

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

École Nationale Polytechnique



LAVALEF

Département de Génie Chimique

Laboratoire de Valorisation et des Energies Fossiles

Mémoire de **Master en Génie Chimique**

**Evaluation des extraits récupérés lors de l'extraction par solvant
des feuilles du *Rosmarinus officinalis* L.**

Roumaissa KHAIR

Sous la direction de Mme R. DERRICHE Professeur

Et Mlle L. LOUCIF SEIAD Maître de conférences classe B

Présentée et soutenue publiquement le (19/06/2016)

Composition du Jury :

Président	M.E. H. BENYOUSSEF	Professeur	ENP
Promotrice	Mme R. DERRICHE	Professeur	ENP
Promotrice	Mlle L. LOUCIF SEIAD	Maître de conférences classe B	UMBB
Examineur	M. A. SELATNIA	Professeur	ENP
Examinatrice	Mme Y. TCHOULAK	Maître assistante classe A	ENP

ENP (2016)

Dédicaces

A celle qui m'a offert tout son amour et tout son espoir, à celle qui n'a jamais cessé de prier Allah pour que tous mes pas soient couronnés de succès et mes vœux soient exaucés..... Ma Mère.

A celui qui s'est incliné pour ma droiture, qui m'a permis d'en arriver là où j'en suis aujourd'hui, celui qui a été et restera mon modèle et mon soutien inépuisable me permettant de franchir tous les obstacles,

A celui qui a illuminé mon chemin..... Mon père.

A mon frère de cœur.

A mes sœurs et ma belle-sœur.

A mes deux chères nièces, Maria et Alaa.

A tous les enseignants,

Qui m'ont formé depuis le premier jour de ma scolarité

A tous mes professeurs de l'ENP,

Pour leur attester mon profond respect et ma loyale considération,

Spécialement M^{me} Derriche et M. Benyoussef.

A tous mes ami(e)s et collègues,

Et A tous ceux qui me sont très chers.

Je dédie ce modeste travail...

En signe de reconnaissance et de profonde affection,

Roumaïssa

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Dieu de m'avoir donné la volonté et le courage qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Je témoigne ma reconnaissance à mes promotrices Mme R. DERRICHE, Professeur au département de Génie Chimique à l'École Nationale Polytechnique d'Alger, Mlle L. LOUCIF SEIAD, Maître de conférences à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, pour le temps qu'elles m'ont consacré, la liberté qu'elles m'ont donnée dans ma recherche, l'aide compétente qu'elles m'ont apportée dans ma recherche, et surtout l'œil critique de Mme DERRICHE, qui m'a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections de mon mémoire. Je les remercie de m'avoir dirigée, conseillée et encouragée, ainsi pour leurs bonnes volontés, leurs patiences et leurs précieux conseils qu'elles m'ont prodigués tout au long de ce projet.

Je tiens à remercier M. E-H. BENYOUSSEF, Professeur au département de Génie Chimique à l'École Nationale Polytechnique d'Alger, de m'avoir fait honneur de sa présence en qualité de président de jury d'évaluation de mon travail.

J'exprime mes plus sincères remerciements aux membres jury, M. A. SELATNIA, Professeur à l'École Nationale Polytechnique d'Alger, Mme Y. TCHOULAK, Maître assistante classe A à l'École Nationale Polytechnique, qui ont accepté la lourde tâche et de lire l'intégralité de ce manuscrit et de participer au jury de ma soutenance. Aussi, je leur suis reconnaissante de m'avoir accordé de leurs temps.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance, à Mme F. MOHELLEBI, Chef du département Génie Chimique de l'ENP, M. T. AHMED ZAID Professeur à l'ENP, ainsi qu'à Mlle F. KIES Docteur à l'ENP.

Que tous les enseignants du département de Génie Chimique de l'École Nationale Polytechnique trouvent ici l'expression de mes sincères gratitude pour les efforts qu'ils n'ont cessé de prodiguer pour ma bonne formation.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance, à Mme R. Benoughlis, technicienne au Département de Génie Chimique de l'École Nationale Polytechnique.

Je ne saurais jamais assez remercier toute ma famille, en particulier papa, maman pour leurs sacrifices et l'amour qu'ils ont témoigné à mon égard, et leurs aides à la préparation de la matière végétale.

Ma gratitude va également à tous mes ami(e)s qui m'ont aidé par leur présence et leur amitié, et spécialement Saddam qui m'a toujours aidé, soutenu et encouragé, et à tout mes collègues qui ont fait mon quotidien et pour leur aide voire leur secours et la bonne ambiance qui règne dans le département et les laboratoires, particulièrement Rabia, Hamza et Kamel.

Quelques lignes ne pourront jamais exprimer la reconnaissance que nous éprouvons envers tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué, par leurs conseils et leurs encouragements.

Roumaissa

تقييم مستخلصات أوراق نبتة إكليل الجبل المتحصل عليها من عملية الاستخلاص بالمذيب

الملخص: الهدف من هذه الدراسة هو تقييم المستخلصات المتحصل عليها من عملية الاستخلاص بالمذيب خليط اثنانول - ماء (80-20) من نبتة إكليل الجبل و متابعة الحركة. نموذج تحويل المواد المستند على الانتشار، تتبع تطور مردودية البوليفينول الكلي الذي اختير بواسطة البرنامج EXDIF، و الذي سمح بمعرفة عامل الانتشار. التحليل الكمي للمركبات الفينولية المعزولة بعملية الاستخلاص سائل - سائل، أجريت بالاعتماد على طرق المعايرة فولين سيوكالتو وثلاثي كلوريد الألمنيوم لتحديد محتوى البوليفينول الكلي والفلاقونويد على التوالي. تقييم القدرة المضادة للأكسدة أجريت باستخدام طريقة محاصرة الجذور الحرة DPPH. التحليل النوعي للمركبات الفينولية لمختلف المستخلصات أجريت بواسطة التحليل على طبقات رقيقة.

الكلمات الدالة: نبتة إكليل الجبل، الاستخلاص، حركية الاستخلاص، البوليفينول الكلي، الفلاقونويد، النشاط المضاد للأكسدة، التحليل على طبقات رقيقة.

Evaluation of extracts recovered during solvent extraction of the leaves of *Rosmarinus officinalis* L.

Abstrat : The objective of this study is to evaluate the extracts recovered during solvent extraction of the leaves of *Rosmarinus officinalis* L. using the ethanol-water mixture (80-20) and follow the kinetics. A mass transfer model based on diffusion, simulates the evolution of the efficiency of total polyphenols was chosen with the help of the EXDIF software, which was very important to determine the diffusion coefficient. The quantitative analysis of phenolic compounds isolated by liquid-liquid extraction process was carried out by the Folin-Ciocalteu method, and aluminum trichloride, to the content of total polyphenols and flavonoids, respectively. The Evaluation of the antioxidant power was carried out using the trapping method of the free radical DPPH. Qualitative analysis of phenolic compounds of the various phases of the extracts was performed by thin layer chromatography.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L., extraction, kinetics of extraction, total polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, thin layer chromatography.

Evaluation des extraits récupérés lors de l'extraction par solvant des feuilles du *Rosmarinus officinalis* L.

Résumé : L'objectif de cette étude est d'évaluer les extraits récupérés lors de l'extraction par solvant des feuilles du *Rosmarinus officinalis* L. par le mélange éthanol-eau (80-20) et suivre la cinétique. Un modèle de transfert de matière, basé sur la diffusion, simule l'évolution du rendement des polyphénols totaux a été choisi à l'aide du logiciel EXDIF, et qui a permis de déterminer le coefficient de diffusion. L'analyse quantitative des composés phénoliques isolés par le procédé d'extraction liquide-liquide, a été effectuée par les méthodes de Folin-Ciocalteu, et de trichlorure d'aluminium, pour la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes, respectivement. L'évaluation du pouvoir antioxydant a été réalisée en utilisant la méthode de piégeage du radical libre DPPH. L'analyse qualitative des composés phénoliques de différentes phases d'extraits a été effectuée par chromatographie sur couche mince.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis* L., extraction, cinétique d'extraction, polyphénols totaux, flavonoïdes, activité antioxydantes, chromatographie sur couche mince (CCM).

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE.....	11
CHAPITRE I:ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	14
I.1 La matière végétale : <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	15
I.1.1 Présentation	15
I.1.2 Description botanique	15
I.1.3 Répartition géographique	16
I.1.4 Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques	17
I.2 Les extraits végétaux.....	18
I.2.1 Définition	18
I.2.2 Appellations	18
I.2.3 Composition chimiques.....	20
I.2.4 Utilisation.....	21
I.3 Etude cinétique de l'extraction solide-liquide.....	23
I.3.1 Principe et mécanisme de l'extraction solide-liquide	23
I.3.2 Cinétique de l'extraction solide-liquide.....	24
I.4 Méthodes d'analyses des extraits	26
I.4.1 Méthodes chromatographiques.....	26
I.4.1.1 Chromatographie sur couche mince CCM.....	26
I.4.1.2 Chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC.....	27
I.4.1.3 Chromatographie en phase gazeuse CPG.....	28
CHAPITRE II:MATERIELS ET METHODES	30
II.1 Etude cinétique de l'extraction solide liquide en mode batch	31
II.1.1 Matière végétale	31
II.1.2 Protocole expérimental.....	31
II.1.3 Logiciel EXDIF.....	32
II.2 Distillation sous vide.....	33
II.3 Extraction liquide-liquide.....	34
II.3.1 Choix des solvants.....	35
II.3.2 Protocole expérimental.....	35

II.3.3	Affrontement par éther de pétrole	36
II.3.4	Affrontement par acétate d'éthyle	36
II.3.5	Affrontement par MEC	37
II.4	Analyse chromatographique sur couche mince	39
II.4.1	Protocole expérimental.....	39
II.4.2	Systèmes utilisés pour les extraits du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	39
II.5	Produits chimiques utilisés	41
CHAPITRE III:RESULTATS ET DISCUSSION		42
III.1	Etude cinétique	43
III.1.1	Rendement d'extraction en polyphénols totaux	43
III.1.2	Modélisation mathématique de la cinétique d'extraction.....	43
III.1.3	Détermination du coefficient de diffusion.....	45
III.2	Quantification des composés phénoliques.....	46
III.2.1	Teneur en polyphénols totaux	46
III.2.2	Teneur en flavonoïdes	46
III.3	Evaluation du potentiel antioxydant des extraits du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	47
III.4	Analyse chromatographique de l'extrait du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. sur couche mince.....	49
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....		52
BIBLIOGRAPHIE.....		55
WEBOGRAPHIE.....		63

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Paramètres mis en œuvre dans les opérations d'extraction et appellations (Peyron, 1992).....	19
Tableau II-1 : Caractéristiques des solvants utilisés	35
Tableau II-2 : Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice des extraits du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ;	39
Tableau III-1 : L'évolution du rendement des polyphénols totaux en fonction du temps d'extraction.....	43
Tableau III-2 : Résultats du dosage des polyphénols totaux dans les extraits du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	46
Tableau III-3 : Résultats du dosage des flavonoïdes dans les extraits du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	47
Tableau III-4 : Pourcentage d'inhibition de radical DPPH par différentes antioxydants	48
Tableau III-5 : Rapports frontaux des extraits du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. séparés par CCM dans le système solvants (Acétate d'éthyle/Méthanol/H ₂ O: 100/13,5/10).....	50
Tableau III-6 : Rapports frontaux des composés phénoliques séparés par CCM des étalons utilisés dans le système solvants (Acétate d'éthyle/Méthanol/H ₂ O :100/13,5/10).	50

Liste des figures

Figure I-1 : Le romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	16
Figure I-2 : Schéma simplifié de la chromatographie sur couche mince (Site web [10]).....	27
Figure I-3 : Schéma principal de la chromatographie en phase liquide à haute performance (Penchev, 2010).....	28
Figure I-4 : Schéma simplifié de la chromatographie en phase gazeuse (Penchev, 2010).....	29
Figure II-1 : Dispositif expérimental de l'extraction solide-liquide.....	32
Figure II-2 : Photo de l'évaporateur rotatif.....	34
Figure II-3 : Dispositif de l'extraction liquide-liquide par éther de pétrole.....	36
Figure II-4 : Dispositif de l'extraction liquide-liquide par acétate d'éthyle.....	37
Figure II-5 : Dispositif de l'extraction liquide-liquide par MEC.....	37
Figure II-6 : Protocole d'extraction des composés phénoliques.....	38
Figure III-1 : L'allure de la cinétique d'extraction solide-liquide ($D_{moy} = 0,67\text{mm}$).....	44
Figure III-2 : L'allure de la cinétique d'extraction solide-liquide ($D_{max} = 1,12\text{mm}$).....	44
Figure III-3 : Pourcentage d'inhibition de radical DPPH par les antioxydants.....	49
Figure III-4 : Chromatographie sur couche mince de différentes phases des extraits du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. et les étalons utilisés dans le système solvants (Acétate d'éthyle/Méthanol/H ₂ O: 100/13,5/10) (Maleš et al., 1998).....	50

Liste des abréviations

AlCl₃ :	Trichlorure d'aluminium
BHA :	Hydroxyanisole butylé
BHT :	hydroxytoluène butylé
BTHQ :	Hydroquinone de butyle tertiaire
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
EAG :	Equivalent acide gallique
EQ :	Equivalent quercétine
HPLC :	high performance liquid chromatography
MEC :	Méthyléthylcétone
MV :	Matière végétale
R :	Rendement en polyphénols totaux
R_f :	Rapport frontale
TF :	Teneur en flavonoïdes
TPP :	Teneur en polyphénols totaux
UV :	Ultraviolet

INTRODUCTION GENERALE

Depuis la nuit des temps, les humains apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées, plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectifs de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des humains (Verdrager, 1978; Iserin, 2001).

Ces dernières années, les plantes aromatiques et médicinales ont suscité beaucoup d'intérêt dans différents domaines. En effet, les substances naturelles extraites de ces plantes ont permis de grandes avancées en raison de leur valeur ajoutée dans la préparation de nombreux produits, en particulier dans les domaines nutraceutique, pharmaceutique, la cosmétique et les parfums, et leur utilisation est encouragée, car les produits équivalents issus de synthèses chimiques ont mauvaise presse parmi le grand public. Il existe donc un besoin de production de substances bioactives isolées, concentrées et purifiées, pour une utilisation dans un large champ d'application.

