

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

École Nationale Polytechnique



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
Ecole Nationale Polytechnique

LAVALEF

Département de Génie Chimique
Laboratoire de Valorisation des Energies Fossiles

Mémoire de projet de fin d'études
pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'état en Génie Chimique

**Optimisation des conditions opératoires de l'extraction des
composés phénoliques 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 d'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'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, Mlle L. LOUCIF SEIAD, Maitre 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'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, Mme Y. TCHOULAK, Maitre assistante classe A à l'Ecole 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 saurai 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

استمثال شروط العمل لاستخراج المركبات الفينولية من اوراق نبتة إكليل الجبل

الملخص : الهدف من هذه الدراسة هو العملية الأمثل من خلال تخطيط التجارب، استخراج المركبات الفينولية من أوراق نبتة إكليل الجبل. من ثم البحث عن القيم المثلى لثلاث معايير رئيسية لعملية الاستخلاص صلب – سائل التي تتمثل في درجة الحرارة، المادة المائية ومدة الاستخلاص وذلك بالاعتماد على مخطط تجارب بمستويين ذو ثلاث معاملات، المعايير الأمثل المحتوى الفينولي الكلي، المحتوى الفلانونويد والقدرة المضادة للأكسدة للمستخلصات. ثم إجراء تحديد محتوى الفينولي الكلي والمحتوى الفلانونويد بالاعتماد على طرق المعايرة فولين سيوكالتو وثلاثي كلوريد الألمنيوم على التوالي. ثم تقييم القدرة المضادة للأكسدة باستخدام طريقة محاصرة الجذور الحرة DPPH. تم استخدام نموذج متعدد الحدود من الدرجة الثانية لوصف كل استجابة للنظام صلب – سائل، أظهر التحليل الإحصائي للنماذج المعمول بها والذي اجري باستخدام برنامج ستات غرافيكس سانتوريون 17، أنها تصف بدقة سلوك النظام المدروس. شروط العمل المثلى تم تحديدها بواسطة النماذج الرياضية وتمثيلها بمساحات إجابة.

الكلمات الدالة : نبتة إكليل الجبل، استخلاص، الاستمثال، البوليفينول الكلي، الفلانونويد، النشاط المضاد للأكسدة.

Optimization the operating conditions of the extraction of the phenolic compounds of *Rosmarinus officinalis* L. leaves.

Abstract: The aim of this study is the extraction optimization, using planning experiences, of phenolic compounds of *Rosmarinus officinalis* L. leaves. The research of optimal values of the three main parameters of the solid-liquid extraction process, temperature, hydromodule and the duration of the extraction, is conducted by adopting a two level factorial design with three parameters. The optimization criteria were the total content of the polyphenol, flavonoid content and the antioxidant power of the extracts. The total polyphenols and the flavonoids extracts content determination were submitted using the Folin-Ciocalteu dosage methods and the aluminum trichlorure respectively. The antioxidant power evaluation was realized using the capturing method of DPPH free radical. A second order polynomial model were used to describe the reaction of the solid-liquid system. The statistic analyses of the established models, leaded using the Statgraphics Centurion XVII software, showed that they correctly describe the behavior of the studied system. The optimal operational conditions were given by the mathematical model equations and illustrated using the response surface.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L., extraction, optimization, total polyphenols, flavonoids, antioxidant activity.

Optimisation des conditions opératoires de l'extraction des composés phénoliques des feuilles du *Rosmarinus officinalis* L.

Résumé : L'objectif de cette étude est l'optimisation, par planification des expériences, de l'extraction des composés phénoliques des feuilles du *Rosmarinus officinalis* L. La recherche des valeurs optimales des trois principaux paramètres du procédé d'extraction solide-liquide, en l'occurrence, la température, l'hydromodule et la durée de l'extraction, est menée en adoptant un plan factoriel à deux niveaux de trois paramètres, les critères d'optimisation étant la teneur en polyphénols totaux, la teneur en flavonoïdes et le pouvoir antioxydant des extraits. La détermination de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits ont été effectuées par les méthodes de dosage de Folin-Ciocalteu et d'AlCl₃ respectivement. L'évaluation du pouvoir antioxydant a été réalisée en utilisant la méthode du piégeage du radical libre DPPH. Un modèle polynomial du second ordre a été utilisé pour décrire chacune des réponses du système solide-liquide. L'analyse statistique des modèles établis, menée à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion XVII, a montré qu'ils décrivent correctement le comportement du système étudié. Les conditions opératoires optimales ont été déterminées à partir des équations des modèles mathématiques et illustrées par les surfaces de réponse.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis* L., extraction, optimisation, polyphénols totaux, flavonoïdes, activité antioxydante.

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION.....	13
CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	16
I.1 La matière végétale : <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	17
I.1.1 Etymologie	17
I.1.2 Historique	17
I.1.3 Description botanique	18
I.1.4 Composition Chimique	19
I.1.5 Utilisation	21
I.2 Les composés phénoliques	23
I.2.1 Généralités.....	23
I.2.2 Biosynthèse	24
I.2.3 Classification et structure phénolique	25
I.2.4 Propriétés thérapeutiques des composés phénoliques	31
I.3 Les radicaux libres et le stress oxydatif.....	34
I.3.1 Définition du stress oxydatif	34
I.3.2 Définition des radicaux libres.....	34
I.3.3 Formation des radicaux libres	34
I.3.4 Mécanisme réactionnel de l'oxydation	34
I.3.5 Conséquences du stress oxydant sur l'organisme	37
I.4 Les antioxydants	37
I.4.1 Définition et classification.....	38
I.4.2 Les antioxydants du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	40
I.4.3 Évaluation de l'activité antioxydante	41
I.4.4 Effet des antioxydants sur la santé humaine	43
I.4.5 Applications des antioxydants.....	44
I.5 Mécanisme et Techniques extractives.....	45
I.5.1 Extraction solide-liquide	45
I.5.2 Mécanisme de l'extraction solide-liquide	45
I.5.3 Technique extractives.....	46
I.5.4 Facteurs influençant les performances de l'extraction	52

CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES	55
II.1 Matière végétale utilisée.....	56
II.1.1 Cueillette	56
II.1.2 Détermination du taux d'humidité	56
II.2 Extraction des composés phénoliques du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	58
II.2.1 Choix du solvant.....	58
II.2.2 Dispositif expérimental d'extraction en mode batch.....	58
II.2.3 Protocole expérimental.....	59
II.3 Mesure du pH	60
II.4 Dosage des composés phénoliques	60
II.4.1 Dosage des polyphénols totaux	60
II.4.2 Dosage des flavonoïdes	61
II.5 Evaluation des propriétés antioxydantes des extraits	62
II.5.1 Protocole expérimental.....	62
II.5.2 Détermination du pourcentage d'inhibition	62
II.5.3 Détermination de la concentration d'inhibition IC ₅₀	63
II.5.4 Détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire.....	63
II.6 Plan d'expérience et modélisation mathématique	64
II.6.1 Terminologie	64
II.6.2 Coordonnées centrées réduites	67
II.6.3 Notion de modèle mathématique.....	68
II.6.4 Plan factoriel complet à deux niveaux de trois paramètres	68
II.6.5 Logiciel STATGRAPHICS Centurion XVII	69
II.7 Produits chimiques utilisés	70
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION	71
III.1 Elaboration du plan des expériences de l'extraction des composés phénoliques du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	72
III.1.1 Choix des paramètres et des critères d'optimisation	72
III.1.2 Choix du plan des expériences et du modèle mathématique.....	72
III.1.3 Définition du domaine d'étude.....	72
III.2 Modélisation.....	73
III.2.1 Modélisation de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	73
III.2.2 Modélisation de la teneur en flavonoïdes de l'extrait du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	75

III.2.3	Modélisation de l'indice d'activité anti-radicalaire	77
III.2.3.1	Evaluation du potentiel antioxydant des extraits du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	77
III.2.3.1.1	Détermination de la concentration IC ₅₀	77
III.2.3.1.2	Détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire.....	78
III.2.3.2	Modélisation de l'indice d'activité anti-radicalaire	79
III.3	Evaluation statistique des modèles mathématiques établis	81
III.3.1	Analyse de la variance.....	81
III.3.2	Surface de réponse.....	89
III.4	Optimisation	92
III.5	Extrapolation du modèle	92
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	94
	BIBLIOGRAPHIE.....	97
	WEBOGRAPHIE.....	113

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Les principales classes des composés phénoliques (Harborne, 1989 ; Macheix et <i>al.</i> , 2006 ; Crozier et <i>al.</i> , 2006).	26
Tableau I-2 : Activités biologiques de quelques composés phénoliques selon (Bruneton 1999 ; Balasundram et <i>al.</i> , 2006 ; Hennebelle, 2007 ; Li et <i>al.</i> , 2007 ; Habauzit et Horcajada, 2008 ; Bondia-Pons et <i>al.</i> , 2009 ; Gresele et <i>al.</i> , 2011).....	33
Tableau III-1 : Niveaux inférieurs, de base et supérieurs des paramètres à optimiser.....	73
Tableau III-2 : Résultats du dosage des polyphénols totaux dans les extraits du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	74
Tableau III-3 : Résultats du dosage des flavonoïdes dans les extraits du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	76
Tableau III-4 : Valeurs des IC ₅₀ et des IAA des échantillons des extraits de l'extraction des composés phénoliques du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	80
Tableau III-5 : Résultats de l'analyse de la variance.....	81
Tableau III-6 : Valeurs des facteurs à l'optimum	92
Tableau III-7 : Valeurs extrapolées de la réponse.....	92

Liste des figures

Figure I-1 : Aspects morphologiques du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Quezel et Santa, 1963)..	19
Figure I-2 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate (Crozier et <i>al.</i> , 2006).....	25
Figure I-3 :Structure générale des flavonoïdes	28
Figure I-4 :Structure du 2-phényl chromane	28
Figure I-5 : Structure des anthocyanosides	28
Figure I-6 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B).....	29
Figure I-7 : Schéma simplifié de l'auto-oxydation (Joaquin, 2002).....	36
Figure I-8 : Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre)	43
Figure I-9 : Diphenylpicrylhydrazyl (réduit).....	43
Figure I-10 : Dispositif expérimental d'un extracteur Soxhlet (Penchev, 2010).	47
Figure I-11 : Représentation schématique du comportement de molécules possédant un dipôle en l'absence de champ électrique, sous l'effet d'un champ électrique continu et sous l'effet d'un champ électrique de haute fréquence (Thomas, 2011).	51
Figure I-12 : Évolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide (Kim et <i>al.</i> , 2010).....	51
Figure II-1 : Appareil de Dean et Stark pour la mesure du taux d'humidité.....	57
Figure II-2 : Schéma du dispositif expérimental de l'extraction solide-liquide.....	59
Figure II-3 : Domaine du facteur.....	65
Figure II-4 : Espace expérimental	65
Figure II-5 : Domaine d'étude pour un plan à deux niveaux de trois facteurs.....	66
Figure II-6 : Surface de réponse pour un plan à trois facteurs	67
Figure III-1 : courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de l'acide gallique	74
Figure III-2 : courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de quercétine.	76
Figure III-3 : Evolution de l'absorbance du DPPH et du pourcentage d'inhibition, en fonction de la concentration de l'échantillon testé.	78
Figure III-4 : Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration du DPPH.....	79
Figure III-5 : Graphique de Pareto pour la teneur en polyphénols totaux ($\alpha = 0,05$).....	83
Figure III-6 : Graphique de Pareto pour la teneur en flavonoïdes ($\alpha = 0,38$)	84
Figure III-7 : Graphique de Pareto pour l'indice d'activité anti-radicalaire ($\alpha = 0,25$)	84
Figure III-8 : Graphique des effets directs pour la teneur en polyphénols totaux.....	85
Figure III-9 : Graphique des effets directs pour la teneur en flavonoïdes.....	86
Figure III-10 : Graphique des effets directs pour l'activité anti-radicalaire.....	86

Figure III-11 : Graphique des interactions pour la teneur en polyphénols totaux.....	87
Figure III-12 : Graphique des interactions pour la teneur en flavonoïdes.....	88
Figure III-13 : Graphique des interactions pour l'activité anti-radicalaire	88
Figure III-14 : Surface de réponse pour la teneur en polyphénols totaux (TPP).....	89
Figure III-15 : Surface de réponse pour la teneur en flavonoïdes (TF).....	90
Figure III-16 : Surface de réponse pour l'activité anti-radicalaire (IAA)	90
Figure III-17 : Graphique de la désirabilité pour la teneur en flavonoïdes (TF).....	93

Liste des abréviations

A :	Absorbance
AA :	Activité antiradicalaire
AND :	Acide désoxyribonucléique
AlCl₃:	Trichlorure d'Aluminium
AOAC :	Association of Official Agricultural Chemists
AVC :	Accidents cardiovasculaires
BHT :	Butyle hydroxytoluène
DPPH :	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EAG :	Équivalent d'acide gallique
EQ :	Équivalent de quercétine
ERO :	Espèces réactives de l'oxygène
FRAP :	Ferric ion reducing antioxidant power
IAA :	L'indice anti-radicalaire
IC₅₀ :	Concentration inhibitrice médiane
ISO :	International Standardization Organization
ORAC :	Oxygen radical absorbance capacity
TEAC :	Trolox equivalence antioxidant capacity
TF :	Teneur en flavonoïdes
TPP :	Teneur en polyphénols totaux
UV-Vis :	Ultraviolet/Visible

INTRODUCTION GENERALE

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (Lhuillier, 2007).

Les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps. Les plantes sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires parmi lesquels on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Avec leur diversité structurale remarquable, ces derniers, également appelés polyphénols, constituent une richesse déjà largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Les polyphénols (principalement, flavonoïdes, acides phénoliques, tannins) sont présents dans toutes les parties de la plante. Ces composés, sont largement recherchés pour leurs propriétés biologiques : anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-carcinogènes. Notant que l'efficacité puissante de ces substances à stopper les réactions radicalaires en neutralisant les radicaux libres est due principalement à leurs structures phénoliques.

Durant ces dernières années une recrudescence d'intérêt est à remarquer concernant les effets biologiques des antioxydants naturels inclus dans la lutte contre le stress oxydatif généré par les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Celles-ci sont impliquées dans le vieillissement et dans le déclenchement et la progression de plusieurs maladies telles que le cancer, l'athérosclérose, les accidents cardiovasculaires (AVC), l'ostéoporose, les maladies inflammatoires et les maladies neurodégénératives. Quelque soit le cas, le risque est aggravé avec l'accumulation de ces molécules dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques à savoir l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides. Dans ce contexte, de nombreuses recherches scientifiques faites sur les composés bioactifs notamment sur les polyphénols qui agissent contre les ERO, ont abouti à leur utilisation dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (Pietta *et al.*, 2000).

Cependant, l'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, antioxydantes et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs (Teixeira da Silva, 2004).

Le fort pouvoir antioxydant et antimicrobien des plantes de la famille des lamiacées, à laquelle appartient le *Rosmarinus officinalis* L., a fait d'elle la famille botanique la plus fréquemment utilisées au niveau mondial. Le romarin représente donc, une source inépuisable de substances ayant des activités anti-oxydantes et biologiques très variées et dont la connaissance constituerait une raison de plus pour la préservation et la valorisation de cette richesse naturelle, par l'extraction des produits à hautes valeurs ajoutées qu'elle contient, en utilisant des procédés de plus en plus performants.

L'objectif de notre étude est l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques de cette espèce végétale. La recherche des valeurs optimales des trois principaux paramètres du procédé d'extraction solide-liquide, en l'occurrence, la température, l'hydromodule et la durée d'extraction, est menée par planification des expériences, les critères d'optimisation étant la teneur en polyphénols totaux, la teneur en flavonoïdes et le pouvoir antioxydant des extraits.

Le premier chapitre de ce manuscrit est une étude bibliographie relative à la matière végétale, objet de cette étude, aux composées phénoliques et aux antioxydants, en général, et ceux du *Rosmarinus officinalis* L., en particulier, ainsi qu'au procédé d'extraction solide-liquide.

La préparation de la matière végétale, préalable à l'extraction de ces composées phénoliques, l'installation d'extraction, la démarche expérimentale adoptée, ainsi que les différentes méthodes d'analyse, 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, réalisés dans le cadre de l'optimisation par le plan factoriel à deux niveaux de trois paramètres. Les modèles mathématiques élaborés pour chacun des trois critères d'optimisation, leur validation statistique, à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion XVII, et les valeurs optimales des paramètres étudiés y sont également présentés.

CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

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

Le romarin ou romarin officinal (*Rosmarinus officinalis* L.), est un arbrisseau de la famille des Lamiacées (ou labiées), poussant à l'état sauvage sur le pourtour méditerranéen, en particulier dans les garrigues arides et rocailleuses, sur terrains calcaires (Rameau et *al.*, 2008).

Le romarin était considéré comme la plante antvieillessement par excellence, particulièrement pour ce qui a trait aux fonctions intellectuelles. En effet, le romarin était réputé pour stimuler l'activité cérébrale et améliorer la mémoire. C'est pour cette raison que les lettrés grecs le portaient en couronne lorsqu'ils devaient se livrer à des exercices intellectuels particulièrement exigeants (Site web [1]).

Les anthropologues et les archéologues ont découvert que le romarin a été employé comme vertus médicinales, culinaires et cosmétiques en Egypte, Mesopotamia, Chine et en Inde antiques (Stefanovits-Banyai et *al.*, 2003).

Le romarin, *Rosmarinus officinalis* L., plante commune à l'état sauvage ou cultivée, est, sans doute, l'une des plantes les plus populaires en Algérie, puisqu'on la trouve dans tous les jardins et les parcs en bordures odorantes.

I.1.1 Etymologie

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). Son nom pourrait aussi lui venir d'autres origines, telles que du grec « rhaps myrinos » signifiant buisson aromatique ou encore du latin « rhus marinus » ou sumac de mer (Rameau et *al.*, 2008).

Le romarin est aussi appelé : « Rose marine », « Romarin des troubadours », « Herbes aux couronnes », et, en provençal, « Encensier » (Paume, 2008).

En anglais, romarin se traduit par « *Rosemary* », en arabe « Azir / Iklil Aljabal » et en berbère « Yazir »

En allemand, le romarin est appelé : Rosmarinblatter, Krankrautblatter, Kranzenkrautblatter, Rosmarein.

I.1.2 Historique

L'utilisation du romarin dans la parfumerie remonte au XIV^e siècle. On prête alors à l'eau de Hongrie, premier parfum alcoolique recensé et constitué essentiellement de romarin, des pouvoirs

d'eau de jouvence. La légende prétend, en effet, que le romarin a permis à Elisabeth de Pologne, guérie de sa paralysie et de ses problèmes d'arthrite, de devenir reine de Hongrie, en séduisant le roi, malgré ses 72 ans. Toutefois, on lui prêtait des effets stimulants sur l'activité cérébrale, dès la Grèce antique. C'est pour cette raison que les intellectuels grecs ceignaient leur tête de couronnes de romarin. (Teuscher et *al.*, 2005).

Les romains tressaient des couronnes de romarin dont on coiffait les mariés le jour de leurs noces. Ils en déposaient également sur leurs tombeaux parce que cette herbe, considérée comme sacrée, devait conserver le corps par son arôme ; et son feuillage persistant garantissait l'immortalité et procurait aux morts la paix éternelle. Les Egyptiens l'utilisaient déjà pour l'embaumement, ainsi qu'en fumigation lors des cérémonies religieuses en remplacement de l'encens (Site web [2]).

C'est Horace qui rendit le plus bel hommage à cette plante dont il disait "*Si tu veux gagner l'estime des dieux porte leurs des couronnes de romarin*". Symbole de bonheur et de gaieté. Utilisé par ailleurs de manière empirique, comme remède à un bon nombre de maux, le miel de Narbonne, issu du romarin, trouvait une place de choix dans la pharmacopée marine au XVIIIe siècle.

Plus près de nous, au XIXe siècle, le médecin et prêtre catholique allemand Sebastian Kneipp, qui contribua activement au développement de la phytothérapie, prescrivait, aux personnes âgées, des bains de romarin. Elles pouvaient, ainsi, lutter contre bon nombre d'affections : faiblesse générale, fatigue des yeux, hypotonie, hypotension, hypercholestérolémie, cirrhoses, surmenages physique et intellectuel, avec perte de mémoire, troubles cardiaques d'origine nerveuse, syncopes, rhumatismes ou encore paralysies (Site web [3]).

I.1.3 Description botanique

Rosmarinus officinalis L. appartient à la famille botanique des *Lamiacées* au sein du genre *Rosmarinus*. C'est un arbrisseau toujours vert de 0,5 à 2 m. La tige ligneuse est couverte d'une écorce grisâtre et se divise en de nombreux rameaux opposés (Chafai Elalaoui A et *al.*, 2014).

Les feuilles sont sessiles, opposées et coriaces, enroulées sur les bords. Les fleurs bleu violacées, visibles de janvier à mai, sont groupées en grappe à l'extrémité des rameaux. Le fruit a une forme ovoïde, entouré par un calice brun et persistant. L'inflorescence et le calice ont une pilosité très courte ; l'inflorescence est en épis très courts et les bractées mesurent 1 à 2 mm.

La floraison des romarins s'étale sur une longue période allant de janvier à mai. Elle est toutefois très dépendante des conditions climatiques au cours de l'hiver : elle atteint généralement un pic d'abondance au début du printemps (mars-avril) (Silberfeld T et *al.*, 2012).

La reproduction peut se faire par voies sexuée (graine) et asexuée (bouture et éclat de touffes). Les modes de dissémination qui lui sont propres sont : la gravité, le vent, l'eau, les animaux (mammifères, oiseaux, insectes, etc.) et l'homme (Chafai Elalaoui A et *al.*, 2014).

Le romarin appartient à la famille botanique des lamiacées qui comprend de très nombreuses plantes aromatiques : Lavande, thym, sarriette, menthe, sauge. La récolte du romarin en fleurs est possible pendant presque toute l'année (Site web [4]).

La classification botanique du *Rosmarinus officinalis* L. est la suivante (Beauquesne et *al.*, 1980) :



Règne :	<i>Plantae</i>
Embranchement :	<i>Phanérogames</i>
Sous-embranchement :	<i>Angiospermes</i>
Classe :	<i>Dicotylédones</i>
Sous-classe :	<i>Gamopétales</i>
Ordre :	<i>Tubiflorae</i>
Sous-ordre :	<i>Lamiale</i>
Famille :	<i>Lamiaceae (labiatae)</i>
Genre :	<i>Rosmarinus</i>
Espèce :	<i>Rosmarinus officinallis L.</i>

Figure I-1 : Aspects morphologiques du *Rosmarinus officinalis* L. (Quezel et Santa, 1963).

I.1.4 Composition Chimique

L'huile essentielle du romarin (1 à 2% dans la plante) contient : de l' α -pinène (7 à 80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 38%), de l'eucalyptol (1 à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène (Beloued, 1998).

En plus de l'huile essentielle on trouve dans le romarin : 2 à 4% de dérivés triterpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol ; des lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadial, des acides phénoliques, des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque, des acides gras organiques : l'acide citrique, glycolique et glycérique, des stérols, de la choline, du mucilage (Bellakhdar, 1997) et de la résine (Beloued, 1998).

Le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence des flavonoïdes, des tannins et des saponines, et l'absence des alcaloïdes détecté dans

l'extrait aqueux. Les flavonoïdes détectés par la chromatographie sur couche mince (CCM) sont la quercétine et le kaempférol (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2007).

Okamura *et al.*, (1994) ont pu isoler de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles du romarin trois flavonoïdes glycosylés (lutéoline 3'-O-β-D-glucuronide, lutéoline 3'-O-(4''-O-acétyl)-β-D-glucuronide, et lutéoline 3'-O-(3''-O-acétyl)-β-D-glucuronide), ainsi que l'hespéridine.

La première application du système d'électrophorèse capillaire à détection électrochimique a permis la détection de : l'hespéretine, l'acacétine, la diosmétine, l'apigénine, la lutéoline, l'acide férulique, l'acide rosmarinique et l'acide caféique dans les extraits ethanologiques du romarin (Peng *et al.*, 2005).

En 2006 Almela et ses collaborateurs ont identifié par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), dans les extraits méthanoliques du romarin issus de différentes matières (romarin sauvage et distillé) des composés classés en trois groupes : les diterpènes, les flavonoïdes et les acides phénoliques. Les structures des diterpènes ont été reliées à l'acide carnosique. Les flavonoïdes dérivent de deux flavones apigénine et la lutéoline : genkwanine ; méthoxytectochrysin ; homoplantaginine ; scutellareine ; cirsimaritrine et 6-hydroxylutéoline-7-glucoside. L'acide rosmarinique était le seul acide phénolique identifié.

Les résultats de l'analyse d'HPLC élaborée par (Kosar *et al.*, 2005) et (Luis *et al.*, 2007) ont montré respectivement la composition suivante : lutéoline-glucoside : 2.90 mg/g ; naringine-glucoside : 7.16 mg/g ; lutéoline : 2.45 mg/g ; apigénine : 1.80 mg/g.

L'acide vanillique 0.004 mg/g ; l'acide caféique 0.012 mg/g ; naringine 0.570 mg/g ; l'acide rosmarinique 2.080 mg/g ; hispiduline 0.020 mg/g ; cirsimaritrine 0.080 mg/g ; carnosol 0.580 mg/g ; acide carnosique 12.180 mg/g.

La chromatographie liquide à détection par spectrométrie de masse (LC×LC - MS) a montré la composition suivante en acides phénoliques de l'extrait ethanologique du romarin : l'acide gallique < 50 µg/g, l'acide chlorogénique 120 µg/g, l'acide syringique < 50 µg/g, l'acide p-coumarique < 50 µg/g, l'acide férulique < 50 µg/g, (Kivilompolo et Hyotylainen, 2007).

18 éléments minéraux ont été identifiés par la spectrométrie d'émission atomique, les plus abondants sont : Al : 146.48 mg/kg ; Ca : 7791.80 mg/kg ; Fe : 330.16 mg/kg ; K : 14916.23 mg/kg ; Mg : 1634.55 mg/kg ; Na : 2711.87 mg/kg ; P : 1474.60 mg/kg ; Cr : 97.36 mg/kg ; Sr : 74.65 mg/kg (Arslan *et al.*, 2007).

Les principaux constituants du romarin responsables des différentes propriétés sont : Les acides phénoliques : acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique (Ibañez *et al.*, 2003), les flavonoïdes : genkwanine, cirsimaritrine (Ibañez *et al.*, 2003), ériocitrine, hespéridine, diosmine, lutéoline (Okamura *et al.*, 1994) apigénine (Yang *et al.*, 2008).

I.1.5 Utilisation

En Industrie cosmétique et parfumerie

Au XIV^e siècle l'essence de *Romarin* servait à la préparation de la très célèbre eau de Cologne de la reine de Hongrie. Aujourd'hui elle rentre dans la composition des produits de beauté, de savonnerie, détergents, crèmes et la plupart des eaux de Cologne : le taux d'utilisation maximum est rapporté à 1% dans la dernière catégorie (Albert et *al.*, 1996).

L'essence est obtenue par la distillation des branches, elle contient notamment du bornéol, du cinéol (ou eucalyptol), du camphène et du pinène. Le romarin entre dans la composition de parfums surtout masculins, hespéridés aromatiques (eaux de Cologne), boisés et fougères (Site web [5]).

Le romarin contient de très bonnes quantités de vitamine A. la vitamine A est connue pour avoir des propriétés antioxydantes. Elle est également nécessaire pour maintenir les muqueuses et la peau en bonne santé. Les feuilles de romarin fraîches sont une bonne source de vitamine C (Site web [6]).

En Industrie agro-alimentaire

Les extraits végétaux de romarin présentent un pouvoir antioxydant important et peuvent être appliqués à la conservation des aliments et des huiles lipidiques (Albert et *al.*, 1996 ; Muzon, 1999), ces propriétés sont dues aux acides polypliénoliques (rosmarinique, caféique) (Muzon, 1999 ; Piozzi, 1996).

