. M.**(2001). «Flavonoids : *a review of probable mechanisms of action and potential applications.» American journal of clinical nutrition.,***74**: 418-425.

[74] **Ghedira k.** (2005). «Les flavonoïdes ,*structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie.,»***3**(4) : 162-169.

[75]**Malešev D**. et **KuntićV**. (2007). « *Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. Journal of the Serbian chemical society.,»***72**(10) : 921-939.

[76] **Medić-Šarić M., Jasprica I., Smolćić-Bubalo A. etMonar A.**(2004). «*Optimisation of chromatography of flavonoids and phenolic acids, Croatica Chemica ActaCcacaa*.,» **77** (1-2) : 361-366.

[77] **Piquemal G**. (2008). «Les flavonoïdes (en ligne) :http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166 &Itemid=215'.

[78]**Karaali A., Boyacioălu D., Gönez G. etŎzçelik B**. (2004). «*Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food quality, nutrition and health–STREP or CA. European commision's the 6th framework programme for research.* Istanbul technical university.» Turkey,

[79] **W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L –Keen C.,.Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., WilliamsonG. Et Burrowes J**.(2007). «Flavonoids and heart health : *Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop,* may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition*.,» **137** (3 supp1) : 718 s-737 s.

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

[81] **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.

[82] **Dacosta, E**. (2003). «*Les phytonutriments bioactifs*». Yves Dacosta (Ed). Paris, 317p.

[83]**Bouakaz, I.,**(2006), «Etude phytochimique de la plante *GenistaMicrocephala*,» Mémoire de magister. Batna-Algérie.

[84] **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.

[85] **Remsy C**., **Manach C**., **Texier O**. and **Regerat F**. (1996), «*Intérêtnutritionnel des flavonoïdes. » Med. Nutr*.; 32: 17-27.

[86] **Bruneton J**. (1993). «Pharmacognosie : *phytochimie, plantes médicinales*. » Ed. Tec & Doc -Lavoisier, Paris,

[87] **DeRijke**. **E**., **Out P**., **Niessen**, **W. M.A**., **Ariese. F**., **Gooijer. C**., **Brinkman, U.A.T**.(2006) .«*Analytical separation and detection methods for flavonoids»*. J Chromatography A.1112: 31-63.

[88] **Bouaziz M., Chamkha M . and Sayadi S** (2004). « *comparative study on phenolique content and antioxidant acivity during maturation of the olive cultivar chemlali from Tunisia.j. agric:* food chem.,52:5476-5481; **Naczk M and Shahidi F .** (2004b) *extraction and analysis of phenolics in food.j: of chromatograp.a»* 1054:95-111

[89] **Diabate S, Konan K.E., Allou D, Ouolo A. Coulibaly O.A.3 and de franqueville H.** (2009) . «*Performance de deux techniques d'extraction des phénols racinaires pour l'évaluation du marquage de la tolérance à la fusariose des clones de palmier a huile (Elaeis guineensis Jacq.*)» *Sci. Nat.*, 6 (2) : 117-123.

[90] **Milane. H**., (2004). «*La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteursDe radicaux libres; études et applications thérapeutiques»*. Thèse de doctorat.Strasbourg,

[91]**Poirt .R** .(2007). « méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté A partir de matière végétal ».Thèse de Doctora ,

[92] **Leybros.J, Fremeaux P**. **(1990).** « *Extraction solide-liquide - Aspects théoriques. Techniques de l'Ingénieur»* (traité Génie des procédé), J 2780. pp 7-8

[93]**http://www.berkem.com/content/tout-sur-l-extraction-vegetale-45 (avril 2015)**

[94] **Aguilera, J.M**.,**Tzia, C**., **Liadakis, G**. (2003). « *Solid-Liquid Extraction*, in *Extraction optimization in food engineering,»* Marcel Dekker, New York, Etats-Unis d'Amérique.

[95] **Dibert, K.** (1989). « *contribution à l'étude de l'extraction solide-liquide de l'huile et de l'acide chlorogénique du café vert*. LYON, Claude Bernard LYON I.
[96] **Vigneron, M.** (1954). « *Fractionnements par solvants*. » Paris, VIGOT Frères.

[97]**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.*

[98] **Mellat Ikram**,(1997). « *Contribution à l'extraction et l'étude de l'huile essentielle d'Eucalyptus»* (PFE) Université de Médéa ..

[99] **M.D. Luque de Castro** and **L.E**. **Garcia-Ayuso**, (1998) . « *Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future,* Analytica ChimicaActa 369 , 1-10.

