

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

FACULTE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE ET SCIENCES DE LA MATIERE

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ POUR OBTENIR LE DIPLÔME DE MAGISTER

EN CHIMIE ORGANIQUE

OPTION : PHYSICO-CHIMIE MOLECULAIRE

PRESENTE PAR :

HAMIDI ABDELRAZAG

THÈME :

Etude phytochimique et activité biologique de la plante

Limoniastrum guyonianum

Devant le jury:

Soutenu le : 23/01/2013

M. Saidi Mokhtar	Pr.	Université Kasdi Merbah Ouargla	Président
M. Ouahrani Mohammed Ridha	Pr.	Université Kasdi Merbah Ouargla	Rapporteur
M. Dendougui Houcine	Pr.	Université Kasdi Merbah Ouargla	Examineur
M. Signi Ladjel	Pr.	Université Kasdi Merbah Ouargla	Examineur
M ^{me} Ghiaba Zineb	MA/A	Université Kasdi Merbah Ouargla	Invitée

Année universitaire: 2011/2012

Avant propos

Avant tout, je remercie **DIEU**, sans **Lui** ce manuscrit n'aurait pu exister.

Ma thèse a été réalisée au sein du laboratoire de valorisation et de promotion des ressources sahariennes (VPRS) de l'Université de Ouargla, sous la direction du Professeur **Ouhrani Mohammed Ridha** que je tiens à remercier pour la disponibilité, la confiance, les conseils, l'encadrement et le soutien moral qu'il a su m'apporter tout au long la période de recherche.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Mr **Dendougui Houcine** pour son aide et son énorme soutien concernant la réalisation de ce projet.

Je remercie également Mr **Saidi Mokhtar** pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

J'exprime mes vifs remerciements à Mr **Dendougui Houcine** et Mr **Signi Ladjel** qui ont bien voulu examiner ce travail.

Je remercie sincèrement Madame **Ghiaba Zineb** et Mademoiselle **Kendour Zaouia** pour leur énorme contribution dans la réalisation de cette thèse, qui m'ont orienté, m'ont soutenu et dirigé mes premiers pas, et qui m'ont toujours aidé chaque fois que je désirais avancer dans la recherche de différentes solutions.

Je remercie de tout cœur Mr **Chihhi Ismail**, Mr **Bechki Lazhar** et Mr **Zidane Mohamed** qui m'ont fait partager les difficultés et les moments délicats.

Mes plus vifs remerciements à tous mes amis de la promotion pour leur soutien et pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble en particulier Atmani et Messai.

Je remercie également, toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

ملخص:

إن دراسة نوع ليمونياستروم جيونيا نوم (*Limoniastrum guyonianum*) تناول فحص فيتوكيميائي يهدف إلى كشف مختلف عائلات المركبات الكيميائية المتواجدة في الأوراق. لقد حضر مستخلصين خامين انطلاقاً من أوراق هذه النبتة، أحدهما مثنولي والآخر أسيتوني .

إن كمية الفينولات الكلية وكذا الفلافونيدات قد حددت انطلاقاً من منحنيات قياسية لحمض الجاليك و الروتين على التوالي. النتائج بينت أن مستخلص الأسيتون غني أكثر بالفينولات المتعددة و الفلافونيدات من مستخلص المثنول.

إن تقدير النشاط المضاد للأوكسدة للمستخلصين المثنولي و الأسيتوني بطريقتي إرجاع الحديد (FRAP) وكذا تفخيخ الجذر الحر DPPH بينت بان المستخلص الأسيتوني اظهر قدرة ارجاعية اكبر من المستخلص المثنولي.

إن القدرة المضادة للنشاط البكتيري قد عينت بطريقة الانتشار على جيلوز ميلر هانتن لثلاث بكتيريا *Staphylococcus aureus*؛ *Staphylococcus albus*؛ *E. coli* . لقد أوضحت النتائج بان المستخلص المثنولي أبدى نشاط متوسط ضد كل من *E. coli* و *S. aureus* . كما أبدى نشاط ضعيف ضد *S. albus* . في المقابل المستخلص الأسيتوني اظهر فعالية جيدة ضد الأنواع الثلاث من البكتيريا .

إن دراسة مقارنة بين الدهون المستخرجة من أوراق النبتة والدهون المستخرجة من بقايا التقطير البخاري ، سمحت بمعرفة وجود اختلافات في الثوابت الفيزيائية وعدد الجزيئات الموجودة في هذه الدهون، أما من ناحية المردود فهما متشابهان. فيما يخص الدهون المستخلصة والمعالجة بالكربون النشط، تمت متابعتها بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ، هذه الدهون تحتوي على اثنين من الجزيئات المختلفة. لقد تم حساب مردودها، فكان حوالي 0.81.

تم استخراج الزيوت الأساسية عن طريق التقطير البخار. المردود منخفض جداً، وهو يساوي 0.025.

كلمات دالة : ليمونياستروم جيونيا نوم ، دراسة فيتوكيميائية ، مركبات فينولية ، فلافونيدات ، ليبيدات ، زيت أساسي ، قدرة مضادة للأوكسدة ، قدرة مضادة للبكتيريا .

Résumé

L'étude de l'espèce *Limoniastrum guyonianum* a porté sur un screening phytochimique visant à identifier les différentes familles de composés chimiques contenus dans les feuilles. Deux extraits bruts ont été préparés à partir des feuilles de cette plante, l'un méthanolique, l'autre acétonique.

Les dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes effectués sur ces extraits bruts ont été déterminés à partir des courbes d'étalonnage d'acide gallique et de la rutine respectivement. Les résultats montrent que l'extrait acétonique est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que l'extrait méthanolique.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanolique et acétonique par la méthode de réduction de fer (FRAP) et celle du piégeage de radical libre DPPH a montré que l'extrait acétonique manifeste un pouvoir antioxydant plus grand que l'extrait méthanolique .

L'effet antimicrobien a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton pour les bactéries-tests *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Eischerichia coli*. Les résultats mettent en évidence que l' extrait méthanolique a manifesté une activité modérée contre *E.coli* et *S.aureus*, et une faible activité contre *S.albus* . En revanche l'extrait acétonique a présenté une bonne activité vis-à-vis les trois bactéries.

L'étude comparative, entre les lipides extraits des feuilles de la plante et les lipides extraits des résidus de l'hydrodistillation, a permis de visualiser des différences concernant les constantes physico-chimiques et le nombre de molécules contenues dans ces deux lipides. Leurs rendements sont voisins. Les lipides extraits et ayant subi au charbon actif, sont identifiés par chromatographie sur couche mince (CCM), ces lipides contiennent deux molécules différentes. Leur rendement a été calculé, il est de l'ordre **0.81**.

Les huiles essentielles sont extraites par hydrodistillation. Le rendement est très faible, il est égal à **0.025**.

Mots clés : *Limoniastrum guyonianum*, étude phytochimique, composés phénoliques, flavonoïdes, lipides, huile essentielle, pouvoir antioxydant, pouvoir antimicrobien.

Abstract

The study of the species *Limoniastrum guyonianum* covered a phytochemical screening to know the different families of chemical compounds in the leaves. Two crude extracts were prepared from the leaves of this plant, one methanolic, the other one acetonic .

Measurements of total polyphenols and flavonoids performed on these crude extracts were determined from calibration curves of gallic acid and rutin, respectively. The results show that the acetone extract is richer in polyphenols and flavonoids than the methanolic extract.

The evaluation of antioxidant activity of methanolic and acetonic extracts by the method of reduction of iron (FRAP) and the trapping of free radical DPPH showed that the acetonic extract shows antioxidant power greater than the methanolic extract.

The antimicrobial effect was determined by the agar diffusion method Mueller-Hinton tests on bacteria-*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Eischerichia coli*. The findings show that the methanolic extract showed moderate activity against *E. coli* and *S. aureus*, and low activity against *S.albus*. However the acetonic extract showed high activity vis-à-vis the three bacteria.

The comparative study between lipids extracted from the leaves of the plant and the lipids extracted from the steam distillation residue, has enabled us to see differences in the physicochemical constants and the number of molecules contained in these two lipids. Their yields are similar. The lipids extracts, and having undergone activated carbon, are identified by thin layer chromatography (TLC), these lipids contain two different molecules. Their yield was calculated, it is about **0.81**.

Essential oils are extracted by steam distillation. The yield is very low, it is equal to **0.025**.