Le romarin (*Rosmarinus Officinalis* L.) fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires. C'est une herbe aromatique de la famille des Labiées, appréciée pour ses propriétés aromatiques, anti-oxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, emménagogues et anti-tumorales, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle (Atik bekkara *et al.*, 2007). Cette plante peut produire des antioxydants similaires aux antioxydants synthétiques (BHA, BHT, BTHQ). Et l'activité antioxydante de ses extraits est, en effet, produite par des composés phénoliques qui sont essentiellement l'acide rosmarinique, camosole, rosmanole et acide carnosique (Ibanez, 1999).

En effet, Les antioxydants naturels connaissent un intérêt croissant pour des applications dans les industries agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Il existe donc un besoin de production d'extraits riches en antioxydants à partir de différentes sources végétales y compris à partir de co-produits d'industries agro-alimentaires.

La spécificité des problèmes d'isolation de composés bioactifs comme les antioxydants naturels est liée à la nécessité de conserver leurs fonctionnalités au cours de leur extraction et purification. Souvent des conditions d'extraction douces sont donc recommandées.

L'objectif de notre étude est, d'isoler les composés phénoliques des extraits du *Rosmarinus officinalis* L. par le procédé d'extraction liquide-liquide, afin d'évaluer leur

activités antioxydantes, et d'analyser la composition phénolique des extraits par chromatographie sur couche mince, ainsi que l'étude cinétique et la détermination du coefficient de diffusion de l'extraction solide-liquide en mode batch.

Le premier chapitre de ce manuscrit est une étude bibliographique relative à la matière végétale, objet de cette étude, aux extraits végétaux, en générale, et ceux du *Rosmarinus officinalis* L., en particulier. Ensuite le mécanisme et la cinétique de l'extraction solide-liquide. Enfin les méthodes d'analyses chromatographiques.

La préparation de la matière végétale, préalable à l'extraction de ces composés phénoliques, l'installation d'extraction solide-liquide et de l'extraction liquide-liquide, les démarches expérimentales adoptées, ainsi que les différentes méthodes d'analyses, les réactifs et les outils utilisés, font l'objet du second chapitre.

Le troisième et dernier chapitre, quant à lui, regroupe les résultats des essais d'extraction solide-liquide, réalisés dans le cadre de la cinétique d'extraction. Le modèle de diffusionnel élaboré pour l'étude cinétique, à l'aide du logiciel EXDIF, et le coefficient de diffusion du modèle, est également présenté. Ensuite, il s'agit de la quantification des composés phénoliques par les méthodes de dosage, suite à la purification des extraits du *Rosmarinus officinalis* L. par le procédé d'extraction liquide-liquide. Enfin, l'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, ainsi l'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits.

CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 La matière végétale : *Rosmarinus officinalis* L.

I.1.1 Présentation

Le romarin est l'une de ces plantes qui inspiraient le respect des anciennes civilisations de par leurs bienfaits qui leurs valaient d'être considérées sacrées. Ainsi, le poète latin lyrique et satirique Horace (65-8 av. J.-C.), le désigne comme étant une plante sacrée douée de vertus fantastiques.

Le romarin fait l'objet de très nombreuses mentions historiques et légendaire. Les anciens lui vouaient une grande vénération. Symbole des fêtes, nuptiales ou funéraires, il était abondamment utilisé pour confectionner des couronnes. Tout d'abord destinées à parer les jeunes épouses lors de la cérémonie étant synonyme d'amour, de fidélité et de bonheur éternel, ces feuilles ont par la suite orné les têtes des étudiants en Grèce, car le romarin était reconnu pour avoir une action stimulante sur les fonctions mentales et de récentes recherches scientifiques tendent d'ailleurs à accréditer ces effets bénéfiques sur l'intellect. Des rameaux ont été trouvés dans les tombes des premières dynasties égyptiennes, on mettait, aussi, des brins de romarin sous les oreillers pour chasser les mauvais esprits et les cauchemars et au temps des grandes épidémies, on en mettait un petit sac autour du cou pour s'en protéger. Mais l'histoire la plus célèbre à propos de cette plante est certainement celle de l'eau de la reine de Hongrie. Celle-ci âgée de 72 ans et paralysée, retrouva la santé et la jeunesse grâce à une cure d'alcoolat à base de romarin (Teuscher et *al.*, 2005).

Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) tiendrait son appellation du latin « ros marinus » (Scheler, 1862), signifiant « rosée de mer » en référence à l'habitat de la plante que l'on trouve, selon une légende, uniquement dans les régions où s'étend, au petit jour, la rosée venant de la mer ou encore du latin *Rosa marina* qui signifie « Rose de mer » (Escuder, 2007).

I.1.2 Description botanique

Le romarin est un arbrisseau de 50 cm à 1,5 voire 2 mètres de hauteur, ligneux, toujours vert, très aromatiques, très feuillé dès la base (Figure I-1). Les feuilles persistantes sont coriaces, sessiles, linières, entières, aux bords légèrement enroulés, beaucoup plus longues que larges, d'un vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. Leur odeur, très camphrée, évoque aussi l'encens (d'où il tient son nom « encensier » en provençal). La vie du romarin peut durer jusqu'à trente-trois ans.



Figure I-1 : Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

Ses fleurs sont souvent bleuâtres, plus rarement blanches, ponctuées à l'intérieur de taches violettes (pour le *R. officinalis albiflorus*), bilabiées, rapprochées en petites grappes axillaires et terminales disposées au sommet des rameaux. Leur calice, en cloche, est velu à dents bordées de blanc, bilabié, pulvérulent, nu à la gorge, à lèvre supérieure ovale et entière, l'inférieure à deux lobes lancéolés. La corolle bilabiée, à tube saillant, possède une lèvre supérieure à casque bifide et une lèvre inférieure à trois lobes dont le médian est très large et concave. Les deux étamines, à filets saillant, munies vers la base d'une petite dent, sont insérées à la gorge de la corolle. Les anthères sont linéaires et à une loge. Comme pour la plupart des lamiacées, le fruit est un tétrakène (de couleur brune) à quatre carpelles obovales et lisses, dissimulés au fond du calice (Ducurf, 2007).

La floraison du romarin est possible pendant toute l'année, lorsqu'il se trouve en situation optimale (Escuder, 2007).

I.1.3 Répartition géographique

Le romarin couvre un domaine géographique relativement vaste. Il pousse naturellement sur tous types de terrains avec une préférence pour les sols calcaires bien drainés, argileux ou argileux limoneux, situés dans les endroits ensoleillés chauds, secs et abrités du vent et ayant idéalement un pH compris entre 6,5 et 7. Le romarin n'apprécie pas une sécheresse trop importante et peut se contenter de l'humidité du littoral, d'ailleurs, on le rencontre entre le niveau de la mer et une altitude de 650 voire jusqu'à 1500 mètres, et bien que ce soit une plante aimant les climats chauds, il supporte les gelées si le sol ne conserve pas l'humidité.

Le romarin pousse spontanément sur la plupart des maquis, garrigues et rocailles et il accompagne le thym, la sauge, l'origan et le pin d'Alep (Gilly, 2005) dans les régions du bassin méditerranéen, où il est cultivé pour ces nombreuses vertus : comme herbe condimentaire et mellifère (le miel du romarin est très réputé) (Site web [1, 2]), ou pour en extraire son huile essentielle, notamment au voisinage du littoral de la Corse, Italie, Tunisie, Maroc, Egypte, Portugal et Algérie où il s'étend sur une superficie de plus de 100000 hectares (Bensebia et al., 2009).

Plante commune du bassin méditerranéen, son aire de répartition s'étend jusqu'au sud-ouest de l'Asie (Rombi et Robert, 2007) et sa production a été introduite en Inde par CIMAP (Central Institute of Medicinal an Aromatic Plants) vers la fin des années 80 notamment dans les Nilgrie et autour du Bangalore.

I.1.4 Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques

Cette plante est utilisée en médecine en raison de ses différentes propriétés :

- Anti spasmodiques, diurétiques, hépatoprotectrices, soulagement des désordres respiratoires (Lemonica et al., 1996 ; Souza et al., 2008) ;
- Antibactériennes, antimutagéniques, antioxydantes, chémopréventives (Ibañez et al., 2000 ; Pérez et al., 2007 ; Wang et al., 2008) ;
- Anti-inflammatoires, antimétastatiques (Cheung et Tai, 2007) ;
- Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires (Singletary et Nelshoppen, 1991) et la prolifération des tumeurs cutanées (Huang et al., 1994) ;
- D'autres études montrent que les composants du romarin inhibent les phases d'initiation et de promotion de cancérogénèse (Offord et al., 1995) ;
- Carnosol du romarin possède une activité antivirale contre le virus du SIDA (HIV) (Aruoma et al., 1996) alors que l'acide carnosique a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1 (Paris et al., 1993).

➤ Principes actifs :

Les principaux constituants du romarin responsables des différentes propriétés sont :

- Les acides phénoliques : acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique (Ibañez et al., 2003 ; Ramirez et al., 2004 ; Cavero et al., 2005 ; Herrero et al., 2005 ; Muchuweti et

al., 2007 ; Pérez et al., 2007), les flavonoïdes : genkwanine, cirsimarine (Ibañez et al., 2000; Cavero et al., 2005), ériocitrine, hespéridine, diosmine, lutéoline (Okamura et al., 1994 ; Del Baño et al., 2004), apigénine (Yang et al., 2008).

I.2 Les extraits végétaux

L'histoire des extraits a commencé bien longtemps. Déjà au XVIème siècle, le célèbre médecin Paracelse expérimentait en essayant d'extraire avec différents solvants ce qu'il appelait « principe actif » ou « force » des plantes.

Aujourd'hui, l'utilisation des plantes sèches et pulvérisées en capsule s'est popularisée notamment dans les grandes villes grâce à leurs stabilités. Cependant, étant donné que ces plantes n'ont pas subi d'extraction, leurs principes actifs restent séquestrés dans les cellules végétales.

C'est pourquoi le monde tourne actuellement vers les extraits qui renferment tout le potentiel curatif des plantes et permettent d'isoler les composés à haute valeur ajoutée.

I.2.1 Définition

Les extraits végétaux sont des préparations obtenues par l'action extractive d'un solvant approprié sur une plante ou une partie de plante, le plus souvent sèche et broyée. Ils contiennent les composés de la plante solubilisés par le solvant utilisé (Site web[1]).

I.2.2 Appellations

Pour une même plante, les conditions et les méthodes employées amènent à différents types d'extraits. Le tableau I-1 rassemble quelques appellations d'extraits en fonction des procédés et des propriétés caractéristiques mises en œuvre. On remarque qu'un même procédé d'extraction n'amène pas toujours à la même appellation.

Il existe également sur le marché de nombreuses appellations technico-commerciales en fonction des propriétés biologiques (extrait diurétique), de la composition (extrait titré en polyphénols), des solvants utilisés (extrait hydro-alcoolique), de l'origine botanique (extrait de Ginkgo) ou en combinaison (extrait hydro-alcoolique de ginkgo par exemple) (Site web[1]).

Tableau I-1 : Paramètres mis en œuvre dans les opérations d'extraction et appellations (Peyron, 1992).

Techniques	Propriétés	Produits fabriqués
Evaporation Déshydratation - Séchage Concentration de miscella (S/pres. atm. ou réduite) Concentration de jus de fruits	Volatilité	Résinoïdes, concrètes Oléorésines
Distillation Rectification (S/pres. atm. ou réduite) Distillation sèche		Isolats, déterpénés Huile empyreumatique
Co-distillation Avec eau (S/pres. atm. ou en surpression) Hydrodistillation et à vapeur humide Vapeur sèche Avec un autre fluide (S/pres. atm. ou réduite) Alcool Polyols		Huiles essentielles Eaux aromatisées Alcoolats Distillats moléculaires
Extraction liquide / solide Solvant conservé : Corps gras Alcool Solvant éliminé: Fluide liquide Fluide liquéfié (ou supercritique)	Solubilité	Pommade Infusion – Teinture } Concrète, résinoïde
Extraction liquide / liquide Discontinue Continue		Essences déterpénées
Cristallisation après concentration partielle et refroidissement		Menthol – Anéthol
Broyage – tamisage	Formes et taille des particules	Huiles essentielles d'agrumes
Expression – Filtration		
Glaçage – Filtration		
Séparation au moyen de membranes		
Séparation chromatographique Décoloration	Adsorption	Huiles essentielles Absolues

I.2.2.1 Les oléorésines : concrètes et résinoïdes

Les extraits obtenus à l'aide de solvants organiques volatils sont plus complets que les huiles essentielles car ils contiennent non seulement les composés volatils mais aussi d'autres constituants qui n'étaient pas entraînés par la vapeur d'eau (triglycérides, cires, colorants de nature lipidique et composés sapides). Les oléorésines regroupent deux types de produits selon l'état de la matière végétale utilisée :

- **Les concrètes** : extraits à odeur caractéristique, obtenus à partir d'une matière première fraîche d'origine végétale, par extraction au moyen d'un solvant non aqueux, suivie de l'élimination de ce solvant par des procédés physiques.
- **Les résinoïdes** : extraits à odeur caractéristique, obtenus à partir d'une matière première sèche d'origine naturelle, par extraction à l'aide d'un solvant non aqueux.

Le terme "oléorésine" désigne indifféremment l'un ou l'autre de ces deux extraits (Bousbia, 2011).

I.2.3 Composition chimiques

L'extraction consiste à solubiliser des molécules d'intérêts dans des solvants. Les composés organiques ainsi extraits appartiennent à différentes familles de molécules comme les glucides (oligosides, monosides et dioses), les peptides, les acides aminés. D'autres composés appartiennent au métabolisme secondaire de la plante, les plus cités sont :

Les alcaloïdes : Le mot alcaloïde vient de l'arabe "Al kali " : potasse et du grec eidos : forme. Un alcaloïde est une substance organique d'origine végétale, azotée, généralement hétérocyclique, et à caractère alcalin. La morphine était le premier alcaloïde isolé dans l'opium (vers 1805). Puis la strychnine (1818) et la caféine (1819) (Site web [2,3]). 12 000 alcaloïdes de structures différentes ont été identifiés, leurs activités biologiques sont diverses (toxiques ou thérapeutiques) : anticancéreux (le taxol), poison (strychnine), stimulant (caféine)... (Dehak, 2013).