Les deux, l'épice et l'huile sont largement utilisés en alimentation, l'épice est utilisé dans les boissons alcoolisées, les aliments cuits, viande et produits de viande, condiment et assaisonnement, les aliments industriels, casse-croûte, sauces et autres, avec le niveau maximum utilisé est d'environ 0.41% (4.098 ppm) dans les aliments cuits. L'huile est utilisée dans les boissons alcoolisées et non, les desserts glacés, confiseries, aliments cuits, gélamines et pouding, viande et produits de viande, condiments et assaisonnement, entre autres, avec le niveau maximum utilisé est d'environ 0.003 % (26.2 ppm) (Albert et *al.*, 1996).

Il est également une très bonne source de fer, de calcium et de vitamine B₆. Il est généralement préparé à partir de la plante entière séchée ou à partir d'extraits en poudre, tandis que les infusions sont préparées à partir de feuilles fraîches ou séchées (Site web [6]).

En thérapie

Le romarin est souvent cultivé pour son huile aromatique et considérée utile pour contrôler l'érosion du sol. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique (Gonzalez-Trujano et *al.*, 2007).

Dans le Mexique et le Guatemala, il est employé principalement comme remède de post-partum et traite également les problèmes respiratoires et les infections de la peau.

En Espagne, l'huile du romarin est très populaire pour beaucoup de genres de douleur, y compris les douleurs musculaires rhumatismales et traumatiques (Heinrich et *al.*, 2006).

Au Maroc, l'infusion des feuilles est utilisée comme apéritif, cholagogue, stomachique et emménagogue. En usage externe, les cataplasmes faits avec les compresses de la décoction concentrée sont appliqués comme vulnéraires. La poudre des feuilles est saupoudrée comme cicatrisant et antiseptique.

La fumigation du romarin est indiquée pour calmer les maux des dents. Depuis quelques décennies, l'huile essentielle du romarin est utilisée en massage sédatif dans les rhumatismes et la sciatique. Les feuilles séchées servent à conserver la laine de l'attaque des mites (Bellakhdar, 1997).

En Turquie, la décoction de feuilles du romarin a été traditionnellement employée pour traiter les diabétiques (Bakirel et *al.*, 2008).

L'infusion des feuilles est tonique, antitussive, carminative, antiasthmatique, fébrifuge, et anti-paralytique (Arnold, 1997). On le recommande dans les asthénies, les troubles du foie, contre les dyspepsies atoniques ainsi que contre les céphalées et les migraines d'origine nerveuse, les vertiges et les troubles de mémoire (Poletti, 1988).

Il a été également employé en tant qu'analgésique, antiépileptique, diurétique, (Soyal, 2007), ainsi que pour traiter l'ictère et sa fumée a été employée contre la peste (Heinrich et *al.*, 2006).

Le romarin contient de « l'acide carnosique » qui a fait l'objet de plusieurs études ayant conclu qu'il pouvait s'agir d'un composé anti-cancer puissant. Les chercheurs ont donné des résultats prometteurs dans des études de son efficacité contre le cancer du sein, le cancer de la prostate, le cancer du côlon, la leucémie et le cancer de la peau.

Le romarin est également souvent utilisé pour les problèmes de digestion, y compris les brûlures d'estomac, les gaz (flatulences) et la perte d'appétit. Il est également utilisé pour la goutte, la toux, le mal de tête, l'hypertension artérielle et les pertes de mémoire.

Le romarin contient des substances qui sont utiles pour la stimulation du système immunitaire, pour améliorer la circulation et la digestion. Le romarin contient également des composés anti-inflammatoires qui peuvent le rendre utile pour réduire la sévérité des crises d'asthme. En outre, le romarin s'est avéré efficace pour augmenter la concentration et réduire le stress.

Le romarin peut être infusé et utilisé en externe pour les irritations de la peau comme l'eczéma et les problèmes articulaires comme l'arthrite. Il s'est également avéré efficace pour accélérer la guérison des plaies et des ecchymoses lorsqu'il est utilisé en externe.

Une infusion de romarin avec des feuilles d'ortie est un excellent rinçage à base de plantes pour les cheveux et beaucoup sont celles qui l'utilisent pour accélérer la pousse des cheveux.

Le romarin peut aider à apaiser l'estomac et soulager la douleur de l'indigestion, des crampes menstruelles ou des autres douleurs du ventre.

Le romarin stimule le système nerveux central et la circulation, favorisant une bonne pression artérielle. L'huile essentielle de romarin est utilisée pour soulager la douleur des entorses, de l'arthrite, de la sciatique et des névralgies. Au niveau du système respiratoire, il est efficace pour traiter différentes affections telles que l'asthme, la bronchite, le catarrhe, la sinusite et la coqueluche en raison de son action astringente (Site web [6]).

I.2 Les composés phénoliques

I.2.1 Généralités

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 9000 structures connues différentes (Bahorun, 1997), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Akowauh et *al.*, 2004). Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthonnes et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué. La grande diversité structurale des

composés phénoliques rend difficile une présentation globale des méthodes qui permettent leur extraction et leur isolement, des processus mis en jeu au cours de leur biosynthèse, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques (Bruneton, 1993).

Ces corps jouent un rôle fondamental car ce sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles des végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi que dans les boissons, le café, le cacao ou le thé. L'homme consomme environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E (Scalbert et *al.*, 2005). L'activité antioxydante des polyphénols est reconnue et pourrait expliquer leur rôle potentiel dans la prévention de plusieurs maladies associées au stress oxydatif, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives.

Des travaux plus anciens (Nitsch et Nitsch, 1961; Alibert et *al.*, 1977) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets protecteurs contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour les propriétés antifongique et antibactérienne (Heimeur et *al.*, 2004). Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur, nous citons : les flavanones sont responsables de l'amertume des Citrus et peuvent donner naissance par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée (Dubois et *al.*, 1977), les anthocyanes, composés de couleur rouge à violet, participent à la coloration des fruits mûrs et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs.

A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt des polyphénols en particulier les flavonoïdes dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

I.2.2 Biosynthèse

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de l'acide shikimique (Figure I-2). Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïque, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines (Bruneton, 1993).

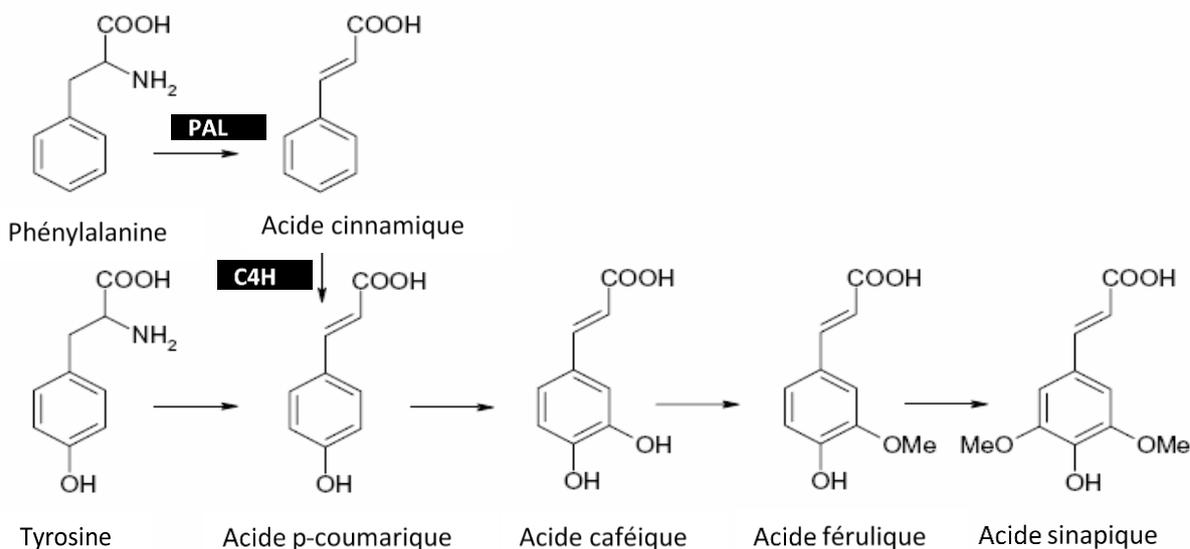


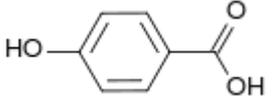
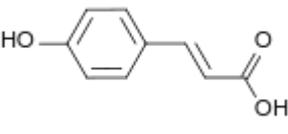
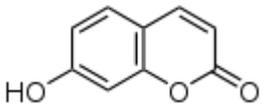
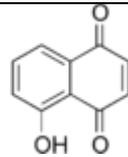
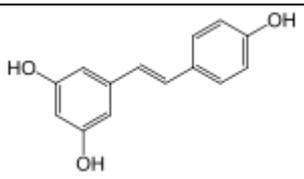
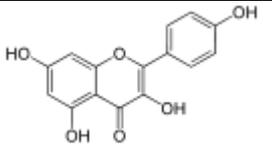
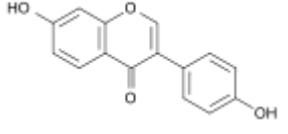
Figure I-2 : Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate (Crozier et *al.*, 2006).

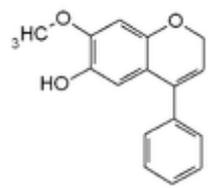
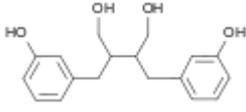
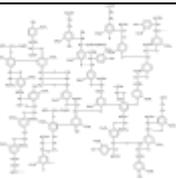
PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; *C4H* : cinnamate 4-hydroxylase.

I.2.3 Classification et structure phénolique

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en une dizaine de classes (Harborne, 1990 ; Macheix et *al.*, 2006) (Tableau I-1) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées). Ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques) (Macheix et *al.*, 2006). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (Harborne, 1990 ; Crozier et *al.*, 2006).

Tableau I-1 : Les principales classes des composés phénoliques (Harborne, 1989 ; Macheix et al., 2006 ; Crozier et al., 2006).

Composés phénoliques				
Squelette carboné	Classe	Exemple	Structure	Origine
C ₆	Phénols simples	hydroquinone		Busserole
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	acide parahydroxybenzoïque		Épices, fraises
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	acide paracoumarique		Tomates, ail
	Coumarines	ombelliférone		Carottes, coriandre
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	juglon		Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbénoides	trans-resvératrol		Raisin
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes <i>lato sensu</i>	kaempférol		Fraises
	Isoflavonoïdes	daidzéine		Graines de soja

	Anthocyanes	dalphiniol		Dalbergia sissoo, petits fruits rouges
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes	entérodiol		Bactéries intestinales, lin
$(C_6-C_3)_n$	Lignines			Bois, fruits à noyaux
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tanins condensés	procyanidine		Raisins, kaki

- **Flavonoïdes :**

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante (Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques (Mukohata *et al.*, 1978), dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance (Havsteen, 2002). Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grünhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C₆-C₃-C₆ de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényl chromane (Yao *et al.*, 2004) (Figure I-3, I-4).

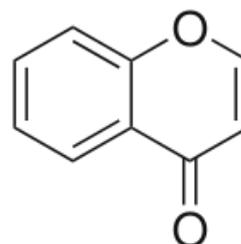
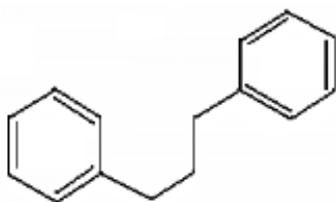


Figure I-3 : Structure générale des flavonoïdes **Figure I-4 :** Structure du 2-phényl chromane

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C c'est-à-dire la présence : de double liaison C₂-C₃, du groupe 3-Oet la fonction 4-oxo (Yao et *al.*, 2004 ; Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines ; flavonoles; isoflavonoles; flavones; isoflavones; flavanes ; isoflavanes; flavanols ; isoflavanols ; flavanones; isoflavanones; auronnes (Havsteen, 2002 ; Edenharder et Grünhage, 2003).

- **Anthocyanosides**

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de la plupart des fleurs et des fruits (Bruneton, 1993). Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides). Leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium plus communément appelé cation flavylum. Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) (Brouillard et *al.*, 1997 ; Bahorum, 1997).

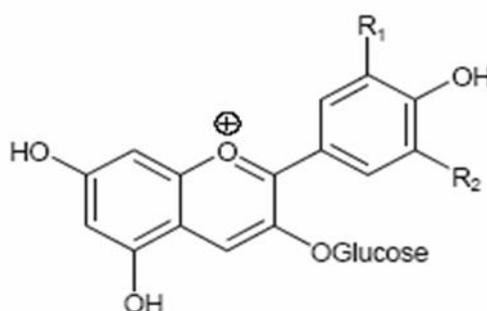


Figure I-5 : Structure des anthocyanosides

- **Tannins :**

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Haslam, 1996 ; Cowan, 1999). Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert, 1991). On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique.

Tannins hydrolysables qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins (Figure I-6) (Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999).

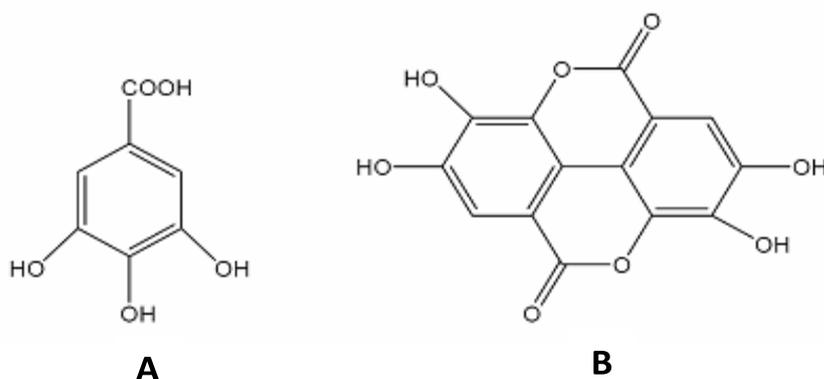


Figure I-6 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)

Tannins condensés ou tannins catechiques ou proanthocyanidols qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux, Gymnospermes et Fougères (Bruneton, 1999).

- **Phénols simples et les acides phénoliques :**

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique.

Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque : les acides phénols en C₆-C₁, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique (Bruneton, 1993).

Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique : la plupart des acides phénols en C₆-C₃ (acides p-coumarique, caféique, férulique, sinapique) ont une distribution très large ; les autres (acides o-coumarique, o-férulique) sont peu fréquents (Bruneton, 1993). Les acides cinnamiques et caféique sont des représentants communs du groupe de dérivés.

Phénols simples : tels que le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montré pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes (Cowan, 1999).

- **Coumarines :**

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C₆-C₃, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo-γ-pyrone (O'Kennedy et Thornes, 1997) et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (Cowan, 1999).

- **Quinones :**

Ce sont des composés oxygénés qui correspondent à l'oxydation de dérivés aromatiques avec deux substitutions cétoniques. Elles sont caractérisés par un motif 1,4-dicéto cyclohexa- 2,5-diéniq (para-quinones) ou, éventuellement, par un motif 1,2-dicéto cyclohexa-3,5- diéniq (ortho-quinones) (Bruneton, 1993). Elles sont ubiquitaire dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (Cowan, 1999).

- **Stilbène :**

Les membres de cette famille possèdent la structure C₆-C₂-C₆ comme les flavonoïdes, ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (Crozier et al., 2006).

- **Lignanes :**

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C6-C3). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante dix familles.

I.2.4 Propriétés thérapeutiques des composés phénoliques

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (Middleton et *al.*, 2000 ; Ksouri et *al.*, 2007). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (Nijveldt et *al.*, 2001).

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (Leong et Shui, 2002). D'après les études multiples attestant de l'impact positif de la consommation de polyphénols sur la santé et la prévention des maladies, les industriels commercialisent maintenant des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. De plus, leur activité antioxydante assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes dans la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (Hennebelle et *al.*, 2004).

En ce qui concerne les flavonoïdes, ces composés peuvent empêchés les dommages oxydatifs par différentes mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxyles et peroxydes (Hodek et *al.*, 2002) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Van Acker et *al.*, 1996 ; Benavente-Garcia et *al.*, 1997). Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de

l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (Anderson et *al.*, 1996 ; Cowan, 1999 ; Yao et *al.*, 2004). Mais, on attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-œstrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telle l'altération de la mémoire et la confusion. D'autres part, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers Citrus) et la fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire) (Hennebelle et *al.*, 2004).

Les anthocyanes sont également utilisés dans les troubles de la fragilité capillaire (vigne rouge, *Vitis vinifera* L.), mais aussi comme diurétiques, voire même antiseptiques urinaires. Leur plus grande spécificité reste cependant leur propriété d'améliorer la vision nocturne en facilitant la régénération du pourpre rétinien (myrtille, *Vaccinium myrtillus* L. ; cassis, *Ribes nigrum* L.) (Hennebelle et *al.*, 2004). Présente comme des couleurs brillant dans les fruits et les légumes, les anthocyanidines ont montré leur effet inhibiteur de la croissance des lignées cellulaires humaines (Zhang et *al.*, 2005).

Les tanins sont considérés comme des anti-nutriments grâce aux divers effets nuisibles à savoir la digestion réduite des aliments, la faible biodisponibilité des micronutriments et les dommages du foie (Chung et *al.*, 1998). Ils sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques (chêne, *Quercus* spp.). Les proanthocyanidines dimères de l'aubépine (*Crataegus* spp.) seraient de bons sédatifs cardiaques (Hennebelle et *al.*, 2004). Concernant le pouvoir antioxydant des tannins, cette propriété est très remarquable due à leurs noyaux phénols et la présence des groupes di- ou trihydroxyles sur le cycle B et les groupes méta 5, 7 dihydroxyles sur le cycle A. Les tannins catéchiques du thé vert : gallate d'épicatéchine, gallate d'épigallocatechine et l'épicatéchine sont des puissants extracteurs des radicaux libres (Rahman et *al.*, 2006), ils inhibent les ions Cu^{2+} qui catalysent l'oxydation des lipoprotéines dans les macrophages in vitro (Yoshida et *al.*, 1999).

Les coumarines sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives (Hennebelle et *al.*, 2004). Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires (Anderson et *al.*, 1996).

Les acides phénols et ces dérivés sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés (Hennebelle et *al.*, 2004). Les composés possédant les activités antioxydantes et

antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique (Bossokpi, 2002). Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons (Cowan, 1999). Alors, l'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuses du poumon chez les souris *in vitro* et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tels la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer (Kawada et al., 2001 in Rangkadilok et al., 2007). Il peut aussi prévenir les dommages oxydatifs d'ADN cellulaire à une faible concentration et exerce une forte activité antiproliférative tels que la quercétine sur les cellules humaines cancéreuses du colon et les cellules épithéliales du foie chez les rats normaux (Lee et al., 2005).

Certaines *quinones*, dérivant de l'antraquinone, sont des laxatifs stimulants. Elles sont rencontrées dans la bourdaine (*Rhamnus frangula* L.), les sénés (*Cassia* spp.) et les aloès (*Aloe* spp.). D'autres activités antidépressives (hypericin), anti-protazoaires, antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques ont été décrites et plusieurs molécules du groupe ont une toxicité non négligeable. (Bruneton, 1993 ; Hennebelle et al., 2004).

Tableau I-2 : Activités biologiques de quelques composés phénoliques selon (Bruneton 1999 ; Balasundram et al., 2006 ; Hennebelle, 2007 ; Li et al., 2007 ; Habauzit et Horcajada, 2008 ; Bondia-Pons et al., 2009 ; Gresele et al., 2011).

Composés phénoliques	Activité biologique
Acides Phénols	Antifongique, anti-oxydante, antibactérienne.
Tanins	Effet stabilisant sur le collagène. antioxydant, anti-diarrhéique, effet antiseptique, effet vasoconstricteur.
Flavonoïdes	Anti-tumorale, anti-carcinogène, anti-inflammatoire, anti-oxydante, antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypotenseur, diurétique.
Coumarines	Anticoagulante, anti-oxydante, protectrice vasculaire et antiœdémateuse.
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux, antioxydants.
Proanthocyanidiues	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydants, anti-tumoraux, antifongiques et anti-inflammatoires.
Tannins galliques et catéchiqes	Anti-oxydantes.
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques.

I.3 Les radicaux libres et le stress oxydatif

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols.

I.3.1 Définition du stress oxydatif

Selon la théorie du vieillissement de Denham Harman « le stress oxydatif est un processus selon lequel des molécules très réactives liées à l'oxygène, en abîmant à chaque instant nos molécules les plus vitales, finissent par nous rendre malades ou nous faire mourir à petit feu » (Site web [7]).

Ces molécules très réactives sont appelées radicaux libres ou espèces oxygénées réactives (EOR ou ROS en anglais pour reactive oxygen species) (Site web [7]).

I.3.2 Définition des radicaux libres

Ce sont des atomes, ou un groupe d'atomes, avec un nombre impair d'électrons, et ils peuvent se former quand l'oxygène interagit avec certaines molécules. Les radicaux libres réagissent rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir de la stabilité (Pellik et Lylym, 2003).

I.3.3 Formation des radicaux libres

La production des radicaux libres nocifs au cours du métabolisme normal augmente lors de l'exposition à des agressions de l'environnement (infection, fumée de cigarette, pollution, rayonnement). Lorsqu'ils ne sont pas neutralisés par le système de défense antioxydant de l'organisme, ils engendrent le stress oxydatif : déséquilibre entre la production et la neutralisation des radicaux libres (Pellik et Lylym, 2003).

I.3.4 Mécanisme réactionnel de l'oxydation

L'oxydation concerne les matières grasses insaturées et comporte trois étapes qui sont l'initiation, la propagation et la terminaison. Au cours de l'initiation, il y a formation de radicaux libres puis de radicaux hydroperoxydes en position α d'une double liaison. La chaleur, la présence de traces de sels de métaux de transition et la lumière ultraviolette sont des agents d'initiation.

Cette première étape, appelée également période d'induction, correspond à une période d'absorption lente de l'oxygène atmosphérique. La deuxième étape est la propagation- au cours de laquelle on assiste à une formation plus accélérée d'hydroperoxydes, ce qui se traduit par une forte consommation d'oxygène. La dernière étape consiste en la combinaison des radicaux formés au cours des deux premières étapes en composés non radicalaires. Le mécanisme réactionnel de l'oxydation des lipides comprend trois phases (Yaacoub, 2009) :

- **Initiation**

En présence d'un initiateur (I), les lipides insaturés (RH) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical libre centré sur le carbone (R^\bullet) (radical alkyle).



- **Propagation**

Le radical alkyle, très réactif fixe une molécule d'oxygène, pour former un radical hydroperoxyde instable, centré sur l'oxygène (2). Celui-ci arrache à son tour un hydrogène labile d'un deuxième acide gras, formant un hydroperoxyde non radicalaire plus stable (3), mais générant une nouvelle espèce radicalaire sur le deuxième acide gras.



Comme le montre la figure 4 citée ci-dessus, la phase de propagation peut elle-même être décomposée en deux étapes séquentielles (Judde, 2004) :

1- La première étape correspond à l'apparition des peroxydes, composés primaires d'oxydation, à partir des radicaux libres instables : la quantité de peroxydes formés peut être évaluée analytiquement grâce à la détermination de l'indice de peroxyde.

2- La deuxième étape se traduit par l'évolution des hydroperoxydes en composés secondaires d'oxydation, par deux voies principales :

- **La scission** : conduisant par coupure à la libération de composés volatiles (chaînes carbonées courtes et moyennes), notamment aldéhydiques, responsables des saveurs de rance, caractérisés par un seuil de détection très faible.

- **Le remaniement** : conduisant suite à différents types de pontage intra- ou inter-acides gras ou suite à l'apparition de fonctions oxydées. A ce stade dit de rancissement, le goût rance est bien entendu perceptible.

- **La phase de terminaison :**

Pendant cette phase, les espèces radicalaires réagissent entre elles pour donner des espèces non radicalaires- mettant ainsi fin aux cycles réactionnels.

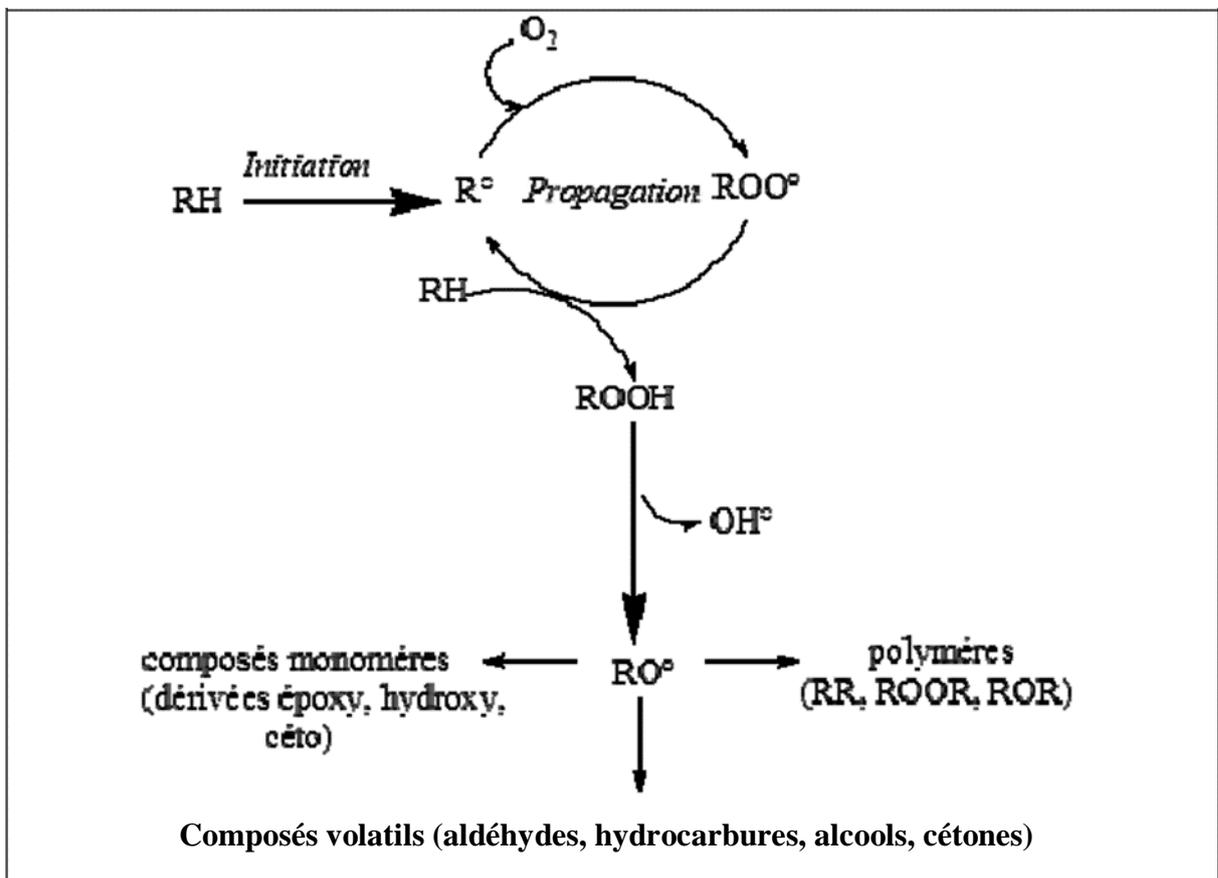


Figure I-7 : Schéma simplifié de l'auto-oxydation (Joaqin, 2002)

I.3.5 Conséquences du stress oxydant sur l'organisme

Le stress oxydant conduit à la production de molécules biologiques défaillantes voire cancéreuses et à la surexpression de certains gènes. De ce fait, il est à l'origine de très nombreuses maladies telles que la cataracte, la sclérose, le syndrome de détresse respiratoire aigu (McGuire et *al.*, 1982), l'œdème pulmonaire ainsi que le vieillissement accéléré des tissus (Sohal et *al.*, 2002), les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Montagnier et *al.*, 1998). De plus, le stress oxydant entraîne des complications diabétiques au niveau macro ou micro-vasculaire ainsi qu'une augmentation de la résistance à l'insuline (Sato et *al.*, 1979). Les EOR seraient impliquées dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer (Evans et *al.*, 1989 ; Perry et *al.*, 2002) où la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres. La maladie de Parkinson serait quant à elle due à un dysfonctionnement mitochondrial et un défaut de l'élimination des protéines oxydées (Gutteridge, 1993). Enfin, le stress oxydant joue un rôle non négligeable dans la cancérogénèse. En effet, les radicaux libres interviennent dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes. Ces molécules carcinogènes créent des lésions de l'ADN, amplifient les signaux de prolifération et inhibent des gènes suppresseurs de tumeurs.