Keywords: *Limoniastrum Guyonianum*, phytochemical study, phenolic compounds, flavonoids, lipids, Essential oil, antioxidant potency, antimicrobial potency.

Liste des abréviations

Abs :	Absorbance.
ADN :	Acide Désoxyribonucléique.
AG :	Acide gras.
ATCC :	American type culture collection.
DPPH :	Diphényles picrylhydrazyl.
ERO :	Espèces réactives de l'oxygène.
GC-FID :	Chromatographie en phase gazeuse- détecteur à ionisation de flamme
GC-MS :	Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse
HIV :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
IC :	Concentration inhibitrice.
Kcal :	Kilo calorie.
MeOH :	Méthanol.
mM :	Milli molaire .
NCIMB :	Collection Nationale de la Bactérie Industrielle et Marine.
SM :	Spectrométrie de masse.
UV :	Ultra Violet.
µg :	Microgramme.
µl :	Microlitre.
% :	Pourcentage.

Glossaire

- Allelopathie :** c'est un phénomène où de nombreuses espèces végétales synthétisent des molécules capables d'agir sur le développement des plantes avoisinantes.
- Angiosperme :** dont les graines sont renfermées dans des fruits.
- Antioedémateux:** contre l'œdème : infiltration de liquide séreux dans le tissu conjonctif.
- Anti tumorale :** substance ou produit qui permet de lutter contre les tumeurs.
- Carcinogène :** pouvant provoquer ou favoriser le cancer.
- Collagène :** est une famille de protéines, le plus souvent présente sous forme fibrillaire.
- Dicotylédone :** dont l'embryon a deux cotylédons, lobes foliacés s'insérant dans la graine graine .
- Diurétique :** est une substance qui entraîne une augmentation de la sécrétion urinaire.
- Dysenterie :** inflammation des intestins due à des amibes ou des bacilles, se caractérisant par de violentes diarrhées.
- Halophile :** vivant sur un sol salé, en parlant d'une plante.
- Hypotenseur :** une classe de médicament qui est administré pour réduire l'hypertension artérielle.
- Mutagène :** qui est capable de produire des mutations dans les organismes vivants.
- Phytopathogène:** susceptible de provoquer une maladie chez un végétal.
- Prophylactique :** relatif à la prophylaxie, ensemble des mesures destinées éviter les maladies et leur développement.
- Prophylaxie :** ensemble des mesures destinées à éviter les maladies et leur développement.
- Spermatophyte :** embranchement du règne végétal regroupant les gymnospermes et les angiospermes.
- vasculo-protecteur :** principe protégeant la paroi des vaisseaux des plantes.

Liste des figures

Figure 01: Limoniastrum Guyonianum –Algérie- entre touggourt et ouargla , sur le plateau du taibet- 10/10/2006.....	5
Figure 02: Structures de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles.....	17
Figure 03 : l'acide benzoïque.....	19
Figure 04 : l'acide cinnamique.....	19
Figure 05 : trans-resveratrol.....	20
Figure 06 : exemple de lignane (matairesinol).....	20
Figure 07: benzo-2-pyrone.....	21
Figure 08: exemple de coumarines(peucédanol).....	21
Figure 09: exemple de xanthones(xanthène-9-one).....	21
Figure 10: Structure générale des flavonoïdes.	22
Figure 11: exemple de chalcone (isobavachalcone).....	22
Figure 12: exemple d'aurones(castillène).....	23
Figure 13: structure générale des flavones.....	23
Figure 14: structure générale des flavanones.....	23
Figure 15: exemple d' isoflavones.....	24
Figure 16: exemple d' isoflavanones.....	24
Figure 17: exemple d' anthocyanes(delphinidine).....	25
Figure 18 : grille récapitulatif des poly phénols.....	26
Figure 19 : L'hydrodistillation traditionnelle.....	35
Figure 20 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.....	36
Figure 21: Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes.....	37
Figure 22 : Un extracteur Soxhlet.....	51
Figure 23 : Principe du spectrophotomètre UV-visible mono faisceau.....	59
Figure 24: Forme libre et réduite du DPPH	61
Figure 25 : Variation du rendement selon les deux types 1 et 2.....	66
Figure 26 : Photographie représentant la plaque chromatographique des lipides 1 et 2 dans le système S1.....	68
Figure 27 : Photographie représentant la plaque chromatographique des lipides 1 et 2 dans le système S2.....	69
Figure 28 : Photographie représentant la plaque chromatographique des lipides 1 et 2 dans le système S5.....	69
Figure 29 : Photographies représentant la plaque chromatographique des lipides dans le système S4 aux deux longueurs d'ondes 365nm et 254nm.....	71

Figure 30 : Courbe d'étalonnage des polyphénols.....	73
Figure 31: Teneur en polyphénols totaux (mg/g de poids sec de la plante).....	73
Figure 32 : Courbe d'étalonnage de la rutine.....	74
Figure 33: Teneur en flavonoïdes totaux (mg/g de poids sec de la plante).....	74
Figure 34: Comparaison des teneurs des polyphénols et des flavonoïdes.....	75
Figure 35 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de acide ascorbique.....	76
Figure 36 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique.....	76
Figure 37 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait acétonique.....	76
Figure 38 : IC ₅₀ de l'acide ascorbique, de l'extrait acétonique et méthanolique.....	77
Figure 39 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.....	78
Figure 40 : Pouvoir réducteur de l'extrait MeOH	78
Figure 41 : Pouvoir réducteur de l'extrait acétone.....	79
Figure 42 : Pouvoir réducteur de BHA.....	79
Figure 43 : Pouvoir réducteur des extraits méthanolique , acétonique et de BHA.....	79
Figure 44 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des extraits méthanolique et acétonique relatives aux différentes souches bactériennes.....	82

Liste des tableaux

Tableau 01: composition chimique (%) des huiles essentielles de <i>L. guyonianum</i> dans les racines, les tiges, les feuilles et les fleurs	8
Tableau 02: effet antibactérien des huiles de différents organes de <i>L. guyonianum</i> – méthode de dilution-	12
Tableau 03: Activités biologiques des composés polyphénoliques.....	27
Tableau 04: Composition phytochimique des feuilles de la plante.....	72
Tableau 05 : Détermination de la zone d' inhibition de l' extrait méthanolique.....	81
Tableau 06 : Détermination de la zone d' inhibition de l' extrait acétonique.....	81

Sommaire

Avant propos.....	
Résumé.....	
Liste des abréviations.....	
Glossaire.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	

Partie bibliographique

Introduction générale	2
-----------------------------	---

CHAPITRE I :

La plante sélectionnée : *Limoniastrum guyonianum*

<i>Limoniastrum guyonianum</i>	5
Description botanique	5
1. Caractères morphologiques.....	5
2. Taxonomies et systématiques.....	6
3. Habitat et répartition géographique.....	6
4. Noms vernaculaires.....	6
5. Utilisations en médecine traditionnelle	6
6. Données phytochimiques de la plante.....	6
7. Données pharmacologiques.....	11

CHAPITRE II :

les substances actives: huiles essentielles, composés phénoliques et lipides	14
Introduction.....	14

1. les huiles essentielles	15
1.1. Définition.....	15
1.2. Rôle physiologique.....	16
1.3. Composition chimique des huiles essentielles.....	16
1.4. Activités biologiques.....	17
2. Les composés phénoliques	18
2-1. Généralités.....	18
2-2. Classification.....	19
2-2-1. Les non flavonoïdes.....	19
2-2-2. Les flavonoïdes.....	21
2-2-2-1. Les flavonoïdes au sens strict.....	22
2-2-2-2. Les isoflavonoïdes.....	24
2-2-2-3. Les anthocyanes.....	25
2-2-2-4. Les tanins.....	25
2-3. Intérêt biologique des flavonoïdes et composés phénoliques.....	27
3. Les lipides	28
3.1. Définition.....	28
3.2. Les lipides vrais.....	28
3.2.1. Les acides gras.....	28
3.2.1.1. Les acides gras saturés.....	28
3.2.1.2. Les acides gras insaturés.....	29
3.2.1.3. Les acides gras atypiques.....	29
3.2.2. Les lipides simples.....	29
3.2.2.1. Les acylglycérols.....	29
3.2.2.2. Les cérides.....	30
3.2.2.3. Les stérides.....	30
3.2.3. Les lipides complexes.....	31
3.2.3.1. Les glycérophospholipides.....	31
3.2.3.2. Les glycéroglycolipides.....	31
3.2.3.3. Les sphingolipides.....	32
3.3. Rôle biologique.....	32