Les polyphénols : Les polyphénols constituent une famille de molécules largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles et sont généralement à masse moléculaire élevée. Ces composés présentent des propriétés redox qui leur permettent d'agir soit comme agents réducteurs (donneur d'hydrogène), piègeur de l'oxygène ou des chélateurs de métaux (N'Goussan et al., 2011). Ils sont aussi impliqués dans les réactions de défense de la plante, dans la communication interbiotique interspécifique (plante/insectes, plante/microorganismes, plante/plante) ou intraspécifiques (communication entre les plantes, signaux d'alertes...) ou encore dans la protection de la plante contre les effets délétères des UV (Bertrand et al., 2013).

Les terpènes et dérivés : Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, leur formule de base est $(C_5H_8)_n$. Ils peuvent être acycliques, polycycliques, et aussi aromatique. Leurs propriétés chimiques, physiques et biologiques dépendent de la taille de leurs structures et les groupes fonctionnels présents (Site web [4]).

La famille des terpènes comprend des hormones (acide abscissique), des pigments caroténoïdes (carotène et xanthophylle, des stéroïdes, des dérivés de stéroïdes. le latex qui est à la base du caoutchouc naturel), ainsi qu'une grande partie des huiles essentielles. De nombreux composés terpéniques possèdent à la fois une valeur commerciale considérable et des rôles physiologiques importants (Hopkins, 2003).

I.2.4 Utilisation

Les extraits de plantes ont l'avantage de concentrer toute la richesse d'une plante en un volume réduit. De plus, les substances présentes peuvent être titrées et dosées ce qui apporte aux consommateurs une certitude des principes actifs présents (Site web[5]). De ce fait, le marché des extraits végétaux a vu une croissance continue notamment ces dernières années, il est constitué de trois segments principaux :

La pharmacologie (50% du marché des extraits végétaux) : Le marché mondial des médicaments à base de plantes a été estimé à 33 milliards \$ US en 2013, enregistrant un taux de croissance annuel de 11 %. Plus de 2618 substances chimiques pures sont extraites à partir des plantes et ont été testées pour leurs propriétés pharmacologiques [6,7] Site web.

Les médicaments phytothérapeutiques sont préparés de plus en plus à partir d'extraits végétaux, ces derniers peuvent être utilisés tel qu'ils sont pour la préparation des médicaments liquides (teintures, gouttes ou sirop), ou traités par évaporation pour éliminer le solvant, après quoi l'extrait sec sera transformé en comprimés ou en capsules ou incorporé dans des pommades ou des suppositoires.

L'agro-alimentaire (30% du marché des extraits végétaux) :

Les extraits sont très utilisés dans l'industrie alimentaire pour l'élaboration de couleurs et d'arômes naturels mais aussi pour leurs richesses en polyphénols (Anthocyanes, tanins, acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques, vanilline, thymol, tocophérols, tocotriénols, quinones...) dont les propriétés intéressent vivement ce secteur.

Ils sont responsables du brunissement, impliqués dans les sensations d'astringence et dans l'amertume, mais également molécules aromatiques et colorées, les polyphénols exercent un effet majeur sur les caractères organoleptiques des produits.

Par leurs propriétés antiseptiques, antibactériennes, antifongiques..., les polyphénols peuvent avoir une incidence sur la conservation des produits alimentaires.

Les propriétés antioxydantes ou anti-inflammatoires des polyphénols participeraient à

lapréservation de la qualité des produits alimentaires (Sarni-Manchado, Cheynier, 2006).

La cosmétologie (20% du marché des extraits végétaux) :

Les extraits de plantes jouent un rôle fondamental en cosmétologie naturelle, du fait de leur richesse en agents actifs, les extraits sont employés dans presque toute la gamme de produits de soin pour le corps (des crèmes aux shampoings). Voici quelques exemples d'extraits de plantes utilisés fréquemment en cosmétologie :

- L'aloé vera pour hydrater et adoucir la peau ;
- Le bleuet pour ses puissantes vertus anti-inflammatoire et décongestionnantes ;
- La rose pour resserrer les pores ;
- La sauge pour ses vertus antiseptiques et astringentes (Site web[8, 9]) ;

Les extraits végétaux sont aussi utilisés dans d'autres secteurs comme la nutrition (compléments alimentaires), la chimie verte, les biomatériaux, inhibiteurs de corrosion.

Les extraits : Inhibiteurs de corrosion.

De nombreuses études se sont intéressées dernièrement au caractère anticorrosif des extraits de plantes. Les résultats obtenus ont montré clairement que les extraits peuvent être une source d'inhibiteurs, écologiques (biodégradables et non toxiques) qui garantissent une efficacité élevée. Ils protègent les métaux dans l'environnement acide et peuvent remplacer les produits chimiques toxiques utilisés actuellement (Benmessaoud Left et *al.*, 2013 ; Selles, 2012).

L'extrait du Rosmarinus officinalis L.

Il était établi que l'extrait de romarin inhibe la formation de substances polaires, les polymères et la décomposition des triglycérides polyinsaturés, en particulier dans le cas de l'huile de colza, et améliore la qualité des frites (Reblova et *al.*, 1999). Pour extraire les différents composés antioxydants du romarin, plusieurs solvants ont été utilisés comme l'hexane, benzène, éthyle l'éther, le chloroforme, le dichlorure d'éthylène, le dioxanne et de méthanol (Chang et *al.*, 1977). Ces extraits ont été testés à 0,02% lors de l'oxydation de lard à 60 ° C dans l'obscurité. Il a été établi que c'est l'extrait méthanolique qui a eu l'activité la plus forte et il a été purifié d'avantage pour étudier l'effet antioxydant d'une fraction dans la friture des croustilles dans l'huile de tournesol à 60 ° C à l'obscurité pendant 60 jours.

D'autres extraits de romarin ont montré une activité antioxydante dans le saindoux, le colza et le tournesol à 100°C à 0,005% (Marinova et *al.*, 1991 et Pokomy et *al.*, 1998). L'extrait éthanolique du romarin a été utilisé pour enrichir le beurre et stabiliser les huiles comestibles à la

friture en particulier en présence d'acide ascorbique et de palmitate. Dans l'huile de soja, il était utilisé avec le BHT (Barbut et *al.*, 1985).

En effet, l'extrait de romarin, à des concentrations de l'ordre de 2500 ppm, a montré une plus grande capacité antioxydante que le BHT et BHA, dans les saucisses de porc fraîches et congelées. Dans l'huile de soja, l'activité antioxydante de l'extrait de romarin à 4% de composés phénoliques diterpènes en comparaison avec de l'a-tocophérol est meilleur d'après des tests de Rancimat. Dans certaines études, l'extrait de romarin a aussi montré une activité antioxydante plus élevée que le carnosol et l'acide rosmarinique. (Edwin et *al.*, 1996 ; Basga et *al.*, 1997)

I.3 Etude cinétique de l'extraction solide-liquide

I.3.1 Principe et mécanisme de l'extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est une opération physique de transfert de matière entre une phase solide, qui contient la substance à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction (Leybros et Frémeaux 1990). Suite au contact entre le solvant et le solide hétérogène, les substances ayant une affinité pour le solvant sont solubilisées et passent de la phase solide dans la phase liquide. Au cours de l'extraction, leurs teneurs (fractions) dans la phase solide diminuent et leurs concentrations dans la phase liquide augmentent. Le transfert de matière se réalise par diffusion moléculaire et par convection. L'extraction est un processus non stationnaire qui s'arrête au moment où s'établit un équilibre entre les deux phases. Cependant si le solvant est continuellement renouvelé, la diffusion se poursuit jusqu'à épuisement de la phase solide (Dibert 1989).

Généralement, l'extraction n'est pas très sélective. En plus des molécules d'intérêt, d'autres substances sont également co-extraites à partir de la phase solide vers le solvant. La solution obtenue est appelée extrait. La matière solide obtenue après évaporation du solvant est aussi appelée extrait ou extrait sec. La source solide épuisée après l'extraction contient très peu ou pas de soluté. Elle est appelée raffinat ou résidu.

Dans certains cas, la matière végétale est prétraitée avant l'extraction pour améliorer le contact entre les phases. Le séchage, le broyage et le morcellement sont souvent utilisés comme opérations de prétraitement. Parfois, des prétraitements enzymatiques sont également utilisés pour faciliter la dissolution des molécules d'intérêt dans le solvant. La rupture des parois cellulaires sous l'action de pectinases et cellulases favorise l'extraction des polyphénols (Bonilla et *al.*, 1999).

Après l'extraction, l'extrait obtenu est séparé du solide épuisé par sédimentation, filtration ou centrifugation. Finalement, un extrait sec peut être obtenu par un séchage approprié (atomisation

ou lyophilisation, par exemple). Les extraits secs peuvent être conservés longtemps et utilisés comme des ingrédients dans des industries alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique.

Au cours de l'extraction plusieurs étapes successives peuvent être distinguées :

- Pénétration du solvant dans la matrice solide ;
- Dissolution du soluté dans le solvant ;
- Diffusion du soluté vers l'extérieur de la matrice solide ;
- Transfert du soluté vers le cœur de la phase liquide (par diffusion ou convection).

La durée de l'extraction solide-liquide est déterminée par l'étape la plus lente qui contrôle la vitesse de l'opération. Le plus souvent il s'agit de l'étape de diffusion interne dans la matrice végétale.

I.3.2 Cinétique de l'extraction solide-liquide

La vitesse d'extraction peut être exprimée en termes de masse de solutés dissous par unité de temps ou par la variation de la fraction de ces molécules dans le solide par unité de temps.

La vitesse de transfert, mesurée par le flux de matière transférée par unité de temps et par unité de surface d'interface, dépend directement des écarts à l'équilibre, appelés potentiels de transfert globaux ou potentiels d'échange. Le potentiel de transfert propre à chaque phase s'exprime par la différence positive entre la concentration moyenne du soluté dans la phase considérée et sa concentration à l'interface.

A toute expression définissant le potentiel d'échange correspond un coefficient de transfert, qui dépend des propriétés physico-chimiques du système et des conditions hydrodynamiques (Poirot 2007).

La description mathématique de l'extraction solide-liquide est très complexe à cause de nombreuses difficultés :

- La forme irrégulière de la source solide ;
- La polydispersion de la phase solide (particules de tailles différentes) ;
- La structure spécifique de chaque source solide ;
- L'anisotropie du solide dans certains cas

Le changement de la structure au cours de l'extraction (gonflement considérable de la matrice végétale suite à la pénétration du solvant) : les variations de la teneur de la substance d'intérêt dans la source solide : l'extraction simultanée compétitive d'autres substances du solide : l'influence du traitement préliminaire mécanique ou thermique. Il est donc pratiquement impossible à prédire exactement la vitesse d'extraction dans un système non étudié. Deux solutions

sont envisageables :

- Proposer une modélisation mathématique avec plusieurs hypothèses simplificatrices (souvent un tel modèle ne correspond pas vraiment à la situation réelle d'extraction) :
- Réaliser une approche expérimentale pour chaque couple solide-liquide afin de trouver les meilleures conditions opératoires en variant les paramètres opératoires du procédé (l'expression de la concentration en fonction du temps de contact entre les deux phases permet de décrire la cinétique d'extraction).

Plusieurs modèles ont été développés pour simuler les situations réelles et représenter au mieux les caractéristiques du transfert de matière entre les deux phases. Etant donné que généralement c'est la diffusion interne qui est l'étape limitant la vitesse d'extraction, c'est le modèle diffusionnel qui est souvent utilisé (Cacace et Mazza, 2003 ; Cissé *et al.*, 2012).

I.3.2.1 Modèle diffusionnel

Le concept de vitesse de diffusion à l'intérieur d'une matrice solide est difficile à étudier. Dans les situations pratiques, les conditions ne sont pas stationnaires, avec une concentration du soluté qui varie avec le temps et la position dans la particule. Cette diffusion est généralement décrite par la seconde loi de Fick :

$$\frac{\partial X}{\partial t} = - D_x \nabla^2 X \text{(I-1)}$$

où X est la teneur en soluté du solide et D_x le coefficient de diffusion moléculaire du soluté.

Cette équation est valide pour la diffusion d'un soluté dans un corps poreux rigide à condition que la structure soit considérée connue quasi homogène et macroscopiquement isotrope. Dans le cas de la matière végétale, le coefficient de diffusion moléculaire utilisé habituellement est un coefficient de diffusion apparent qui tient compte de la porosité et de la tortuosité de la matrice solide (Wongkittipong *et al.*, 2004).

Une résolution analytique est accessible lorsque le transfert est supposé monodirectionnel et le coefficient de diffusion constant. Par contre, dans le cas où celui-ci est variable, des résolutions numériques sont nécessaires.

Ce modèle physique est bien adapté pour décrire l'extraction à partir de particules de forme et taille uniformes. Cependant il est difficile d'utiliser un tel modèle dans les cas de taille et forme

irrégulières des particules et lorsque la structure, la forme et la taille des particules changent considérablement au cours de l'extraction pour différentes raisons : gonflement de la matrice végétale sous l'action du solvant, agglomération des particules ou réduction de leur taille et modification de leur structure provoquées par l'application d'ultrasons ou par des collisions dans le cas d'agitation importante etc. Dans des cas aussi complexes, il s'avère plus pratique d'utiliser des équations empiriques.

I.4 Méthodes d'analyses des extraits

I.4.1 Méthodes chromatographiques

La chromatographie est une méthode séparative qui permet l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange. Le principe est basé sur les différences d'affinité des composés du mélange avec la phase stationnaire et la phase mobile. Le chromatogramme traduit la variation du soluté dans l'éluant en fonction du temps. Il existe différents types de chromatographie suivant la méthode de séparation utilisée : d'adsorption, de partage, d'échange d'ions, d'exclusion. On distingue trois grandes familles de chromatographie: chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie en phase gazeuse (CPG) et chromatographie liquide haute performance (HPLC).