Les radicaux libres sont produits *in vivo* sous l'action de plusieurs systèmes biochimiques, mais également sous l'influence d'autres facteurs endogènes, notamment le stress intellectuel ou thermique. Des facteurs exogènes liés à l'environnement ou au mode de vie sont également à l'origine d'une augmentation du stress oxydant dans l'organisme. Parmi ces facteurs exogènes, on peut citer : l'exposition prolongée au soleil, aux rayons γ ou UV (Podda et *al.*, 1998 ; Heck et *al.*, 2003), la pollution et les gaz atmosphériques, le contact avec des agents cancérogènes (amiante), le tabagisme, la prise de médicaments, la pratique trop intensive ou mal gérée du sport, la consommation excessive d'alcool (Sergent et *al.*, 2001), une alimentation déséquilibrée (carences en vitamines et oligo-éléments) ou encore les situations cliniques (chirurgie, transplantation).

I.4 Les antioxydants

À la fin du XIX^e siècle, leurs propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leur utilisation dans les procédés industriels afin de réduire la corrosion des métaux, la vulcanisation du caoutchouc et la polymérisation des carburants dans les moteurs à explosion.

En biologie, les premières recherches sur les antioxydants concernèrent la réduction de l'oxydation des acides gras insaturés. Cependant, ce n'est qu'avec l'identification des vitamines A, C et E qu'est apparue leur importance dans la biochimie des organismes vivants. En 1969, McCord et Fridovich ont isolé à partir de globules rouges humains un système enzymatique pouvant éliminer un radical

libre présent dans les organismes vivants (anion superoxyde) Defraigne, 2007) et les mécanismes possibles des antioxydants ont été étudiés à partir du moment où l'on a compris qu'une substance antioxydante devait être elle-même facilement oxydable (Site web [8]).

I.4.1 Définition et classification

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Il est défini par Halliwell (Marc et *al.*, 2004) comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres.

I.4.1.1 Antioxydants naturels

L'organisme dispose d'un vaste réseau d'antioxydants : un certain nombre d'enzymes sont synthétisées pour réparer les éventuels dommages oxydatifs au niveau des protéines ou de l'ADN, d'autres sont obtenus à partir de l'alimentation (Pelli, 2003). Les antioxydants issus des plantes sont efficaces dans l'industrie agroalimentaire et pour la santé humaine (les composés phénoliques, les composés azotés, les caroténoïdes, l'acide ascorbique) (Pushparaj, 2014). D'autres antioxydants sont présents dans presque tous les micro-organismes, les champignons et même dans les tissus animaux.

- **Les caroténoïdes** : sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules. Ils sont présents dans les carottes, les fruits rouge et jaune, les légumes verts et les tomates (Marc et *al.*, 2004). Les principaux caroténoïdes sont le β -carotène, le lycopène, la lutéine et l' α -carotène. L'activité anti-oxydante de ces molécules repose principalement sur la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein de leur structure (Mortensen et *al.*, 2001). Elles sont particulièrement efficaces dans la neutralisation de l'oxygène singulet et jouent le rôle de bouclier contre la photoinitiation de réactions radicalaire par les rayonnements UV. Le rôle biologique des caroténoïdes est, entre autres, complémentaire de celui de vitamine E, elle-même régénérée par la vitamine C, d'où l'intérêt de consommer une alimentation équilibrée, riche en fruits et légumes variés pour bénéficier des nombreux effets de synergie entre micronutriments (Miller et *al.*, 1996). Différents systèmes *in vitro* ont confirmé le rôle protecteur de ces molécules. Cependant, les études effectuées *in vitro* sont peu nombreuses et le rôle anti-radicalaire des caroténoïdes reste à préciser.

• **La vitamine E** : elle désigne une famille de molécules liposoluble. Il en existe quatre isomères (α -, β -, γ -, δ - tocophérol) dont l'activité anti-oxydante est fortement tributaire à la structure. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. En effet, son activité anti-oxydante est extrêmement efficace et l'on estime qu'une molécule d' α -tocophérol peut inhiber la peroxydation de 1000 molécules d'acide gras polyinsaturé. Aux concentrations élevées, il peut jouer le rôle de pro-oxydant. Il semble que parmi les quatre principaux tocophérols, l' α -tocophérol est plus rapidement oxydé à l'air et formerait un excès de radicaux libres tocophéroxyles susceptibles de relancer le mécanisme de l'autoxydation (Cillard et *al.*, 1980). La vitamine E est présente dans les huiles végétales telles que l'huile de colza, ainsi que les noix, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes.

• **Vitamine C** : ou l'acide ascorbique, c'est un micronutriment qui n'est pas synthétisé par l'organisme humain et doit être apporté dans les aliments, on le trouve en grande quantité dans les agrumes, le kiwi, le persil. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, la vitamine C passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui sera régénérée par le glutathion. Celle-ci est capable de capter l'oxygène singulet et certains espèces radicalaire (Pokorny et *al.*, 2000). C'est ainsi qu'elle protégerait la peau de la toxicité induite par les rayonnements ultraviolets. Cependant, à forte concentration, la vitamine C peut se comporter comme un pro-oxydant générateur des radicaux libres.

• **Les composés phénoliques** : également appelés « polyphénols », ces derniers représentent une famille de molécules très largement répandus dans le règne végétal. Leur diversité est due à leur structure qui constituée d'un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupement hydroxyles (Bloor, 2001). Les polyphénols principalement, flavonoïdes, acide phénolique, tannins, constituent une richesse déjà largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Les relations structure-activités anti-oxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité anti-oxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales.

I.4.1.2 Antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques (BHT, BHA, TBHQ...) sont utilisés depuis longtemps, mais beaucoup d'études récentes ont porté sur leur toxicité élevée (Pelli, 2003 ; Moghaddam, 2015). Le besoin de réduire leur utilisation impose d'orienter le marché vers des antioxydants naturels et stimule la recherche (Penchev, 2010).

I.4.2 Les antioxydants du *Rosmarinus officinalis* L.

Divers extraits d'herbes pouvant être utilisées en tant qu'antioxydant naturel sont à l'étude à l'heure actuelle. Parmi ces extraits naturels qui sont susceptibles d'être utilisés industriellement figurent les extraits des herbes de Lamiaceae qui contiennent des niveaux élevés des antioxydants diététiques (Zheng et Wang, 2001 ; Dragland et *al.*, 2003 ; Shan et *al.*, 2005 ; Halvorsen et *al.*, 2006), et le pouvoir antioxydant in vitro de ces herbes a été indiqué dans de nombreuses études (Exarchou et *al.*, 2002 ; Pizzale et *al.*, 2002 ; Dorman et *al.*, 2004).

Le romarin appartenant à cette famille, possède une activité anti-oxydante caractérisée par la capacité à inhiber les radicaux libres (Vareltzis et *al.*, 1997). On dit que ses extraits sont très efficaces pour retarder l'oxydation des lipides et pour protéger les cellules vivantes des dommages causés par le stress oxydatif (Chen et *al.*, 1992 ; Wang et *al.*, 1995).

L'usage traditionnel de romarin comme épice, ainsi que les propriétés anti-oxydantes de ses feuilles ont poussé plusieurs groupes de recherche à étudier la composition de la plante et les constituants responsables de cette activité :

- La première approche pour l'utilisation des plantes aromatiques comme antioxydant est décrite par Chipault et *al.* en 1952.
- En 1955, Rac et Ostric ont utilisé l'extrait des feuilles du romarin comme antioxydant naturel (Culevier et *al.*, 1996 ; Boukhalifa, 1995).
- En 1966, Briscon et *al.*, ont isolé le carnosol dans le romarin et ils ont attribuée l'activité anti-oxydante à ce principe actif.
- Dans les années soixante et soixante-dix, la plus part des travaux dans cet axe sont effectués par les chercheurs japonais, Siao et *al.*, en 1976.
- Fin des années soixante et soixante-dix, Chang et *al.* proposent un système d'extraction des antioxydants naturels de romarin et de soja. Une revue complète de ce sujet est publié en 1985 par Kramer.
- Dans les années quatre-vingt-dix, les recherches sont orientés vers (Paris et *al.*, 1993 ; Schwarz et Ternes, 1992 ; Naktani et Inatani, 1984 ; Culevier et *al.*, 1996) :
 - L'isolation de l'acide carnosique à partir du romarin et la synthèse des autres diterpènes phénoliques ;
 - L'étude des différentes activités biologiques de cette fraction (diterpènes phénoliques) (in système vivo ou vitro).

Les extraits de romarin contiennent plusieurs composés dont les effets antioxydants ont été montrés. Ces composés appartiennent essentiellement à la classe des acides phénoliques, des flavonoïdes, des diterpénoides et triterpènes (European Food Safety Authority, 2008). Les propriétés anti-oxydantes des extraits du romarin sont principalement dues à l'acide carnosique, à l'acide rosmarinique et au carnosol (Culevier et *al.*, 1996, Richheimer et *al.*, 1996). Selon Aruoma et *al.* (1992), l'activité anti-oxydante des extraits de romarin est due à plus de 90% à l'acide carnosique et au carnosol.

Les diterpènes phénoliques et les acides phénoliques comptent parmi les anti-oxydants hydrosolubles identifiés dans le romarin (Bounoua et Boumahdi, 2013). Ces composés se trouvent, en grande partie, comme aglycones des hétérosides, c'est-à-dire, liés chimiquement aux groupes hydroxyles des sucres, contenus dans la plante (Bravo, 1998). La liaison entre la partie glucidique et la partie aglycone se faisant par un atome d'oxygène, on dit que ces deux parties ont une liaison O-glycosidique et qu'on est en présence d'un O-hétéroside. L'hydrolyse des hétérosides redonne l'ose et la partie aglycone (Gomez, 2014). Les hétérosides phénoliques n'ont pas d'activité biologique, mais les aglycones libérés après hydrolyse sont des puissants antioxydants (Brito-Arias, 2007).

L'industrie agroalimentaire a récemment découvert les puissantes propriétés anti-oxydantes du romarin. La plante pourrait en effet remplacer le BHT et le BHA, les deux antioxydants de synthèse utilisés pour la conservation des aliments, mais qui ont l'inconvénient de présenter un risque cancérigène.

En effet, dans notre travail du master (Khair, 2016), on a bien démontré que l'extrait du romarin purifié par l'acétate d'éthyle présente une activité anti-oxydante très proche du BHT.

I.4.3 Évaluation de l'activité antioxydante

Les propriétés antioxydantes peuvent être évaluées par plusieurs méthodes : les méthodes évaluant la peroxydation des lipides nécessitant des conditions d'oxydation accélérées, et celles mesurant l'activité antiradicalaire regroupées selon la réaction chimique ayant lieu : transfert d'électron singulet ou d'atome d'hydrogène (Miguel, 2009).

I.4.3.1 Les méthodes se basant sur le transfert d'atome d'hydrogène

L'antioxydant réduit le radical libre en lui donnant un atome d'hydrogène selon la réaction suivante : $X^\circ + AH \rightarrow XH + A^\circ$, cette réaction est très rapide (quelques secondes). Ces méthodes

incluent : total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) ; crocin-bleaching assay (CBA) et oxygen radical absorbance capacity (ORAC) plus récente et applicable sur toutes les matrices (Miguel, 2009).

- **Test ORAC**

Ce test a été développé en 1994 et mesure le taux d'inhibition du radical libre peroxyde d'hydrogène. Il est basé sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'un oxydant chimique l'AAPH (un radical peroxy libre stable). Le produit à tester peut être capable de protéger la fluorescéine et réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence. Il possède alors un pouvoir antioxydant. C'est la seule qui combine à la fois le pourcentage d'inhibition de la réaction d'oxydation et la longueur dans le temps de cette inhibition en une seule mesure. Son avantage majeur est de proposer une mesure standardisée et largement acceptée (Agrobio, 2009).

I.4.3.2 Les méthodes se basant sur le transfert d'électron singulet

Ces méthodes détectent l'habilité d'un antioxydant à céder un électron pour réduire n'importe quel composé en causant un changement de couleur. Ces réactions sont généralement lentes, le calcul se base sur le pourcentage d'inhibition de l'agent d'oxydation.

Ces méthodes incluent : Potentiel antioxydant total en utilisant le Cu(II) comme oxydant, Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), Trolox equivalence antioxidant capacity (TEAC) et 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) qui sont couramment utilisées pour analyser les extraits de plantes et de fruits (Miguel, 2009).

- **Test TEAC**

Il est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical ABTS⁺ de coloration bleuvert en le transformant en ABTS⁺ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre.

La capacité antioxydante, exprimée en équivalent Trolox (TEAC), correspond à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester à une concentration. Le résultat est donné en μM ou mM d'équivalent Trolox par g de produit ou par mL s'il s'agit d'un liquide (Agrobio, 2009).

• Test DPPH

Il est basé sur la réduction du radical libre 1,1-diphényl-2-picryl hydrazyl (α, α -diphényl- β -picrylhydrazyl) ; DPPH (Figure I-8). Le radical libre DPPH est stable grâce à la délocalisation de son électron autour de la molécule, qui donne une couleur violette caractérisée par une absorption dans l'éthanol ou méthanol dans une bande comprise entre 515 nm et 520 nm. Un antioxydant aura la capacité de donner un atome d'hydrogène au radical libre DPPH et le transformer à un état réduit (Figure I-9) avec la perte de la couleur violette et l'apparition d'une couleur jaune.

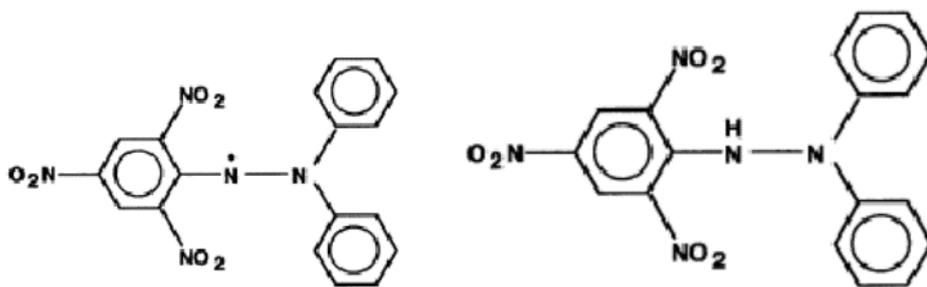


Figure I-8 : Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre) **Figure I-9** : Diphenylpicrylhydrazyl (réduit)

On associe généralement au test DPPH la valeur EC_{50} ou IC_{50} qui représente la quantité d'un antioxydant nécessaire pour faire diminuer de 50% la quantité initiale de DPPH. Plus la valeur de IC_{50} est faible, plus l'activité antioxydante est importante (Miguel, 2009).

Cette méthode est très utilisée actuellement pour étudier les extraits végétaux et alimentaires pour mesurer la capacité antioxydante totale et permet de faire une comparaison des activités antioxydantes. Son avantage majeur par rapport aux autres méthodes est la solubilité du DPPH dans les solvants aqueux et organique (polaire et non polaire).

I.4.4 Effet des antioxydants sur la santé humaine

Lors de la photosynthèse, les plantes fabriquent des substances antioxydantes pour se protéger des effets délétères des radiations solaires. Par conséquent, des vitamines (C, E, caroténoïdes) et des enzymes (catalases, peroxydases) sont synthétisés. De plus, Ces plantes élaborent des flavonoïdes qui préviennent l'oxydation. Ces substances jouent deux rôles au niveau de la plante : celui d'un filtre solaire et celui d'un antioxydant vis à vis des radicaux libres produits par les radiations. Tous ces antioxydants sont directement assimilables par notre organisme quand on

consomme des végétaux ou des produits dérivés de ceux ci. Il existe une forte corrélation entre la consommation de légumes et de fruits et une moindre incidence des maladies cardio-vasculaires et les cancers. Les antioxydants végétaux ont des propriétés protectrices en matière de vaisseaux sanguins, leurs vertus antvieillessement et leurs implications probables dans la prévention des pathologies liées au stress oxydatif. Les potentiels antioxydants, comparés à celui de la vitamine E. les plus élevés pour les fruits et légumes sont respectivement ceux de la fraise et l'ail (Aoucher, 2010 ; Salhi et Sehal, 2012).

I.4.5 Applications des antioxydants

L'oxydation des lipides insaturés en présence d'oxygène sont des troubles majeurs qui, peuvent intervenir soit dans la cellule elle-même, soit lors de la préparation et de la conservation du produit utilisé par l'homme dans des domaines variés comme l'agroalimentaire, la pharmacologie et la cosmétique. Elles conduisent à la formation de radicaux libres très réactifs et à dérivés toxiques souvent carcinogènes et dont certains présentent des odeurs ou des saveurs désagréables.

L'addition des antioxydants est une solution pour protéger de tels produits de l'oxydation. L'objectif principal est d'empêcher l'altération des caractéristiques du produit par inhibition de l'oxydation. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation de ce dernier.

Les antioxydants sont utilisés dans le but d'entretenir la santé et de prévenir certaines maladies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et coronariennes, la cataracte, la dégénérescence musculaire liée à l'âge (DMLA) et les problèmes articulaire. Ils permettent aussi de favoriser la réponse et la protection immunitaire, ainsi de lutter contre les signes de vieillesse dus essentiellement à la destruction des cellules.

Un bon antioxydant doit présenter plusieurs propriétés :

- Efficacité à faible concentration
- Compatibilité physique et chimique avec le substrat qu'il est censé protéger
- Absence de toxicité

Même si des études suggèrent que les compléments d'antioxydants sont bénéfiques à la santé, de nombreux travaux cliniques ont prouvé qu'un excès de suppléments ou compléments en antioxydants peut, parfois, avoir des effets négatifs.

I.5 Mécanisme et Techniques extractives

L'extraction des principes actifs contenus dans les plantes, date de la plus haute antiquité. L'homme a en effet découvert très tôt les bienfaits des végétaux et les premières techniques pour en retirer ce que l'on appelle aujourd'hui un "extrait". Les premiers extraits sont obtenus principalement par distillation aqueuse ou fermentation alcoolique, les méthodes d'extraction ont évolué au fil du temps grâce aux avancés du génie des procédés : les ultrasons, les micro-ondes, les hautes pressions sont devenues, aujourd'hui, des termes fréquents dans l'extraction végétale. Dans ce chapitre, nous nous limiterons à la présentation de quelques techniques d'extraction par solvant.

I.5.1 Extraction solide-liquide

L'extraction solide/liquide est une opération de séparation d'un ou plusieurs constituants solides ou liquides contenus dans un corps solide par solubilisation dans un fluide. Ce fluide, appelé généralement solvant, peut être un liquide ou un gaz (vapeur d'eau ou fluides supercritiques) (Herzi, 2013).

Pour la thermodynamique, le corps solide est un mélange homogène à l'équilibre c'est-à-dire qu'il ne subit pas de modification en absence de perturbation extérieur. En extraction solide/liquide, l'apport d'une énergie thermique et mécanique crée un déséquilibre, les molécules actives présentes dans la plante (soluté) diffusent alors vers l'extérieur sous l'effet du gradient de concentration en soluté entre la solution au voisinage intime de la phase solide (plus concentrée) et la phase liquide. L'opération s'achève quand les concentrations des deux côtés deviennent égales.

Par contre si la phase liquide est continuellement renouvelée, la diffusion se poursuit jusqu'à épuisement de la phase solide (Dibert, 1989).

I.5.2 Mécanisme de l'extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide (ou extraction par solvant) est une opération de transfert de matière destinée à séparer les principes solubles d'un substrat solide par leur diffusion dans un solvant. Les mécanismes d'extraction et leurs importances relatives varient considérablement selon la nature du produit traité (Aurelio, 2002). Il est néanmoins possible de schématiser le déroulement de l'extraction au solvant de la manière suivante :

Une phase initiale : dans un premier temps, on assiste à un gonflement des particules, témoignant d'une sorption du solvant dans la phase solide. Cette sorption est provoquée par les forces osmotiques, les forces de capillarité et de solvation des ions intracellulaires. Une certaine

proportion de soluté contenu dans les cellules blessées est directement extraite ; c'est ce qu'on appelle le lessivage. A cette dissolution initiale s'ajoute très souvent une solubilisation par hydrolyse d'une fraction naturellement insoluble. L'hydrolyse peut être purement chimique ou plus fréquemment enzymatique. Finalement, le solvant chaud dénature les cellules par coagulation des lipoprotéines rendant la perméabilité des parois cellulaires de moins en moins sélective. Par réchauffement, le volume de la phase liquide interne augmente, donnant lieu à des surpressions qui entraînent des courants de solutions centrifuges à travers les pores.

Une période de diffusion : la dénaturation cellulaire rendant les membranes perméables, le processus de diffusion peut avoir lieu. Celui-ci se déroule en deux phases : Une phase interne à l'intérieur de la phase solide et une phase externe à travers les couches limites entre les particules. Il est difficile de déterminer dans ces différentes étapes à laquelle constitue le facteur limitant pour la vitesse d'extraction. En fait, ce facteur varie d'un produit à l'autre, et peut changer en fonction, par exemple, de la taille des particules.

I.5.3 Technique extractives

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, éthanol, méthanol, moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone (Kim et Lee, 2002; Dapkevicius et al., 1998). Cependant il existe plusieurs techniques pour l'extraction des concrètes et des oléorésines, ces techniques peuvent être subdivisées en techniques dites conventionnelles (extraction par Soxhlet, macération avec un mélange alcool-eau, extraction en mode batch) et en techniques nouvelles (extraction par solvant accéléré, extraction par fluide supercritique)

Le choix de la méthode la mieux adaptée à l'extraction se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'extrait et de son usage (Abdoul, 2002).

I.5.3.1 Méthodes classiques

- **Extraction dans un Soxhlet**

L'extraction par Soxhlet, employé pendant longtemps, est une technique standard et la référence principale pour évaluer la performance d'autres méthodes d'extraction solide-liquide. Il s'agit d'une technique générale et bien établie, et qui dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction, excepté dans le cas de l'extraction des composés thermolabiles (Luque de Castro et Garcia-Ayuso, 1998).

Le système Soxhlet est constitué par un ballon, un Soxhlet et un réfrigérant (Figure I-10). La matière végétale est placée dans une cartouche, le ballon est rempli d'un volume adéquat de solvant frais et placé dans un chauffe-ballon. Les vapeurs du solvant sont condensées et descendent sous forme liquide dans la cartouche contenant la plante, Quand le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire la solution de la cartouche et la décharge de nouveau dans le ballon à distiller, portant les corps dissous extraits dans le liquide en bloc. Dans le ballon, le corps dissous (soluté) est séparé du solvant par distillation. Le soluté reste dans le flacon et le solvant frais passe de nouveau dans le lit de solide. L'opération est répétée jusqu'à ce que l'extraction complète soit réalisée.

L'extraction par Soxhlet dépend fortement des caractéristiques de la matrice solide et de la dimension des particules vu que la diffusion interne est souvent l'étape limitante pendant l'extraction (Luque-Garcia et Luque de Castro, 2004).

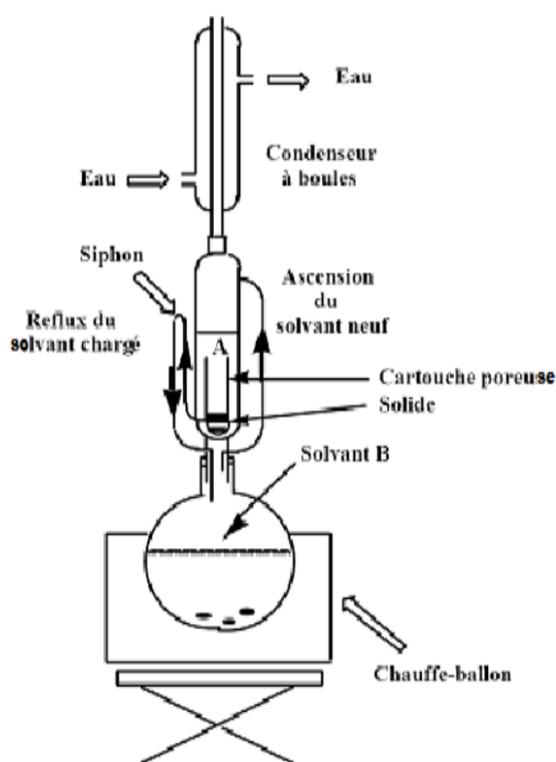


Figure I-10 : Dispositif expérimental d'un extracteur Soxhlet (Penchev, 2010).

Les avantages du Soxhlet sont les suivants :

- L'échantillon entre rapidement en contact avec une portion fraîche de solvant, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant.
- Une bonne reproductibilité, efficacité et aisance lors de la manipulation des extraits
- Le maintien d'une température relativement élevée d'extraction avec la chaleur du ballon à distiller,
- Aucune nécessité de filtration après l'extraction. En outre, la méthode de Soxhlet est très simple et bon marché

Les inconvénients les plus significatifs de cette méthode sont :

- la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée, ce qui conduit non seulement à des pertes économiques mais pose aussi des problèmes sur le plan environnemental.
- Les échantillons étant portés à haute température pendant une période relativement longue, le risque de thermodestruction de certains composés n'est pas à négliger si la matière végétale contient des composés thermolabiles.
- Etant donné la grande quantité de solvant utilisée, l'étape postérieure d'évaporation/concentration devient limitante. Des échauffements locaux sont également possibles (Penchev, 2010).

- **Extraction en mode batch**

Dans ce mode d'extraction, la matrice végétale est immergée dans le solvant pendant un temps suffisamment lent pour atteindre l'équilibre. L'extrait est ensuite collecté pour être purifié (Chung-Hung et *al.*, 2014). L'avantage majeur de l'extraction en mode batch par agitation dans le Soxhlet est la possibilité de travailler facilement avec des mélanges de solvants (par exemple diverses proportions alcool-eau) et de contrôler la température d'extraction, en évitant le risque de destruction des composés thermolabiles. C'est une méthode simple et efficace mais qui exige des procédures postérieures de filtration et de concentration relativement longues (Chung-Hung et *al.*, 2014).

- **Infusion**

L'eau bouillante est versée sur les feuilles ou sur les fleurs finement hachées pour qu'elles libèrent tout l'arôme et leur principe actif. On laisse infuser une dizaine de minutes (France-Ida, 1996 ; Collin, 1997).

- **Décoction**

La plante est mise dans l'eau froide, portée à ébullition. Cette méthode de transformation ne permet pas d'extraire autant de principes actifs que l'infusion, mais elle est adaptée aux racines et aux écorces pour lesquelles l'extraction est difficile (France-Ida, 1996; Collin, 1997).

- **Macération**

C'est l'action de laisser séjourner à froid dans un solvant organique une substance pour en extraire les constituants solubles (Chiasson et *al*, 2001).

- **Relargage**

Le relargage est un procédé qui consiste, lorsqu'un produit est soluble à la fois dans l'eau et dans un autre liquide non miscible à l'eau, à ajouter à ce mélange liquide un peu de chlorure de sodium pour faciliter la séparation. En effet, la solubilité du produit concerné est moins importante dans l'eau salée que dans l'eau pure (augmentation de la force ionique du milieu). De plus, la densité de la phase aqueuse saline est plus grande que celle de l'eau.

I.5.3.2 Méthodes alternatives

- **L'extraction accélérée par solvants**

L'extraction accélérée par solvants est une technique qui utilise les solvants conventionnels à des températures (50 – 200 °C) et des pressions (100 – 150 bar) élevées. La pression est maintenue assez élevée pour maintenir le solvant à l'état liquide à température élevée tout en restant au-dessous des conditions critiques. Les avantages de cette technique devant les techniques conventionnelles sont les suivants : on évite les échauffements locaux et on consomme de plus petites quantités de solvant en comparaison à l'extraction par Soxhlet et par batch avec agitation. Ses inconvénients sont liés à la non sélectivité, ce qui impose des procédures supplémentaires de nettoyage des extraits. Les températures opératoires élevées peuvent mener à une dégradation des solutés thermolabiles (Chung-Hung et *al.*, 2014).