CHAPITRE III :

Les procédés d'extraction

1. Les techniques d'extraction des huiles essentielles	34
1.1. La distillation.....	34
1.2. Extraction par micro-ondes.....	36
1.3. Extractions par les solvants et par les graisses.....	37
1.4. Extraction au CO2 supercritique.....	38

CHAPITRE IV :

Les antioxydants et les antimicrobiens

1. Les antioxydants	40
1.1. Les radicaux libres.....	40
1.1.1. Généralités.....	40
1.1.2. Mécanismes d'action des radicaux libres.....	40
1.1.3. Principaux radicaux libres.....	41
1.2. Les antioxydants.....	41
1.2.1. Définition.....	41
1.2.2. Les antioxydants naturels.....	41
1.3. Le stress oxydatif.....	42
1.3.1. Définition.....	42
1.3.2. Origine du stress.....	42
2. Les agents antimicrobiens	42
2.1. Introduction.....	42
2.2. Mode d'action des agents antimicrobiens.....	42
2.3. Action germicide.....	42
2.4. Action germistatique (bactériostatique et fongistatique).....	43
2.5. Types d'agents antimicrobiens.....	43
2.5.1. Agents physiques.....	43
2.5.2. Agents chimiques.....	43
2.5.3. Agents chimio thérapeutiques.....	44
2.6. Détermination de l'activité antimicrobienne.....	44

2.6.1. Notion de germe test.....	44
2.6.2. Détermination des doses actives d'un agent antimicrobien.....	45
2.6.3. Méthode des porte-germes.....	45
2.6.4. Détermination des doses minimales inhibitrices et bactéricides.....	45

Partie expérimentale

CHAPITRE V :

Matériels et méthodes

1. Matériel végétal.....	48
1.1. Récolte de la plante.....	48
1.2. Conservation.....	48
2. Analyses phytochimiques.....	48
2.1. Test des alcaloïdes.....	48
2.2. Test des saponosides.....	49
2.3. Test des flavonoïdes.....	49
2.4. Test des coumarines.....	49
2.5. Test des stérols et triterpènes.....	49
2.6. Test des Tanins.....	49
2.7. Test des glycosides.....	49
3. Les huiles essentielles.....	50
3.1. Procédé d'extraction.....	50
3.2. Calcul du rendement.....	50
4. Les lipides:.....	50
4.1. Principe d'extraction par soxhlet.....	50
4.2. Extraction des lipides.....	51
4.2.1. Evaporation.....	52
4.3. Détermination des constantes physico chimiques.....	52
4.3.1. La densité.....	52
4.3.2. L'indice de réfraction.....	52

4.3.3. L'indice d'acide	53
4.3.4. L'indice de saponification.....	53
4.3.5. L'indice d'estérification.....	54
4.3.6. L'indice d'iode.....	55
4.4. Séparation des lipides.....	56
4.4.1. La chromatographie sur couche mince (CCM).....	56
4.4.2. La séparation par chromatographie sur couche mince (CCM).....	57
4.5. Calcul du rendement	57
5.les composés phénoliques	57
5.1. Extraction des polyphénols	57
5.1.1. Macération.....	57
5.1.2. Evaporation.....	58
5.1.3. Extraction par les solvants.....	58
5.1.3.1. Affrontement à l'acétate d'éthyle	58
5.2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible).....	58
5.2.1. Spectrophotométrie	58
5.2.2. Analyses quantitatives.....	59
5.2.2.1. Dosage des polyphénols.....	59
5.2.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	60
6.Test antioxydant	60
6.1.Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH.....	60
6.1.1. Préparation de la solution DPPH	61
6.1.2. Solution d'extrait	61
6.1.3. L'essai au DPPH.....	61
6.1.4. Expression des résultats.....	62
6.2. Méthode de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxydant power).....	62
7.Tests microbiologiques.....	63
7.1. Les souches testées.....	63
7.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des disques.....	63

CHAPITRE VI :

Résultats et discussions

I- Résultats de l'étude phytochimique	66
1. Rendement en huile essentielle	66
2. Rendements et analyse des lipides	66
2.1.Lipides sans subir au charbon actif.....	66
2.1.1.Rendement des lipides.....	66
2.1.2. Indice d'acide.....	67
2.1.3. Indice de saponification.....	67
2.1.4. Indice d'iode.....	67
2.1.5. Indice de réfraction.....	68
2.1.6. Densité des lipides.....	68
2.1.7. Chromatographie des lipides par CCM.....	68
2.2.Lipides ayant subi au charbon actif.....	70
2.2.1.Rendement des lipides.....	70
2.2.2. Indice d'acide.....	70
2.2.3. Indice de saponification.....	70
2.2.4. Indice d'iode.....	70
2.2.5. Indice de réfraction.....	70
2.2.6. Densité des lipides.....	70
2.2.7. Chromatographie des lipides par CCM.....	71
3. Composition phytochimique	71
4.Teneur en polyphénols	72
5.Teneur en flavonoïdes	73
6.Comparaison des teneurs des polyphénols et des flavonoïdes	75
II- Résultats du test du pouvoir antioxydant	75
1. Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH	75
1.1.Comparaison des IC ₅₀ avec les teneurs en polyphénols et flavonoïdes.....	77

2. Méthode de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power)	77
2.1.Comparaison des rapports Ki/K avec les teneurs en polyphénols et flavonoïdes.....	80
2.2.Comparaison des rapports Ki/K avec IC ₅₀	80
III- Résultats du test du pouvoir antimicrobien	80
1.Pouvoir antimicrobien	80
2.Pouvoir antimicrobien de l'antibiotique	81
Conclusion générale	83
Références bibliographiques	86

Partie bibliographique

Introduction générale

Un grand nombre de plantes, aromatiques, médicinales, des plantes épicées et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales folklorique. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires font et reste l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles.

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués à des composés tels que les alcaloïdes et dérivés, des terpènes, stéroïdes et des composés poly phénoliques [1].

Beaucoup de métabolites secondaires sont également important pour notre alimentation (goût, couleur), alors que d'autres parmi alcaloïdes, anthocyanines, flavonoïdes, quinine, lignanes, les stéroïdes, et les terpenoïdes ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux et font partie des drogues, colorants, arômes, parfums et des insecticides [2].

Le continent africain est un des continents dotés d'une biodiversité la plus riche dans le monde, avec une avalanche de beaucoup de plantes utilisées comme herbes, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. C'est en grande partie dû à la géographie vaste englobant une masse de terre approximativement de 216, 634.000 hectares de secteurs forestiers fermés. Plus de 5.000 de substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont avérées utiles dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies. Malgré la nature hétérogène du continent, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents chimio thérapeutiques et prophylactiques de ces plantes [3].

Ce travail vise à une étude phytochimique et activité antimicrobienne de la plante *Limonistrum guyonianum*.

Notre travail sera donc réparti en six chapitres, initié par une recherche bibliographique où nous apportons dans le premier chapitre la plante sélectionnée: *Limonistrum guyonianum*. Dans le deuxième chapitre nous avons développé un abrégé sur les substances actives: huiles essentielles, composés phénoliques et lipides. Le troisième chapitre élucide les différents procédés d'extraction des huiles essentielles. Le quatrième chapitre a pour objet de définir les antioxydants et les antimicrobiens.

La partie pratique est subdivisée en deux chapitres, le premier (5ème chapitre) présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail.

Enfin le sixième chapitre discute les résultats obtenus dans cette étude.

CHAPITRE I

LA PLANTE SELECTIONNEE :

Limoniastrum guyonianum

Limoniastrum guyonianum

L. Guyonianum est une plante qui appartient à la famille des Plombaginacées , est une famille de plantes dicotylédones qui comprend 775 espèces en 14 à 24 genres. Ce sont des plantes herbacées la plupart du temps, des arbustes ou des lianes. C'est une famille cosmopolite, que l'on peut rencontrer dans tous les milieux, y compris salins, des régions froides à tropicales [4].

L. Guyonianum est une plante saharienne qui se rencontre en grande abondance dans les terrains salés des sebkhas et des chotts.