I.4.1.1 Chromatographie sur couche mince CCM

La Chromatographie sur Couche mince ou CCM est une méthode analytique couramment utilisée dans les laboratoires de phytochimie pour la séparation et l'identification rapides des constituants d'un extrait donné. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile est un solvant ou un mélange des solvants ; qui progresse le long d'une phase stationnaire qui peut être soit une couche mince de gel de silice ; l'alumine ; ou cellulose. Celle-ci doit être uniformément étalée sur un support en aluminium, sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou sur une plaque de verre (Benguerba, 2008). Le schéma (Figure I-2) présente le principe général de la méthode.

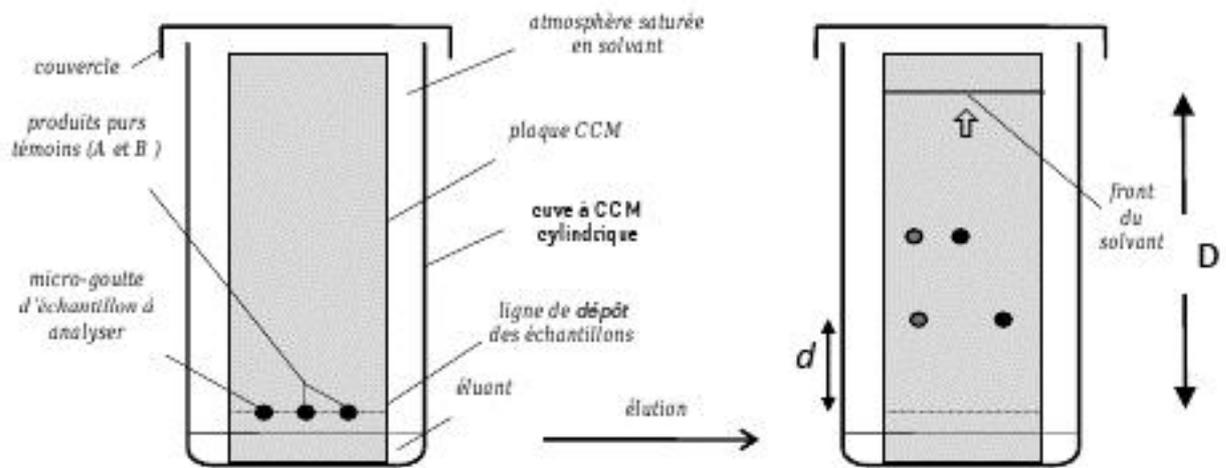


Figure I-2 : Schéma simplifié de la chromatographie sur couche mince (Site web [10])

I.4.1.2 Chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC

La chromatographie en phase liquide à haute performance (l'abréviation anglaise HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* est plus fréquemment utilisé) est une technique de séparation analytique basée sur l'hydrophobicité des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide (appelé aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases – stationnaire et mobile. A la sortie de la colonne les composés sont détectés à l'aide d'un détecteur (pouvant être UV, IR etc.). Le schéma (Figure I-3) présente le principe général de la méthode (Penchev, 2010).

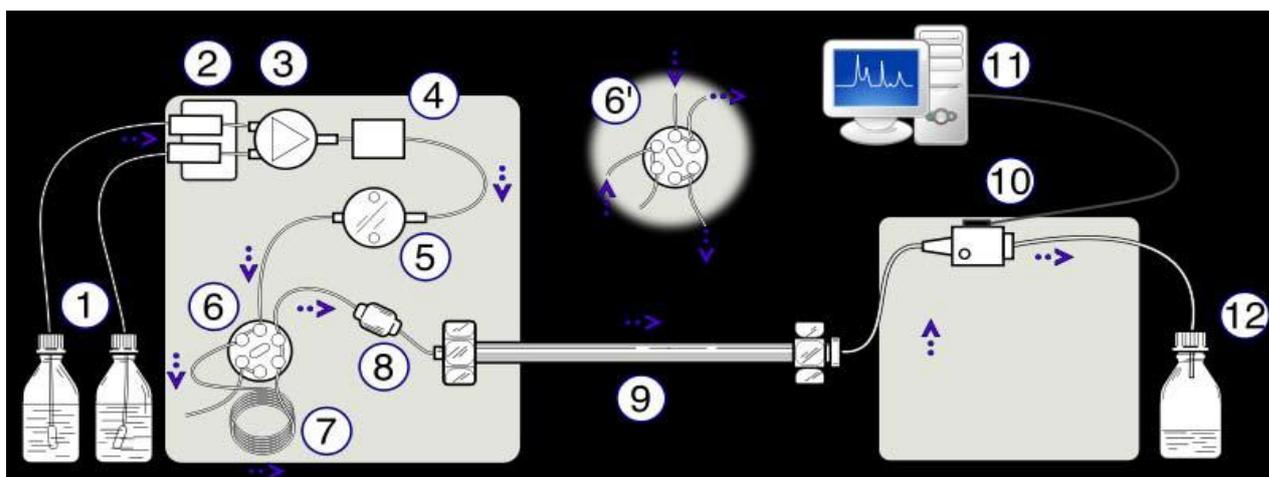


Figure I-3 : Schéma principal de la chromatographie en phase liquide à haute performance
(Penchev, 2010)

1- Réservoirs des solvants, 2 - Dégazeur, 3 - Valve de gradient d'éluant, 4 - Doseur de phase mobile (ou éluant), 5 - Pompe à haute pression, 6 - Vanne d'injection en position "inject", 6' - Vanne d'injection en position "load", 7 - Boucle d'injection de l'échantillon, 8 - Précolonne (éventuelle), 9 - Colonne analytique, 10 - Détecteur, 11 - Acquisition du signal, 12 - Décharge déchets

I.4.1.3 Chromatographie en phase gazeuse CPG

Comme l'HPLC, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique permettant de séparer les composés d'un mélange. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La différence principale par rapport à l'HPLC vient du fait que dans la CPG la phase mobile est gazeuse. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée de la colonne. La phase stationnaire dans la colonne peut être solide (notre cas) ou liquide. Le mélange est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange se séparent et sortent de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps dépendant de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules. A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un élément essentiel - le détecteur. Il évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physiques du mélange gazeux et envoie un signal électronique vers un enregistreur.

Parmi les détecteurs les plus utilisés on cite, le détecteur à ionisation de flamme (FID). Le principe de fonctionnement de ce type de détecteur est le suivant : une tension de l'ordre de la centaine de volts est maintenue entre la buse de la flamme hydrogène-air et une électrode entourant la flamme. Lorsque les molécules traversent la flamme, elles deviennent ionisées, ce qui provoque

un courant électrique entre les électrodes qui est ensuite amplifié (Penchev, 2010). Le schéma principal de la CPG est présenté sur la figure I-4.

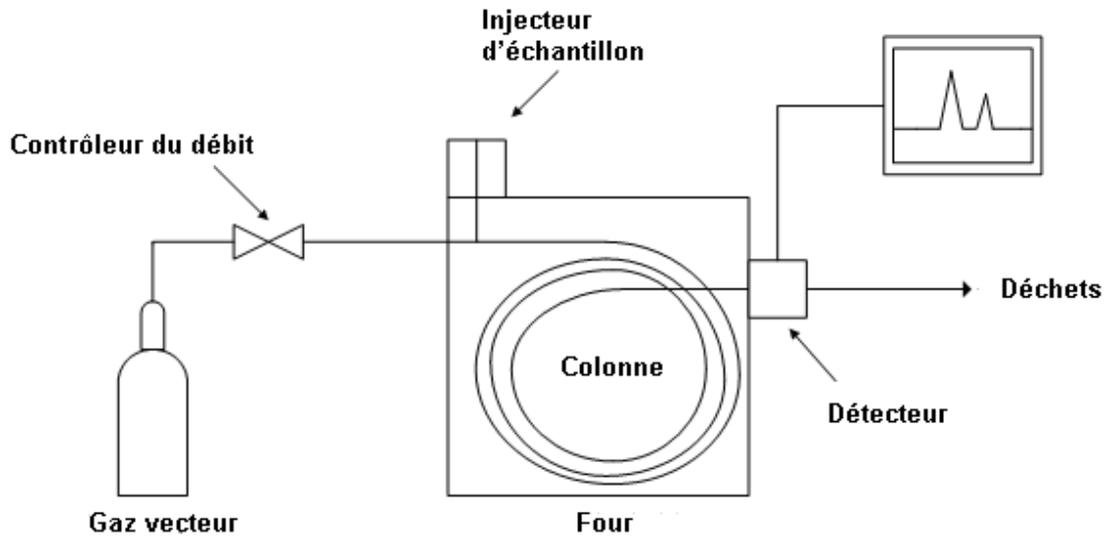


Figure I-4 : Schéma simplifié de la chromatographie en phase gazeuse (Penchev, 2010)

CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES

II.1 Etude cinétique de l'extraction solide liquide en mode batch

Le transfert de soluté dans le liquide exige un certain temps pour être complet. Il est donc essentiel de déterminer la vitesse globale du phénomène. Au sein d'un substrat végétal, nous avons vu au Chapitre I que cette notion de vitesse de transfert de matière était difficile d'accès car il est impossible de définir exactement les cheminements suivis par la matière. Cependant, il est possible d'obtenir une approximation de la grandeur de la vitesse de transfert grâce à la seconde loi de Fick qui décrit la cinétique d'extraction au moyen d'un coefficient de diffusion effectif. Cette grandeur permettra d'évaluer le temps de contact nécessaire à l'extraction.

Dans cette étude, on ne cherche pas à optimiser la cinétique, on vise juste à identifier le coefficient de diffusion.

II.1.1 Matière végétale

Rosmarinus Officinalis L. a été récoltée, au moment de leur floraison le mois de mars, dans la région d'Alger, du nord d'Algérie. La plante a été identifiée au Département Botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'Alger, comme étant le *Rosmarinus Officinalis* L.

La partie récoltée est la partie arienne « fleurs, feuilles, tiges ». Les feuilles ont été isolées des tiges, ces dernières ont été séchées à l'ombre pendant deux semaines, à température ambiante, afin de préserver au maximum l'intégrité de leurs molécules. La plante a subi un traitement préliminaire, le broyage et le tamisage.

Le broyage à été réalisé dans un broyeur électrique à hélice, puis avec le mortier et pilon en petites particules de diamètres inférieurs à 1,12 mm, l'échantillon obtenu était conservée dans un grand flacon en verre et bien fermés (sans humidité).

Le taux d'humidité de la matière végétale utilisée a été déterminé dans notre travail d'ingéniorat (Khair, 2016).

II.1.2 Protocole expérimental

Les cinétiques d'extraction est, dans la plupart des cas, très dépendante des conditions opératoires. Les essais sont réalisés en utilisant le dispositif expérimental schématisé sur la figure II-1. Une masse de 10 g de matière végétale broyée de diamètre moyen de 1,12 mm est introduite dans le ballon pour un volume de 200 mL de solvant (éthanol-eau, 80%). Les essais sont réalisés à une température de 30 °C sur une durée de 3 h, qui semble de prime abord suffisante.

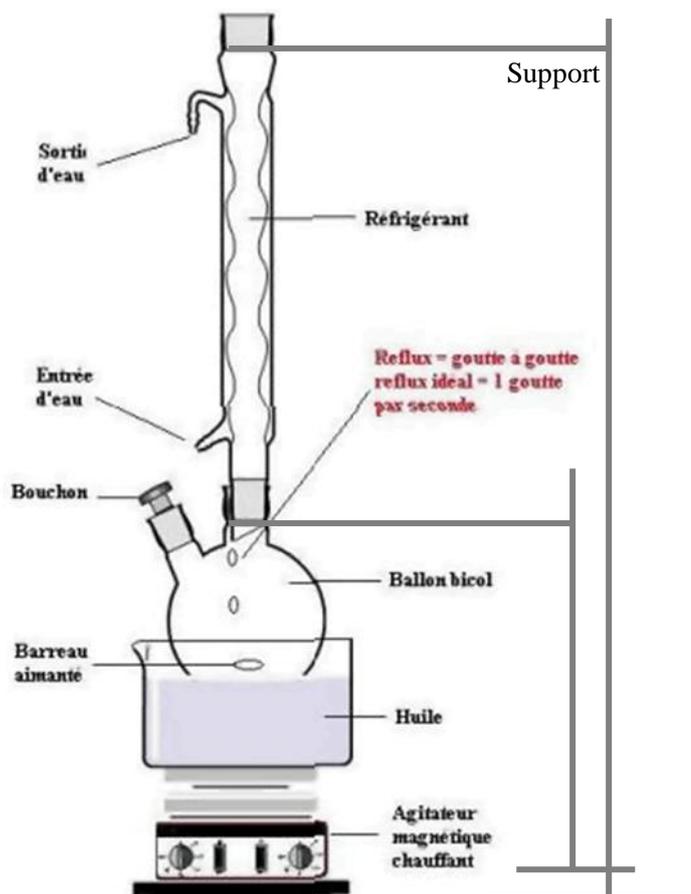


Figure II-1 : Dispositif expérimental de l'extraction solide-liquide

Des prélèvements liquides sont effectués régulièrement dans le temps à l'aide d'une pipette de 1 mL. Le ratio S/L est légèrement supérieur à celui utilisé habituellement afin de s'assurer que l'ensemble des volumes prélevés pour l'analyse soit petit par rapport à celui engagé initialement. Ainsi, on peut faire l'hypothèse que le volume total prélevé n'influe pas sur le procédé. L'analyse des polyphénols totaux des extraits a été réalisée par la méthode de dosage de Folin-Ciocalteu décrite dans notre travail d'ingénieur (Khair, 2016).

II.1.3 Logiciel EXDIF

EXDIF, est un logiciel de traitement des phénomènes de transfert de matière dans un solide, il permet de déterminer l'ordre de grandeur du coefficient de diffusion des composés phénoliques dans la matière végétale (Aoucher, 2010).