- **Extraction par fluide supercritique**

L'état supercritique d'un composé organique pur est atteint lorsque celui-ci est placé dans des conditions de pression et de température supérieures aux valeurs de ses points critiques. Au de là de ces valeurs le fluide est dit supercritique et possède des propriétés à la fois proche d'un gaz et d'un liquide qui vont être intéressantes pour l'extraction de molécules à partir de matière végétale (Thomas, 2011), les avantages principaux de cette méthode sont :

- la puissance de dissolution d'un solvant liquide supercritique dépend de sa densité, qui est fortement réglable en changeant la pression ou/et la température
- le fluide supercritique a un coefficient de diffusion plus élevé et une tension superficielle plus faible ainsi qu'une viscosité inférieure à celle d'un solvant liquide, menant à un transfert de masse plus favorable (Ben Amor, 2008).

La SFE est principalement utilisé avec le CO₂ supercritique, car celui-ci est peu coûteux (sous-produit de l'industrie), non-inflammable, largement présent dans l'atmosphère, facile à éliminer et nécessite des conditions critiques faciles à atteindre (T = 31.1°C, P = 73.8 bar).

Cependant le CO₂ supercritique est hydrophobe, il est souvent ajouté à un solvant polaire (éthanol, méthanol) pour extraire les composés polaires.

- **Extraction assisté par micro-ondes**

L'efficacité de cette technique réside dans son principe de chauffage qui est dû à deux phénomènes qui interviennent simultanément : la conduction ionique et la rotation dipolaire : la conduction ionique est due à la migration électro phorétique des ions dans un champ électromagnétique. La résistance du milieu à ces courants ioniques induit des frictions libérant de la chaleur par effet Joule.

La rotation dipolaire correspond au phénomène d'alignement/réalignement des molécules possédant un dipôle dans un champ électrique alternatif de haute fréquence (Figure I-11). En l'absence de champ électrique, ces molécules sont orientées aléatoirement. Sous l'effet d'un champ électrique continu, les molécules s'orientent dans la direction du champ électrique. Cette technique a montré l'augmentation des rendements et minimiser les temps d'extraction (Chan et *al.*, 2011 ; Li et *al.*, 2010).

Les mouvements de réalignement vont être perturbés par les liaisons qui existent entre les molécules (liaisons hydrogène, liaisons de Van der Waals) induisant des frictions entre molécules et par conséquent une libération d'énergie thermique (Thomas, 2011).

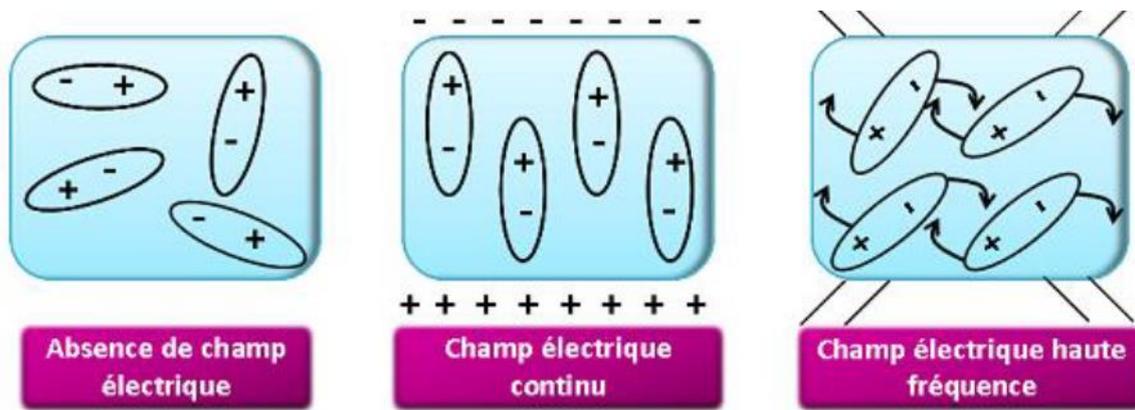


Figure I-11 : Représentation schématique du comportement de molécules possédant un dipôle en l'absence de champ électrique, sous l'effet d'un champ électrique continu et sous l'effet d'un champ électrique de haute fréquence (Thomas, 2011).

- **Extraction par ultrason**

Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 16 KHz à 1 GHz pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz. La propagation des ondes, dans un milieu liquide, va générer des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression) (Marston, 2011). Cette différence de pression permet de créer des mouvements moléculaires et d'augmenter la distance entre elles pendant la raréfaction. Ainsi, des bulles de cavitation se forment et deviennent asymétrique à proximité d'une surface solide ce qui permet de projeter des jets de liquide à très grande vitesse (Figure I-12) (Kim *et al.*, 2010). Dans le cas d'une matrice végétale, ces jets de liquides vont percer les parois végétales et permettre ainsi la libération des molécules dans le milieu liquide (Marston, 2011).



Figure I-12 : Évolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide (Kim *et al.*, 2010).

Les principaux avantages de l'utilisation des ultrasons dans l'extraction solide-liquide incluent :

- L'augmentation de la cinétique et du rendement d'extraction,
- Réduction de la température de fonctionnement permettant l'extraction des composés thermolabiles,
- Faible coût de l'appareillage et facilité de l'opération par comparaison à d'autres nouvelles techniques d'extraction telles que l'extraction assistée par micro-ondes,
- Possibilité d'utilisation de n'importe quel solvant ce qui permet d'intervenir dans l'extraction d'une large variété de composés naturels (Ben Amor, 2008).

Cependant une dispersion non homogène de la phase solide peut contribuer à l'atténuation des ondes ultrasons, et la zone qui subit les ultrasons est alors restreinte à une zone localisée près de l'émetteur ce qui peut réduire le rendement d'extraction (Marston, 2011).

I.5.4 Facteurs influençant les performances de l'extraction

- **PH**

Le pH du milieu d'extraction intervient essentiellement au niveau de la dissolution des composés solubles et au niveau de la solubilisation de la fraction hydrolysable. Les macromolécules douées d'une certaine polarité ne sont solubles que si le pH du solvant est éloigné de leur point isoélectrique. D'autre part, le pH agit sur les hydrolyses chimiques et enzymatiques (Su et Willey 1998 ; Aurelio 2002 ; Lambelet et Werner 2002).

- **Taille des particules**

Les auteurs s'accordent sur l'effet généralement positif du broyage sur les opérations d'extraction. Le broyage du solide permet d'augmenter la surface spécifique et réduire la distance de pénétration dans le matériel (Ben Amor, 2008). La diminution de la taille des particules permet aussi d'augmenter le gradient de concentration et d'intensifier l'opération de transfert (Mafart et Béliard, 1993).

Cependant, la finesse des particules est limitée car un broyage intense peut conduire à l'évaporation des composés volatils et la suppression des éléments actifs. Les particules très fines réduisent la perméabilité du lit solide et créent ainsi des chemins préférentiels bloquant ainsi le processus d'extraction dans des endroits où le solvant ne peut pas circuler.

- **Nature du solvant**

Un solvant est, par définition, une substance qui a le pouvoir de former avec d'autres substances une solution homogène (Gerin, 2002), le choix du solvant se base sur plusieurs critères : sélectivité, température d'ébullition peu élevée, faible viscosité, inflammable, non explosif, caractéristiques économiques (Leybros et Fremeaux, 1990). Le solvant doit aussi avoir un bon pouvoir solubilisant et extractant des composés intéressés.

- **Pouvoir de solubilisation**

Le pouvoir de solubilisation d'un solvant est rattaché à sa polarité et son hydrophilie, ces dernières sont notamment révélées par :

- La présence de groupes fonctionnels dissociant,
- Le potentiel de liaison hydrogène et la faculté de mise en commun d'électrons

Les substrats végétaux peuvent atteindre des teneurs en eau dépassant les 80% pour les matières fraîches, par conséquent l'affinité eau/solvant conditionne la diffusion dans les tissus riches en eau interstitielle et dans les cellules où l'eau libre est abondante.

La polarité d'un solvant est un indicateur de son affinité vis-à-vis de l'eau, une forte polarité se traduit soit par une action directe du solvant sur les constituants polaires du contenu cellulaire, soit par une solubilisation de certains de ces constituants ou encore par une rupture des interactions (Schultz et Ambroscheit, 1989).

L'estimation du pouvoir solubilisant ne doit pas se reposer sur la seule solubilité (ou l'insolubilité) des corps purs dans le solvant .mais doit tenir compte que les principes existent dans la plante, le plus souvent, sous forme de complexes ce qui modifie les solubilités, ainsi une substance insoluble dans l'eau à l'état pur pourra se trouver en abondance dans un soluté aqueux végétal (Ollier, 1991).

- **Le pouvoir extractant :**

Le pouvoir extractant est défini par la capacité du solvant à pénétrer et à diffuser dans la structure végétale, il est lié au pouvoir solvant ainsi que la sélectivité chimique et peut être apprécié par :

- La capacité de pénétration qui dépend de la tension superficielle et de la viscosité,
- La capacité de diffusion.

La diffusion a lieu grâce au gradient de concentration du soluté dans le solide (végétal) et la phase liquide (solvant), elle est accélérée par une viscosité faible et une masse volumique peu élevée, Ces derniers paramètres permettent aussi de faciliter l'agitation du solvant et d'améliorer sa séparation mécanique (Leybros et Fremeaux, 1990 ; Dibert, 1989).

- **La température**

L'élévation de la température permet généralement d'augmenter le rendement, en effet :

- La chaleur facilite l'extraction en perméabilisant les parois cellulaires par dénaturation,
- La gamme des hautes températures usuelles, augmente la solubilité des matières à extraire,
- Elle augmente les coefficients de diffusion,
- Enfin, elle diminue la viscosité des solvants d'extraction, ce qui facilite non seulement le passage du solvant à travers la masse de substrat solide, mais aussi les opérations ultérieures de séparation (Ben Amor, 2008).

Cependant, la température opératoire est limitée par les risques d'extraire des composés nuisibles, de dégradation thermique du soluté et par la sécurité de l'installation. Par conséquent, la température ne peut pas être augmentée indéfiniment et un compromis doit alors être déterminé pour optimiser l'extraction (Leybros et Fremeaux, 1990).

- **Durée d'extraction**

Les quantités de substances extraites sont fonction du temps de séjour du matériel au sein du solvant (temps nécessaire à la pénétration du solvant à l'intérieur des vacuoles, dissolution du composé etc.) (Ben Amor, 2008). La durée d'extraction dépend du procédé utilisé et de l'objectif de l'extraction.

Si l'objectif est d'extraire toutes les substances chimiques présentes dans la matière végétale pour les identifier l'extraction doit être poussée vers des temps longs. Et si on s'intéresse au rendement tout en tenant compte de la consommation énergétique, la durée d'extraction est un optimum à déterminer.

CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES

II.1 Matière végétale utilisée

II.1.1 Cueillette

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 aérienne « 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 a 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 conservé dans un grand flacon en verre et bien fermés (sans humidité).

II.1.2 Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité de la plante est mesurée par la méthode Dean et Stark, présenté à la figure II-1, cette méthode a été approuvée par l'AOAC en 2002 et a atteint de bons niveaux de fidélité (Horwitz, 2002)

La fraction d'humidité extraite de l'échantillon par la chaleur est exprimée en masse ou en volume. Le plus souvent, un solvant organique insoluble dans l'eau (par exemple toluène, xylène) est ajouté aux échantillons solides avant la distillation. Ce solvant constitue avec l'eau un mélange azéotropique qui bout à une température inférieure à 100° C. les vapeurs montantes sont condensées et refroidies à l'aide d'un réfrigérant, après refroidissement, les deux composants liquides se séparent. La fraction eau est déterminée volumétriquement.

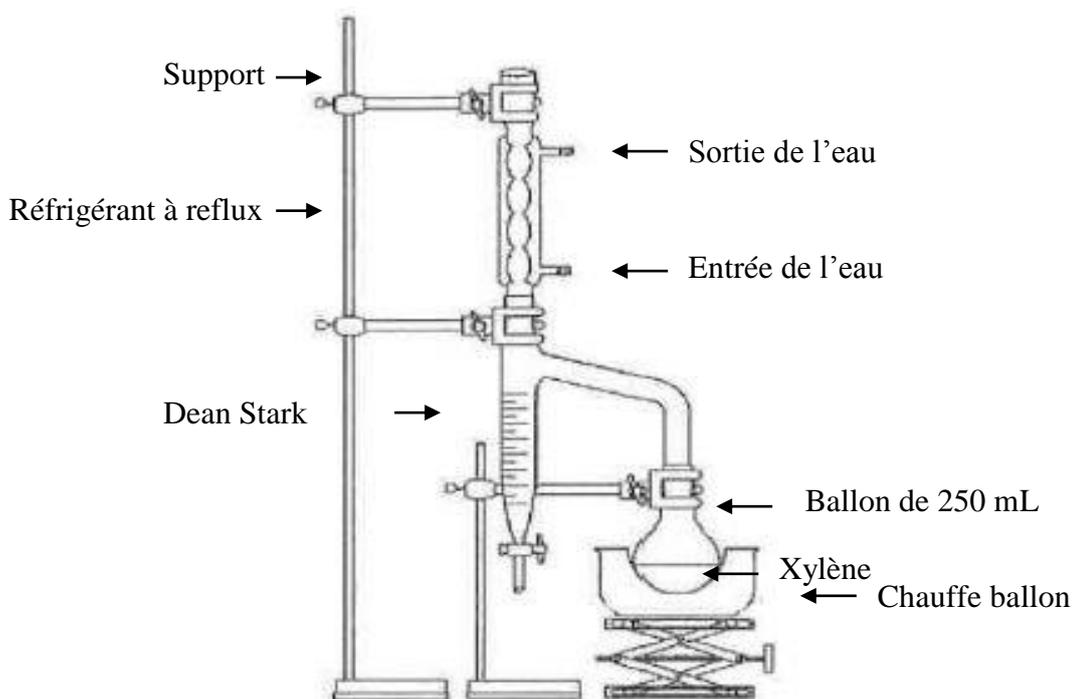


Figure II-1 : Appareil de Dean et Stark pour la mesure du taux d'humidité

La méthode est normalisée ISO 1897-2 (Site web [9]) dont le protocole expérimental est le suivant :

Une masse de matière végétale, pesée est introduite dans un ballon de 250 mL et immergé dans le xylène. Le mélange est, ensuite, porté à ébullition. Les vapeurs eau-xylène, refroidies et condensées dans le réfrigérant. Lorsque la phase supérieure, dans ce cas le xylène, atteint le niveau du bras, elle s'écoule et retourne dans le ballon, alors que la phase inférieure, l'eau, reste dans le tube. L'opération est arrêtée lorsque le volume d'eau est constant dans le décanteur. Le volume d'eau est mesuré avec précision, après une séparation complète des deux phases.

La matière végétale étant sèche, un mL d'eau est ajouté au préalable dans le décanteur pour pouvoir lire le volume recueilli.

La teneur en eau de la matière végétale, exprimée en pourcentage massique (%), est calculée par la formule suivante :

$$H = \frac{V_{\text{eau}} \cdot \rho_{\text{eau}}}{M} * 100 \quad (\text{II-1})$$

Avec :

H : taux d'humidité, en % ;

V_{eau} : volume d'eau recueilli dans le tube récepteur, en mL ;

ρ_{eau} : est la masse volumique de l'eau à la température ambiante, en g/mL

M : la masse de la matière végétale humide, en g.

II.2 Extraction des composés phénoliques du *Rosmarinus officinalis* L.

II.2.1 Choix du solvant

Le choix du solvant d'extraction peut se faire sur la base de ses capacités de pénétration dans la matière végétale, de son pouvoir de solubilisation et de ses propriétés de transfert de matière. Notre choix du solvant repose sur sa capacité de pénétration cellulaire et de diffusion dans les organes sécréteurs d'une part et sa sélectivité d'extraction sans avoir une action destructrice sur les molécules aromatiques d'une autre part.

Dans notre étude nous avons choisi de travailler avec le mélange (éthanol-eau, 80%). Il est à noter que l'éthanol est un bon solvant pour l'extraction des composés phénoliques, en raison de leur polarité moyenne et de leur bonne solubilité, mais il peut entraîner aussi des substances lipophiles résiduelles, les résultats de (Mohsen et Ammar, 2009), ont prouvé que l'éthanol était le meilleur solvant pour extraire les composés phénoliques, suivi du méthanol et finalement par de l'eau.

L'addition de l'eau au solvant d'extraction fait améliorer le rendement en composés phénoliques glycosyles et des phénols avec un degré de polymérisation plus élevé. D'autre part, l'augmentation de l'eau dans le solvant d'extraction fait extraire en quantité importante les composés non phénoliques comme les glucides et les protéines, susceptibles de polymériser avec les composés phénoliques ce qui conduit à la formation de complexes colloïdaux qui ne sont pas détectés par le test utilisé (Poncet-Legendre et *al.*, 2003). Ce qui explique notre choix du solvant et les proportions du mélange.

Les caractéristiques de l'éthanol sont les suivantes :

- Masse moléculaire : 46.06 g/mol.
- Point d'ébullition : 78.29 °C à 1 atm.
- Tension de vapeur : 7.87 KPa à 25°C.
- Constante diélectrique : 24.25 (sans unité à 25°C).

II.2.2 Dispositif expérimental d'extraction en mode batch

Il s'agit d'un dispositif composé d'un ballon de 500 mL surmonté d'un réfrigérant à reflux et un bain marie, l'agitation a été maximale grâce à un barreau aimanté à vitesse d'agitation constante. Les expériences qui ont été réalisées grâce à cette technique nous ont permis d'estimer l'influence de divers paramètres, température, hydromodule (le rapport quantité de matière première et le volume du solvant) et le temps d'extraction des composés phénoliques du

Rosmarinus officinalis L. Le schéma du dispositif est représenté sur la figure II-2.

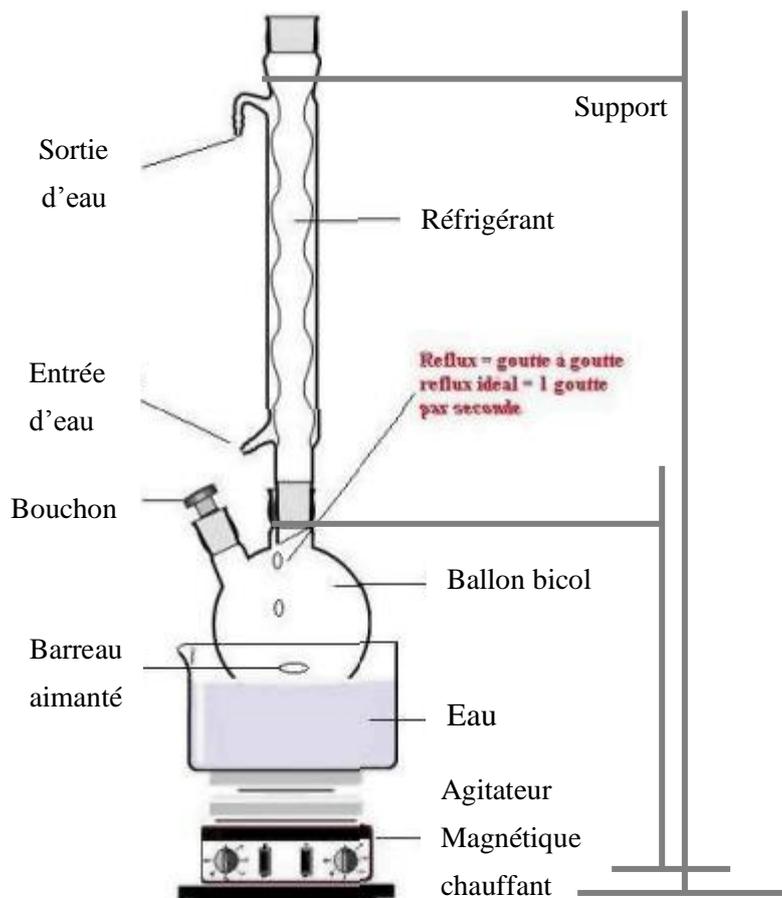


Figure II-2 : Schéma du dispositif expérimental de l'extraction solide-liquide

L'avantage majeur de cette méthode est la possibilité de travailler facilement avec des mélanges de solvants et de contrôler les paramètres opératoire d'extraction, pour éviter le risque de destruction des composés thermolabiles. C'est une méthode qui exige des procédures ultérieures de filtration ou de centrifugation.

II.2.3 Protocole expérimental

L'échantillon de la matière végétale *Rosmarinus officinalis* L., obtenu par le broyage, préalablement pesé, est mis en contact avec le mélange solvant (éthanol-eau, 80%) dans le ballon. Le mélange est agité et maintenu à une température fixée, selon les conditions opératoires.

Après un temps d'extraction bien déterminé, les phases solide et liquide sont séparées par centrifugation au moyen d'une centrifuge SIGMA à une vitesse de 3500 rpm pendant 20 minutes. La phase liquide contenant les composés phénoliques est récupérée et conservés à l'abri de la lumière.

La masse de la matière sèche, Ms est calculée par la formule suivante :

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

Tel que :

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

H : le taux d'humidité, en %.

II.3 Mesure du pH

La mesure du pH a été effectuée, à la température ambiante, avant et après l'extraction des composés phénoliques du *Rosmarinus officinalis* L., en utilisant le papier-pH.

II.4 Dosage des composés phénoliques

II.4.1 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux, présents dans les extraits, a été évaluée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, décrite par (Singleton et Rossi, 1965), en utilisant l'acide gallique comme standard.

- **Principe de la méthode de Folin-Ciocalteu**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Ceux-ci sont réduits, en présence des polyphénols totaux, formant un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

L'intensité de la couleur du mélange est proportionnelle à la concentration des polyphénols totaux.

- **Protocole expérimental**

Des échantillons ont été préparés dans le méthanol à partir d'une solution mère d'acide gallique de 1 mg/mL dans l'intervalle 1-30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Un volume de 2.5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans de l'eau distillée) est ajouté à 0,5 mL de l'échantillon. Le mélange est agité et laissé pendant 5 minutes, puis 2 mL d'une solution saturée de carbonate de sodium (Na_2CO_3) de 75g.L⁻¹ sont versés dans la solution. Les mélanges réactionnels, correspondant à chaque point de gamme et échantillon, sont agités et incubés 10 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Les solutions sont versées dans des tubes à essai, puis sont mis dans un bain-marie (50°C)

pendant 25 minutes, ensuite les tubes sont refroidis dans la glace.

L'absorbance de la solution est mesurée à une longueur d'onde de 760 nm au moyen d'un spectrophotomètre UV-VIS SECOMAM S250.

La concentration en polyphénols totaux, exprimés en mg équivalent d'acide gallique par millilitre de solution à doser, mg EAG/mL, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage donnant l'évolution de l'absorbance, en fonction de la concentration d'acide gallique.

II.4.2 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïde, présent dans les extraits, a été évaluée par la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) cité par (Djeridane et *al.*, 2006) et (Boudiaf, 2006), en utilisant la quercétine comme étalon.

- **Principe de la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3)**

Le dosage des flavonoïdes est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Ce dernier forme un complexe jaune avec les flavonoïdes. En effet, ce réactif forme des complexes acides stables soit avec le carbonyle ($\text{C}=\text{O}$) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. Par ailleurs, AlCl_3 peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes. Chang et *al* ont montré que les complexes formés par l' AlCl_3 avec 15 composés flavonoliques références présentent une absorption maximale à des longueurs d'onde variant entre 415 et 440 nm.

Le dosage est fait à l'aide d'un composé standard appartient à la classe des flavonols, à savoir la quercétine.

- **Protocole expérimental**

Un volume de 2 mL de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol).

Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation au moyen d'un spectrophotomètre UV-VIS SECOMAM S250.

La concentration en flavonoïde, exprimés en mg équivalent de quercétine par millilitre de solution à doser, mg EQ/mL, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage donnant l'évolution de l'absorbance, en fonction de la concentration de quercétine.

II.5 Evaluation des propriétés antioxydantes des extraits

Les propriétés antioxydantes du *Rosmarinus officinalis* L. ont été indiquées dans de nombreuses études (Chen et al., 1992 ; Wang et al., 1995, Varelziz et al., 1997 ; Zheng et Wang, 2001 ; Exarchou et al., 2002 ; Dragland et al., 2003 ; Dorman et al., 2004 ; Shan et al., 2005 ; Halvorsen et al., 2006 ; Djediat, 2014), ces auteurs ont montré que le *Rosmarinus officinalis* L. possède une activité antioxydante très importante. Au vue de ces résultats, nous avons alors entrepris l'étude des propriétés antioxydantes des différents extraits du *Rosmarinus officinalis* L. en utilisant le test DPPH (Que et al., 2006):

II.5.1 Protocole expérimental

La solution DPPH a été préparée 2 heures avant d'effectuer les analyses : 0,0098 g de DPPH sont dissout dans 250 mL de méthanol pour obtenir une solution de 0,1 mmol/L. Cette solution ne peut être conservée plus de 4 jours, à condition d'être conservée à l'abri de la lumière. L'absorbance de la solution de DPPH est mesurée avant de procéder à l'analyse de chaque échantillon. Celle-ci reste pratiquement constante tout au long de la mesure.

Des solutions aqueuses de différentes concentrations allant de 10 µg/mL à 50 µg/mL ont été préparées à partir des extraits obtenus.

Après 30 minutes d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante, l'absorbance du blanc (DPPH + méthanol) servant de calibre a été mesurée à une longueur d'onde de 517 nm, au moyen d'un spectrophotomètre UV-VIS SECOMAM S250.

Un volume de 2 mL de solution à tester est ajouté à 2 mL de solution de DPPH. Le mélange réactionnel obtenu est agité vigoureusement pendant 10 secondes avant d'être introduit dans la cellule du spectrophotomètre. Celle-ci est ensuite incubée dans l'appareil pendant le temps nécessaire, à la stabilisation de la valeur de l'absorbance.

II.5.2 Détermination du pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition (AA, %) est calculé par la relation suivante :

$$AA (\%) = \frac{\text{Abs (blanc)} - \text{Abs (échantillon)}}{\text{Abs (blanc)}} * 100 \quad (\text{II-5})$$

AA : Le pourcentage d'inhibition, en %.

Abs (blanc) : absorbance du DPPH dissout dans le méthanol.

Abs (échantillon) : absorbance de l'échantillon (extraits dilués).

Le pourcentage inhibition AA (%) renseigne uniquement sur la capacité de l'échantillon à une concentration donnée, de réduire ou non les radicaux du DPPH.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité anti-oxydantes d'un composé, les résultats sont souvent comparés à ceux d'un antioxydant de référence, tels que l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (L'hydroxytoluène butylé) ou le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-Carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E (Molyneux, 2004)

II.5.3 Détermination de la concentration d'inhibition IC₅₀

La concentration inhibitrice IC₅₀ est la concentration d'un antioxydant, nécessaire pour provoquer une réduction de 50% de l'absorbance du DPPH dans le milieu réactionnel.

Ce paramètre, exprimé en microgrammes d'antioxydant par millilitre de solution, a été calculé à partir des équations des courbes, donnant l'évolution du pourcentage d'inhibition AA, en fonction de la concentration C de l'échantillon, AA = f (C), en posant AA = 50%.

La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa valeur d'IC₅₀ est faible.

II.5.4 Détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire

L'indice d'activité anti-radicalaire, IAA, est défini par le rapport :

$$IAA = \frac{C_{DPPH}}{IC_{50}} \quad (II-6)$$

Avec :

- **C_{DPPH}** : Concentration de la solution DPPH dans la cellule au moment de l'analyse.
- **IC₅₀** : Concentration inhibitrice à 50 %, toutes deux exprimées en µg/ mL (Scherer et Godoy, 2009)

L'indice d'activité anti-radicalaire est une constante, indépendante des concentrations du DPPH et de l'échantillon.

Selon Scherer et Godoy (2009), l'échantillon présente une faible activité anti-oxydante, si IAA < 0,5, une activité anti-oxydante modérée, pour des valeurs d'IAA entre 0,5 et 1, une forte activité anti-oxydante, si < IAA < 2 et une très forte anti-oxydante, lorsque la valeur d'IAA est supérieur à 2.