Description botanique

1.Caractères morphologiques

Arbuste élevé de 0.5 à 1m , tiges très rameaux gris-vert. Les branches ont souvent de grosses galles. Longues feuilles linéaires ou presque cylindriques coriaces à extrémité un peu pointue. Les feuilles comportent des incrustations calcaires et sont couvertes de dépôts de sel. Fleurs roses purpurines à cinq pétales. C'est une espèce halophile [5].



Figure 01: *Limoniastrum Guyonianum* –Algérie- entre touggourt et ouargla ,sur le plateau du taibet- 10/10/2006 [5].

2. Taxonomies et systématiques

Règne:	Végétal
Embranchement:	Spermatophytes
Sous Embranchement:	Angiospermes
Classe:	Dicotylédones
Ordre:	Plumbaginales
Famille:	Plumbaginaceae
Genre:	<i>Limoniastrum</i>
Espèce:	<i>Limoniastrum guyonianum</i>

3. Habitat et répartition géographique

Elle est répandue dans les déserts du nord africain. Espèce endémique du Sahara septentrional (Algérie, Tunisie) dans les sols salés des grands chotts [5].

4. Noms vernaculaires

En Algérie, dans certaines régions, *Limoniastrum guyonianum* s'appelle Zeita , et dans d'autres régions, elle s'appelle Zita .

5. Utilisations en médecine traditionnelle

Dans le sud de la Tunisie, la tisane des feuilles, des branches et des galles de *L. guyonianum* a été utilisée dans la médecine populaire comme un remède de la dysenterie [6].

L'importance de la décoction des racines est considérable à ses applications en tant que dépuratif, les extraits des galles sont utilisés pour le tannage des cuirs [7].

6. Données phytochimiques de la plante

L'étude de Saoussen Hammami et al , de la Faculté des Sciences de Monastir (Tunisie) , montre que les huiles essentielles obtenues à partir des racines, graines,feuilles et fleurs de *L. guyonianum* ,

après hydro distillation dans un appareil de type Clévenger , ont respectivement. des rendements : 0,014; 0,01 ; 0,025 ; 0,028% [6].

L'analyse chimique des huiles volatiles des différents organes, a été effectuée par GC-FID et GC-MS. La composition des huiles est indiquée dans le tableau(01), trente-cinq constituants étaient identifiés dans l'huile essentielle des racines et qui représentent 87,28% de la totalité des huiles volatils, 25,67% de la composition de ces huiles sont des terpénoïdes. Les espèces chimiques qui représentent l'huile essentielle des racines sont : 2,43% amines, 2,78% alcools, 13,33% cétones, 29,84% esters, 1,41% éthers, 21,71% aldéhydes, 4,73% dérivés de soufre, 3,11% des acides gras, 2,3% des anhydrides , et 5,64% des dérivés phénoliques. (3Z) hex-3- enylmethanoate a été identifié comme étant le chimiotype de l'huile.

D'autre part , trente et un composants ont été identifiés dans les graines de l'huile essentielle, cette fraction est caractérisée par des composés non terpéniques 78,34% contenant essentiellement des esters et des aldéhydes (31,52 et 18,64%, respectivement). Furfural était le constituant le plus abondant dans la fraction des huiles volatiles des graines. Des esters ont été trouvés aux niveaux des huiles essentielles des feuilles et des fleurs (40,74 et 41,68%, respectivement). Les terpènes représentent 36,4% des constituants de l'huile des feuilles et 21,04% de celle des fleurs. Méthyl-2 ,4-diméthylbenzoate (14,70%) et 3 - phénylprop-2-enylpentanoate (15,05%) étaient les majeures constituants des fractions des huiles volatiles des feuilles et des fleurs , respectivement.

Une étude comparative des huiles des différents organes de *L. guyonianum* a été réalisée par GC-FID et le SM-GC, des différences ont été détectées dans la composition , d'autre part, 2 - (4-méthylcyclohex-3-ényl) propanol a été identifié comme un monoterpénol constitutif commun des racines, des feuilles et des fleurs .

En général, on a constaté que les proportions des sesquiterpènes augmentent dans l'ordre suivant: les tiges (totalement absent), les racines (3%), les fleurs (7%) et les feuilles (10%), tandis que les proportions des monoterpènes ont diminué à partir des feuilles de racines, des fleurs et des tiges (26, 23, 10 et 6%). En outre il a été noté que les dérivés terpéniques étaient présents en grandes quantités, dans les tiges (79%), les fleurs (65%), les racines (61%) et feuilles (47%), respectivement [6].

Tableau 01: composition chimique (%) des huiles essentielles de *L. guyonianum* dans les racines , les tiges, les feuilles et les fleurs [6].

N°	Composés	IR polaire	Racines (%)	tiges (%)	feuilles (%)	fleurs (%)	Identification
1	2-methylprop-2-enal	973	8.54	-	-	-	SM.IR
2	Methyl-2-methylbutanoate	1007	1.08	2.93	-	-	SM.IR
3	Hexan-3-one	1049	1.68	1.26	-	-	SM.IR
4	ethylbenzen	1252	-	-	-	2.11	SM.IR
5	(3Z) hex-3-enylmethanoate	1254	9.18	-	-	-	SM.IR
6	2-methylbutyl-2-methylbutanoate	1285	3.15	-	-	-	SM.IR
7	2-methylbutyl-3-methylbutanoate	1296	2.56	-	-	-	SM.IR
8	4,8-dimethylnona-1,3,7-trien	1297	-	3.08	-	-	SM.IR
9	(3E)-Hex-3-enylethanoate	1311	-	-	-	1.30	SM.IR
10	2,3-dimethyl-1,4-diazin	1318	2.43	-	-	-	SM.IR
11	Nonan-3-one	1354	-	2.01	-	-	SM.IR
12	2,6-dimethylhept-5-enal	1356	3.79	-	1.82	-	SM.IR
13	butylhexanoate	1408	2.07	-	-	1.82	SM.IR
14	Hexyl-2-methylbutanoate	1424	1.71	-	-	-	SM.IR
15	ethyloctanoate	1425	-	1.18	-	-	SM.IR
16	Prop-2-enyldisulfide	1435	-	3.4	-	-	SM.IR
17	1-(methylthio)-ethylprop-2-enylsulfide	1437	1.73	-	-	-	SM.IR
18	furfural	1462	-	14.63	1.15	-	SM.IR
19	(2E) hex-2-enylbutanoate	1465	1.18	-	-	-	SM.IR
20	2-isopropyl-5-methylcyclohexanone	1477	-	3.04	-	-	SM.IR
21	di-prop-2-enylsulfide	1489	-	1.04	-	-	SM.IR
22	1-methyl-3-propyltrisulfide	1494	1.47	2.00	-	-	SM.IR

23	5-methyl-2-(1-methyl-1-enyl)cyclohexylethanoate	1585	-	-	3.43	-	MS.RI
24	3-isopropyl-2,6-dimethylphenol	1586	-	-	-	8.17	MS.RI
25	5-methyl-2-(1-methyleth-1-enyl) cyclohexanone	1588	1.76	-	-	-	MS.RI
26	2-methyl-5-(1-methyleth-1-enyl) cyclohexanone	1614	-	-	-	2.00	MS.RI
27	5-isopropylbicyclo [3.1.0]hexan-2-one	1627	1.57	-	-	-	MS.RI
28	benzylformate	1674	-	1.31	-	-	MS.RI
29	1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ylpropanoate	1675	1.34	-	-	-	MS.RI
30	(3Z) Non-3-en-1-ol	1687	1.36	-	-	-	MS.RI
31	benzylethanoate	1714	-	1.1	3.65	-	MS.RI
32	3,4-dimethylfuran-2,5-dione	1730	2.3	5.17	-	-	MS.RI
33	(2E, 4Z) deca-2,4-dienal	1744	8.31	-	-	-	MS.RI
34	2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-5-methylcyclohexanone	1769	1.00	-	-	-	MS.RI
35	Benzyl-2-methylpropanoate	1771	-	6.2	-	1.37	MS.RI
36	3,7-dimethyloct-6-enylbutanoate	1786	1.00	2.12	-	-	MS.RI
37	(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl-2-methylpropanoate	1788	-	-	2.59	-	MS.RI
38	hexyloctanoate	1802	-	-	-	1.01	MS.RI
39	2-methyl-5-(1-methyleth-1-enyl) cyclohex-2-enol (carveol)	1804	1.42	1.55	-	-	MS.RI