La résolution analytique, à l'aide du logiciel EXDIF a été utilisée dans notre étude. Afin de décrire le transfert, les hypothèses émises sont les suivantes :

- Les particules sont sous une forme sphérique ;

- La diffusion est unidirectionnelle. Elle a lieu dans la direction radiale de la particule ;
- Chaque particule est un milieu pseudo-homogène ;
- Le coefficient de diffusion est constant au cours de l'expérience. La concentration du soluté dans le solide ne dépend que de la position et du temps ;
- Le solvant dans le dispositif de l'extraction solide-liquide en mode batch est suffisamment agité pour que la résistance au transfert à l'interface solide/liquide soit négligeable. La concentration du soluté en phase liquide ne dépend que du temps ;
- Un équilibre à l'interface solide-liquide ;
- Il n'y a pas de réaction chimique.

II.2 Distillation sous vide

Afin d'éliminer le solvant et récupérer l'extrait, nous avons procédé à la distillation sous vide en utilisant un évaporateur rotatif. Dans cet appareil on réalise une évaporation sous vide en utilisant une pompe à vide. 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.



Figure II-2 : Photo de l'évaporateur rotatif

L'abaissement de la pression permet d'évaporer le solvant à température réduite, évitant ainsi la dégradation thermique éventuelle des composés. C'est une méthode d'évaporation simple, utile, douce et rapide.

II.3 Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est une technique de séparation largement utilisée en laboratoire et à l'échelle industrielle, dans des domaines très variés incluant l'industrie agroalimentaire.

Elle permet la séparation de deux ou plusieurs constituants d'un mélange en mettant à profit leurs différentes affinités pour deux solvants non ou très peu miscibles. En pratique, on met en contact intime une solution d'alimentation contenant les constituants à séparer (solutés) avec un solvant non-miscible qui extrait préférentiellement un ou plusieurs des solutés. À l'équilibre, le rapport des concentrations du soluté dans l'extrait et le raffinat, appelé rapport (ou coefficient) de distribution, donne une mesure de l'affinité relative du soluté pour chacune des deux phases. Les

deux liquides (extrait et raffinat) sont ensuite séparés, généralement sous l'effet de la gravité, auquel on peut dans certains cas ajouter l'effet d'autres forces: force centrifuge, champ électrique, etc (Mafart et Béliard 1992 ; Ronze *et al.*, 2008).

Concernant les applications de l'extraction liquide-liquide pour la séparation des substances bioactives à partir des extraits natifs, elle est utilisée pour la purification des extraits d'alcaloïdes (Lazarova et Dimitrov, 2009), mais rarement appliquée pour séparer des composés phénoliques des autres substances des extraits végétaux (Krishnan et Maru, 2006). Cependant elle est souvent utilisée comme un moyen d'analyser les composés phénoliques dans des extraits végétaux (Nave *et al.*, 2007 ; Van Beek *et al.*, 2009). Dans ces cas sont utilisés les meilleurs solvants qui sont habituellement plus ou moins toxiques.

II.3.1 Choix des solvants

Dans notre étude nous avons choisi de travailler avec trois solvants organiques de différentes polarités : Méthyléthylcétone (MEC), l'acétate d'éthyle et l'éther de pétrole. Leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau II-1 :

Tableau II-1 : Caractéristiques des solvants utilisés

	MEC	Acétate d'éthyle	Ether de pétrole
Masse moléculaires, g/mol	72,11	88,10	-
Point d'ébullition, °C à 1 atm	79,59	77,11	35 -60
Tension de vapeur, Kpa à 25°C	13,3	12,6	Supérieur à 300 (à 50°C)
Classement selon la polarité	Polaire	Moyennement polaire	Apolaire

II.3.2 Protocole expérimental

On introduit la solution à extraire et le solvant d'extraction dans l'ampoule à l'aide d'un entonnoir à liquide. Après avoir bouché l'ampoule, on la tient retournée, à deux mains, et on agite énergiquement. Or si on laisse le contenu de l'ampoule sans agitation, l'interface entre les deux phases est très faible et la diffusion du soluté d'une phase vers l'autre est lente. L'agitation énergique de l'ampoule permet d'augmenter cette interface et d'atteindre l'équilibre plus rapidement.

L'ampoule est dégazée entre chaque agitation pour éviter une surpression dans l'ampoule. En effet, l'équilibre de mélange peut être exothermique et entraîner une légère augmentation de température dans l'ampoule. Cela provoque une vaporisation du solvant le plus volatil qui met l'ampoule sous pression. Dans le cas de l'éther de pétrole, très volatil, l'ampoule est dégazée avant même la première agitation.

Après un temps de décantation, on récupère les deux phases séparément : la phase aqueuse est en générale plus dense que les phases organiques, à l'exception des solvants chlorés. On recommence l'extraction de la phase aqueuse avec un autre solvant. Une fois l'extraction terminée, les phases organiques sont évaporées dans l'évaporateur rotatif, pour éliminer le solvant. Ces phases organiques, ainsi la phase aqueuse résiduelle sont analysées par les méthodes de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) décrites dans notre travail d'ingénieur (Khair, 2016), afin de déterminer la teneur en polyphénols totaux et la teneur en flavonoïdes respectivement.

II.3.3 Affrontement par éther de pétrole

L'affrontement par l'éther de pétrole permet d'extraire les impuretés (composés non phénoliques) en éliminant les pigments chlorophylliens et caroténoïdes (Macheix et *al.*, 2005). Surtout les lipides qui risquent de compliquer les épreuves chromatographiques. La phase organique est supérieure et la phase aqueuse est inférieure.



Figure II-3 : Dispositif de l'extraction liquide-liquide par éther de pétrole

II.3.4 Affrontement par acétate d'éthyle

Entraine les aglycones, le mono-O-glycosides et partiellement les di-O-glycosides présents

dans les extraits. La phase d'acétate est supérieure et l'aqueuse est inférieure (Benkiki, 2006)



Figure II-4 : Dispositif de l'extraction liquide-liquide par acétate d'éthyle

II.3.5 Affrontement par MEC

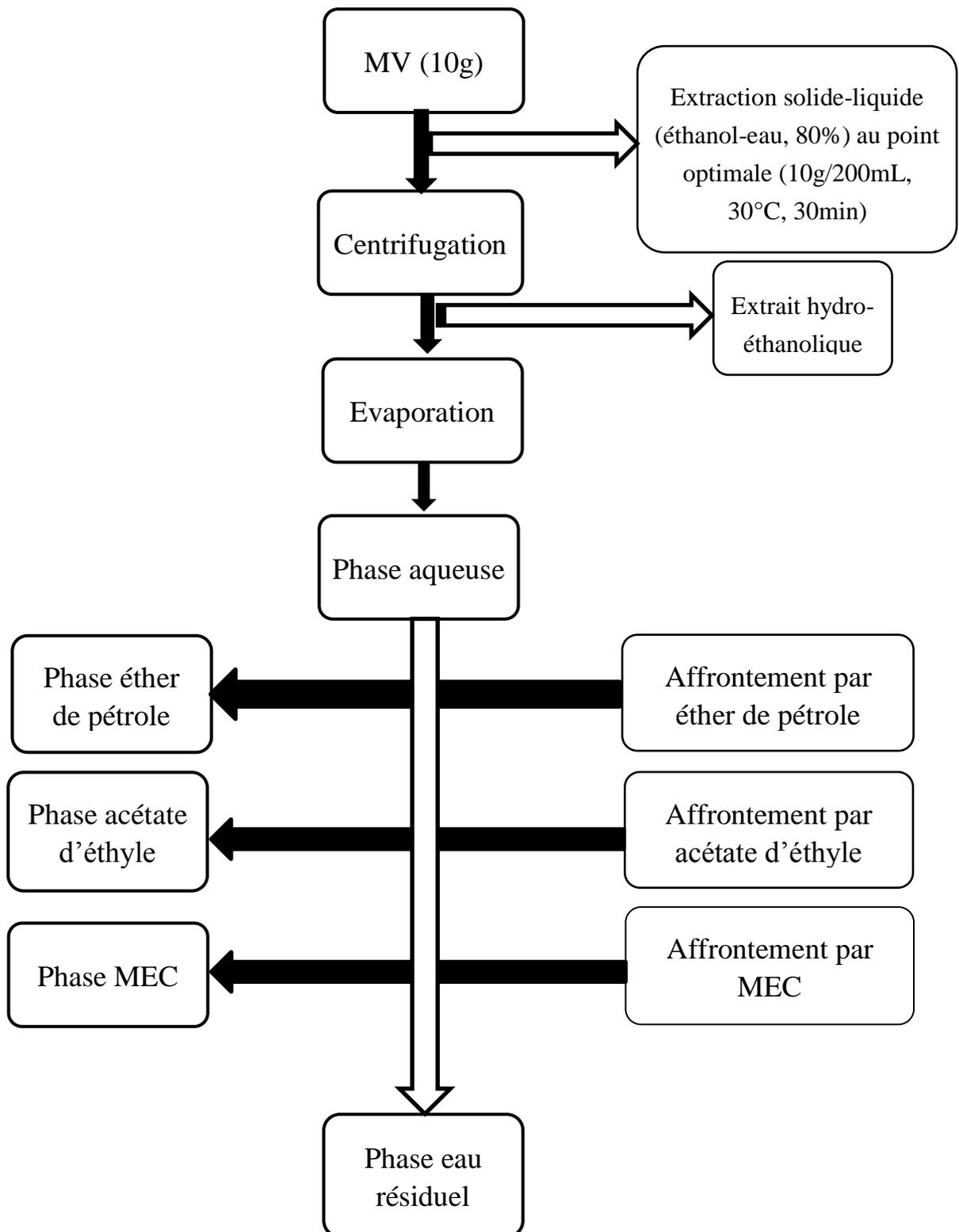
Cet affrontement permet d'extraire les composés organiques et les di-O-glycosides. La phase organique est supérieure et la phase aqueuse est inférieure.



Figure II-5 : Dispositif de l'extraction liquide-liquide par MEC

Les phases éther de pétrole ne contenant pas des composés phénoliques sont rejetées. Les autres phases, sont évaporées dans l'évaporateur rotatif et enfin on récupère les deux extraits. Le protocole d'extraction est résumé dans l'organigramme suivant :

Figure II-6 : Protocole d'extraction des composés phénoliques



II.4 Analyse chromatographique sur couche mince

II.4.1 Protocole expérimental

Le principe de la chromatographie repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire (Benguerba, 2008).

- **Préparation de la phase mobile :** La phase mobile est constituée par un mélange des solvants organiques. Pour cela, différents systèmes des solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations.
- **La phase stationnaire :** La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques d'aluminium constituées de gel de silice. L'échantillon est déposé sur les plaques de gel de silice à l'aide d'une pipette Pasteur ; on laisse sécher puis on place les plaques dans des cuves contenant l'un des systèmes de solvants donnés dans le tableau II-1 :

II.4.2 Systèmes utilisés pour les extraits du *Rosmarinus officinalis* L.

Dans la présente étude, les échantillons sont analysés en utilisant des plaques commerciales prêtes à être utilisées, de gel de silice. Trois systèmes de solvants ont été essayés :

Tableau II-2 : Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice des extraits du *Rosmarinus officinalis* L. ;

CCM sur gel de silice		
	Systèmes solvants	Proportions (V/V)
Systèmes essayés	Acétate d'éthyle/Méthanol/H ₂ O	(100/13,5/10)
	H ₂ O /Méthanol/MEC	(7/3/1)
	Acétone/ H ₂ O	(26/23)
Système choisis	Acétate d'éthyle/Méthanol/H ₂ O (Maleš et al., 1998)	(100/13,5/10)

Les systèmes solvants choisis sont utilisés comme éluant des phases stationnaires leurs vapeurs doivent saturer l'atmosphère de la cuve ceci impose d'utiliser une cuve bien fermée.

- **Le dépôt :** le dépôt se fait avec des pipettes Pasteur en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire et linéairement. Chaque phase doit être déposée en solution diluée dans le méthanol, on peut effectuer plusieurs dépôts successifs du même analyte au même endroit, cette pratique permet de concentrer l'analyte (Sine, 2003)

- **Développement des plaques** : chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque (Sine, 2003).
- **Révélation** : si les constituants sont colorés, ils seront directement visible sur la plaque, sinon la révélation peut se faire soit aux UV ou bien par des méthodes chimiques.
- **Révélation par des méthodes chimiques** : ces méthodes consistent à mettre en contact de la plaque un réactif plus ou moins spécifique qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler (Latifou, 2005).
- **Identification des composés phénoliques** : le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son R_f (le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile c'est à dire le front du solvant) qui est compris entre 0 et 1.

Dans notre cas la révélation des constituants a été directement visible sur la plaque pour certains constituants colorés.

Calcul du rapport frontal (R_f)

$$R_f = D_c/D_s \text{ (II-4)}$$

Où

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

D_s : distance parcourue par le front du solvant.

II.5 Produits chimiques utilisés

- Réactif de Folin-Ciocalteu (2M, Sigma-Aldrich)
- Carbonate de sodium (99,5%, BDH Chemicals Ltd)
- Chlorure d'Aluminium (99,0%, Merck)
- Méthanol (99,7%, Sigma-Algrich)
- Ethanol (96%, Riedel-de Haën)
- Xylène (99,9%, Cheminova PRS)
- 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH (Sigma-Aldrich)
- Acide gallique (97%, Sigma-Aldrich)
- Quercétine (95%, Sigma)
- Ether de pétrole (rectapur, Prolabo)
- Acétate d'éthyle (99,9%, Sigma-Aldrich)
- Méthyléthylcétone, MEC (99,0%, Merck)
- Acétone (99,0%, Fluka)
- Catéchine (98%, Sigma-Aldrich)

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Etude cinétique

III.1.1 Rendement d'extraction en polyphénols totaux

Nous avons suivi la cinétique de l'extraction au point (10 g/200mL, 30°C), le tableau III-1 donne l'évolution du rendement des polyphénols totaux en fonction du temps d'extraction.

Tableau III-1 : L'évolution du rendement des polyphénols totaux en fonction du temps d'extraction

t (min)	0	5	10	15	20	40	60	100	160	180
R (%)	0	4,47	4,72	6,5	7,38	9,70	12,80	12,91	13,03	13,03

Le rendement en polyphénols totaux est estimé par le rapport de masse de polyphénols totaux et de la matière végétale sèche. Il est exprimé en pourcentage (%).

$$R = \frac{M_p}{M_s} \times 100 \quad (\text{III-1})$$

Tel que :

M_p : la masse des polyphénols totaux, en g EAG ;

M_s : la masse de la matière sèche, en g, est calculée par la formule suivante :

$$M_s = M \times (1 - H) \quad (\text{III-2})$$

Tel que :

M : la masse de la matière végétale utilisée, en g ;

H : le taux d'humidité, en %.