II.6 Plan d'expérience et modélisation mathématique

L'expérimentation est un des moyens privilégiés pour acquérir ou améliorer les connaissances, mais elle doit être optimisée, car l'objectif est d'obtenir des informations les plus fiables possibles en réalisant un minimum d'essais. Aussi, toute expérience devrait être l'objet d'une planification précise qui se concrétise sous la forme d'un plan d'expériences.

Les plans d'expériences constituent une stratégie d'organisation de l'expérimentation, afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique. La méthodologie des plans d'expériences est basée sur le fait qu'une expérience convenable organisée, conduira à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats.

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt, y , et des variables x_i . Il faut penser aux plans d'expériences si l'on s'intéresse à une fonction du type : $y = f(x_i)$

II.6.1 Terminologie

La grandeur d'intérêt, qui est généralement notée y , porte le nom de réponse. Les variables qui peuvent modifier la réponse sont appelées paramètres ou facteurs x_i . Les termes facteurs et réponse sont universellement employés dans le domaine des plans d'expériences (Goupy et Creighton, 2009).

- La réponse y (variable de sortie) correspond à un paramètre de sortie du système étudié. Une réponse doit être représentative, quantifiable et la moins dispersée possible pour des variables d'entrées maîtrisées et constantes (Droesbeke et *al.*, 1997).
- Le paramètre d'entrée d'un système (variable d'entrée ou facteur) x est une cause possible de variation de la réponse y . un facteur peut être qualitatif ou quantitatif, continu ou discontinu, contrôlable ou non contrôlable.

Les facteurs sont pleinement caractérisés par les valeurs suivantes :

- Borne inférieure (binf) : limite basse (ou niveau bas) des valeurs que le facteur peut prendre.
- Borne supérieure (bsup) : limite haut (ou niveau haut) des valeurs que un facteur peut prendre.

L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, est appelé domaine de variation du facteur ou plus simplement le domaine du facteur. S'il y a plusieurs facteurs, chacun d'eux a son domaine de variation. Afin d'avoir une représentation commune pour tous les facteurs par ± 1 (Droesbeke et *al.*, 1997).

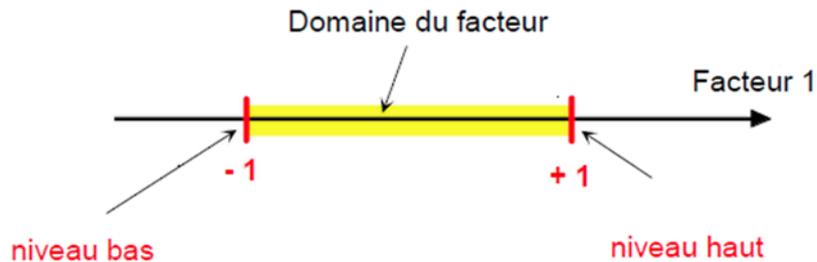


Figure II-3 : Domaine du facteur

Chaque facteur est représenté par un axe gradué et orienté. Les axes des facteurs sont orthogonaux entre eux. L'espace ainsi défini est l'espace expérimental.

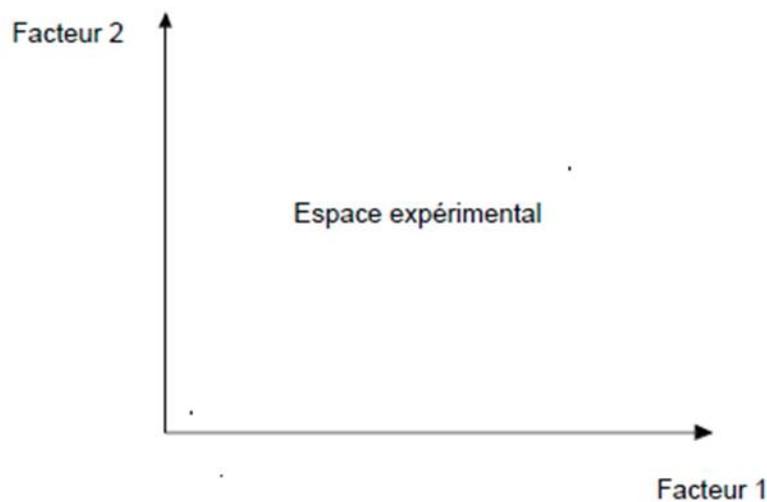


Figure II-4 : Espace expérimental

Dans la pratique, l'expérimentateur sélectionne une partie de l'espace expérimental pour réaliser son étude. Cette zone particulière de l'espace expérimental est le domaine d'étude. Il est défini par les niveaux hauts et les niveaux bas de tous les facteurs.

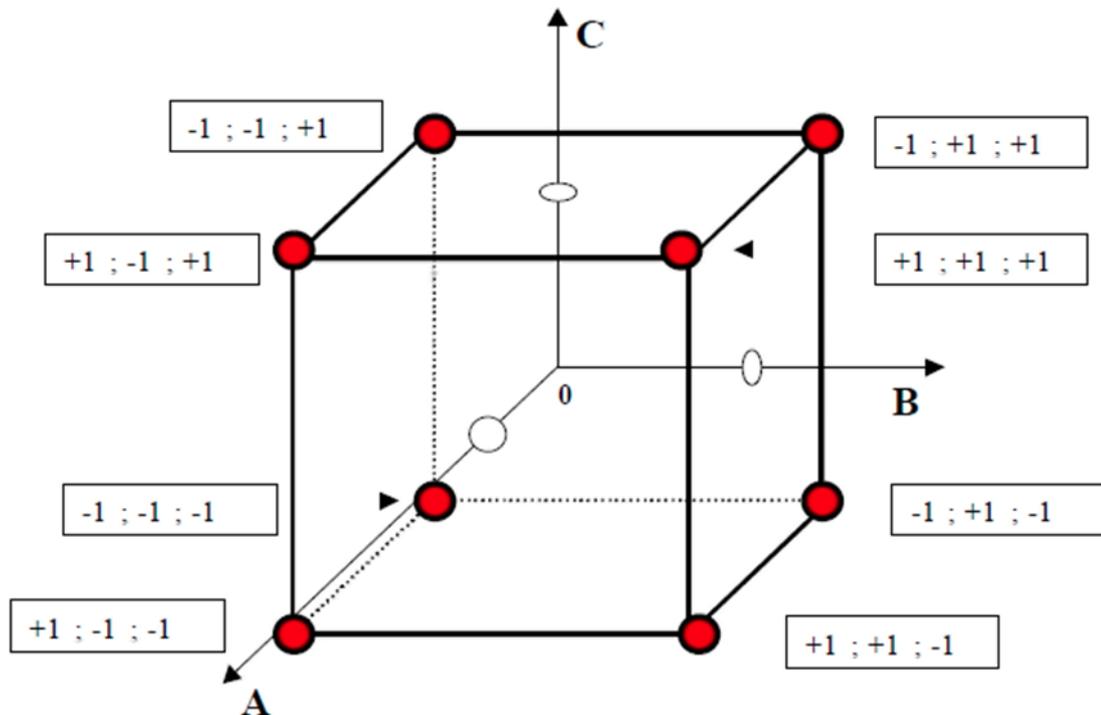


Figure II-5 : Domaine d'étude pour un plan à deux niveaux de trois facteurs

Jusqu'à trois facteurs, il est possible de dessiner le domaine d'étude. Au-delà de trois facteurs, on utilise une représentation en tableau, dite matricielle, plus générale puisqu'elle permet de représenter les points d'expériences dans un hypervolume à un nombre quelconque de dimensions. Les points intérieurs à ce domaine sont les points de l'expérience, car ils sont la traduction mathématique, par leur coordonnées, des combinaisons de valeurs des grandeurs physiques leur correspondants (Droesbeke et *al.*, 1997).

- **Surface de réponse**

La représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse nécessite un espace ayant une dimension de plus que l'espace expérimental. Un axe orthogonal à l'espace expérimental est alors attribué à la réponse.

A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forme la surface de réponse (Figure II-6) (Goupy et Creighton, 2009).

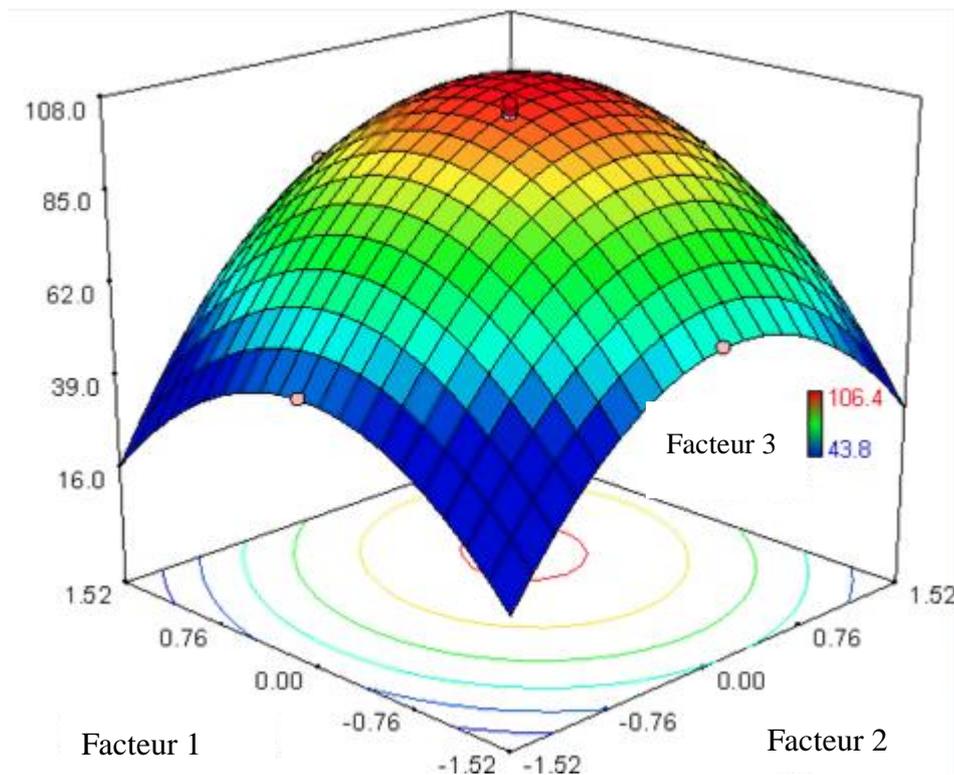


Figure II-6 : Surface de réponse pour un plan à trois facteurs

La projection de la surface de réponse sur un plan horizontal, donne un graphique d'iso contours, présenté sur la Figure II-6, qui affiche des lignes ou des régions colorées basées sur les valeurs des la réponse prévue.

II.6.2 Coordonnées centrées réduites

Lorsqu'on attribue la valeur -1 au niveau bas d'un facteur, la valeur 0 au niveau de base et la valeur +1 au niveau haut, on effectue deux modifications importantes :

- On change l'unité de mesure.
- On déplace l'origine des mesures.

Ces deux modifications entraînent l'introduction de nouvelles variables que l'on appelle variables centrées réduites (V.C.R). Centrées, pour indiquer le changement d'origine, et réduites pour signaler la nouvelle unité.

Le passage des variables d'origine, A , aux variables centrées réduites, x , et inversement, est donnée par la formule suivante, où A_0 est la valeur centrale en unité courantes :

$$x = \frac{A - A_0}{Pas} \quad (\text{II-7})$$

Où A_0 est la valeur centrale entre le niveau haut et le niveau bas et le Pas est égal à la moitié de la différence entre les deux niveaux.

L'intérêt des variables centrées réduites est de pouvoir présenter les plans d'expériences de la même manière quels que soient les domaines d'étude retenus et quels que soient les facteurs. (Goupy et Creighton, 2009).

Cependant, lorsque les facteurs sont continus dans le domaine d'étude, l'utilisation des variables centrées réduites n'est pas indispensable (STATGRAPHICS® Centurion XVII, Manuel de l'Utilisateur, 2014).

II.6.3 Notion de modèle mathématique

Un modèle mathématique est une fonction, généralement, un développement limité de la série de Taylor-Mac Laurin, qui relie la réponse aux facteurs. Ses dérivées sont supposés constantes et le développement prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \sum a_{ii} x_i^2 + \dots \quad (\text{II-8})$$

Où :

- y : est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et est obtenue avec précision donnée.
- x_i : représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai.
- a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} : sont les coefficients du modèle mathématique adopté. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer, d'une part, toutes les réponses dans le domaine d'étude sans être obligé de réaliser les expériences et d'autres part, de rechercher l'extremum de la fonction mathématique (Goupy et Creighton, 2009).

II.6.4 Plan factoriel complet à deux niveaux de trois paramètres

Dans notre étude, le plan factoriel utilisé est un plan à deux niveaux de trois facteurs, 2^3 . Ce plan prévoit 8 essais et on ajoute 3 essais répétitifs, soient donc 11 essais à réaliser. Le modèle mathématique comporte 10 coefficients :

$$y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 + a_{12} x_1 x_2 + a_{13} x_1 x_3 + a_{23} x_2 x_3 + a_{11} x_1^2 + a_{22} x_2^2 + a_{33} x_3^2 \quad (\text{II-9})$$

Une fois le modèle établi, on doit procéder à une évaluation statistique pour vérifier sa validité et apprécier les effets individuels et conjugués des paramètres étudiés.

II.6.5 Logiciel STATGRAPHICS Centurion XVII

STATGRAPHICS Centurion XVII est la 17^{ème} version de STATGRAPHICS pour micro-ordinateurs. La première version est apparue en 1982.

C'est un logiciel d'analyse statistique et graphique largement utilisé pour les statistiques descriptives et exploratoires, les modélisations, l'amélioration de la qualité et le Six Sigma. Il contient plus de 230 procédures (site web [11]), dont :

- Analyses exploratoires des données
- Analyses de la variance et régressions
- Ajustements de lois
- Maîtrise Statistique des Procédés (SPC)
- Plans d'expériences
- Six Sigma
- Fiabilité et Méthodes de survie
- Méthodes de survie
- Analyses de séries temporelles et précision
- Méthodes multivariées
- Méthodes non paramétriques
- Simulations Monte Carlo

Toutes les procédures sont pilotées par des menus et les outils qui aident à utiliser le logiciel de façon efficace, dont :

- **StatWizard** : permet de sélectionner les bonnes analyses pour les données en fonction des types des données.
- **StatAdvisor** : explique la signification des résultats statistiques en un ou deux paragraphes, en prenant en compte les résultats des analyses et en indiquant si les tests statistiques sont statistiquement significatifs ou non.
- **StatLink** : permet de lier les analyses à une ou plusieurs sources de données si bien qu'elles sont mises à jour dès que les données sont modifiées.
- **Six Sigma Toolbox** : contient un riche ensemble d'outils pour l'implémentation de la

démarche Six Sigma.

- **StatGallery** : juxtapose et superpose des graphiques pour permettre de comparer aisément différents ensembles de données, et il permet de créer des rapports personnalisés que le logiciel ne propose pas par défaut.

- **StatReporter** : organise les résultats pour une publication aisée, et les enregistrer au format RTF pour les importer.

- **StatPublish** : enregistre tous les résultats des analyses pour les afficher dans le navigateur Internet. Il crée automatiquement des pages HTML incluant les images.

- **StatFolio** : enregistre toutes les analyses dans un fichier pour permettre de les exécuter à nouveau lorsque cela est nécessaire. Si les données ont été modifiées, les résultats le seront automatiquement.

II.7 Produits chimiques utilisés

- Réactif de Folin-Ciocalteu (2M, Sigma-Aldrich)
- Carbonate de sodium, Na_2CO_3 (99,5%, BDH Chemicals Ltd)
- Chlorure d'Aluminium, AlCl_3 (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)

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Elaboration du plan des expériences de l'extraction des composés phénoliques du *Rosmarinus officinalis* L.

III.1.1 Choix des paramètres et des critères d'optimisation

La température, l'hydromodule et la durée d'extraction sont les principaux paramètres intervenant dans l'extraction solide-liquide. Ils sont indépendants, continus, expérimentalement accessibles et quantitativement mesurables. Pour ces raisons ils ont été choisis comme variables d'entrée ou paramètres à optimiser.

Quant aux critères d'optimisation, ou grandeurs d'intérêt, appelés encore réponse, le choix s'est porté sur la concentration des polyphénols totaux dans la phase liquide, exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme de matière sèche (mg EAG/g Ms), la concentration des flavonoïdes dans la phase liquide, exprimée en milligrammes équivalent de quercétine (EQ) par gramme de matière sèche (mg EQ/g Ms), et l'indice d'activité anti-radicalaire IAA. Ces trois critères d'optimisation sont, eux aussi, quantitativement mesurables. Cependant, l'indice d'activité anti-radicalaire IAA renseigne sur le potentiel antioxydant des extraits et est, donc, une réponse qualitative, tout en demeurant quantitativement mesurable.

III.1.2 Choix du plan des expériences et du modèle mathématique

Nous avons opté pour un plan factoriel complet à deux niveaux des trois paramètres. Le plan 2^3 prévoit 8 essais, et trois essais répétitifs au centre, soit le total des combinaisons des deux niveaux des trois paramètres. Les résultats des essais programmés et réalisés permettent d'établir un modèle mathématique de second ordre. Notre choix c'est porté sur ce type de modèle, en tenant compte du fait que l'élévation de la température d'extraction diminuerait l'extraction des composés phénoliques dans l'extrait en provoquant leur décomposition thermique, dans le cas où ils seraient thermosensible. Ces considérations laissent supposer l'existence d'un extremum dans le domaine d'étude.

III.1.3 Définition du domaine d'étude

En tenant compte de la capacité de l'installation, et des résultats des essais préliminaires et des travaux antérieurs sur l'extraction des composés phénoliques (O'Connell et Fox, 1999 ; Aoucher 2010 ; Bonnaillie et *al.*, 2012 ; Fadili et *al.*, 2015), nous avons fixé et réuni dans le tableau III-1, les niveaux inférieurs, de base et supérieurs des paramètres à optimiser. Le fait que la température, l'hydromodule et le temps sont des grandeurs continues, leur conversion en variables réduites n'est pas nécessaire.

Tableau III-1 : Niveaux inférieurs, de base et supérieurs des paramètres à optimiser

Niveau Paramètres	Niveau inférieur	Niveau de base	Niveau supérieur
Température, °C	30	45	60
Hydromodule, g/200mL	10	20	30
Durée de l'extraction, min	30	60	90

Des échantillons représentatifs de même taux d'humidité, égale à 10 %, ont été utilisés pour les 11 essais prévus par le plan 2³. Les 11 essais ont été réalisés en espace de cinq jour, pour chacun des essais, nous avons déterminé, la concentration en polyphénols totaux de l'extrait en mg EAG/g Ms, la concentration en flavonoïdes en mg EQ/g Ms et l'indice d'activité anti-radicalaire IAA. Ces résultats ont permis d'établir le modèles mathématique pour chaque réponse et d'apprécier les effets individuels, conjugués et quadratique des trois paramètres étudiés.

III.2 Modélisation

III.2.1 Modélisation de la teneur en polyphénols totaux de l'extrait du *Rosmarinus officinalis* L.

Lors de l'extraction des composés phénoliques du romarin, nous avons mesuré le pH des différents extraits obtenus à la température ambiante. La valeur du pH enregistré est égale à 6, signifiant la présence des composés phénoliques à caractère acide, en l'occurrence, des acides carboxyliques, et/ou des composés phénoliques hydrosolubles, nous ont suggéré à effectuer un test avec le réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans l'eau distillée). Ce dernier s'est avéré positif, témoignant de la présence des polyphénols totaux. Nous avons alors appliqué la méthode de Folin-Ciocalteu pour le dosage des polyphénols totaux le même jour de l'extraction pour éviter la dégradation des composés phénoliques, en utilisant l'acide gallique comme étalon. La courbe d'étalonnage, utilisé à cet effet, donnant la variation de l'absorbance, en fonction des concentrations des solutions diluées de l'acide gallique, allant de 0,001 à 0,03 mg/mL, est une droite passant par l'origine de pente égale à 12,045 et de coefficient de corrélation $R^2 = 0,9985$.

La courbe est déterminée par rapport à l'acide gallique dilué dans le méthanol. Elle est représentée dans la figure III-1 :

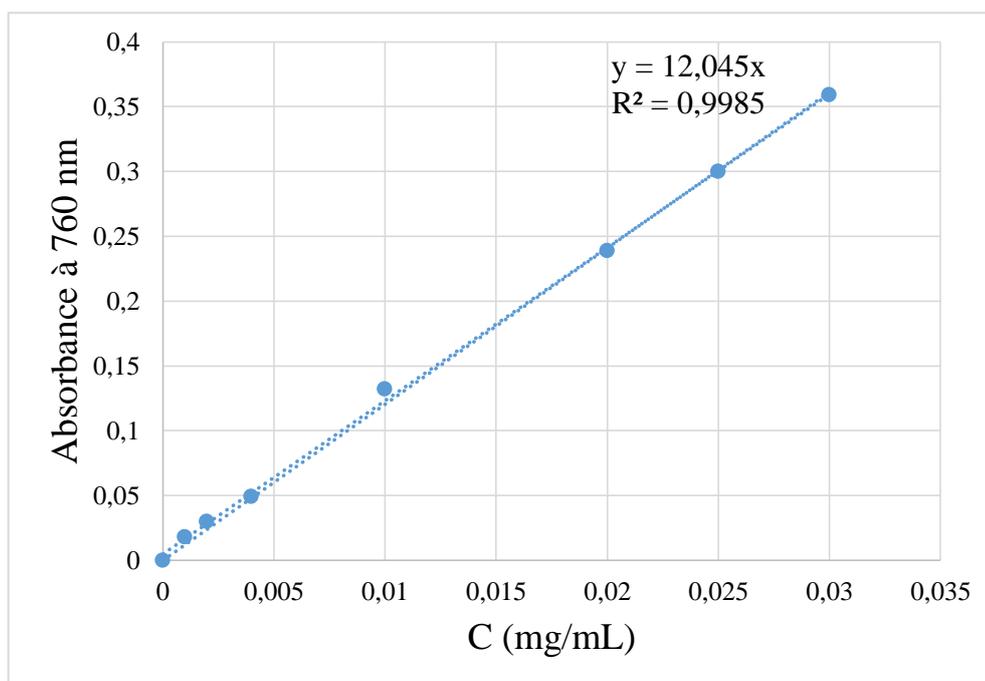


Figure III-1 : courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de l'acide gallique

L'équation de la courbe est la suivante : $A = 12,045 \cdot C_{AG}$

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.

Essai	Temps, min	Hydromodule, g/200mL	Température, °C	Teneur en polyphénols totaux (mg EAG/g Ms)
1	90	30	60	68,99
2	30	30	60	34,40
3	90	10	60	99,63
4	30	10	60	92,98
5	90	30	30	20,91
6	30	30	30	15,79
7	90	10	30	45,94
8	30	10	30	122,13
9	60	20	45	110,70
10	60	20	45	109,00
11	60	20	45	111,00

L'examen des valeurs du tableau III-2, suscite les remarques suivantes :

- La teneur en polyphénols totaux dans la phase liquide varie sensiblement, en fonction de la température, l'hydromodule et le temps de l'extraction : entre 15,79 et 122,13 mg EAG /g Ms.
- L'essai 8 a fourni la valeur maximale en teneur de polyphénols totaux, égal à 122,13 mg EAG/g Ms.

L'équation (III-1) du modèle mathématique, donnant l'évolution de la teneur en polyphénols totaux dans la phase liquide, en fonction de la température, l'hydromodule et le temps de l'extraction, s'écrit :

$$TPP = 132,6830 + 5,9310.T - 8,6834.H - 1,6067.t - 0,0852.T^2 + 0,0142.H^2 - 0,0063.t^2 + 0,0351.T.H + 0,0312.T.t + 0,0455.H.t. \quad \text{(III-1)}$$

III.2.2 Modélisation de la teneur en flavonoïdes de l'extrait du *Rosmarinus officinalis* L.

Pour déterminer la teneur en flavonoïdes, nous avons appliqué la méthode d' AlCl_3 , en utilisant la quercétine comme étalon. La courbe d'étalonnage, utilisé à cet effet, donnant la variation de l'absorbance, en fonction des concentrations des solutions diluées de la quercétine, allant de 4 à 40 $\mu\text{g/mL}$, est une droite passant par l'origine de pente égale à 0,0113 et de coefficient de corrélation $R^2 = 0,9985$:

La courbe est déterminée par rapport à la quercétine diluée dans le méthanol. Elle est représentée dans la figure III-2 :

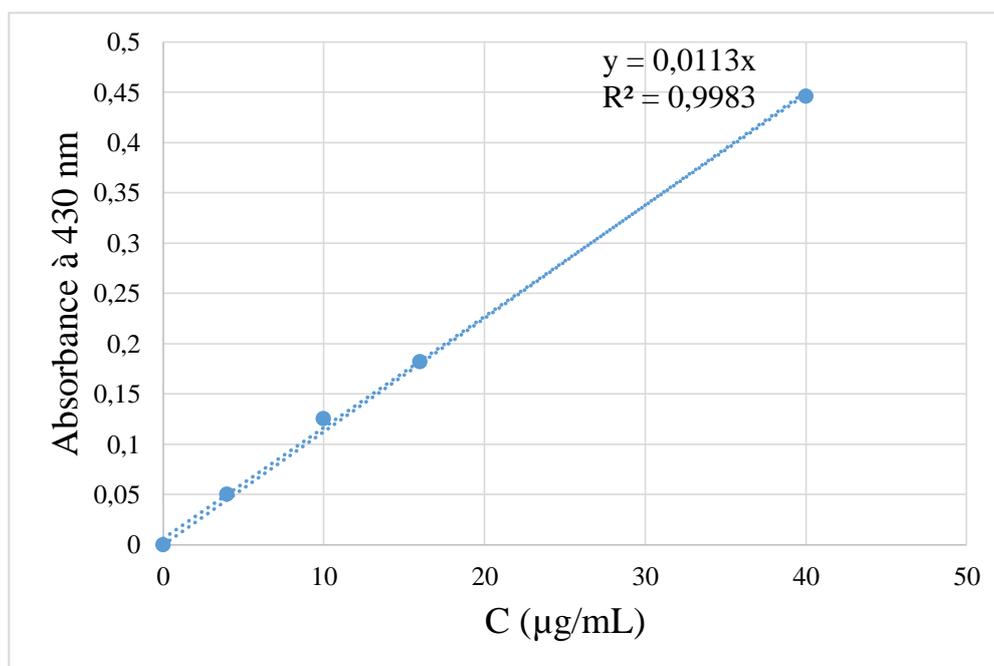


Figure III-2 : Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de quercétine.

L'équation de la courbe est la suivante : $A = 0,0113 \cdot C_Q$

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.

Essai	Temps, min	Hydromodule, g/200ml	Température, °C	Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g Ms)
1	90	30	60	22,86
2	30	30	60	13,93
3	90	10	60	41,06
4	30	10	60	43,53
5	90	30	30	14,65
6	30	30	30	14,10
7	90	10	30	40,31
8	30	10	30	43,68
9	60	20	45	26,03
10	60	20	45	22,35
11	60	20	45	28,69

L'examen des valeurs du tableau III-3, suscite les remarques suivantes :

- La teneur en flavonoïdes dans la phase liquide varie sensiblement, en fonction de la température, l'hydromodule et le temps de l'extraction : entre 13,93 et 43,68 mg EQ /g Ms.
- L'essai 8 a fourni la valeur maximale de la teneur en flavonoïdes, égal à 43,68 mg EQ/g Ms.

L'équation du modèle mathématique, donnant l'évolution de la teneur en polyphénols totaux dans la phase liquide, en fonction de la température, l'hydromodule et le temps de l'extraction, s'écrit :

$$TF = 70,1000 - 0,2067.T - 1,9500.H - 0,22850.t + 0,0062.T.H + 0,0026.T.t + 0,0064.H.t \quad (\text{III-2})$$

III.2.3 Modélisation de l'indice d'activité anti-radicalaire

III.2.3.1 Evaluation du potentiel antioxydant des extraits du *Rosmarinus officinalis* L.

Nous avons procédé à l'évaluation de la capacité de piégeage du radical libre DPPH, de l'ensemble des échantillons des extraits récupérés, lors de l'extraction des composés phénoliques du *Rosmarinus officinalis* L.