[100] **Singh, J.,Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo**, **G., Rakesh, D.D.(2008).** « *Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants,* in *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*, »Internationalcentre for science and high technology, Trieste, Italie.

[101] **Crouzet. J, (1996).** «*Arômes alimentaires.»* Techniques de d'ingénieur, F 4 100, Paris,

[102] **A. P. Carnat, A. Carnat, D. Fraisse, L. Ricoux and J. L. Lamaison,** (1998), «*The aromatic andpolyphenolic composition of lemon balm (Melissa officinalis L. subsp. Officinalis) tea, »* Pharmaceutica Acta Helvetiae, 72 (5) 301-305.

[103] **D. Grigonis, P.R. Venskutonis, B. Sivik,M. Sandahl** and **C.S. Eskilsson**, (2005). «*Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (Hierochloëodorata) »*, The Journal of Supercritical Fluids, 33 (3) (2005) 223-233.

[104] **Patist, A., Bates, D**. (2008). «*Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production»*. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 9,(2), 147-154.

[105]**Mason, T.J.,Paniwnyk, L**., **Lorimer, J.P**. (1996).*"The uses of ultrasound in food technology.»*Ultrasonics Sonochemistry. 3, (3), S253-S260.

[106] **Mason, T.J., Paniwnyk, L**,**Zeuthen, P., Bogh-Sorensen,L,**(2000). «*Ultrasound as a preservation technology*, in *Foodpreservation techniques* Woodhead Publishing.» Limited, Cambridge, Angleterre.

[107] **Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha,S**.(2007). «*Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. »*, 1-(1), 7-18.

[108] **C .Grigoras** (2012). «*Valorisation des fruits et des sous-produitd de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composes* **.**l'Université « Vasile Alecsandri » de Bacău

[109] **T. Clifford**, (1989). « Fundamentals of Supercritical Fluids»; Oxford University Press, New York.

[110] **L. Wang and C.L. Waller**,(2006). «*Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants,Trends in Food Science & Technology, »* 17- 300 – 312.

[111] **Hurren, D.** (1999). «*Supercritical fluid extraction with CO2. »* Filtration and Separation 36:25-27.

[112]**Reighard.T.S**, and **Olesik.S.V**, (2006). «*Bridging the Gap Between Supercritical Fluid Extraction and Liquid Extraction Techniques»*,Alternative Approaches of the Extraction of Solid and Liquid Environmental Matrices, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 26 (2&3), 1-39.)

[113]**Lagunez. R**, (2006). «*Etude l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction themomagnetique directe»*.Thése De Doctorat:

[114] **Gauthier A.**(2001). «*Industrie chimique, Un contexte favorable pour les applications de l'électricité»*. Info chimie magazine nº 426.

[115] **Salfati S**. (1996). «Le *vecteur énergétique de la chimie nouvelle»*. Informations chimie No.384.

[116] http://fastoche.voila.net/Induction_electromagnetique/Inductionelectromagnetique.htm, date de dernière consultation le 04/04/2015.

[117] http://fr.wikipedia.org/wiki/Loi_de_Lenz-Faraday,date de dernière consultation le 04/04/2015

[118] https://fr.wikipedia.org/wiki/Analyse_qualitative_(chimie) , 28/06/2015

[119] **Ikan R** , (1969). «*naturalproducts.A laboratory guide»*. Academic press; London.new York and san fransisco, (-17 19).

[120] **Delmeyda W**. (2001). «*Méthodes analytiques en chimie instrumentale .chromatographie sur couche mince. »*

[121] **Souad Akroum**, (2006) .« *Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de Rosmarinus officinalis et Vicia faba L.»*mémoire de magister . université de constantine.

[122] **Jacob.V**., (2010). «*la chromatographie liquide haute performance [HPLC] »* . p 1

[123] **Kechkar.M** .,(2008) . «*Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne.»* Thèse de magéster,UniversitéMentouri Constantine

[124] **nakanishi K,Goto .T,Ito.S,natori.S,nazoe S**.,(1975) . «*naturalproductschemestry»*vol 1 et 2 kodanshascientificltd : (12.18.218-239)

[125] **Bourre .JM., Edition Odile Jacob**; avril (2003). «*Diététique du cerveau : la nouvelle donne»*. P :125-215

[126] https://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9action_d%27oxydor%C3%A9duction 26/06/2015

[127] **Cotelle**; (2001) . «*role of flavenoidsydative in oxidative stress curr»*. Top.med chem.1.569-590 .