40	1,2-dimethoxy-4-methybenzene	1805	-	-	5.40	-	SM.IR
41	2-methyl-5-(1-methyleth-1-enyl)cyclohex-2-nylethanoate	1814	-	-	-	2.12	SM.IR
42	Ethyl-2-hydroxybenzoate	1816	2.36	2.95	-	-	SM.IR
43	Methyl-2,4-dimethylbenzoate	1821	-	-	14.70	-	SM.IR
44	2-hydroxy-3-methylcyclopent-2-enone	1835	-	2.94	-	-	SM.IR
45	2-acetyl-5-methyloxol	1845	-	1.54	-	-	SM.IR
46	Dihydro- β -ionone	1852	4.81	-	-	-	SM.IR
47	2-phenylethyl-2-methylpropanoate	1855	-	5.03	4.43	1.04	SM.IR
48	Prop-2-enylpropyldisulfide	1866	1.53	-	-	-	SM.IR
49	3-isopropyliden-4a,5-dimethyldecahydronaphtalene	1867	-	-	-	3.15	SM.IR
50	1-(7,7-dimethylbicyclo [3.1.1] heptanyl)methanol	1871	-	1.02	8.12	-	SM.IR
51	(2Z)-3-phenylprop-2-enal	1889	-	1.17	-	-	SM.IR
52	2-(4'-methylcyclohex-3'-enyl)propan-1-ol	1905	-	1.02	1.26	1.16	SM.IR
53	4,7-dimethyl-1-(1'-methylethyl)-1,2-dihydronaphtalene	1917	-	-	1.05	-	SM.IR
54	3,7-dimethylocta-2,6-dienyl-3-methylbutanoate	1918	2.04	-	-	-	SM.IR
55	2-ethylhexanoic acid	1953	1.07	-	-	-	SM.IR
56	(2E) 3,7-dimethylocta-2,6-dienylpentanoate	1965	-	-	5.11	2.66	SM.IR
57	3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one	1966	-	1.11	-	-	SM.IR
58	pentadecanal	2002	1.07	-	-	-	SM.IR
59	1-(1,5-dimethylhex-4-enyl)-4-methylcyclohex-3-enol	2014	-	-	2.74	-	SM.IR
60	(2E)-3-phenylprop-2-enal	2019	-	-	-	1.69	SM.IR
61	2-phenylethylpentanoate	2037	-	-	1.37	-	SM.IR
62	Pentyl-2-hydroxybenzoate	2075	-	-	-	4.53	SM.IR
63	Hexadecane-2-one	2091	2.51	1.1	-	-	SM.IR
64	1,2,4-trimethoxybenzene	2099	-	-	-	1.65	SM.IR
65	(3Z) hex-3-enylbenzoate	2106	-	-	-	4.98	SM.IR

66	1-(4-methoxyphenyl)ethanone	2113	-	-	-	1.35	SM.IR
67	Oct-7-enoic acid	2150	-	-	-	2.36	SM.IR
68	(2E) hex-2-enylbenzoate	2168	1.06	2.65	1.90	2.91	SM.IR
69	4-isopropylphenol	2177	-	-	-	1.39	SM.IR
70	2-methoxy-4-(prop-1-enyl)phenol	2184	2.30	-	-	-	SM.IR
71	Decahydro-6-isopropyl-4,8a-dimethylnaph-1-ol	2216	-	-	-	1.10	SM.IR
71	(3Z) hex-3-enyl-2-hydroxybenzoate	2232	-	1.59	-	-	SM.IR
73	2-methoxy-4-(prop-2-enyl)phenylethanoate	2260	-	-	-	1.94	SM.IR
74	(2E) 3-phenylprop-2-en-1-ol	2264	-	-	9.62	-	SM.IR
75	2-formyl-1,1,5-trimethylcyclohexa-2,4-dien-6-ol	2293	-	-	2.13	1.82	SM.IR
76	(Z) 3,7-dimethylocta-2,6-dienoic acid	2298	2.04	-	-	-	SM.IR
77	(2E) 3,7-dimethylocta-2,6-dienoic acid	2312	-	1.72	-	-	SM.IR
78	2-(4-methoxyphenyl) ethanol	2342	-	-	1.33	-	SM.IR
79	3-phenylprop-2-enylpentanoate	2347	-	-	-	15.05	SM.IR
80	2,3-(1',2'-dimethoxy-3'-allyl)benzyliden-1,4-dioxolane	2369	-	-	-	1.17	SM.IR
81	Benzoic acid	2424	-	1.44	-	1.01	SM.IR
82	benzophenone	2466	-	-	-	7.10	SM.IR
83	(9Z) Ethyloctadec-9-enoate	2472	-	-	-	1.89	SM.IR
84	4-(prop-2-enyl)-2-dimethoxyphenol	2493	-	-	-	1.43	SM.IR
85	5-hydroxymethylfurfural	2515	-	2.84	-	-	SM.IR
86	(9Z,12Z,15Z) ethyloctadeca-9,12,15-trienoate	2614	-	-	-	1.97	SM.IR

7. Données pharmacologiques

Selon l'étude de Saoussen Hammami et al , de la Faculté des Sciences de Monastir (Tunisie) , les essais biologiques ont montré que *L. guyonianum* a empêché la croissance visible de tous les bactéries testés à une concentration minimale inhibitrice (CMI = 0,02 mg/ml) [6]. Cela peut s'attribuer à l'abondance des esters et des aldéhydes. En fait, les aldéhydes sont connus dans la littérature pour leurs effets significatifs antibactériens [8]. Toutefois, dans de nombreux cas, l'ensemble des fractions des huiles volatiles s'avère plus actif que ses principaux constituants, cela donnait à penser que la contribution des composants moins abondants devrait être considérée

comme un effet synergique de tous les composants, [9]. Par exemple, le furfural carboxaldéhyde est le chémotype de d'huile essentielle (14,63%), ce composé est cité dans la littérature d'avoir des effets antimicrobiens, le même aldéhyde est moins abondant dans les feuilles (1,15%) et tout à fait absent dans les racines et dans les fractions des huiles volatiles actives des fleurs.

En comparaison avec d'autres plantes, les fractions des huiles volatiles de *L. guyonianum* ayant un CMI égal à 0,02 mg/ml, sont plus actifs que *Limonium echioides* et *Suaeda fruticosa* appartenant à la même Famille Plumbaginaceae , qui ont une CMI égal à 0,5 mg/ml [10].

Tableau 02: effet antibactérien des huiles de différents organes de *L. guyonianum* – méthode de dilution-[6].

	Racines	Racines	tiges	tiges	feuilles	feuilles	fleurs	fleurs
	CMI ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	CMB ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	CMI ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	CMB ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	CMI ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	CMB ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	CMI ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	CMB ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)
<i>Escherichia. coli</i> , ATCC 5218	20	-	20	-	20	-	20	-
<i>M. luteus</i> NCIMB 8166	20	-	20	-	20	-	20	-
<i>S. idermidis</i> NCIMB 853	20	-	20	-	20	-	20	-
<i>Staphylococcus aureus</i> . ATCC 29213	20	-	20	-	20	-	20	-

CHAPITRE II

LES SUBSTANCES ACTIVES: HUILES ESSENTIELLES, COMPOSES PHENOLIQUES ET LIPIDES

les substances actives: huiles essentielles, composés phénoliques et lipides.

introduction:

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites: les métabolites primaires et les métabolites secondaires [11].

- Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes, les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques.

- Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures.

Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

- Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Ils sont largement utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires.

La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles ou des matières premières pour la hémisynthèse de composés actifs. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs au XIX^{ème} siècle, a contribué à l'amélioration des connaissances des structures, ce qui a permis de passer progressivement d'une phytothérapie traditionnelle souvent empirique, acceptée parfois avec une certaine méfiance à une thérapie moderne, acceptée scientifiquement.

Les métabolites secondaires constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés anti oxydantes, anti microbiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes [12].

Ce sont des composés très hétérogènes tant par leur composition que par leur structure. Pendant longtemps, ces composés ont été considérés comme secondaires et métaboliquement inactifs, ils ne suscitaient donc que peu d'intérêt. A l'heure actuelle, cette opinion a changé, du fait de nombreuses recherches qui ont largement montré que ces composés ne sont pas inertes et contribuent efficacement dans la biosynthèse de divers métabolites de l'organisme.

Chez les végétaux, ils sont soumis à d'importantes variations quantitatives et qualitatives, ce qui témoigne d'une dynamique biochimique incontestable [13]. Ils interviennent dans des processus vitaux les plus divers. D'où l'importance croissante des études consacrées à ces composés.