III.2.3.1.1 Détermination de la concentration IC₅₀

Afin de déterminer la concentration, en µg/mL, des extraits nécessaires à la diminution de l'absorbance du DPPH de 50%, nous avons préparé des solutions aqueuses des échantillons des extraits, de différentes concentrations en µg/mL. 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 concentrations. Ces données expérimentales nous ont permis de tracer les courbes, donnant l'évolution de l'absorbance, A, du DPPH et du pourcentage d'inhibition, AA, en fonction de la concentration de l'échantillon. A titre d'exemple, la figure III-3 présente l'allure générale des courbes $A = f(C)$ et $AA = f(C)$, obtenus pour chacun des échantillons des extraits, où C est la concentration en extrait au moment de la mesure.

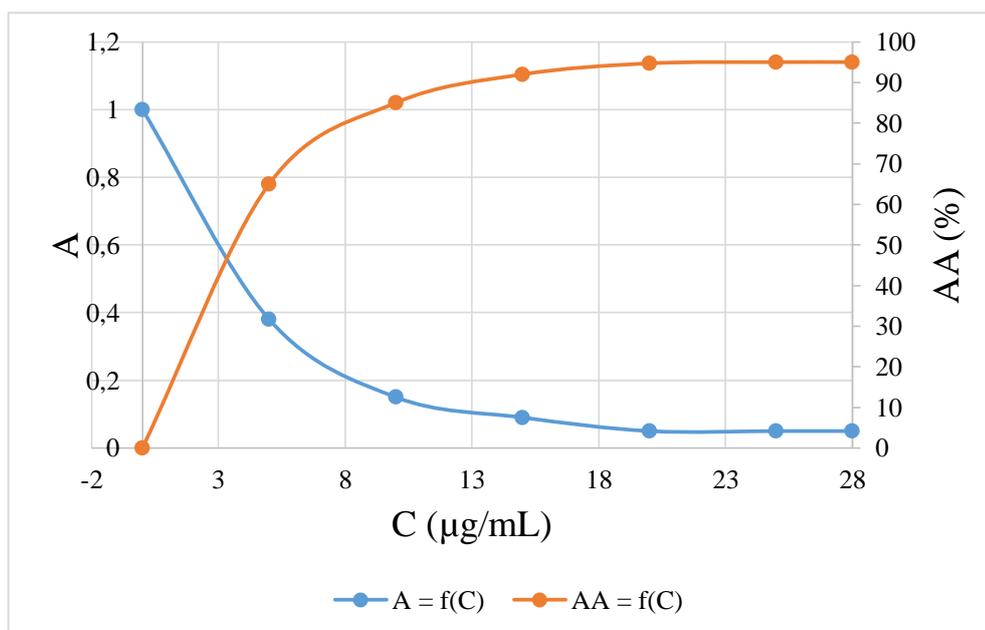


Figure III-3 : Evolution de l'absorbance du DPPH et du pourcentage d'inhibition, en fonction de la concentration de l'échantillon testé.

Les valeurs des concentrations IC_{50} en, $\mu\text{g/mL}$ des échantillons des extraits du *Rosmarinus officinalis* L., ont été déterminées, à partir des courbes $AA = f(C)$, en posant $AA = 50\%$.

III.2.3.1.2 Détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire

Pour la détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire (IAA), nous avons utilisé une courbe d'étalonnage, établie au préalable, donnant l'évolution de l'absorbance des solutions méthanoliques du DPPH, en fonction de sa concentration. Dans le domaine des concentrations allant de 5 à 40 $\mu\text{g/mL}$, la courbe d'étalonnage est une droite passant par l'origine de pente égale à 0,0323 de coefficient de corrélation $R^2 = 0,9998$. La courbe est représentée sur la figure III-4:

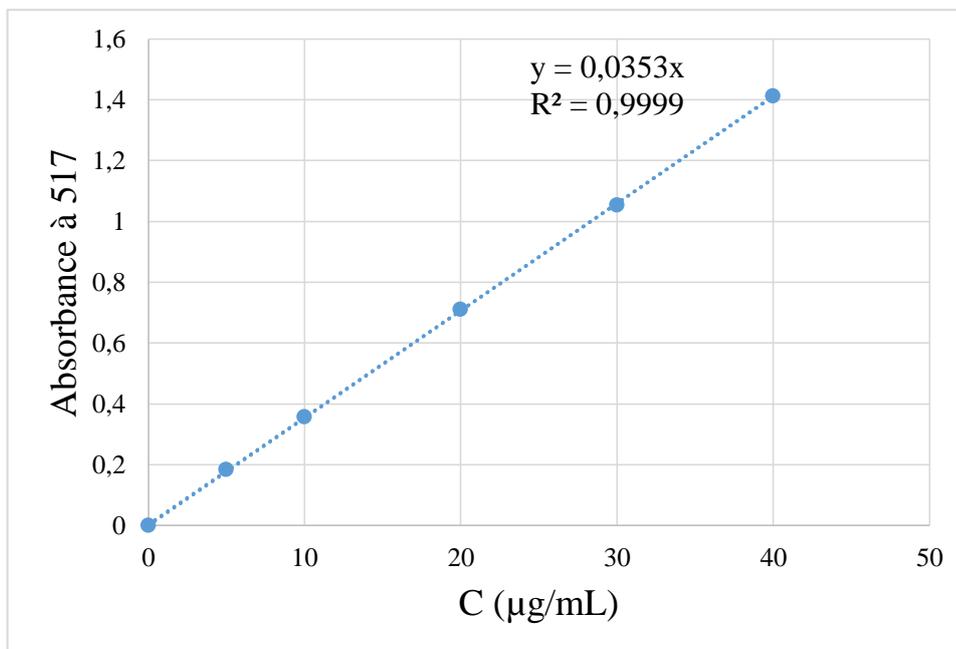


Figure III-4 : courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration du DPPH

L'équation de la courbe est la suivante : $A = 0,0353.C_{\text{DPPH}}$

Où C_{DPPH} est la concentration massique du DPPH exprimée en $\mu\text{g/mL}$.

Nous avons eu recours à la courbe d'étalonnage, afin d'estimer la concentration finale de la solution du DPPH dans la cellule, au moment de la mesure de l'absorbance.

Les indices d'activité anti-radicalaire de l'ensemble des échantillons des extraits sont calculés par le rapport de cette concentration et la concentration IC_{50} , déterminée précédemment.

III.2.3.2 Modélisation de l'indice d'activité anti-radicalaire

Les indices d'activité anti-radicalaire de l'ensemble des échantillons des extraits, sont rapportés dans le tableau III-4 :

Tableau III-4 : Valeurs des IC₅₀ et des IAA des échantillons des extraits de l'extraction des composés phénoliques du *Rosmarinus officinalis* L.

Essai	Temps, min	Hydromodule, g/200mL	Température, °C	IC ₅₀ , µg/mL	IAA
1	90	30	60	5,85	3,49
2	30	30	60	7,78	3,33
3	90	10	60	4,43	3,78
4	30	10	60	4,32	3,76
5	90	30	30	8,12	3,27
6	30	30	30	8,91	3,21
7	90	10	30	7,67	3,36
8	30	10	30	3,41	4,78
9	60	20	45	3,60	4,31
10	60	20	45	3,58	4,22
11	60	20	45	3,62	4,43

L'examen des valeurs du tableau III-4, nous a permis de formuler les remarques suivantes :

- Les valeurs des IAA des échantillons des 11 essais sont toutes supérieures à 2 et permettent de conclure que les extraits du *Rosmarinus officinalis* L. obtenus présentent une très forte activité anti-radicalaire (Scherer et Gidoy, 2009)
- L'indice d'activité anti-radicalaire de l'échantillon obtenu par l'essai 8, égal à 4,78 est supérieur à celui de l'acide ascorbique, IAA = 4,48 (Haddou et Hamouche, 2012), et à celui de la quercétine, IAA = 4,72 (Cretu et *al.*, 2013), qui comptent parmi les antioxydants les plus puissants.

Le modèle mathématique, donnant l'évolution de l'indice d'activité anti-radicalaire des extraits, en fonction de la température, l'hydromodule et le temps de l'extraction est donné par l'équation suivante :

$$IAA = 7,4702 - 0,0435.T - 0,1055.H - 0,0377.t - 0,0413.T^2 + 0,0008.T.H + 0,0004.T.t + 0,0007.H.t \quad \text{(III-3)}$$

III.3 Evaluation statistique des modèles mathématiques établis

Les modèles mathématiques établis, à l'aide du logiciel STATGRAPHICS Centurion XVII pour les trois principaux paramètres d'extraction, s'écrivent comme suit :

$$TPP = 132,6830 + 5,9310.T - 8,6834.H - 1,6067.t - 0,0852.T^2 + 0,0142.H^2 - 0,0063.t^2 + 0,0351.T.H + 0,0312.T.t + 0,0455.H.t \quad \text{(III-1)}$$

$$TF = 70,1000 - 0,2067.T - 1,9500.H - 0,22850.t + 0,0062.T.H + 0,0026.T.t + 0,0064.H.t \quad \text{(III-2)}$$

$$IAA = 7,4702 - 0,0435.T - 0,1055.H - 0,0377.t - 0,0413.T^2 + 0,0008.T.H + 0,0004.T.t + 0,0007.H.t \quad \text{(III-3)}$$

III.3.1 Analyse de la variance

L'évaluation des modèles mathématique a été effectuée par analyse de la variance (ANOVA) à l'aide du logiciel STATGRAPHICS Centurion XVII. Le tableau suivant, regroupe les valeurs de la probabilité, ou p-value, pour chacun des effets, le coefficient de corrélation R^2 , l'erreur standard de l'estimation et l'erreur absolue moyenne.

Tableau III-5 : Résultats de l'analyse de la variance

Réponse / Effet	TPP	TF	IAA
	p- Value		
T	0,0664	0,4569	0,7696
H	0,0064	0,0006	0,0608
t	0,4236	0,7464	0,2417
T ²	0,0077	-	0,0369
T.H	0,2828	0,5178	0,3303
T.t	0,0401	0,4268	0,1538
H.t	0,0430	0,2184	0,1397
R ² , %	97,6002	98,1070	91,5923
erreur standard de l'estimation	11,4136	3,0147	0,2867
l'erreur absolue moyenne (MAE)	5,7088	1,28727	0,1418
La statistique de Durbin-Watson (DW)	2,4206 (P=0,7948)	1,4962 (P=0,1126)	2,6963 (P=0,9112)

Chacune de ces statistiques apporte des informations permettant la validation ou l'invalidation des modèles mathématiques élaborés :

- La valeur de la probabilité permet de vérifier la signification statistique de chaque effet en comparant le carré moyen à une estimation de l'erreur expérimental,
- Le coefficient de corrélation R^2 indique la qualité de l'approximation du modèle,
- L'erreur standard de l'estimation est l'écart type des résidus,
- L'erreur moyenne absolue (MAE) est la moyenne des résidus,
- La statistique de Durbin-Watson (DW).

Dans le modèle de la teneur en polyphénols totaux, TPP, les 4 effets ont des valeurs de probabilité inférieure à 0,05, ce qui indique qu'ils sont significativement différents de zéro au niveau de confiance de 95,0 %. Par ailleurs, ce modèle décrit correctement la variation du TPP, puisque son coefficient de corrélation R^2 est très élevé, est égale à 97,60 %.

Par contre, dans les cas du modèle de la teneur en flavonoïdes, TF, un effet a une probabilité inférieures à 0,05, ce qui indique qu'il est significativement différents de zéro au niveau de confiance de 95,0%, et quatre des cinq effets ont des valeurs de probabilité supérieure à 0,05 et ne sont pas significatifs pour un intervalle de confiance de 95,0%. En diminuant le niveau de confiance de 95,0 % à 62,0 % l'effet de la combinaison entre l'hydromodule et le temps, et entre la température et le temps deviennent significativement différent de zéro. Ceci suppose qu'en réalisant des essais répétitifs, 38 % des résultats obtenus seront erronées. Ceci pourrait être dû au fait de la méthode d' $AlCl_3$ qui est très sensible au pH de l'échantillon à analyser. Ce qui pourrait être à l'origine de la relative imprécision de la détermination de la teneur en flavonoïdes. D'autres parts, on observe que le modèle établi dans ce cas décrit correctement la variation du TF, car son coefficient de corrélation R^2 est très élevé, est égale à 97,11 %.

Dans le modèle de l'indice anti-radicalaire, IAA, un effet a une probabilité inférieure à 0,05, ce qui indique qu'il est significativement différents de zéro au niveau de confiance de 95,0%, et cinq de six effets ont des valeurs de probabilité supérieure à 0,05 et ne sont significatifs pour un intervalle de confiance de 95%. En diminuant le niveau de confiance de 95,0 % à 75,0 %, les effets de combinaison entre les différents facteurs deviennent significativement différents de zéro.

Les graphiques de Pareto, basés sur l'analyse de la variance, traduisent, dans un ordre décroissant, les effets standardisés individuels, conjugués et quadratiques affectent les critères d'optimisation étudiés. Ils sont représentés par les figures III-5, III-6, III-7 respectivement.

Dans le cas de la teneur en polyphénols totaux, on exclut tout ce qui n'est pas significatif dans le

graphique de Pareto, à l'exception des effets directs température et temps. Ces effets directs sont conservés car, l'effet quadratique de la température est significatif pour un intervalle de confiance de 95,0 %, ainsi l'effet temps présent dans l'interaction significative avec le facteur hydromodule.

La statistique de Durbin-Watson (DW) teste les résidus pour déterminer s'il y a une corrélation significative en se basant sur l'ordre dans lequel apparaissent les données des expériences. La statistique de Durbin-Watson pour TPP, TF, et IAA respectivement, est égale à 2,42 ; 2,41 ; 1,50 ces valeurs situées autour de 2 montrent une absence d'autocorrélation des résidus estimés d'ordre un au niveau de signification de 5,0%.

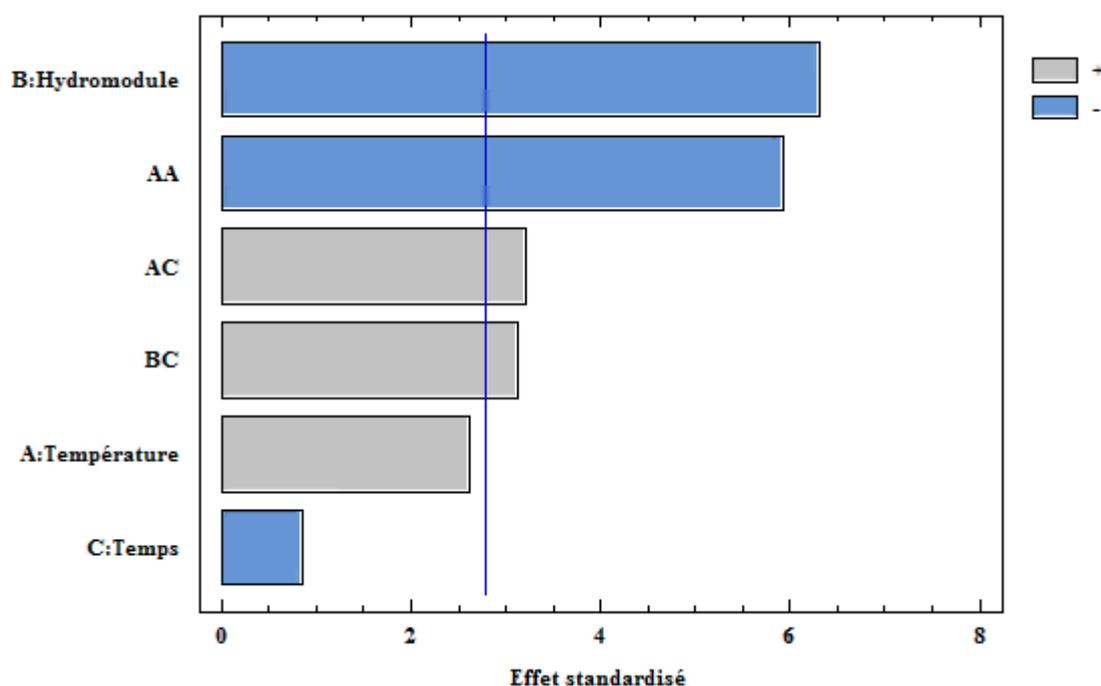


Figure III-5 : Graphique de Pareto pour la teneur en polyphénols totaux ($\alpha = 0,05$)

Au seuil de confiance indiqué, le modèle de TPP comporte quatre termes significatifs, parmi lesquels, l'effet individuel de l'hydromodule est le plus important.

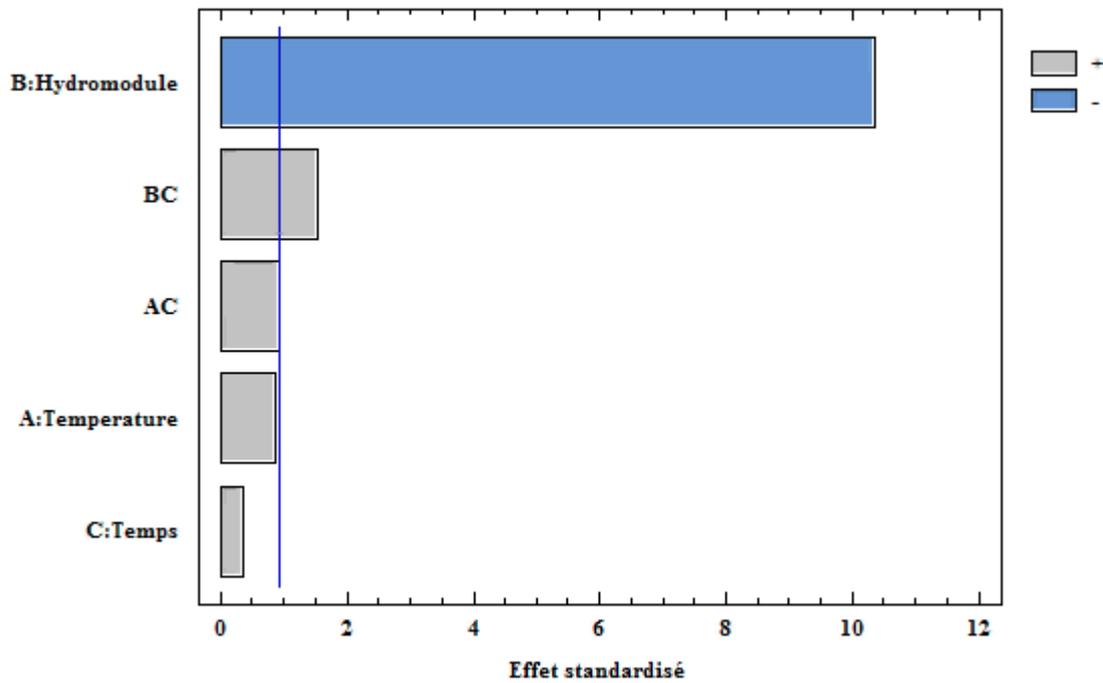


Figure III-6 : Graphique de Pareto pour la teneur en flavonoïdes ($\alpha = 0,38$)

Au seuil de confiance indiqué, le modèle de TF comporte trois termes, parmi lesquels, l'effet individuel de l'hydromodule est le plus important come dans le cas du modèle de TPP.

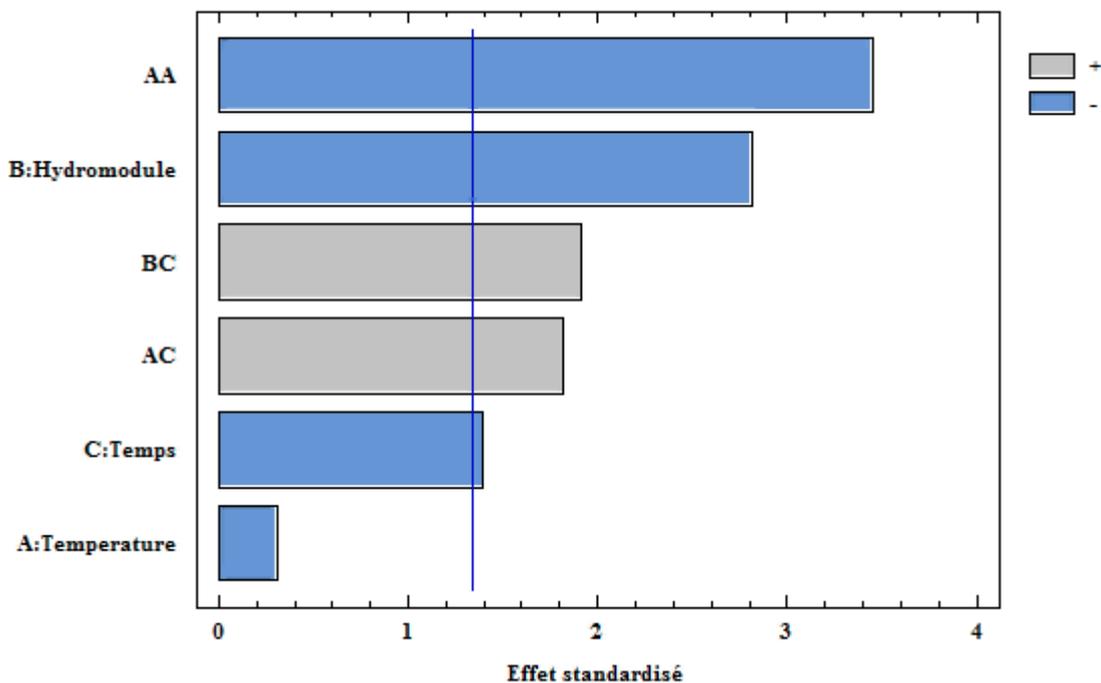


Figure III-7 : Graphique de Pareto pour l'indice d'activité anti-radicalaire ($\alpha = 0,25$)

Au seuil de confiance indiqué, le modèle d'IAA comporte quatre termes, parmi lesquels, l'effet individuel de l'hydromodule est le plus important come dans le cas du modèle de TPP.

Les graphiques des effets directs, basés sur l'analyse de la variance montre comment chaque facteur affecte sur les réponses. Ils sont représentés par les figures III-8, III-9, III-10 respectivement.

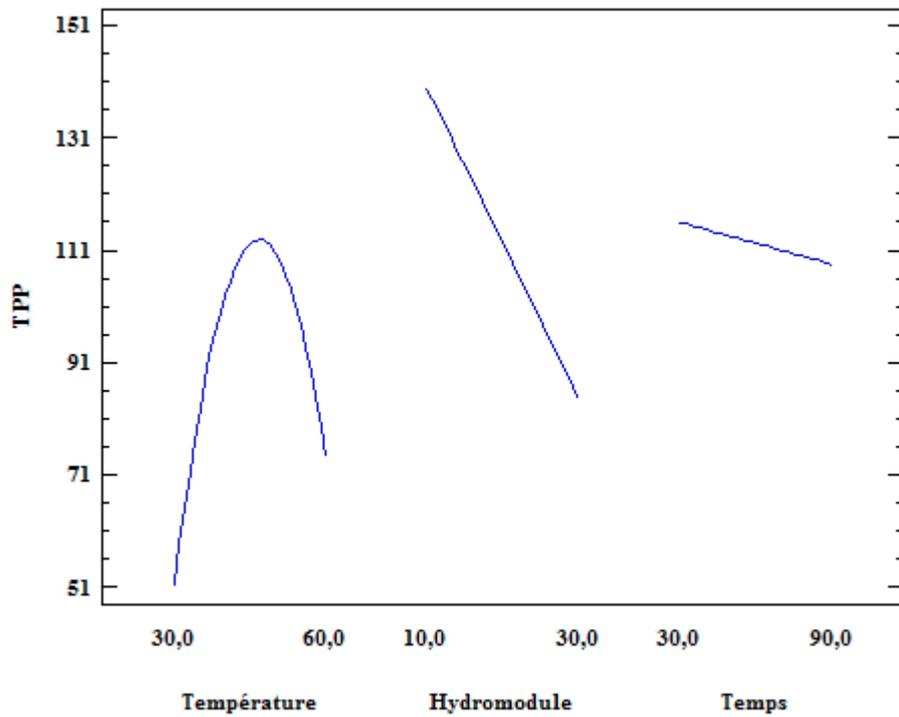


Figure III-8 : Graphique des effets directs pour la teneur en polyphénols totaux

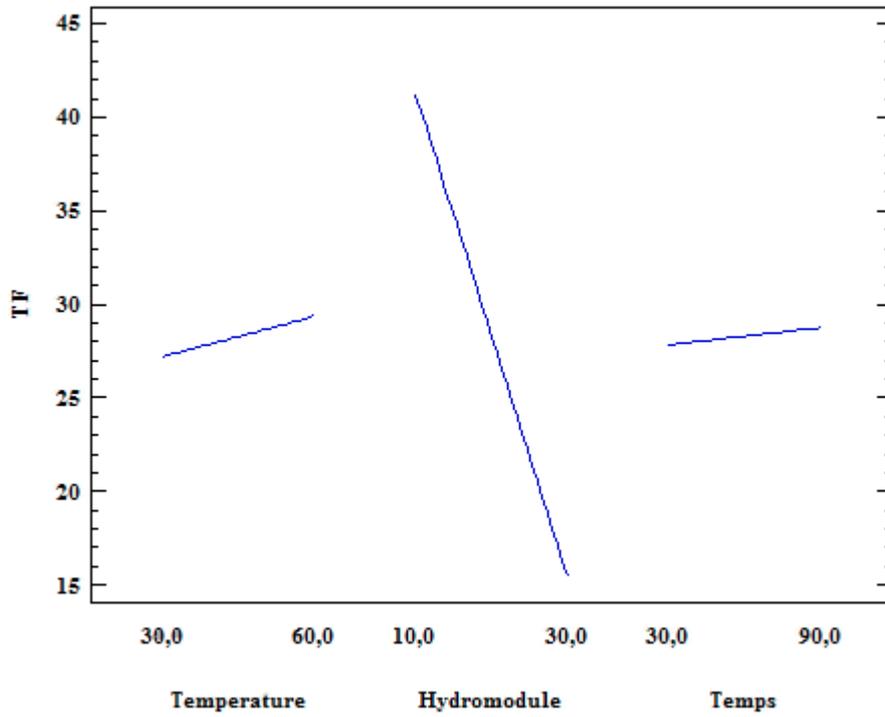


Figure III-9 : Graphique des effets directs pour la teneur en flavonoïdes

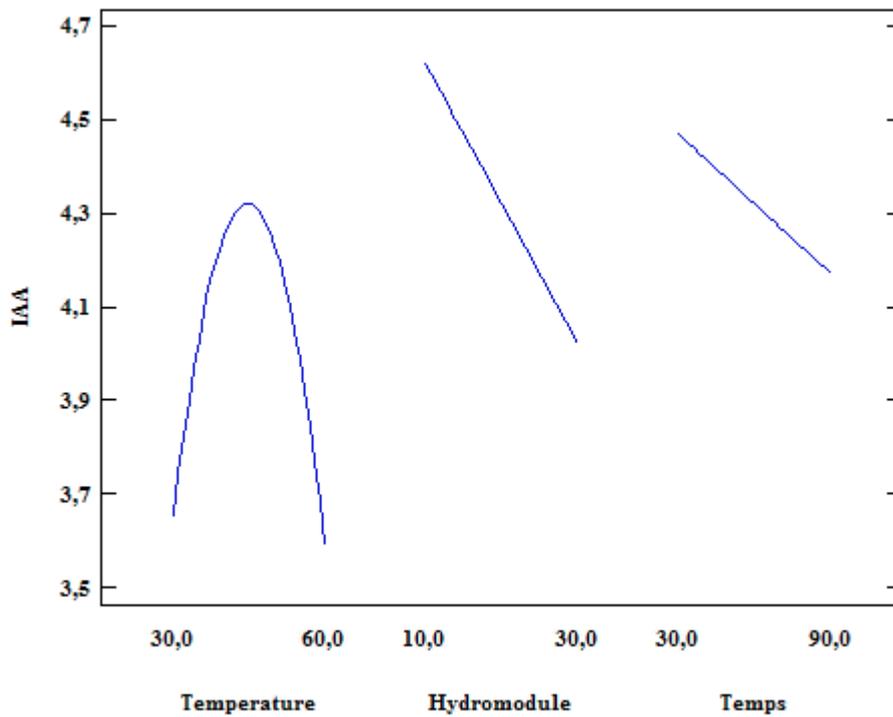


Figure III-10 : Graphique des effets directs pour l'activité anti-radicalaire

Les lignes indiquent les variations estimées des réponses TPP et TF, lorsque chaque facteur passe de son niveau bas à son niveau haut, sachant que tous les autres facteurs sont maintenus à des valeurs à mi-chemin entre leurs niveaux hauts et bas respectifs. Les trois facteurs ayant des effets significatifs ont des impacts plus importants sur les réponses que les autres. Par exemple, la teneur en flavonoïdes moyen pour un hydromodule élevé est approximativement de 15,5, alors que la teneur en flavonoïdes moyen pour un hydromodule faible est approximativement de 42,0. Cette différence de 36,5 est appelée « effet direct » d'hydromodule.