III.1.2 Modélisation mathématique de la cinétique d'extraction

La teneur en polyphénol totaux a été suivie dans chaque essai réalisé. La cinétique d'extraction solide-liquide en mode batch a été modélisée par le logiciel EXDIF (Figure III-1 et III-2). La cinétique a été relevée pour une masse de matière végétale broyée, le rendement augmente très rapidement. En 60 min, il a déjà atteint sa valeur maximale. Après 60 min le rendement tend à se stabiliser vers la valeur du potentiel plante.

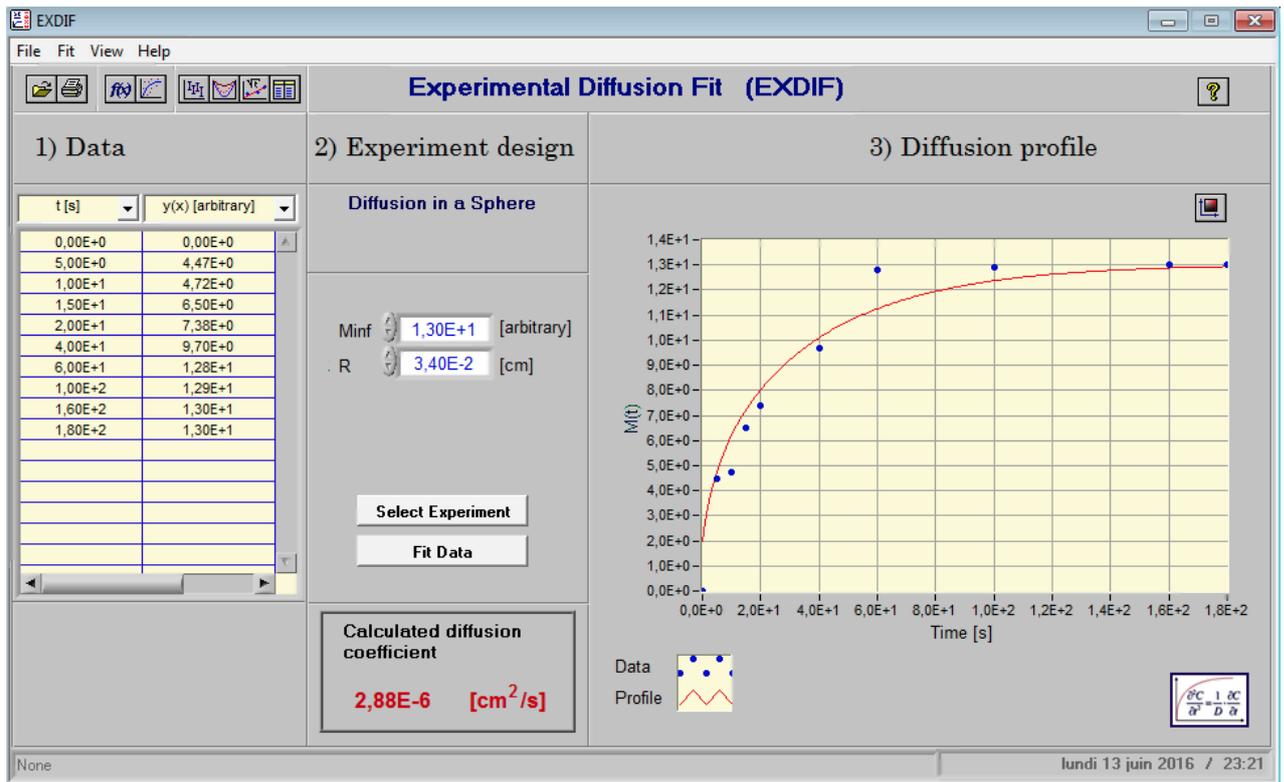


Figure III-1 : L'allure de la cinétique d'extraction solide-liquide ($D_{moy} = 0,67\text{mm}$)

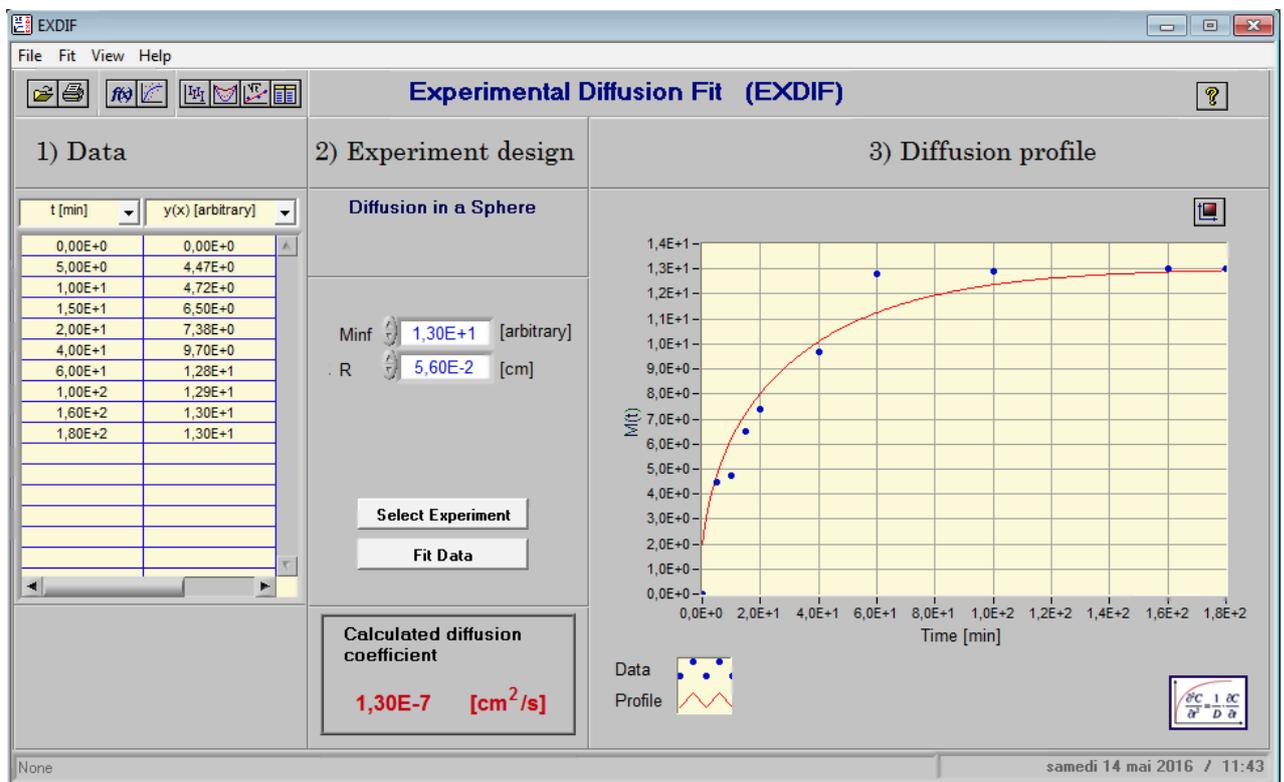


Figure III-2 : L'allure de la cinétique d'extraction solide-liquide ($D_{max} = 1,12\text{ mm}$)

L'équation mathématique pour le calcul du coefficient de diffusion est la suivante :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} e^{-\frac{D\pi^2 n^2 t}{R^2}} \quad (\text{III-3})$$

M_t : le rendement d'extraction à l'instant t ;

M : le rendement d'extraction maximal

D : le coefficient de diffusion.

R : le rayon de la sphère

t : le temps d'extraction

A ce stade d'étude, on pourrait dire que l'extraction à des faibles valeurs de la température et du temps (30 - 40 min) concernerait préférentiellement les composés phénoliques libres, présents sous forme non conjugués avec les sucres contenus dans la plante.

La valeur maximale du rendement en polyphénols totaux est atteinte au bout de 60 min. Ceci peut s'expliquer par le contact prolongé entre l'eau et la plante qui provoquerait l'hydrolyse des liaisons O-glycosique que forment les acides phénoliques (aglycone) avec des sucres (glycones), (Bravo, 1198 ; Gomez, 2014), libérant l'ose et les composés phénoliques hydrosolubles qui seront à leur tour extrait.

III.1.3 Détermination du coefficient de diffusion

Afin de déterminer le coefficient de diffusion de l'extraction, la forme sphérique a été choisie pour décrire les particules. Le rayon utilisé pour les calculs est choisi selon deux hypothèses ;

Première hypothèse : le diamètre maximal, l'ouverture du tamis 1,12 mm ;

Deuxième hypothèse : comme les fines particules sont inexistantes, la taille des particules est supérieure à l'ouverture du tamis 0,224 mm, nous avons calculé la valeur moyenne arithmétique des deux ouvertures de tamis, ce qui nous a donné un diamètre moyen de 0,67 mm.

Les figures III-1 et III-2, représentent les simulations dans le cas de la cinétique obtenue à partir des feuilles broyées du *Rosmarinus officinalis* L. Le modèle diffusionnel mené à l'aide du logiciel EXDIF, a montré qu'il décrit correctement le phénomène d'extraction. La valeur identifiée pour le coefficient de diffusion effectif est comprise entre **1,30 10⁻¹¹ m²s⁻¹** et **2,88 10⁻¹⁰ m²s⁻¹** ce qui nous paraît d'un ordre de grandeur tout à fait acceptable. On constate que la variation de la taille des particules influe sur le coefficient de diffusion.

III.2 Quantification des composés phénoliques

III.2.1 Teneur en polyphénols totaux

Afin de déterminer la teneur en polyphénols totaux, on a utilisé la courbe d'étalonnage réalisée dans notre travail d'ingéniorat (Khair, 2016).

L'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique est la suivante : $A = 12,045 * C_{AG}$

Les résultats du dosage, exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique (EAG), par gramme de matière sèche (mg EAG/g Ms) sont réunis dans le tableau III-2 suivant :

Tableau III-2 : Résultats du dosage des polyphénols totaux dans les extraits du *Rosmarinus officinalis* L.

	Phase acétate d'éthyle	Phase MEC	Phase eau résiduel
TPP (mg EAG/g Ms)	54,43	45,26	6,51

- La teneur en polyphénols totaux dans les trois phases récupérés après la décantation liquide varie visiblement : entre 6,51 et 54,43 mg EAG /g Ms.
- La phase acétate d'éthyle a fourni la valeur maximale en teneur de polyphénols totaux, égal à 54,43 mg EAG/g Ms.

III.2.2 Teneur en flavonoïdes

Afin de déterminer la teneur en flavonoïdes, on a utilisé la courbe d'étalonnage réalisée dans notre travail d'ingéniorat (Khair, 2016).

L'équation de la courbe d'étalonnage de la quercétine est la suivante : $A = 0,0113 * C_Q$

Les résultats du dosage, exprimés en milligrammes équivalent de quercétine (EQ), par gramme de matière sèche (mg EQ/g Ms) sont réunis dans le tableau III-3 suivant :

Tableau III-3 : Résultats du dosage des flavonoïdes dans les extraits du *Rosmarinus officinalis* L.

	Phase acétate d'éthyle	Phase MEC	Phase eau résiduel
TF (mg EQ/g Ms)	19,67	10,27	2,17

- La teneur en flavonoïdes dans les trois phases récupérés après la décantation liquide varie visiblement : entre 2,17 et 19,67 mg EQ /g Ms.
- La phase acétate d'éthyle a fourni la valeur maximale en teneur de flavonoïdes, égal à 19,67 mg EQ/g Ms.

On constate donc que l'acétate d'éthyle est un solvant efficace pour l'extraction des composés phénoliques, il a permis d'extraire une quantité assez importante de ces composés, ce qui est déjà trouvé dans les travaux de (Aoucher 2010 ; Madjour, 2014). En effet l'acétate d'éthyle est un solvant de polarité intermédiaire, la plupart des phénols se retrouvent alors dans ce solvant, qu'il est ensuite aisé d'éliminer sous vide afin de transférer finalement la fraction phénolique correctement purifiée (Macheix et *al.*, 2005). Cette fraction qu'on récupère sera ensuite utilisée pour les analyses qualitatives.

La quantité des composés phénoliques des extraits de la plante étudiée dépend essentiellement : de leur origine (Ebrahimzadeh et *al.*, 2008), la variété, la saison de culture, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (Park et Cha, 2003) et la durée de conservation.

III.3 Evaluation du potentiel antioxydant des extraits du *Rosmarinus officinalis* L.

Les extraits sont des mélanges de plusieurs composés, avec différents groupements fonctionnels, polarités et comportements chimiques. Cette complexité chimique des extraits pourrait mener à des résultats dispersés selon l'essai utilisé. Par conséquent, une approche avec des analyses multiples pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits serait plus instructif et même nécessaire (Ozturk et *al.*, 2007).

Dans ce travail, nous avons procédé à l'évaluation de la capacité de piégeage du radical libre DPPH, de l'ensemble des échantillons de différentes phases d'extraits du *Rosmarinus officinalis* L. obtenus par le procédé d'extraction liquide-liquide.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits a été comparée avec d'autres molécules antioxydantes de références, le BHT, la vitamine E et la vitamine C étudiés par (Amari et Dergam, 2010), les résultats sont donnés dans le tableau III-4.

Le protocole expérimental de la méthode DPPH est décrit dans notre travail d'ingénieur (Khair, 2016). Afin de déterminer le pourcentage d'inhibition AA, %, des extraits, nous avons préparés des solutions aqueuses des échantillons d'extraits, de même concentration. Les mesures de l'absorbance de la solution méthanolique du DPPH pur et en présence de l'échantillon à tester ont été effectuées pendant le temps nécessaire à la stabilisation de la valeur de l'absorbance. Nous avons calculé les pourcentages d'inhibition AA, %, correspondant aux différentes phases. Ces données expérimentales nous ont permis de tracer les histogrammes, donnant le pourcentage d'inhibition, AA, de chaque extrait pour la même concentration (Figure III-2).