[128] **Rajendran.M., manisankar P., gandhidasan R., murugesan R.** (2004). « *Free radical scavenging efficiency of a few naturally occuring flavenoids : A comparative study.J.Agric. food chem.»*.,52, 7389-7394.

[129 **] Miller N.J., castelluccio C., Tijburg L., Rice-evans C**. (1996a). « *The antioxidant properties of the aflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators* ?*»* FEBS lett., 392,40-44

[130] **Miller N.J., Sampson J., candeias L.P., bramley P.M., Rice-evans C.A**. (1996b). «*antioxidant activities of carotenes and xanthopylls FEBS let»*., 384., 240-242.

[131]**Rastija V., medié-sarié M.** (2009). «*QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols . European journal of medicinal chemistry »*44, 400-408,

[132] **Montoro P., Braca A., pizza C., De Tomassi N.** (2005)«*Structure-antioxidant activity relationships of flavenoids isolated from different plant species*.*»* Food chem.., 92, 349-355.

[133] **Rice-evans C , A.,Miller N, J Paganga G**. (1996). « *Structure-antioxidant activity relationships of flavenoids and phenolic acids.»* Free Radical Boil. Med., 20, 933-956

[134] **Atsumi T., Iwakura I., kashiwagi Y., Fujisawa S., Ueha T** . (1999). «*Free Radical scavenging activity in the nonenzymatic fraction of human saliva: a simple DPPH assay showing the effect of physical exercise». Antioxid. Redox Sign*., 1, 537-546.

[135] **Molineux P**. (2004). «*The use of the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*.» *Songklanakarin J-Sci.Technol*, **26**:211-219

[136] **Dellatre J., beaudeux J-l., bonnefort- rousselot D**. (2005). « *Radicaux libres et stress oxydant. Aspect biologiques et pathologiques* ». tec & doc lavoisier : londres-paris-new york.

[137] **Moridani M .Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A., O'brien P.J.** (2003). « *Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide Radical scavengers*». Free Radic. Biol. Med 34, 243-253.

[138] **Bodini M.E., Copia G., Tapia R., Leighton F., Herrera L.** (1999). « *Iron complexes of quercetin in Aprotic medium. Redox chemistry and interaction with superxide anion radical. » Polyhedron,* 18, 2233-2239.

[139] **Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A**. (2006). « *Screening of the antioxidant potentials of six Salvia species from Turkey*». *Food Chem*., 95: 200-204.] .

[140] **Deba, F., Dang Xuan, T., Yasuda, M., Tawata, S.** (2008) «*Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from Bidens pilosa Linn. »* var. *Radiata*. *Food Control*. **19**: 346-352.

[141] **Fink N.B., Steck S.E ., Wolff M.S ., Britton J.A., Kabat G.C., Gaudet M.M ., Abrahamson P.E., Bell P., Schroeder J.C., Teitelbaum S.L., Neugut A.I., Gammon M.D**.(2007). « *Dietary flavenoid intake and breast cancer survival among women on long island. Cancer Epidemiol. » Biomarkers Prevent* 16, 2285-2292.

[142] **Favier A,** (2003). « *Interet conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique ». L'actualité chimique* , 108-115.

[143] **Plochamann K. korte G. koutsilieri E. richling E. riederer P. rethwilm A. schreier P. scheller C.**(2007). « *Structure-activity relationships of favonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells.arch. biochem.biophys»*. 460, 1-9,

[144] **DiCarlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F.** (1999). « *Flavenoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs»*. Lifs Sci, 65, 337-353.

[145] **Hadi M**. (2004*).* «*La quercétine et ses derives: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques.»*Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I. p 155

[146] **Marfak A**., (2003). « *Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools»*: Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. p 187

[147] **Bruneton J**. (1999). «*Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*, » 3ème édition, lavoisier, Paris, 1120 p.

[148 **] Kaufmann SHE.** (1997), « *Host response to intracellular pathogens.»* Ed. Springer ; R.G. Landes, New York; Austin, , p. 345.

[149] **Billing J. and Sherman P. W**. (1998), «*Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. » Q. Rev. Biol.*; 73: 3-49.

[150] **CE :commission européenne.,** Juin (2001), «*proposition de la commission en matière de lutte contre la Resistance microbienne ».*

[151] http://www.baccide.fr/les_microbes.html 2015 (17:23)

[152]**Nauciel C**. (2000), « *Bactériologie medicale, Masson »* (Ed).Paris, p 275.