Le graphique de Pareto a montré les effets significatifs de la combinaison des différents facteurs, Ceci peut être représenté, également par les graphiques d'interactions. Ces derniers montrent la moyenne des réponses, pour un choix de deux facteurs, en prenant dans notre cas, l'hydromodule et le temps de l'extraction. Ils sont représentés par les figures III-11, III-12, III-13 respectivement.

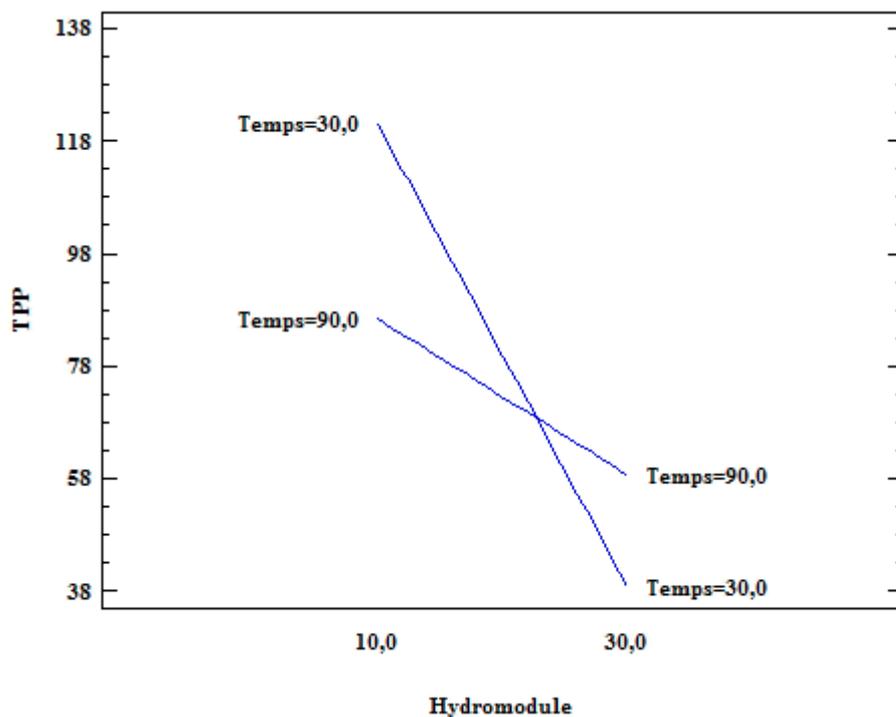


Figure III-11 : Graphique des interactions pour la teneur en polyphénols totaux

On constate que si le temps est à son niveau haut, l'hydromodule a un faible effet sur la teneur en polyphénols totaux. Par contre si le temps est à son niveau bas, l'hydromodule est un facteur important.

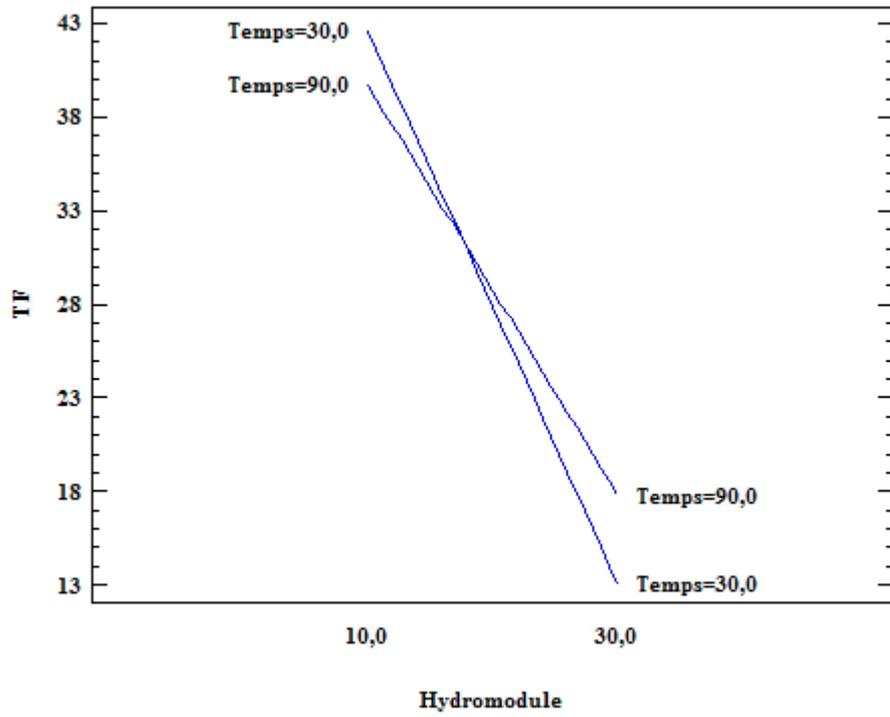


Figure III-12 : Graphique des interactions pour la teneur en flavonoïdes

On constate que l’hydromodule est un facteur important sur la teneur en flavonoïdes, si le temps est à son niveau haut ou à son niveau bas.

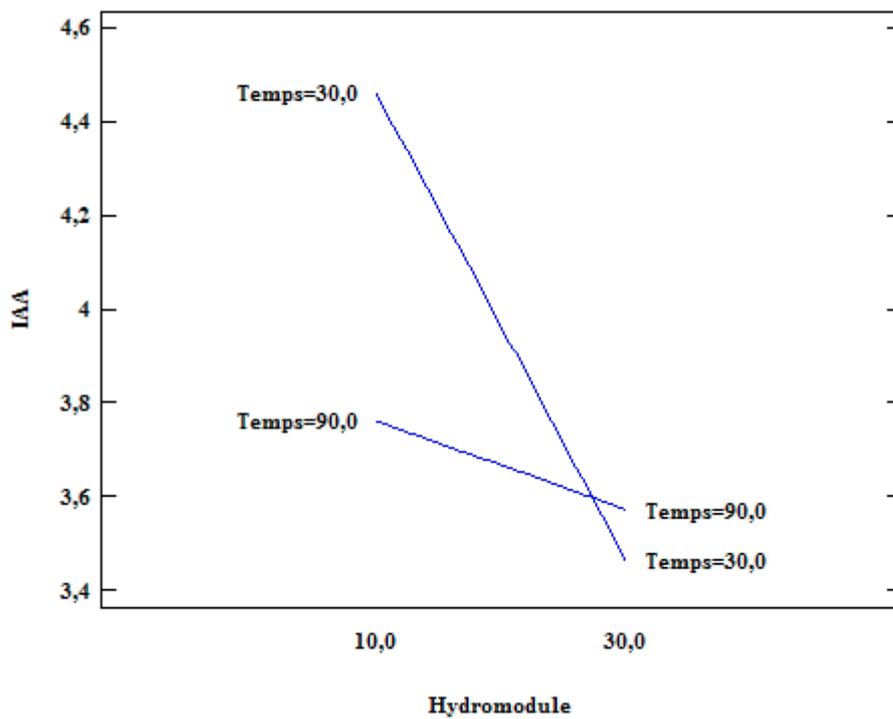


Figure III-13 : Graphique des interactions pour l’activité anti-radicalaire

On constate que si le temps est à son niveau haut, l'hydromodule a un faible effet sur la teneur en polyphénols totaux. Par contre si le temps est à son niveau bas, l'hydromodule est un facteur très important.

III.3.2 Surface de réponse

Les Figures III-14, III-15 et III-16 présentent les surfaces de réponses des trois critères d'optimisation étudiés.

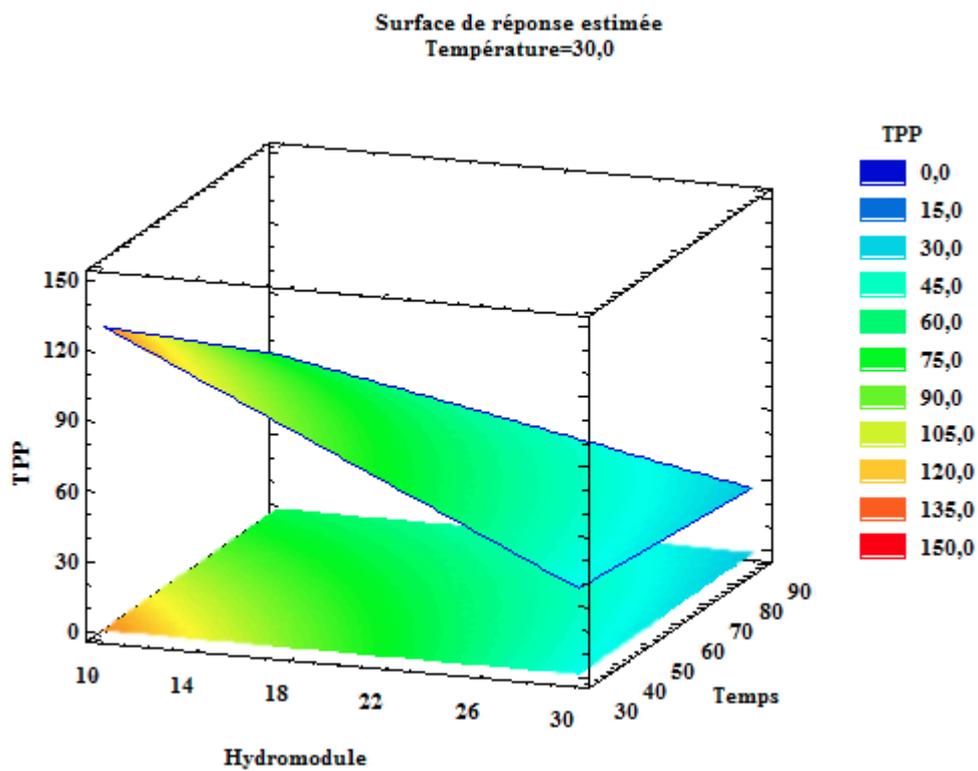


Figure III-14 : Surface de réponse pour la teneur en polyphénols totaux (TPP)

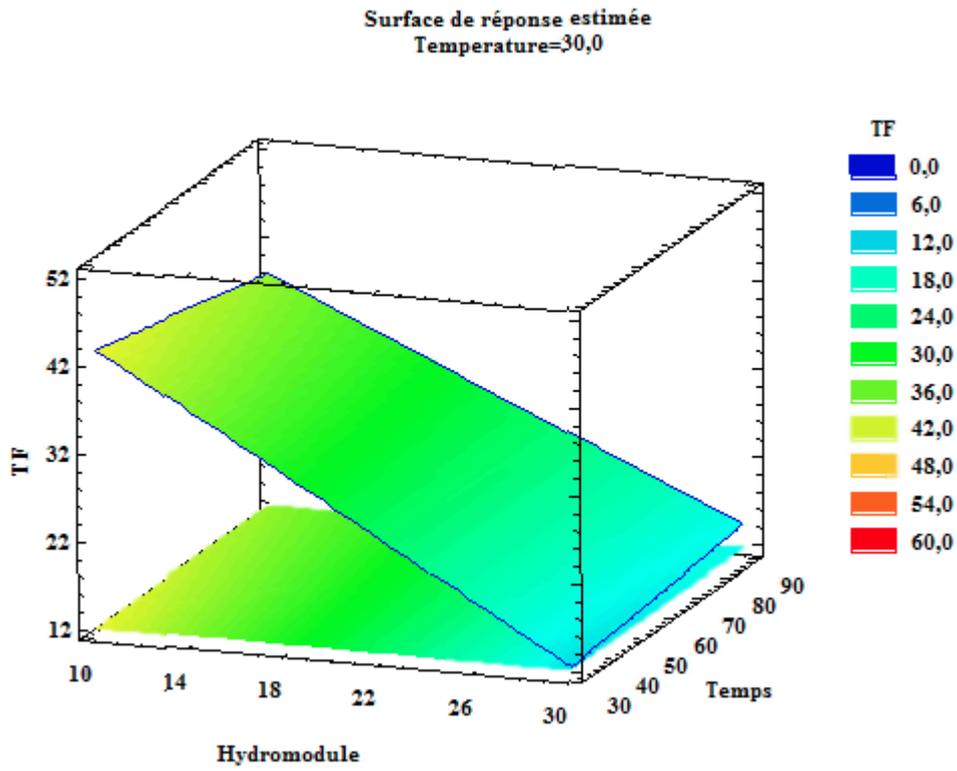


Figure III-15 : Surface de réponse pour la teneur en flavonoïdes (TF)

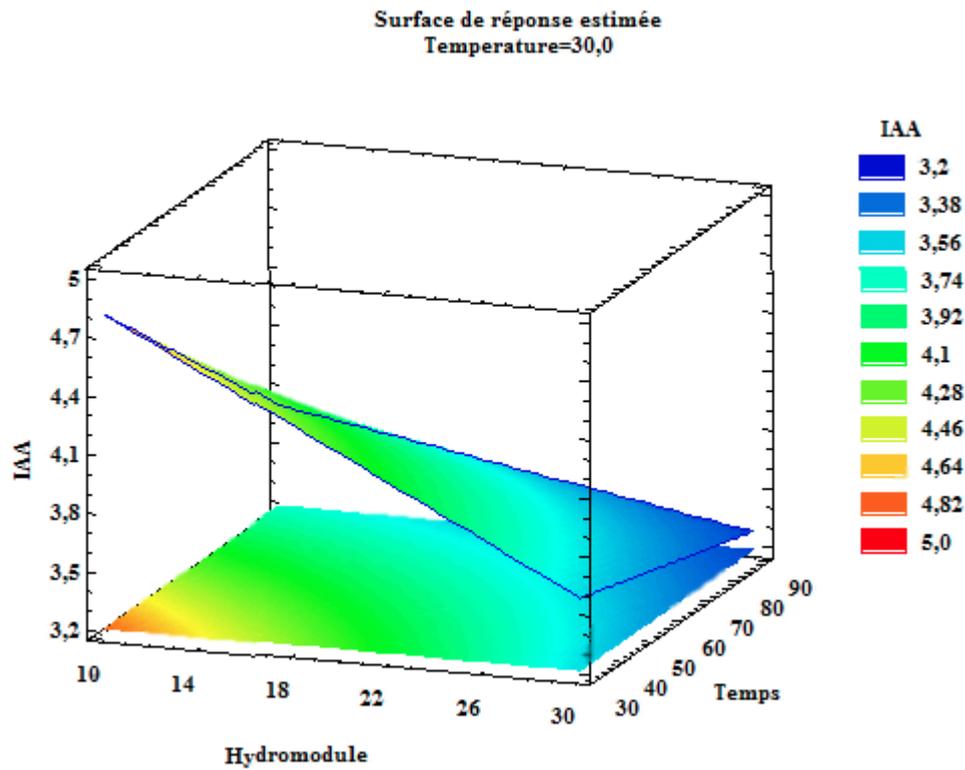


Figure III-16 : Surface de réponse pour l'activité anti-radicalaire (IAA)

L'examen des figures ci-dessus montre que les surfaces de réponses des trois critères d'optimisation ont la même allure, caractérisée par une variation importante de chaque réponse entre le niveau supérieur et de base de l'hydromodule et la durée d'extraction, suivie d'une forte ascension vers le niveau inférieur des trois paramètres.

Les expériences présentées ci-dessus ont été menées avec une variation d'hydromodule (le rapport de la quantité de la matière première et du volume du solvant) afin d'éviter la limitation éventuelle due à la solubilité, d'économiser le solvant et de travailler donc avec un hydromodule moins important. Les résultats présentés sur les figures III-14, III-15 et III-16 montrent que l'hydromodule affecte de façon importante sur chaque réponse. Cela signifie qu'il y a une limitation à cause de la solubilité, due à la variation de l'hydromodule.

D'autre part un dépôt superficiel pourrait accroître la résistance au passage du solvant et limiter le passage des composés phénoliques par effet tamis. Ceci peut s'expliquer par l'existence d'un dépôt à la structure trop serrée pour laisser passer les composés phénoliques due au broyage par le mortier et pilon.

A ce stade d'étude, on pourrait expliquer cette allure des surfaces de réponse en supposant que l'extraction à des faibles valeurs de la température (30°C) et du temps concernerait préférentiellement les composés phénoliques libres, présents sous forme non conjugués avec les sucres contenus dans la plante.

L'extraction à haute température (50 – 60 °C) provoque une dégradation de la structure phénolique des composés phénoliques (O'Connel et Fox, 1999). En effet, en milieu acide à chaud, la liaison interflavanique des procyanidines (polymères de flavonols), qui est relativement fragile, est rompue. Sa rupture conduit à la formation d'un carbocation réactif (Bate-Smith, 1954). Les carbocations formés sont des molécules très réactives qui peuvent s'oxyder dans le milieu afin de former des anthocyanes. De plus, ces carbocations, formés en milieu acide, peuvent réagir avec des groupements nucléophiles des protéines, des polysaccharides et des polyphénols puis former des liaisons exogènes avec la chaîne polypeptidique, polysaccharidique ou des liaisons polyphénol/polyphénol (Beart et *al.*, 1985 ; Le Bourvellec et *al.*, 2013). De plus, les traitements thermiques peuvent conduire à la formation d'o-quinones et d'o-semi-quinones, molécules très réactives qui peuvent réagir avec des groupements nucléophiles des protéines et/ou des polysaccharides (O'Connel et Fox, 1999).

Le travail de (Djediat, 2014), a montré que l'extraction à l'eau donnait un optimum au niveau supérieur de température et de la durée d'extraction (80 °C, 150 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. La teneur en polyphénols récupérée dans leur travail est plus faible (49,4 mg EAG/g Ms) ce qui nous conforte dans le choix du solvant. D'autre part les conditions opératoires que nous avons obtenues sont plus favorable, température et temps faibles.

III.4 Optimisation

Les surfaces de réponse montrent que les valeurs maximales de chaque critère d'optimisation tendent vers le sommet du domaine d'étude, correspondant au niveau inférieur des trois paramètres, de coordonnées 30 °C, 10 g/200ml, 30 min. Ces conditions opératoires ont été indiquées comme optimales par le logiciel Statgraphics Centurion XVII tableau III-6.

Tableau III-6 : Valeurs des facteurs à l'optimum

Facteur	Réponse	TPP	TF	IAA
	Valeur			
Température, °C	30	30	30	
Hydromodule, g/200ml	10	10	10	
Temps de l'extraction, min	30	30	30	

III.5 Extrapolation du modèle

Tableau III-7 : Valeurs extrapolées de la réponse

Réponses	Facteurs	T, °C	H, g/200ml	T, min	Désirabilité
		30	10	30	
TPP (mg EAG/g Ms)		115,46			0,94
TF (mg EQ/g Ms)		44,62			1,00
IAA		4,61			0,90

La recherche élargie des meilleures conditions d'opération a été menée en extrapolant le modèle ajusté.

Les réponses ont été optimisées. La désirabilité à l'emplacement optimal pour la TPP, TF et IAA, respectivement est de 94%, 100%, 90%. Les meilleures valeurs des facteurs donnent pour les réponses prévues un indice de désirabilité proche de 100% (Figure III-17).

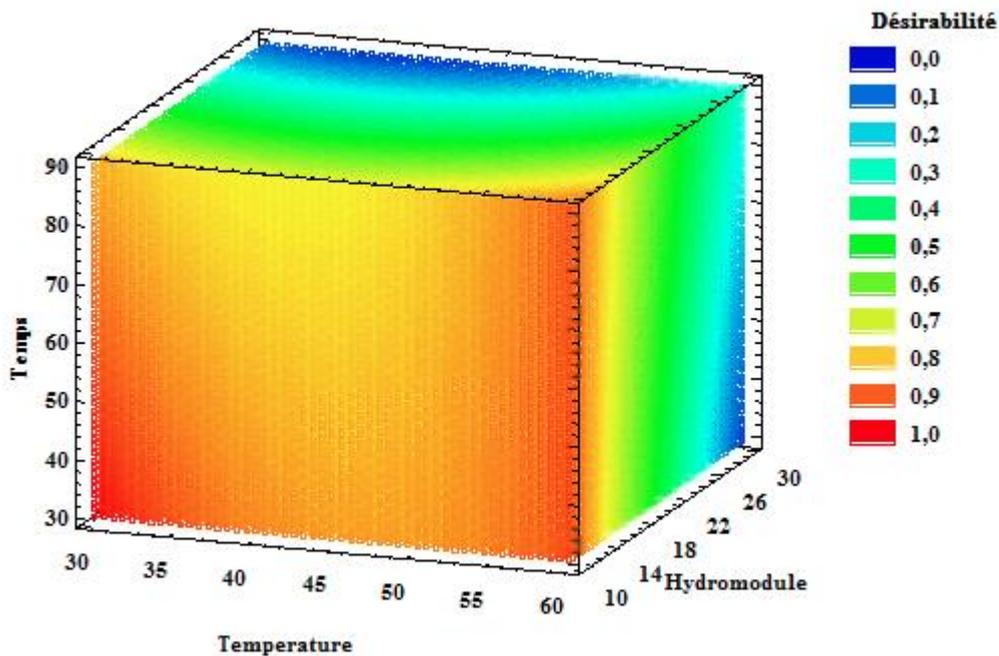


Figure III-17 : Graphique de la désirabilité pour la teneur en flavonoïdes (TF)

La position optimale, affichée en rouge, est caractérisée par des valeurs faibles de température, d'hydromodule et du temps d'extraction.

La figure III-17 indique que l'atteinte de ces valeurs optimales, est possible avec une désirabilité de l'ordre de 100 % pour la teneur en flavonoïdes, en assurant comme conditions opératoires, une température de 30 °C, hydromodule de 10 g/200mL, et une durée d'extraction de 30 min.

L'étude des profils de désirabilité permet de déterminer visuellement les niveaux des variables prédictives qui produisent les réponses prévues les plus désirables sur les variables dépendantes.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Cette étude a porté sur l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques du *Rosmarinus officinalis* L., provenant de la région d'Alger, du nord d'Algérie. Les essais d'extraction solide-liquide ont été effectués en charge dispersée, à l'échelle laboratoire.

L'optimisation des principaux paramètres du procédé, en l'occurrence, la température, l'hydromodule et la durée d'extraction, a été menée par planification des expériences, en adoptant un plan factoriel à deux niveaux des trois paramètres, 2^3 , les critères d'optimisation étant la teneur en polyphénols totaux, la teneur en flavonoïdes et le pouvoir antioxydant des extraits.

Les essais programmés par le plan factoriel ont été réalisés, en utilisant la matière végétale broyée de diamètres inférieurs à 1,12 mm, pour un taux d'humidité constant. Des modèles du second ordre, donnant l'évolution de chaque critère d'optimisation, en fonction des trois paramètres étudiés, ont été établis.

L'analyse statistique de ces modèles, menée à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion XVII, a montré qu'ils décrivent correctement le comportement du système étudié et ont permis la détermination des valeurs optimales de la température, de l'hydromodule et la durée de l'extraction, dans le domaine d'étude, correspondant au niveau inférieur des trois paramètres, de coordonnées 30 °C, 10 g/200mL, 30 min.

Les surfaces de réponse, correspondant à chacun des critères d'optimisation, dont les allures se sont révélées identiques, ce qui prouve que les composés phénoliques interviennent dans l'activité antioxydante des extraits du *Rosmarinus officinalis* L.

Ces résultats peuvent être une base pour l'extrapolation de l'optimisation des conditions expérimentales de l'extraction des composés phénoliques, par procédé pilote ou industriel. Ces derniers, présentent un grand intérêt économique, suite à la présente étude où l'effet de température, de l'hydromodule et la durée d'extraction a une influence considérable sur la teneur en composés phénoliques et surtout avec un minimum d'expériences.

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux et des flavonoïdes, par le réactif de Folin-Ciocalteu et par la méthode d' $AlCl_3$, respectivement, a révélé que le *Rosmarinus officinalis* L. est riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes.

L'extraction par le mélange (éthanol-eau, 80%) nous a permis d'extraire une quantité importante des composés phénoliques, ce qui confirme les résultats trouvés par (Mohsen et Ammar, 2009), que l'éthanol est le meilleur solvant pour extraire les composés phénoliques, en

raison de leur polarité et de leur bonne solubilité pour ces composés, ainsi l'addition de l'eau au système d'extraction a amélioré la teneur en composés phénoliques.

Cette étude, loin d'être achevée, a permis, néanmoins, d'optimiser le procédé d'extraction solide-liquide, de mettre en évidence la présence des antioxydants dans les extraits du *Rosmarinus officinalis* L., d'évaluer leur potentiel antioxydant par la méthode de DPPH, et d'envisager leur éventuelle récupération.

L'étude des antioxydants dans le *Rosmarinus officinalis* L., est une perspective pour la découverte de nouvelles substances naturelles dans les plantes algériennes ayant un pouvoir antioxydant important, afin d'enrichir une variété d'antioxydants naturels, substituer les antioxydants synthétiques qui ont des effets indésirables contre l'organisme, et de trouver des remèdes aux maladies causées par le stress oxydatif.

Cette étude ouvre la voie de futures recherches, en vue de la valorisation du *Rosmarinus officinalis* L., et comme perspective on propose :

- D'utiliser des procédés alternatifs tels que l'extraction assistée par micro-onde, l'extraction par CO₂ supercritique et d'optimiser les conditions opératoires, afin de minimiser la consommation énergétique, et donc le coût de production des antioxydants naturels.
- L'utilisation de solvants moins toxiques comme l'eau, afin d'obtenir des substances naturelles pures et d'augmenter l'activité antioxydante, ainsi que l'activité antibactérienne.
- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles qui peuvent répondre aux différents problèmes de la santé et être un alternatif aux médicaments synthétiques, pour être employées dans des applications thérapeutiques et pharmacologiques.
- La réalisation d'études approfondies et complémentaires de l'activité antioxydante et antibactérienne des composés phénoliques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires.

BIBLIOGRAPHIE

- **ABDOUL, D.S.** Compositions chimiques d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : valorisation. Thèse de doctorat, Ouagadougou: Université d'Ouagadougou : 2002, p. 24-27.
- **AGROBIO.** Evaluer la capacité antioxydante par des tests in vitro. [en ligne]. [consulté le 05/05/2016]. Disponible sur : <<http://www.agrobio-rennes.com/fr/evaluer-la-capacite-antioxydante-par-des-tests-vitro>>
- **AKOWAUH, G.A., ZHARI, I., NORGYATI, I., SADIKUN, A., KHAMSAH, S.M.** The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry.*, 2004, 87: 559-566.
- **ALBERT, Y., LEUNG, STEVEN, F.** Encyclopedia of Common Naturel Ingredients Used In Foods, Drugs, And Cosmetics, 2eme éd, Awrley- interscience publication. 1996, 445 p.
- **ALMELA, L., SANCHEZ-MUNOZ, B., FERNANDEZ-LOPEZ, J.A., ROCA, M.J., RABE, V.** Liquid chromatographic- mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J Chromatography A.*, 2006, 1120: 221-229.
- **ANDERSON, C.M., HALLBERG, A., HOGBERG, T.** Advances in development of pharmaceutical antioxidants. *Adv. Drug. Res.* 1996, 28 : 65-180.
- **AOUCHER, H.** Extraction et valorisation des polyphénols d'inule visqueuse. 48 p. Mémoire de projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'état: Génie Chimique : Alger, Ecole Nationale Polytechnique : 2010.
- **ARNOLD, N., VALENTINI, G., BELLOMARIA, B., LAOUER, H.** Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. From Algeria and *R. Officinallis* L. from other countries. *J. essent. Oil Res.* 1997, 9: 167-175.
- **ARSLAN, D. MUSA-OZCAN, M.** Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and color characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management: Selcuk University, Turquie* : 2007. (in press).
- **AURELIO, D.L.** Caractérisation et optimisation de la flaveur du jus d'orange non fait de concentré. Thèse pour l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph. D.). Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Université Laval : 2002.