Leurs modes d'action et leurs significations physiologiques ne sont pas encore suffisamment claires, d'où la place de plus en plus large qui revient aux études de ces composés et de leurs fonctions.

On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Parmi les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes on distingue :

- Les composés phénoliques qui interviennent dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance). Parmi ces composés, on citera les poly phénols, les lignines, les stilbènes, les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les anthocyanes et les tannins.
- Les alcaloïdes, renferme un atome d'azote dans la structure. Parmi ces derniers, certains relarguent de l'acide cyanhydrique quand les plantes sont abîmées. Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés. On citera la nicotine, l'atropine, la codéine, la lupinine.
- Les huiles essentielles: Ce sont des liquides concentrés et hydrophobes des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante, ces essences sont très volatiles et non miscibles à l'eau.

1. Les huiles essentielles

1-1. Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation par la vapeur ou des solvants [14].

Pour la 8e édition de la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles (= essences =huiles volatiles) sont : « des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. » [15].

1-2. Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu [16].

Il y a beaucoup de spéculation au sujet du " rôle " d'huiles essentielles des plantes. Certainement plusieurs effets apparent " utiles " ont été décrits: réduction de la compétition des autres espèces de plante (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines, et protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides, et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux [17].

Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, conservent l'humidité des plantes dans les climats désertiques [18].

1-3. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles volatiles sont des mélanges très complexes, les constituants sont principalement des mono terpènes et des sesquiterpènes de formule générale $(C_5H_8)_n$. les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. On estime qu'il y a plus de 1000 mono terpènes et 3000 de structures sesquiterpènes. D'autres composés incluent des phenylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote [19]. La figure 02 présente la structure de quelques composants retrouvés dans l'huile essentielle [20].

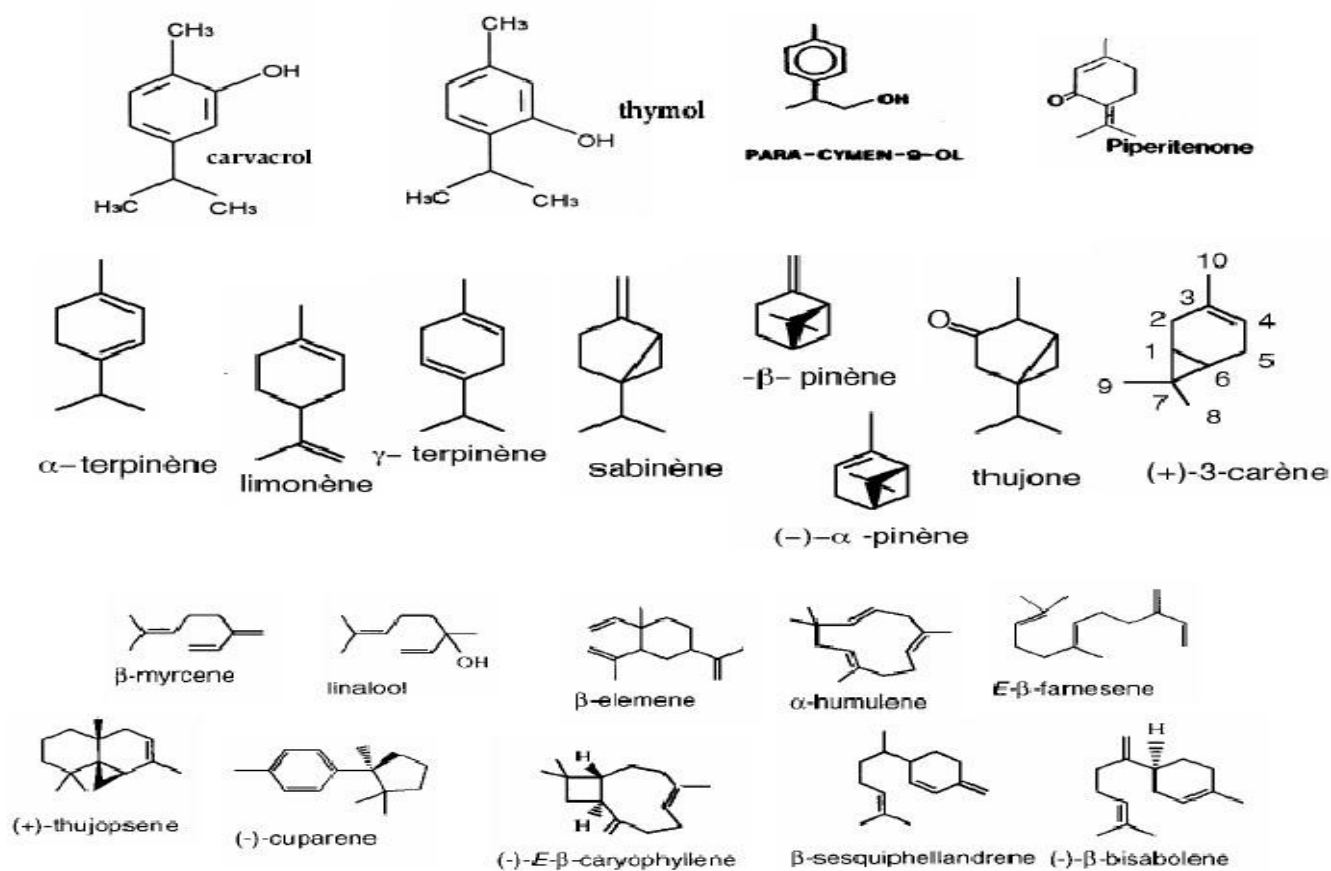


Figure 02: Structures de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles .

1-4. Activités biologiques

les huiles essentielles sont employées pour leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums [14].

Activité antimicrobienne et antiparasitaire : les terpénoïdes ont des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires. En 1977 a été signalé que 60% des dérivés des huiles essentielles examinés jusqu'au 1999 sont inhibiteurs de mycètes tandis que 30% inhibent les bactéries. Le triterpénoïde, l'acide betulinique est de juste un de plusieurs terpénoïdes qui ont montrés une action inhibitrice envers HIV. Le mécanisme de l'action des terpènes n'est pas entièrement compris mais on pense qu'il s'agit de la rupture de la membrane par les composés

lipophiles [21]. Le carvacrol et le thymol possèdent une activité antibactérienne, activité antifongique contre les mycètes phytopathogène [22], également l'huile essentielle de la Menthe pouliot dont le composé majoritaire est la R (+) Pulégone (82%) est dotée d'un fort pouvoir antifongique contre *Penicillium* et *Mucor* [23].

Activité antioxydante : la capacité antioxydante de l'huile volatile est étroitement liée à tout le contenu phénol [24].

Le carvacrol est un des composants principaux des huiles essentielles de certaines labiaceae (lamiaceae), comme l'origan, thym dont la teneur peut atteindre jusqu'à 86%. L'activité antioxydante de ces herbes est due au carvacrol, thymol et un autre phénol [24]. Ceci a été confirmé par un certain nombre de travaux. Jukić et Miloš (2005) ont montré dans une étude portant sur l'huile essentielle de *Thymus* (*Thymus vulgaris* L.), que les chemotypes phénoliques (thymol et carvacrol) et non phénoliques (linalool) sont capables de réduire le radical 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl, avec un effet plus élevé enregistré pour les chemotypes phénoliques. Ces observations, l'on a expliquées par la concentration élevée de thymol et carvacrol dans ces derniers.

2. Les composés phénoliques

2-1.Généralités

Le terme « *poly phénols* » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols. Ce qui exclurait alors les mono phénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. Donc la désignation générale « composés phénoliques » concerne à la fois les mono, les di et les poly phénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques, qui dérivent de la biogenèse de l'acide chikimique et/ou l'acétate et qui ne contiennent pas de l'azote [25].

Ils sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait sont des éléments faisant partie de l'alimentation animale. Ces composés présentent une grande diversité de structures, divisées en non flavonoïdes et flavonoïdes.

2-2. Classification

2-2-1. Les non flavonoïdes

Ce groupe comprend plusieurs composés parmi lesquels on distingue les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les coumarines et les xanthones .

➤ Les acides phénoliques

On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque (Figure 03) et les dérivés de l'acide cinnamique (Figure 04). La concentration de l'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents [18].