[153] **Ulanowska K., Majchrzyk A., Moskot M., Jak__bkiewicz-Banecka J. and W_Âgrzyn G.** (2007), « *Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures.» Biologia*; 62: 132-135.

[154] **Chung K-t et Wei C-I**, (1998). «*Are tannins a double edged sword in biology and health? ».Trends in Food Science et Technology*, ***9****:168*-175.

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

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

[157] **Bousseboua.H.,**janvier (2002). «*Element de microbiologie générale, »* p 160-161. Ed de l'université mentouri constantine.

[158] cite web http://uqac-laboratoirelaseve.blogspot.com/p/services.html

[159] **Guiraud.JL.,(**1998). «*botanique 11éme Ed révisée.» Marron,* paris,(49-152 ,279.

[160] **Prescott.M ,harley .p, klein .A.,(**2003) , « *microbiologie 2éme Edition française , traduction de la 5éme Edition américaine»* par Clair Michelle Bacq calberg et Jean Dusart (univ de liége)p (139-142-144-118-119).

[161] **Yang J ., Guo J ., Yuan J**. (2008).«*In vitro antioxidant properties of rutin».LWT, **41***:1060-1066

[162] **Merghem** R .(1996). « *Les facteurs antinutritionnels (FAN) phénoliques de PisumSativum L. et de Vicia faba L. (Leguminosae) : Aspects structuraux génétiques et phénotiques*.*»*Thèse Doctorat. Univ. Claude Bernard -Lyon.

[163]**Fekhar.N et Arabi.M (2011) ;«** *Extraction de Métabolites Secondaires {flavonoïdes} de RosmarinusOfficinalis.L par le Procédé de Chauffage par Induction Magnétique » mémoire de magister ;université de Médéa.*

[164]**Wong, C.C., Li H.B., Cheng, K.W., Chen, F**. (2006) «*A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay.»Food Chem*. **97**: 705-711.

[165] **Vuorela, S**. (2005) «*Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics.»*

[166] **Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N.** (2006) «*Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenoliccompounds. »Food Chem*. **97**: 654-660.

[167] **Cosio M. S., Buratti S., Mannino S. et Benedetti S**. (2006)«*Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiataefamilly. »Food chemistry.,**97** (4) : 725-731.*

[168] **Ardestani, A., Yazdanparast, R**. (2007) «*Antioxidant and free radical scavenging potential of Achilleasantolina extracts*. *»Food Chem*. **104**: 21-29.

[169]**Matkowski A., Tasarz P.** and **Szypuła E. (2008).** «*Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. » Journal of Medicinal Plants Research*,**2** (11): 321-330.

[170] **Markowicz Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A.C.H. F., Cunha, I B.S., Carvalho, P. O. Eberlin, M. N.** (2007) «*Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (Ilex paraguariensis) and Green Tea (Cameliasinensis) Extracts.Molecules. »***12**: 423-432.

[171] **Lopes-Lutz, D., S. Alviano, D., S. Alviano, C., P. Kolodziejczyk, P.** (2008) «*Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils Phytochemistry.»***69** :1732-1738.

[172] **Joffin J.N et Leyral G.**(2001) «*Microbiologie Technique.1Dictionnaire des Techniques Collection Biological Technique. »* 3^{em}edition.CNDP.312p

[173] **Ciulei, I.** (1982) «*Methodology for analysis of vegetable drugs*. *»*67p.

[174] **Ebrahimzadeh M. A., Pourmmorad F. etHafezi S**. (2008). «*Antioxidant activities of Iranian corn silk. » Turkish journal of biology.*,**32 :** 43-49.

[175] **Özgüven M. et Tansi S. (**1998) «*Drug yield and essential oil of Thymus vulgaris L as ininfluenced by ecological and ontogenetical variation*. *»The Turkish journal of agriculture and forestry*.,**22 :** 537-542.

[176] **Ho, S.C., Tsai, T.H., Tsai, P.J., Lin, C.C.** (2008) «*Protective capacities of certain spices againstperoxynitrite-mediated biomolecular damage». Food and Chemical Toxicology*. **46**:920-928.

[177] **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).

[178] **Ribereau- Gayon**(**1968) .** «*Les composes phénoliques des végétaux. »Edition Dunod, Paris, p 254.*

[179] **Gulçin I (2006)**«*Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). »Toxicology., 217 : 213–220*.

[180] **Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H.** (2007) «The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts.*»International J Food Microbiology*. **117**: 112-119.

[181] **Cowan M. M**. (1999). «*Plant products as antimicrobial agents*. *»Clinical microbioloy reviews*.,**12**(4) : 564-570.