Tableau III-4 : Pourcentage d'inhibition de radical DPPH par différents antioxydants

Molécule ($\mu\text{g/mL}$)	Pourcentage d'inhibition (AA, %)
Extrait d'acétate d'éthyle	95,56
Extrait de MEC	72,31
Extrait d'eau résiduel	57,78
Vitamine E (Amari et Dergam, 2010)	80,90
Vitamine C (Amari et Dergam, 2010)	91,46
BHT (Amari et Dergam, 2010)	95,75

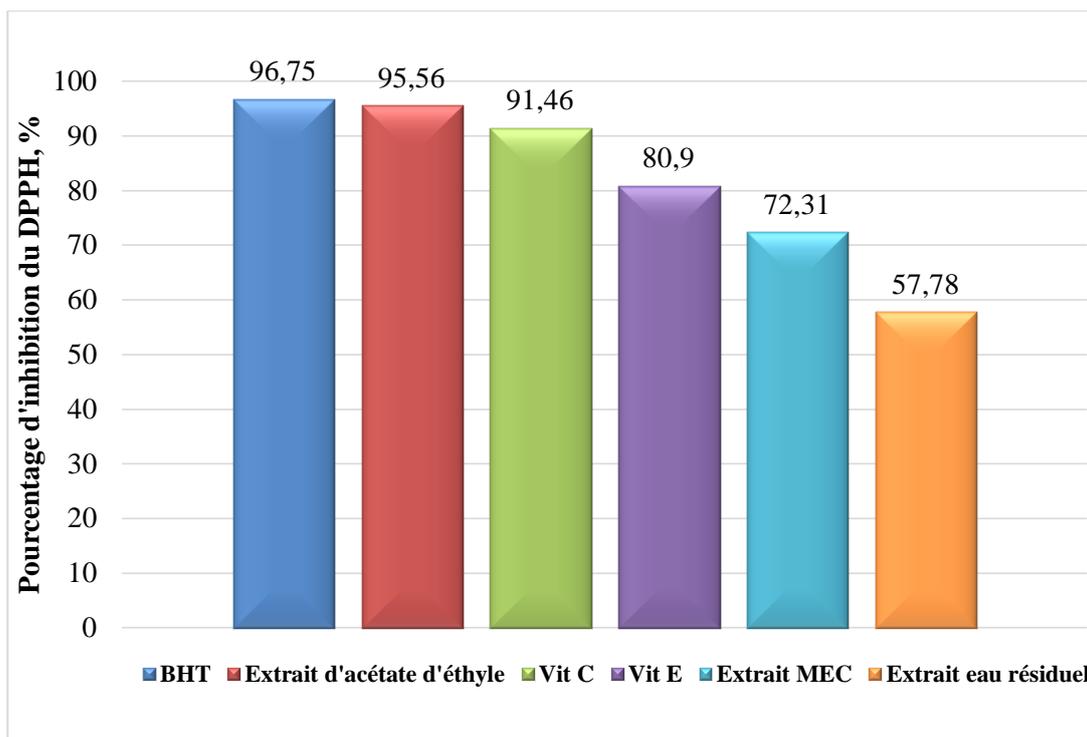


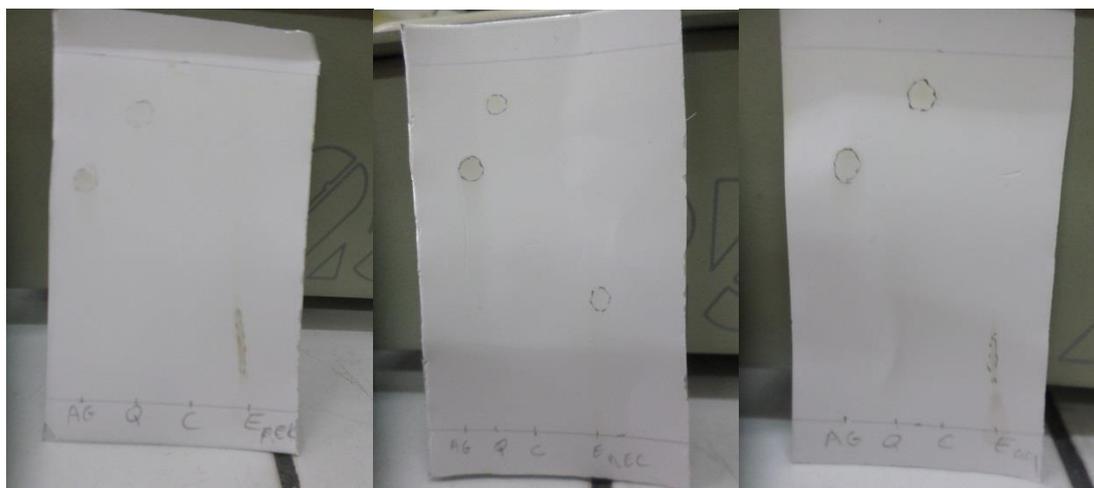
Figure III-3 : Pourcentage d'inhibition de radical DPPH par les antioxydants

- La figure montre que le pourcentage d'inhibition de radical DPPH, de l'extrait acétate d'éthyle est situé entre deux antioxydants de références, le BHT et la Vitamine C, ce qui signifie un pouvoir antioxydant très élevé de l'extrait du *Rosmarinus officinalis* L. purifié par l'acétate d'éthyle.
- Nous remarquons que l'extrait d'acétate d'éthyle montre une activité antioxydante plus élevée que l'extrait MEC et l'extrait eau résiduel.

On constate que l'activité antioxydante est plus élevée dans la phase la plus riche en composés phénoliques (phase d'acétate d'éthyle), nos résultats montrent que le potentiel antioxydant est dû essentiellement aux composés phénoliques, ce qui est conforme à l'étude de (Ibanez, 1999).

III.4 Analyse chromatographique de l'extrait du *Rosmarinus officinalis* L. sur couche mince

Pour avoir les empreintes des composés phénoliques de nos extraits, et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, une chromatographie sur couche mince a été réalisée en utilisant des systèmes solvants moyennement polaires. Sans aucun moyen de révélation les taches des produits qui se présentent sur les plaques de gel de silice ont été délimitées par un crayon (Figure III-3).



Phase acétate d'éthyle

Phase MEC

Phase eau résiduel

Figure III-4 : Chromatographie sur couche mince de différentes phases des extraits du *Rosmarinus officinalis* L. et les étalons utilisés dans le système solvants (Acétate d'éthyle/Méthanol/H₂O: 100/13,5/10) (Maleš et al., 1998).

Afin de déterminer les rapports frontaux de différentes phases d'extraits et celle des étalons utilisés, on a délimité les taches colorées par un crayon. Les Rf calculés suite à l'analyse par chromatographie sur couche mince, sont représentés dans le tableau III-5:

Tableau III-5 : Rapports frontaux des extraits du *Rosmarinus officinalis* L. séparés par CCM dans le système solvants (Acétate d'éthyle/Méthanol/H₂O: 100/13,5/10).

	Extrait d'acétate	Extrait MEC	Extrait eau résiduel
Rf	0,10 < Rf < 0,31	0,35	0,13 < Rf < 0,29
couleur	Marron foncé	Jaune doré	Miel

Tableau III-6 : Rapports frontaux des composés phénoliques séparés par CCM des étalons utilisés dans le système solvants (Acétate d'éthyle/Méthanol/H₂O :100/13,5/10).

	Acide gallique	Quercétine
Rf	0,67	0,87
	0,71	0,85
	0,73	0,93
Couleur	transparent	Jaune clair

Structure-Rf :

La distance de migration des substances dépend essentiellement de leur polarité :

- Les polyhydroxyflavones ont des faibles valeurs de Rf (0,00-0,25).
- Les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones ont des valeurs de Rf comprises entre (0,3-0,5).
- Les flavanones, les flavonols, méthoxyflavones ont les valeurs les plus élevées de Rf (0,5-0,75) (Bandyukova et Shinkarenko, 1973 ; Zeghad, 2009).

La chromatographie résultant de l'analyse des extraits du *Rosmarinus officinalis* L. montre la présence de certains composés phénoliques.

Selon les Rf obtenus, on remarque que la phase d'acétate d'éthyle et eau résiduel donnent des Rf compris entre (0.00-0.25) et (0.3-0.5), ces composés sont : Les polyhydroxyflavones, les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones selon (Bandyukova et Shinkarenko, 1973 in Zeghad, 2009), la diminution des Rf est expliquée, selon le même auteur, par l'augmentation des groupements (OH) dus principalement à l'introduction de nouveaux groupement de ces derniers (glycolation)

La phase MEC, donne un Rf entre (0,3-0,5), cette phase renferme, les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones.

La chromatographie obtenue dans notre travail, ne montre pas la présence de composés flavonoidiques de types (flavanones, les flavonols et méthoxyflavones), ce qui ne veut pas dire que nos extraits ne renferme pas ces composés, il peut y avoir des taches incolore pour les différentes phases d'extraits, mais le manque de moyen n'a pas permis de révéler les constituants incolores.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Notre société contemporaine s'intéresse de plus en plus aux produits à base d'extraits végétaux pour son bien-être et sa santé. C'est pourquoi, l'extraction solide-liquide, suivie éventuellement de purification, sont des opérations couramment employées de nos jours dans différentes industries.

L'oxydation constitue probablement l'un des paramètres majeurs à l'origine de l'altération des produits alimentaires et cosmétiques. Les dégradations oxydatives qui en résultent affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des produits et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur. Dans ce contexte, différents moyens de prévention sont disponibles pour limiter ces phénomènes. Parmi eux, la valorisation d'antioxydants d'origine végétale à des fins alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques représente un enjeu majeur pour la recherche et l'industrie. En effet, leur utilisation en tant que conservateurs naturels pourrait constituer une alternative attractive aux antioxydants synthétiques qui souffrent d'une moindre acceptation par le consommateur. Parmi les antioxydants naturels, les composés phénoliques, et plus particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes, suscitent un intérêt grandissant.

L'étude cinétique de l'extraction solide-liquide, menée à l'aide du logiciel EXDIF, a donné un modèle de transfert de matière basé sur la diffusion. La simulation de la cinétique est suivie par l'évolution du rendement de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait du *Rosmarinus officinalis* L. Ce modèle diffusionnel, a montré qu'il décrit correctement le phénomène d'extraction. Ainsi la valeur identifiée pour le coefficient de diffusion est comprise entre $1,30 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ et $2,88 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, ce qui nous paraît d'un ordre de grandeur tout à fait acceptable.

L'analyse quantitative des composés phénoliques a été effectuée par la méthode de Folin-Ciocalteu, et d' AlCl_3 , pour la teneur en polyphénol totaux et en flavonoïdes, respectivement. L'extrait d'acétate d'éthyle obtenu par le procédé d'extraction liquide-liquide de l'extrait du *Rosmarinus officinalis* L., a donné la teneur en composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes) plus élevée que l'extrait MEC et l'extrait eau résiduel.

Le potentiel antiradicalaire des extraits du *Rosmarinus officinalis* L. a été déterminée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, les résultats montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle a manifesté une activité antioxydante très élevée, proche du BHT. En revanche l'extrait d'acétate d'éthyle a présenté une bonne activité antioxydante que les deux extraits MEC et l'extrait d'eau résiduel. On peut donc considérer que l'extrait du *Rosmarinus officinalis* L. purifié, rentre dans la catégorie des agents antioxydants de première classe et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires.

D'autre part, l'analyse de différentes phases d'extraits (acétate d'éthyle, MEC, eau résiduel) du *Rosmarinus officinalis* L. par la chromatographie sur couche mince de gel de silice, a montré sous l'étude directe, sans aucun moyen de révélation, la présence de certains composés phénoliques. La révélation de tous les composés phénoliques présents dans nos phases d'extrait du *Rosmarinus officinalis* L. n'a pas pu être réalisée, par manque de moyen de révélation de ces composés. Après le calcul des rapports frontaux on constate que cette plante, est riche en polyhydroxyflavones, les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones.

Il sera essentiel à l'avenir de mener plusieurs axes de recherche à savoir:

- La mise en place de nouveaux procédés, innovants et écologiques pour l'extraction des composés phénoliques, ainsi la récupération sélective des molécules actives pourrait être envisagée.
- De préciser la composition qualitative et quantitative de chacun des composés phénoliques, afin de les tester individuellement. Cela doit permettre d'abord de comprendre le mode d'action de chacun d'eux, et ensuite d'évaluer toutes les activités biologiques qui se présentent dans cette plante médicinale, ainsi que leur biodisponibilité.
- De mener une étude approfondie sur le *Rosmarinus officinalis* L., afin d'isoler et identifier les principes actifs de cette plante en utilisant des techniques plus modernes comme, la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), ou chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrophotométrie de masse.

BIBLIOGRAPHIQUE

- **ARUOMA, O. I., SPENCER, J. P., ROSSI, R., AESCHBACH, R., KHAN, A., MAHMOOD, N., MUNOZ, A., MURCIA, A., BUTLER, J., HALLIWELL, B.** An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosmariny and provençal herb. *Food and Chemical Toxicology*, 1996. 34 (5): 449-456.
- **ATIK BEKKARA, A., F., BOUSMAHA, L., TALEB BENDIAB, S.A., BOTI, J.B., CASANOVA, J.** Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé*, 2007. 7: 6-11.
- **BANDYUKOVA, V. A., SHINKAREAKO, A. L.** The thin layer chromatography of flavonoids. *Chemistry of natural compounds*, 1973. 9 (1) : 17-21.
- **BARBUT, S., JOSEPHSON, D. B., MAURER, J.** Antioxidant properties of rosemary oleoresin in turkey sausage. *J Food Sci*, 1985. 50 (13) : 56-63.
- **BASGA, H., TEKKAYA, C., ACKIKEL, F.** Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. *Food Sci Technol (London)*, 1997. 30 (10) : 5-8.
- **BENGUERBA, A.** Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espèce *Inula crithmoides* L. 43 p. Thèse de magister : Chimie organique : Constantine, Université de Mentouri : 2008.
- **BENKIK, N.** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*. 51 p. Thèse de doctorat, Batna : Université Hadj Lakhdar, 2006.
- **BENMESSAOUD, LEFT, D., ZERTOUBI, M., IRHZO, A., AZZI, M.** Huiles et Extraits de plantes comme inhibiteurs de corrosion pour différents métaux et alliages dans le milieu acide chlorhydrique. *J. Mater. Environ. Sci*, 2013. 4 (6) .855-866.
- **BENSEBIA, O., BARTH, D., BENSEBIA, B., DAHMANI, A.** Supercritical CO2 extraction of rosemary: effect of extraction parameters and modeling, *J. Supercrit Fluids*, 2009. 49: 161 – 166
- **BERTRAND, C., ANDREU, V.** Caractéristiques et intérêts des préparations à base de plantes. 7 p. Colloque Intrants Naturels 9&10 avril ITAB/GRAB. 2013.
- **BONILLA, F., MAYEN, M., MERIDA, J., MEDINA, M.** Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, 1999. 66, 209-215.
- **BOUSBIA, N.** Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. 128 p. Thèse de doctorat : Avignon :

Université d' Avignon et des Pays de Vaucluse & École Nationale Supérieure
Agronomique : 2011.