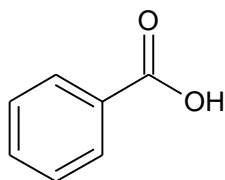


Figure 03 : l'acide benzoïque

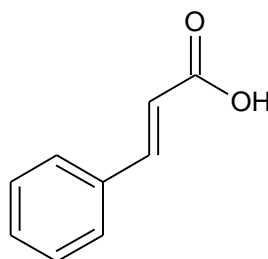


Figure 04 : l'acide cinnamique

➤ Les stilbènes

Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine, parmi ces composés on trouve le resveratrol qui est un anticancéreux présent dans certaines plantes médicinales, l'exemple le trans-resveratrol (Figure 05) [25].

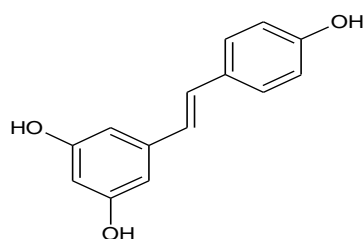


Figure 05 : trans-resveratrol

➤ Les lignanes et les lignines

Les monolignols sont les dérivés de l'acide cinnamique, ils servent de précurseurs pour les composés de types phénylpropanoïdes tels que les lignanes et les lignines.

Les lignines constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal et seraient formées par polymérisation oxydative de monolignols (monomères) qui sont les alcools *p*-coumarique, coniférique et sinapique [26].

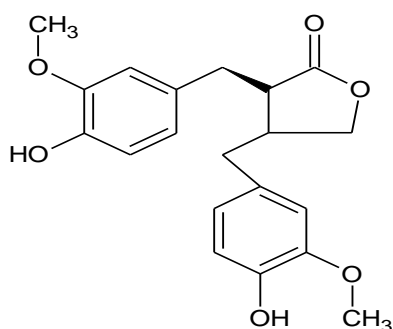


Figure 06 : exemple de lignane (matairesinol)

➤ Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (Figure 07). Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata*. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes [26].

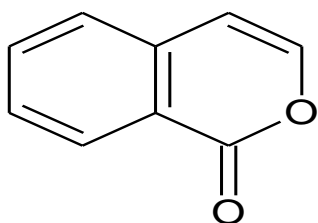


Figure 07: benzo-2-pyrone(isocoumarine)

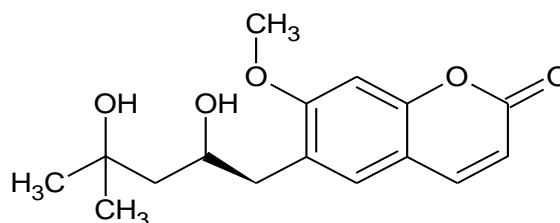


Figure 08: exemple de coumarines(peucedanol)

➤ Les xanthones

C'est une famille constituée des composés polyphénoliques généralement isolés dans les plantes supérieures et dans les microorganismes.

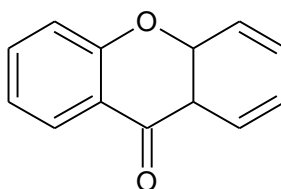


Figure 09: exemple de xanthones(xanthène-9-one)

2-2-2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastides particuliers, les chromoplastes [27]. Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On dénombre près de 6500 flavonoïdes répartis en 12 classes [28] et leur nombre ne cesse d'accroître. Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane (C6-C3-C6) (4); les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C [29].

De Rijke et coll. [29] ont classé les flavonoïdes en 6 familles qui impliquent les flavonols, les flavones, les flavanes, les isoflavones, les anthocyanines et les flavanols. Au sein de ces six familles, deux types de structures ont été relevés, celui des flavonoïdes au sens strict dont la structure porte le noyau aromatique B en position 3 sur la chaîne C3 et celui des isoflavonoïdes dont le noyau aromatique B est en position 2 sur la chaîne C3.

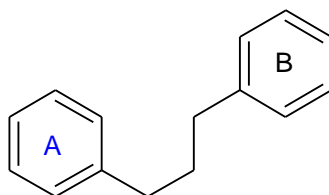


Figure 10: Structure générale des flavonoïdes.

2-2-2-1. Les flavonoïdes au sens strict

Dans ce groupe on distingue les chalcones, les aurones, les flavones, les flavanes, les flavanones, les flavanols, les flavonols et les flavanonols

➤ *Chalcones et dérivés*

Les chalcones sont des flavanoïdes ne comportant pas d'hétérocycle C. Ils sont prénylés le plus souvent sur le noyau A tandis que le noyau B reste peu ou pas substitué.

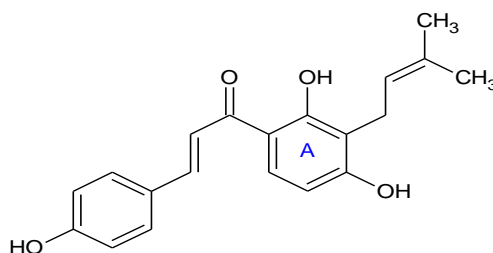


Figure 11: exemple de chalcone (isobavachalcone).

➤ *Aurones et dérivés*

Les aurones sont des isomères structuraux des flavones. Ils ont une structure proche mais différente de la plupart des autres flavonoïdes. Ces molécules dérivent de la chalcone. En effet dans les cas des aurones, la chalcone se ferme en formant un cycle à 5 atomes, alors qu'elle forme un cycle de 6 atomes pour les autres flavonoïdes.

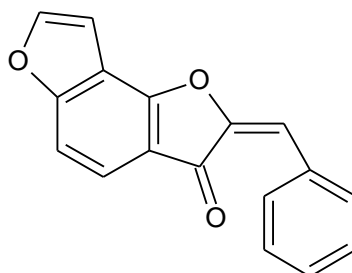


Figure 12: exemple d'aurones(castillène).

➤ *Flavones et flavanones*

Les flavones comme tous les flavonoïdes ont une structure C6-C3-C6 avec en C3 l'apparition d'un hétérocycle porteur d'un groupement carbonyle et d'une insaturation. Les flavanones ont une structure similaire à celle des flavones mais ne possèdent pas d'insaturation au niveau de l'hétérocycle.

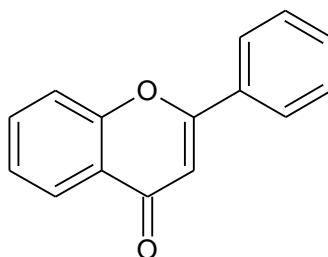


Figure 13: structure générale des flavones.

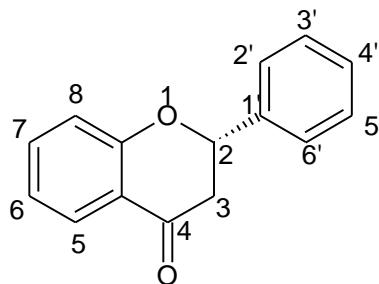


Figure 14: structure générale des flavanones.

Les flavonols et les flavanonols correspondent aux dérivés hydroxylés des flavones et des flavanones.

Les flavanones et les flavanonols dérivés sont les flavonoïdes responsables de la saveur amère de certaines pamplemousses, des citrons, des oranges.

Les flavanes sont des dérivés saturés et non carbonylés des flavones, ils sont caractérisés par la présence d'une double prénylation du noyau A (cyclisée et linéaire) et d'un pont époxy reliant les carbones 4 et 6' du noyau B.

2-2-2-2. Les isoflavonoïdes

Les iso flavonoïdes constituent une grande et très diversifiée sous classe des flavonoïdes. Ils dérivent d'une structure 1,2-diphénylpropane.

Ils peuvent être classés en une douzaine de catégories structurales: 3-arylcoumarines, coumaronochromones, coumestanes, isoflavanes, isoflavènes, isoflavones, roténoïdes, ptérocarpanes. Ces catégories diffèrent entre elles, par le degré d'oxydation et l'existence ou non, d'hétérocycles supplémentaires.

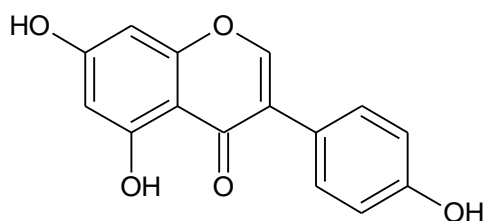


Figure15: exemple d' isoflavones (Génistéine).