- **BAHORUN, T.** Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritiass. 1997, p. 83-94.
- **BAKCHICHE, B., GHERIB, A., SMAIL, A., CUSTÓDIA, G., GRACAMIGUEL, M.** Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2013, 46 : 85–96.
- **BAKIREL, T., BAKIREL, U., USTUNER-KELES, O., GUNES-ULGEN, S., YARDIBI H.** In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol*. 2008, 116: 64-73.
- **BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN, S.** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential use. *Food Chem*. 2006, 99: 191-203.
- **BATE-SMITH, E.C.** Leuco-anthocyanins. 1. Detection and identification of anthocyanidins formed leuco-anthocyanins in plant tissues. *The Biochemical Journal*. 1954, 58: 122-125.
- **BEART, J.E., LILLEY, T.H., HASLAM, E.** Polyphenol interactions.2. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalysed decomposition, observation on some polymeric proanthocyanidins. *Journal of the Chemical. Society-Perkin Transactions 2*. 1985, 1439-1443.
- **BEAUQUESNE, B., PINKAS, L., TORK, M.** Plantes médicinales des régions tempérées, éd. Masson. 1980, p 19-21.
- **BELLAKHDAR, J.** La pharmacopée marocaine traditionnelle. *Ibis Press*, éd. Paris. 1997, 764 p.
- **BELOUED, A.** Plantes médicinales d'Algérie. 2ème Edition. Office des publications universitaires, éd. Alger. 1998, 274 p.
- **BELYAGOUBI NEE BENHAMMOU, N.** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. 82 p. Thèse de doctorat : Tlemcen, Université Aboubakr Belkaïd : 2012.
- **BEN AMOR, B.** Maitrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs : texturation par détente instantanée contrôlée (DIC). 187 p. Thèse de doctorat : France, Université de la Rochelle : 2008.
- **BLOOR, S.J.** *Method, Enzymol*. 2001, 335: 3-14.

- **BONDIA-PONS, I., AURA A.M., VUORELA, S., KOLEHMAINEN, M., MYKKANEN, H., POUTANEN, K.** Rye phenolics in nutrition and health. *J. of Cereal Science*. 2009, 3: 1-14.
- **BONNAILLIE, C., SALACS, M., VASSILIOVA, E., SAYKOVA, I.** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Génie Industriel*. [en ligne]. 2012, vol. 7 [consulté le 01 juin 2016]. p 35-36 Disponible sur : < <http://www.revue-genie-industriel.info> >
- **BOSSOKPI, I.P.L.** Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). 133 p. Thèse de pharmacie : Bamako, 2002.
- **BOUKHALFA, K.** Apport des couplages CPG/MS et CPG/IR dans l'analyse des mélanges naturels complexes, exemple l'huile essentielle de romarin. Mémoire de projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat : Alger, USTHB : 1995.
- **BOUNOUA, D., BOUMAHDI, L.** Hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L. et valorisation des eaux de distillation. Mémoire de projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat : Génie Chimique, Alger : Ecole Nationale Polytechnique : 2013.
- **BRAVO, L.** Polyphenol chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr. Rev.* 1998, 56: 317-333.
- **BRITO-ARIAS, M.** Synthesis and Characterization of Glycosides, Ed. Spring, NewYork, 2007.
- **BRUNETON, J.** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. Techniques & Documentation. 2 ème éd. Paris : Lavoisier, 1993.
- **BRUNETON, J.** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. Techniques & Documentation. 3 ème éd. Paris : Lavoisier, 1999. 1120 p.
- **CHAFAI ELALAOU, A., BOUKIL, A., BACHAR, M., DRISS, L., GUERMAL, A.** Projet PAM : Intégration de la biodiversité dans les chaînes de valeurs des plantes aromatiques et médicinales méditerranéennes : Manuel des bonnes pratiques de Collecte du romarin « *Rosmarinus officinalis* L. » éd : Maroc, 2014, p 3-5.
- **CHAN, C.H., YUSOFF, R., NGOH, G.C., KUNNG, F.W.L.** Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J. Chromatogr. A*. 2011, 1218 (37): 6213–6225.

- **CHEN, Q., SHI, H., HO, C.T.** Effects of rosmary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1992, 69: 999-1002.
- **CHIASSON, H., LANGER, A., BOSTANIAN, N., VINCENT, C., POLIQUIN, A.** Acaricidal Properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) Essential Oils Obtained by Three Methods of Extraction. *J. Economic Entomology*, 2001. 94 p.
- **CHUNG, K., WONG, T.Y., WEI, C., HUNG, Y., LIN, Y.** Tannins and human health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1998, 38: 421-464.
- **CHUNG-HUNG, C., RORITA, Y., GEK-CHENG, N.** Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical engineering research and design.* 2014, 92: 1169–1186.
- **CILLARD, J., CILLARD, P., CORMIER, M.** Effect of Experimental Factors on the Prooxidant Behavior of *oc*-Tocopherol, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1980, 57: 255-261.
- **COLLIN, G.** L'industrie des produits Aromatiques végétaux et son marché. INFO-ESSENCES. Bulletin sur les huiles essentielles. 1997; n° 6.
- **COWAN, M.M.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re.*, 1999, 12 (4): 564- 582.
- **CRETU, E., KARONEN, M., SALMINEN, J.P., MIRCEA, C., TRIFAN, A., CHARALAMBO, C., CONSTANTINOU, A.I., ANCA MIRON, A.** In Vitro Study on the Antioxidant Activity of a Polyphenol-Rich Extract from *Pinus bmtia* Bark and Its Fractions. *J. of med. Food.* 2013, 16 (11): 1 - 8.
- **CROZIER, A., CLIFFORD, M.N., ASHIHARA, H.** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Éd: Blackwell Publishing Ltd, 2006.
- **CULEVIER, M.E., RICHARD, H., BERSSET, C.** Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1996, 73: 645-652.
- **DAPKEVICIUS, A., VENSKUTONIS, R., VAN BEEK, T.A., LINSSEN, J.P.H.** Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of Science Food and Agriculture.* 1998, 77(1): 140-146.
- **DEFRAIGNE, J.O., PINCEMAIL, J.** Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités, *Rev Med Liege*, 2007. 62 p.

- **DIBERT, K.** Contribution à l'étude de l'extraction solide-liquide de l'huile et de l'acide chlorogénique du café vert. 78 p. Thèse de doctorat : Lyon, Claude Bernard LYON I : 1989.
- **DJEDIAT, H.** Optimisation de l'extraction des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L. 50 p. Mémoire de projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat : Génie Chimique : Alger, Ecole Nationale Polytechnique, 2014.
- **DORMAN, H.J.D., BACHMAYER, O., KOSAR, M., HILTUNEN, R.** Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey, *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52: 762-770.
- **DRAGLAND, S., SANOO, H., WAKE, K., HOLTE, K., BLOMHOFF, R.** Culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxydants, *J. Nutr.* 2003, 133: 1286-1290.
- **DROESBEKE, J.J., FINE, J., SAPOTRA, G.** Plans d'expériences, applications à l'entreprise. éd. Paris, France: TECHNIP, 1997.
- **DUBOIS, G.E., GROSBAY, G.A., SAFFRON, P.** Non nutritive Sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones. *Science.* 1977, 195: 397-399.
- **EDENHARDER, R., GRUNHAGE, D.** Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* 2003, 540: 1-18.
- **EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY.** Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission on the use of rosemary extracts as a food additive, *The EFSA Journal*, 72: 4, 2008.
- **ESCUDE O.** Plantes médicinales : mode d'emploi, les reconnaître dans la nature, les utiliser, les cultiver au jardin, éd : Eugen Ulmer, Romarin, 2007. 210 P.
- **EVANS, P., KLINOWSKI, J., YANO, E., URANO, N.** Alzheimer's disease: a pathogenic role for alumino-silicate-induced phagocytic free radicals; *Free Rad. Res. Comms.* 1989, 6: 317- 321.
- **EXARCHOU, V., NENADIS, N., TSIMIDOU, M., GEROTHANASSIS, I.P., TROGANIS, A., BOSKOU, D.** Antioxidant Activities and Phenolic Composition of

- Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory, *J. Agric Food Chem.* 2002, 50: 5294-5299.
- **FADILI, K., AMALICH, S., N'DEDIANHOUA, S. K, Bouachrine M., MAHJOUBI M., EL HILALI F., ZAIR T.** Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc: *Rosmarinus Officinalis et Thymus Satureioides*. Aug, 2015, vol. 17 n° 1. 26 p. ISSN 2351-8014
 - **FRANCE-IDA, J.** Sondage: Les huiles essentielles au Québec. INFO-ESSENCES. Bulletin sur les huiles essentielles. 1996. n° 3.
 - **GERIN, M.** Solvants industriels : Santé, Sécurité, Substitution. éd. Paris : Masson, 2002.
 - **GOMEZ, G.** Abécédaire de chimie organique, 2014. [en ligne]. Consulté le 25/02/2016. Disponible sur : < <http://webpeda.ac-montpellier.fr> >.
 - **GONZALEZ-TRUJANO, M.E., PENA, E.I., MARTINEZ, A.L., MORENO, J., GUEVARA-FEFER, P., DECIGA- CAMPOS, M., LOPEZ-MUNOZ, F.J.** Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol.* 2007, 111: 476-482.
 - **GOUPY, J., CREIGHTON, L.** Introduction aux plans d'expériences avec applications, 4ème édition, éd, Paris : Dunod, 2009.
 - **GRESELE, P., CERLETTI, C., GUGLIELMINI, G., PIGNATELLI, P., DE GAETANO, G., VIOLI, F.** Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J. of Nutr. Biochem.* 2011, 22: 201-211.
 - **GUTTERIDGE, J.M.C.** Free radicals in disease processes a compilation of cause and consequence; *Free Rad. Res. Comms.* 1993, 19: 141-158.
 - **HABAUZIT, V., HORCAJADA, M.N.** Phenolic phytochemicals and bone. *Phytochem Rev.* 2008, 7: 313-344.
 - **HALVORSEN, B. L., CARLSEN, M. H., PHILLIPS, K. M.** Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in United States, *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 84: 95-135.
 - **HARBORNE, J. B.** General procedures and measurement of total phenolics. In J. B. Harborne. éd, Methods in plant biochemistry: London: Academic Press Volume Plant Phenolics. 1989, p. 1-28.
 - **HARBORNE, J. B.** Constraints on the evolution of biochemical Pathways. *Biol J. of the Linnean Societ.* 1990, 39: 135-151.

- **HASLAM, E.** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro.* 1996, 59: 205-215.
- **HAVSTEEN, B.H.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.* 2002, 96: 67–202.
- **HECK, D.E., VETRANO, A.M., MARIANO, T.M., LASKIN, J.D.** UVB light stimulates production of reactive oxygen species; *J. Biol. Chem.* 2003, 278: 22432-22436.
- **HEIMEUR, N., IDRISSE, HASSANI, L.M., AMINE, SERGHINI, M.** Les polyphénols de *Pyrus mamorensis* (*Rosaceae*). *Reviews in Biology and Biotechnology.* 2004, 3 (1): 37-42.
- **HEINRICH, M., KUFER, J., LEONTI, M., PARDO-DE-SANTAYANA, M.** Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol.* 2006, 107 :157-160.
- **HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., BAILLEUL, F.** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie.* 2004, 1: 3-6.
- **HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., SKALTSOUNIS, A.L., BAILLEUL, F.** Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. *Biochem. Syst. Ecol.* 2007, 35: 624-626.
- **HERZI, N.** Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. 7 p. Thèse de doctorat : Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse) : 2013.
- **HODEK, P., TREFIL, P., STIBOROVA, M.** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact.* 2002, 139: 1–21.
- **HORWITZ, W.** Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg, Md: AOAC International. 2002, chapitre 7.
- **IBAÑEZ, 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.
- **JOAQUIN, V., CARMEN, D.** Oxidative stability of virgin olive oil. *Eur. J. Lipidsc Technol.* 2002, 104: 661-676.

- **JUDDE, A.** Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique: mécanismes, conséquences, moyens de mesure. Juels antioxydants pour quelles applications, ocl. 2004, vol. 11, n° 6.
- **KHAIR, R.** Evaluation des extrais récupérés lors de l'extraction par solvant des feuilles du *Rosmarinus officinalis* L. 37 p. Mémoire de pour l'obtention du diplôme de Master : Génie Chimique : Alger, Ecole Nationale Polytechnique : 2016.
- **KIM, J.S., KWON, Y.S., SA, Y.J., KIM, M.J.** Isolation and identification of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) phenolics with antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 59 (1): 138-144.
- **KIM, N.S., LEE, D.S.** Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2002, 982: 31-47.
- **KIVILOMPOLO, M., HYOTYLAINEN, T.** Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of *Lamiaceae* herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *J Chromatography A*. 2007, 1145: 155-164.
- **KOSAR, M., DORMAN, H.J.D., HILTUNEN, R.** Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected *Lamiaceae* species. *Food Chem*. 2005, 91: 525-533.
- **KSOURI, R., MEGDICHE, W., DEBEZ, A., FALLEH, H., GRIGNON, C., ABDELLY, C.** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol Bioch*. 2007, 45: 244-249.
- **LAMBELET, P., WERNER, B.** Les techniques de séparation, Science Alimentaire. Ecole Polytechnique Fédéral, Lausanne. 2002, p. 2-19.
- **LE BOURVELLEC, C., GOUBLE, B., BUREAU, S., LOONIS, M., PLE, Y., RENARD, C.M.G.C.** Pink discoloration of canned pears: Role of procyanidin chemical depolymerization and procyanidin / cell wall interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, 61: 6679-6692.
- **LEE, K.W., HUR, H.J., LEE, C.Y.** Antiproliferative effects of dietary phenolic substances and hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem*. 2005, 53: 1990-1995.
- **LEONG, L.P., SHUI, G.** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem*. 2002, 76: 69-75.
- **LEYBROS, J., FREMEAUX, P.** Extraction solide-liquide, aspect théorique. *Techniques de l'ingénieur. J 2780*. 1990, p. 7-8.

- **LHULLIER, A.** Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat : Toulouse, Université de Toulouse : 2007.
- **LI, H.B., CHENG, K.W., WONG, C.C., FAN, K.W., CHEN, F., TIAN, Y.** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chem.* 2007, 102: 771-776.
- **LI, J., ZU, Y.G., FU, Y-J., YANG, Y.C., LI, S.M., LI, Z.N., WINK, M.** Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11. 2010, 637 p.
- **LUIS, J.C., MARTIN PEREZ, R., VALDES GONZALEZ, F.** UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. *Food Chem.* 2007, 101: 1211-1215.
- **LUQUE DE CASTRO, M.D., GARCIA-AYUSO, L.E.** Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future: *Analytica Chimica Acta.* 1998, 369: 1-10.
- **LUQUE-GARCIA, J.L., LUQUE DE CASTRO, M.D.** Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment-Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography A.*1034. 2004, p. 237-242.
- **MACHEIX, J.J., FLEURIET, A., SARNI-MANCHADO, P.** Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles : Les polyphénols en agroalimentaire, éd. Paris : Lavoisier, 2006.
- **MAFART P., BELIARD, E.** Génie Industriel Alimentaire techniques séparatives. Techniques et Documentation, éd. Paris : Lavoisier, 1993.
- **MARC, F., DAVIN, A., DEGGLENE-BENBRAHIM, L., FERRAND, C., BACCAUNAUD, M., FRITSCH, P.** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences.* 2004, 20 : 458-463.
- **MARSTON, A.** Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A,* 2011, 1218(19) : 2676-2683.
- **MARTIN, S., ANDRIANTSITOHAINA, R.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéologie.* 2002, 51 : 304-315.

- **MCGUIRE, W., SPRAG, R. C., COHEN, A. B., COCHRANE, C. G.** Studies on the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome; *J. Clin. Invest.* 1982, 69: 543-553.
- **MIDDLETON, E., KANDASWAMI, C., THEOHARIDES, T.C.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000, 52: 673-839.
- **MIGUEL, M. G.** Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. *Flavor and fragrance journal.* 2009, 25(5). 291-312.
- **MILLER, N.J., SAMPSON, J., CANDEIAS L.P., BRAMLEY, P.M., RICE-EVANS, C.A.** Antioxydant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters.* 1996, 384: 240-219.
- **MOHSEN, S. M., AMMAR, A.S.M.** Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chem.* 2009, 112: 595-598.
- **MOGHADDAM, M., KHALEGHI MIRAN, S.N., GHASEMI PIRBALOUTI, A., MEHDIZADEH, L., GHADERI, Y.** Variation in essential oil composition and antioxidant activity of cumin (*Cuminum cyminum L.*) fruits during stages of maturity. *Industrial Crops and Products: activity of cumin (Cuminum cyminum L.) fruits during stages of maturity.* *Industrial Crops and Products.* 2015, 70: 163–16.
- **MOLYNEUX, P.** The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2004, 26(2): 211-219.
- **MONTAGNIER, L.R., OLIVIER, C. PASQUIER:** Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases Marcel Dekker, New York, 1998.
- **MORTENSEN, A., SKIBSTED, L.H., TRUSSCOTT, T.G.** The interaction of dietary carotenoids with radical species, *Arch. Biophys.* 2001, 385 (1): 13-19.
- **MUKOHATA, Y., NAKABAYASHI, S., HIGASHIDA, M.** Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett.* 1978, 85: 215– 218.
- **MUZON, O.** Antioxydant Activity of Rosmary, 50 (50); 1999. 355 p.
- **NAKTANI, N., INATANI, R., FUWA, H.H., SETA, H.** Structure of a new antioxidants phenolic diterpens isolated from rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*), *Agric. Biol. Chem.* 1983. 1661 p.
- **NIJVELDT, R. J., NOOD, E., HOORN, D. E., BOELENS, P. G., NORREN, K., LEEWEN, P.** Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin Nutr.* 2001, 74: 418–425.

- **NITSCH, J.P., NITSCH, C.** Synergistes naturels des auxines et des gibbérellines. *Bull. Soc. Fr.* 1961, 26: 2237-2240.
- **O'CONNELL, J.E., FOX, P.F.** Proposed mechanism for the effect of polyphenols on the heat stability of milk. *International Dairy Journal.* 1999, 9 (8): 523–536.
- **O'KENNEDY, R., THORNES, R.D.** Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. *John Wiley & Sons Inc.* New York. N.Y, 1997.
- **OKAMURA, N., HARAGUCHIU, H., HASHIMOTO, K., YAGHI, A.** Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry.* 1994, 37 (5): 1463-1466.
- **OLLIER C.** L'extraction végétale en phytothérapie. Thèse de doctorat : Faculté de pharmacie, Montpellier : Université de Montpellier I : 1991.
- **PARIS ET AL.** Effect of carnosolic acid products. 1993, vol. 56, n°8, 1426 p.
- **PAUME, M.C.** Sauvages et médicinales plante remèdes pour nos petits maux, romarin, éd. France : Edisud, 2008. 212 p.
- **PELLI, K., LYLly, M.** Les antioxydants dans l'alimentation, VTT Biotechnology, Finlande. Project n° QLK1-CT - 2000 – 00040. 2003. N° ISBN : 2-7380-1069-5.
- **PENCHEV, P.I.** 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. 65 - 80. Thèse de doctorat : Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse : 2010.
- **PENG, Y., YUAN, J., LIU, F., YE, J.** Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2005, 39: 431-437.
- **PERRY, G., CASH, A.D., SMITH, M.A.** Alzheimer disease and oxidative stress; *J. Biomed. Biotechnol.* 2002, p. 2-3.
- **PIETTA, P.G.** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Naturel Products.* 2000, 63: 1035-1042.
- **PIOZZI, F.** *PHYTOCHEMISTRY J.* 1996, vol : 6. 146 p.
- **PIZZALE, L., BORTOLOMEAZZI, R., VICHI, S., UBAREGGER, E., CONTE, L.S.** Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content, *J. Sci. Food. Agric.* 2002, 82: 1645-1651.

- **PODDA, M., TRABER, M.G., WEBER, C., YAN, L.J., PACKER, L.** UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin; *Free Rad. Biol. Med.* 1998, 24 : 55-65.
- **POKORNY, J., YANISHLIEVA, N., GORDON, M.** Antioxidant in food: practical applications, éd: Woodhead. 2000. 17: 43-44.
- **POLETTI, A.** Fleurs et plantes médicinales. 2ème Edition. Delachaux & Niestlé, éd, Paris, 1988. 222 p.
- **PONCET-LEGRAND C., CARTALADE D., PUTAUX, J.L., CHEYNIER V., VERNHET A.** Flavan-3-ol Aggregation in Model Ethanolic Solutions: Incidence of Polyphenol Structure, Concentration, Ethanol Content, and Ionic Strength. *Langmuir*, 2003, 19(25), 10563–10572.
- **PUSHPARAH, F.S., UROOJ, A.** Antioxidant Activity in Two Pearl Millet (*Pennisetum typhoideum*) Cultivars as Influenced by Processing. *Antioxidants*. 2014, 3: 55-66. doi: 10.3390/antiox3010055.
- **QUE, F., MAO, L., PAN, X.** Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compound. *Food Research International*. 2006, 39 : 581-587.
- **QUEZEL, P., SANTA, S.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales 565 p. Tome II. C.N.R.S, éd, Paris. 1963.
- **RAHMAN, I., BISWAS, S.K., KIRKHAM, P.A.** Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*, 2006. 72: 1439-1452.
- **RAMEAU, J.C., MANSION, D., DUMÉ, G., TIMBAL, J., LECOINTE, A., DUPONT, P.** Flore forestière française : Région méditerranéenne, éd. Institut pour le développement forestier/Ministère de l'agriculture et de la pêche, 2008.
- **RANGKADILOK, N., SITTHIMONCHAI, S., WORASUTTAYANGKURN, L., MAHIDOL, C., RUCHIRAWAT, M., SATAYAVIVAD, J.** Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruits extract. *Food Chem. Toxicol.* 2007, 45: 328-336.
- **RICHEIMER, M.A., BERNARDO-GIL, M.G., ESQUIVEL, M.M.** *Melissa officinalis* L.: study of antioxidant activity in supercritical residues, *J. Supercrit Fluids*. 2001, 21: 51-60.
- **SALHI, H., SEHAL, I.** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de l'inule visqueuse. 61 p. Thèse de doctorat : Génie Chimique, Alger : Ecole Nationale Polytechnique, 2012.

- **SATO, Y., HOTTA N., SAKAMOTO, N., MATSUOKA, S., OHISHI, N., YAGI, K.** Lipid peroxide levels in plasma of diabetic patients; *Biochem. Med.* 1979, 21: 104-107.
- **SCALBERT, A., MANACH, C., MORAND, C., REMESY, C.** Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2005, 45: 287–306.
- **SCHELER, A.** Dictionnaire d'étymologie française d'après les résultats de la science moderne, éd. Bruxelles : Auguste Schnée, 1862.
- **SHERER R., GODOY H.T.** Antioxydant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method, *Food Chemistry.*, 2009. 112: 654-658.
- **SCHLTZ, H., AMBROSCH, G.** Characterization of oakmoss products used in perfumery by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog A.* 1989, 466: 301-306.
- **SCHWARTZ, K., TERNES, W.** Isolation and formation of other phenolic diterpens. 1992, vol. 195. 99 p.
- **SERGENT, O., GRIFFON, B., CILLARD, P., CILLARD, J.** Alcool et stress oxydatif; *Pathol. Biol.* 2001, p. 49: 689-695.
- **SHAN, B., CAI, Y.Z., SUN, M., CORKE, H.** Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents, *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53: 7749-7759.
- **SILBERFELD, T., REEB, C., DOUX, Y., CLÉMENT, H.** Guide des plantes mellifères : 200 plantes de France et d'Europe, éd., Paris : Delachaux et Niestlé, 2012. 24 p.
- **SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965, 16:144-158
- **SOHAL, R. S., MOCKETT, R. J., ORR, W. C.** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis; *Free Rad. Biol. Med.* 2002, 33: 575-586.
- **SOYAL, D., JINDAL, A., SINGGH I., GOYAL, P.K.** Modulation of radiation-induced biochemical alterations in mice by rosemary (*Rosemarinus officinalis*) extract. *Phytomedicine.* 2007, 14: 701-705.
- **STATGRAPHICS® CENTURION XVII.** Manuel de l'Utilisateur, éd, Paris: Stat Point Technologies Inc, 2015.

- **STEFANOVITS-BANYAI, E., TULOK, M.H., HEGEDUS, A., RENNER, C., SZOLLOSI, VARGA, I.** Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones+. *Acta Biologica Szegediensis*. 2003, 47:111-113.
- **SU, S.K., WILLEY, R.C.** Changes in Apple Juice Flavor Compounds During Processing. *Engineering/processing, journal of food science*. 1998, 63 (4): 688-691.
- **TEIXEIRA DA SILVA, J.A.** Mining the essential oils of the Anthemideae. *Afr. J. Biotechnol.* 2004, 3: 706-720.
- **TEUSCHER, ANTON, R., LOBSTEIN, A.** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles, éd, Paris, France : Lavoisier, 2005. 522 p.
- **THOMAS, M.** Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*). *Food and Nutrition*. Université d'Orléans. French. 2011. NNT: 2011ORLE2032.
- **TSIMOGIANNINS, D. I., OREOPOULOU, V.** The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 2006, 7: 140-146.
- **VAN ACKER, S., VAN BALEN, G.P., VAN DEN BERG, D.J., VAN DER VIJGH, W.J.F.** Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol*, 1996, 56: 935– 943.
- **VARELTZIS K., KOUFIDIS D., GAVRILIDOU E., VASILIADOU S.** Effectiveness of a natural rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage, *Z Lebensm Unters Forsch A*. 1997, vol. 205, p. 93-96.
- **WANG, J.W., HASHIMOTO, K., SHIBAMATO, T.** Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in model meat system, *J. Agric. Food Chim.* 1995, 43: 2707-2712.
- **YAACOUB R.** Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux ; Intérêt de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés. Thèse de doctorat, N° 2009AGPT 0048, Paris : Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro paris tech) : 2009.
- **YAO L.H., JIANG Y.M., SHI J., TOMAS-BARBERAN F.A., DATTA N., SINGANUSONG R., CHEN S.S.** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr.* 2004, 59: 113-122.

- **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.
- **ZHANG, Y., VAREED, S. K., NAIR, M. G.** Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci*. 2005, 76: 1465-1472.
- **ZHENG, W., WANG, S. Y.** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J. Agric. Food Chem*. 2001, 49: 5165-5170.

WEBOGRAPHIE

- **Site web [1]**
[http://www.passeportsante.net/fr/Solutions/HerbierMedicinal/Plante.aspx?doc=romarin_h
m](http://www.passeportsante.net/fr/Solutions/HerbierMedicinal/Plante.aspx?doc=romarin_hm)
- **Site web [2]** http://reliance9.free.fr/Page_verte/romarin.html
- **Site web [3]** [http://www.doctissimo.fr/html/sante/phytotherapie/plante-
medicinale/romarin.htm](http://www.doctissimo.fr/html/sante/phytotherapie/plante-medicinale/romarin.htm)
- **Site web [4]** <http://www.pharmaciedelepoulle.com/romarin.htm>
- **Site web [5]** [https://www.semencier.com/articles/plantes-aromatiques/44-le-romarin-
rosmarinus-officinalis.html](https://www.semencier.com/articles/plantes-aromatiques/44-le-romarin-rosmarinus-officinalis.html)
- **Site web [6]** <http://www.mr-plantes.com/2014/07/romarin/>
- **Site web [7]** [http://www.thierrysouccar.com/nutrition/info/quest-ce-que-le-stress-oxydant-
471](http://www.thierrysouccar.com/nutrition/info/quest-ce-que-le-stress-oxydant-471)
- **Site web [8]** <http://fr.wikipedia.org/wiki/Antioxydant>
- **Site web [9]** <https://www.iso.org/obp/ui#!iso:std:iso:5939:ed-1:v1:fr>