- **BRAVO, L.** Polyphenol chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr. Rev.*, 1998. 56: 317-333.
- **CACACE, J.E., MAZZA, G.** 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 2003 59(4):379-389.
- **CAVERO, S., JAIME, L., MARTIN-ÁLVAREZ, P. J., SEÑORÁNS, F. J., REGLERO, G., IBANÑEZ, E.** In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *European food research and technology*, 2005. 221: 478-486.
- **CHANG, S.S., OSTIC-MTILASAVIC, B., HSIEH, O. A. L., HUANG, C. L.** Natural antioxidants from rosemary and sage. *J Food Sci*, W11 42 (110): 2-6.
- **CHEUNG, S., TAI, J.** Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology reports*, 2001. 17 (6) : 1525-1531.
- **CISSÉ, M., BOHUOUN, P., SAMBE, F., KANE, C., SAKHO, M., DONNER, M.** Aqueous extraction of anthocyanins from Hibiscus sabdariffa: experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering*, 2012. 109:16—21.
- **DEHAK, D.** Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles. Présentation (ppt). Thèse de doctorat : Ouargla, Université KASDI Merbah : 2013.
- **DEL BAÑO, M. J., LORENTE, J., CASTILLON, J., BENAVENTE-GRACIA, O., MARIN, M. P., DEL RIO, J. O., ORTUÑO, A., IBARRA, I.** Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems and roots of *Rosmarinus officinalis*, postulation of a biosynthetic pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004. 52 (16) : 4987-4992.
- **DIBERT, K., CROS, E.** Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee. Part II: Kinetic data. *Journal of Food Engineering*, 1989. 10(3):199-214
- **DUCERF, G.** l'encyclopédie des plantes bio-indicatrice, alimentaires et médicinales, Guide de diagnostic des sols, éd, Promonature, vol 2, 251 p. Fiche n° 454 « Romarin », 2007.
- **EBRAHIMZADEH, M. A., POURMMORAD, F., HAFEZI, S.** Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish journal of biology.*, 2008. 32 : 43-49.
- **EDWIN, N. F., SHU-WEN, HUANG, S.W., AESCHBACH, R.** and Elizabeth Prior. Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol,

- and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *J. Agric. Food Chem.*, 1996,44 (1), pp 131-135
- **ESCUDEF, O.** Plantes médicinales : mode d'emploi, les reconnaître dans la nature, les utiliser, les cultiver au jardin. 210 p. éd, Eugen Ulmer, Romarin, 2007.
 - **GILLY, G.** (2005) Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse : botanique, culture, chimie, production, et marché, Ed. l'harmattan, Paris, France, p.418.
 - **GOMEZ, G.** Abécédaire de chimie organique. [en ligne]. 2014. [consulté le 25/01/2016]. Disponible sur : <<http://webpeda.ac-montpellier.fr>>.
 - **HERRERO, M., ARRÁEZ-ROMÁN, D., SEGURA, A., KENNDLER, E., GIUS, B., RAGGI, M. A., IBÁÑEZ, E., CIFUENTES, A.** Pressurized liquid extraction–capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts. *Journal of chromatography A*. 2005. 1084 : 54-62.
 - **HOPKINS, W.G.** Physiologie végétale. Éd, De Boeck Université, 2003. 268-269.
 - **HUANG, M. T., HO, C. T., WANG, Z. Y., FERRARO, T., LOU, Y. R.,** Stanber K., Ma W., Hoffman L., Besseau S., Geoffroy P., Rizenthaler C., Meyer D., Lepierre C., Pollet B. et Legrand M. Silencing of Hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell*. 1994. 16 (4) : 1446-1465
 - **IBÁÑEZ, E., KUBÁTOVÁ, A., SEÑORÁNS, F. J., CAVERO, S., REGLERO, G., HAWTHORNE, S.B.** Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary Plants. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, 2003. 51 (2) : 375-382.
 - **ISERIN, P.** 2001. Larousse des plantes médicinales, identification, préparation, soins. (ed.).Larousse., 2001 : 15-16, 68.
 - **KHAIR, R.** Optimisation des conditions opératoires de l'extraction des composés phénoliques des feuilles du *Rosmarinus officinalis* L. Mémoire de projet de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat : Génie Chimique : Alger, Ecole Nationale Polytechnique : 2016.
 - **KRISHUAU, R., MARU, G.B.** Isolation and analyses of polymeric polyphenol fractions from black tea. *Food Chemistry.*, 2006. 94:331-340
 - **LATIFOU, L.** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. 32 p. Thèse de doctorat : Strasbourg, Université Louis Pasteur de Strasbourg : 2005.
 - **LAZAROVA, M., DIMITROV, K.** Selective recovery of alkaloids from *Glaucium flavum crantz* usina integrated process extraction-pertraction. Séparation, *Science and Technology.*, 2009. 44(1) : 227-242.

- **LEMONICA, I.P., DALASCENO, D.C., DLI-STASI, L.C.** Study of the embryotoxic effects of an extract of Rosmary (*Rosmarinus officinalis*). *Brazilian journal of medical and biological research.*, 1996. 29 (2) : 223-227.
- **LEYBROS, J. FREMEAUX, P.** 1990. Extraction solide-liquide aspects théoriques. Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés.
- **MACHEIX, J.J, FLEURIET, A., JAY-ALLEMAND, C.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presse Polytechnique et Universitaire Romand*, éd. France, Amzon. 62 p.
- **MADJOUR, S.** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une labiée *rosmarinus officinalis*. 56 p. Mémoire de fin d'étude en Master : Sciences de la Matière : Biskra, Université Med Khider Biskra : 2014.
- **MAFART, P., BÉLIARD, E.** Génie Industrial Alimentaire. Tomme II Technique Separatives. Editions Tec & Doc. Lavoisier, 1992. ISBN: 2-85206-808-7.
- **MAIEŠ, Z., MEDIC-ŠARIĆ, M., BUCAR F.** Flavonoids of *Guiera senegalensis* J F GMEL–Thin layer chromatography and numerical methods. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, 1998. 71 (1) : 69-79.
- **MALEŠ, Z., MEDIC-ŠARIĆ M., BUCAR, F.** 1998. Flavonoids of *Guiera senegalensis* J F GMEL–Thin layer chromatography and numerical methods. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, 1998. 71 (1) : 69-79.
- **MARINOVA, E., YANISHLIEVA, N., GANEVA, I.** Antioxidative effect of Bulgarian rosemary and inhibiting activity of its carnosol Oxidation Communications, 1991. 14: 125-31.
- **MUCHUWETI, M., KATIVU, E., MUPURE, C. H., CHIDEWE, C., NDHLALA, A. R., BENHURA, M. A. N.** Phenolic composition and antioxidant properties of some species. *American journal of food technology.*, 2007. 2 (5) : 414-420.
- **N'GUSSAN, A.H.O, DELIKO, C.E.D, AKHANOVNA, M.B, BEKRO, Y.A.** 2011. Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. *Revue de génie industrielle.*6. 55-62.
- **NAVE F., CABRITA, M.J., TEICEIRA DA COSTA, C.** Use of solid-supported liquid-liquid extraction in the analysis of polyphenol in wine. *Journal of Chromatography A.*, 2007. 1169:23-30.

- **OFFORD, E. A., MACÉ, K., RUFFIEUX, C., MALNOË, A., PFEIFER, A. M.** 1995. Rosmary components inhibit benzo [a] pyrene-induced genotoxicity in human bronchical cells. *Carcinogenesis.*, 1995. 16 (9) : 2057-2062.
- **OKAMURA, N., HARAGUCHI, H., HASHIMOTO, K., YAGHI, A.** Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry.*, 1994. 37 (5) : 1463-1466.
- **OZTURK, M., AYDOGMUS-OZTURK, F., DURU, M-E., TOPCU, G.** Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chem.*, 2007. 103: 623-630.
- **PARIS, A., STRUKEL, J., B., RENKO, M., TURK, V., PUKL, M., UMEK, A., KORANT, B. D.** Inhibition effects of carnosic acid on HIV-I protease in cell free assays. *Journal of natural products.*, 1993. 56 (8) : 1426-1430.
- **PARK, H. J., CHA, H. C.** Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean. journal of biological society.*, 2003. 7 : 327-330.
- **PENCHEV, P. I.**, 2010 Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions, p. 56-59. Thèse de Doctorat : Toulouse, Université de Toulouse : 2010.
- **PEREZ, M. B., CALDERÓN, N. L., CROCI, C. A.** Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of Rosmary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food chemistry.*, 2007. 104 : 585-592.
- **PEYRON, L.** Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques. Ed. Tec & Doc-Lavoisier et Apria. Chapitre 10, 1992, p. 217 – 238.
- **POIROT, R.** Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale. Thèse de Doctorat : Toulouse, l'Institut National Polytechnique de Toulouse : 2007.
- **RAMIREZ, P., SEÑORÁNS, F. J., IBAÑEZ, E., REGGLERO, G.** Separation of rosmmary antioxidants compounds by supercritical fluid chromatography on coated packed capillary columns. *Journal of chromatography A.*, 2004. 1057 : 241-245.
- **REBLOVA, Z., KUDRNOVA, J., TROJAKOVA, L., POKORNY, J.** Effect of rosemary extracts on the stabilization of frying oil during deep fat frying. *J Food Lipids*, 1999. 6 13-23.
- **ROMBI, M., ROBERT, D.** 120 Plantes Médicinales : compositions, mode d'action et intérêt thérapeutique de l'ail à la vigne rouge : romarin, Ed. Alpen, 2007. 398 p.

- **RONZE, D.** Introduction au génie des procédés. Editions Tec & Doc. Lavoisier, 2008. ISBN : 978-2-7430-1066-9.
- **SARNI-MANCHADO, P., CHEYNIER, V.** Les polyphénols en agroalimentaire (résumé). Ed Tec et Doc / Lavoisier, 2006.
- **SELLES, C.** Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen : *Anacyclus pyrrhtrum* L. Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0,5M. 219 p. Thèse de doctorat Tlemcen, Université Abou Beker Belkaid : 2012.
- **SCHULER, A.** Dictionnaire d'étymologie française d'après les résultats de la science moderne, Ed. August Schnée. Bruxelles, 1862.
- **SINE, J.P.** Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques cours et exercices. Ellipses editions marketing S A., 2003, p. 99-101.
- **SINGLETARY, K. W., NELSHOPPEN, J. M.** Inhibition of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) induced mammary tumorigenesis and of in vivo formation of mammary DMBA-DNA adducts by rosemary extract. *Cancer lettres.*, 1991. 60 (2) : 169-175.
- **SOUZA, C.R.F., SCHIAVETTO, I.A., THOMAZINI, F.C.F. et OLIVIEIRA, W.P.** Processing of *Rosmarinus officinalis* linne extract on spray and spotted bed dryers. *Brazilian journal of chemical engineering.*, 2008. 25 (1) : 59-69.
- **TEUSCHER, ANTON R., LOBSTEIN A.** (2005) Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles, éd. Paris, France : Lavoisier, 2005, 522 p.
- **VAN BEEK, T.A., TETALA, K.K.R., KOLEVA, IL. DAPKEVICIUS, A., EXARCHOU, V., JEURKSEN, S.M.F., CIAASSEN, F.W., VAN DER, KLIFT, E.J.C.** Récent developments in the rapid analysis of plants and tracking their bioactive constituent. *Phytochemistry Review.*, 2009. 8:387-399.
- **WONGKITTIPONG, R., PRAT, L., DAMRONGLERD, S., GOURDON, C.** Solidliquid extraction of andrographolide from plants experimental study, kinetic reaction and model. *Separation and Purification Technology*, 2004, p 147-154.
- **WANG, W., WU, N., ZU, Y. G., FU, Y. J.** Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L oil compared to its main compounds. *Food chemistry.*, 2008. 108 (3) : 1019-1022.
- **YANG, R. Y., LIN, S., KUO, G.** Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species. *Asia of pacific journal of clinical nutrition.* 2008. 17 (S1) : 275-279.

- **ZEGHAD, N.** (2009) Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. p: 12. 18-19. 36-37. Thèse de magister : Constantine, Université de Constantine.

WEBOGRAPHIE

- **Site web [1]**<www.albanmuller.com>
- **Site web [2]**<<http://www.ecosociosystemes.fr/alcaloide.html>>
- **Site web [3]**<<http://www.cnrtl.fr/lexicographie/alcalo%C3%AFde>>
- **Site web [4]**<<http://fr.wikipedia.org/wiki/Terp%C3%A8ne>>
- **Site web [5]**<<http://www.laboratorio.takiwasi.org/fra/extract.php>>
- **Site web [6]**<<http://www.intracen.org/itc/secteurs/plantes-medicinales/>>
- **Site web [7]**<<http://www.ciesin.org/docs/002-256c/002-256c.html>>
- **Site web [8]**<http://www.laveritesurlescosmetiques.com/themen_003_fr.html>
- **Site web [9]**<<http://santepourvous.overblog.com/2015/01/les-secteurs-d-utilisation-des-extraitsde-plante.html>>
- **Site web [10]**<<http://www.assistancescolaire.com>>