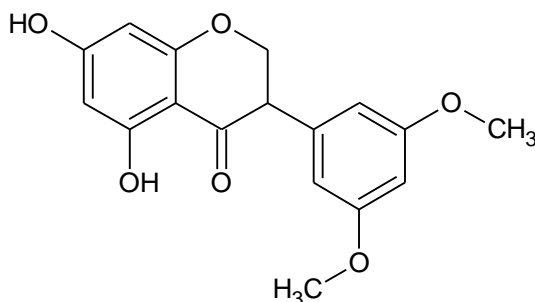


Figure16: exemple d' isoflavanones (5,7-Dihydroxy-2',4'-dimethoxyisoflavonone Homoferreirin)

2-2-2-3. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés [27]. Les anthocyanines sont des flavonoïdes porteurs d'une charge sur l'oxygène de l'hétérocycles C. La structure de base des anthocyanines est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C3 [30]. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange [31, 32]. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau [33]. Si la coloration des fleurs et des fruits est leur rôle le plus connu, on trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines.

En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle.

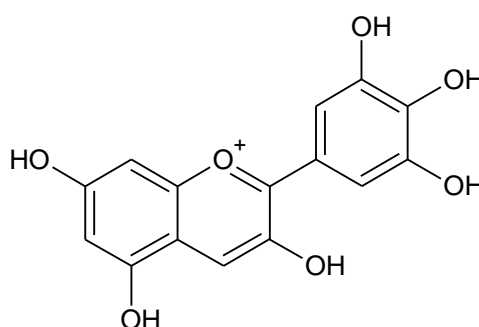


Figure17: exemple d'anthocyanes (delphinidine)

2-2-2-4. Les tanins

Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir par le dit composé. Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux [34]. On distingue: les tanins hydrolysables et condensés.

Polyphenols classification

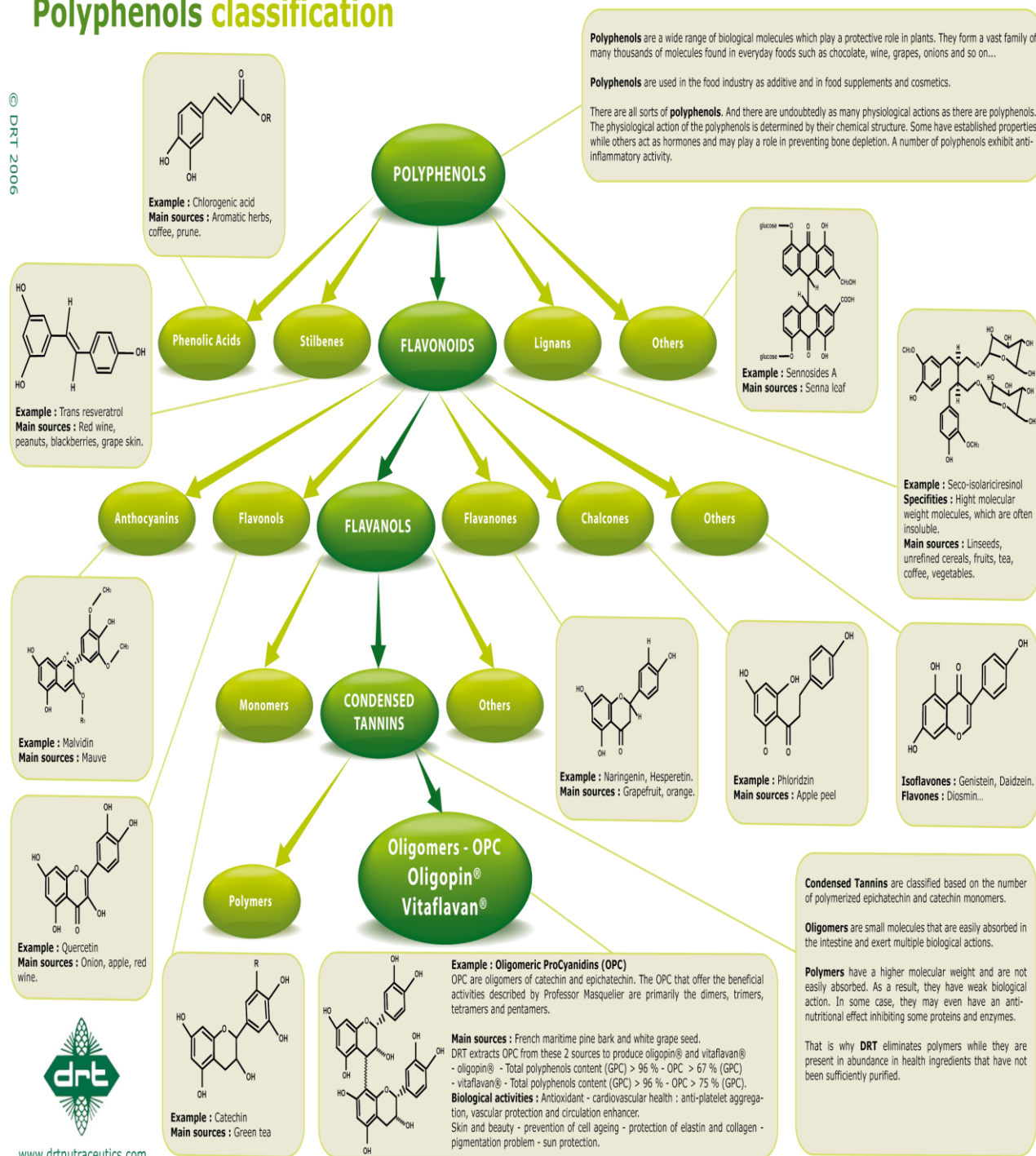


Figure 18 : grille récapitulatif des poly phénols.

2-3. Intérêt biologique des flavonoïdes et composés phénoliques

Les flavonoïdes montrent une activité antimicrobienne, exemple des travaux de Harikrishna et al. (2004), ont démontré le pouvoir antimicrobien d'un flavonoïde glycoside " prunine-6"-O-p-coumarate" contre deux souches de bactéries gram+ (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus albus*) et deux bactéries gram- (*Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*).

In vitro, chez les animaux de laboratoire, ils ont montré une inhibition de la croissance de diverses variétés de lignées de cellules cancéreuses [35].

Tableau 03: Activités biologiques des composés polyphénoliques.

Polyphenols	Activités	Auteurs
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériens Antifongiques Antioxydants	[36] [37] [38]
Coumarines	vasoprotectrices et antioedémateuses	[39]
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydants	[40] [41] [42] [43]
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires	[43]
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydants Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires	[44] [45] [46] [47] [48]
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydants	[49] [50]

3. Les lipides [51]

3.1. Définition

Alors que la plupart des familles de molécules de base du monde vivant sont définies par leurs structures chimiques, les lipides (du grec *lipos*, graisse) sont caractérisés par une propriété physique : la solubilité. Ce sont des composés à solubilité nulle ou faible dans l'eau mais par contre élevée dans les solvants organiques non polaires (méthanol, chloroforme, cyclohexane, éther éthylique, acétone...).

3.2. Les lipides vrais

Ils résultent de la condensation d'acides "gras" avec des alcools par liaison ester ou amide.

3.2.1. Les acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques R-COOH dont le radical R est une chaîne aliphatique de type hydrocarbure de longueur variable qui donne à la molécule son caractère hydrophobe (gras).

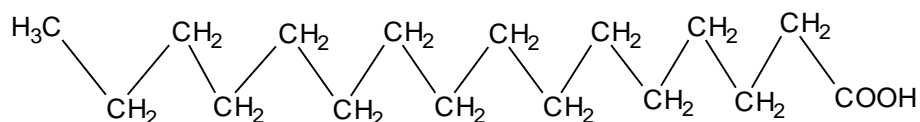
La grande majorité des acides gras naturels présentent les caractères communs suivants :

- mono carboxylique,
- chaîne linéaire avec un nombre pair de carbones,
- saturés ou en partie insaturés avec un nombre de double liaisons maximal de 6.

3.2.1.1. Les acides gras saturés

De formule générale $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$, chaque acide gras est constitué par une chaîne hydrocarbonée, plus ou moins longue, fortement apolaire et un groupement carboxyle polaire. Les plus abondants sont l'acide palmitique à 16C et l'acide stéarique à 18C.

Exemple d'un acide gras saturé : l'acide palmitique en C16 de formule $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{COOH}$

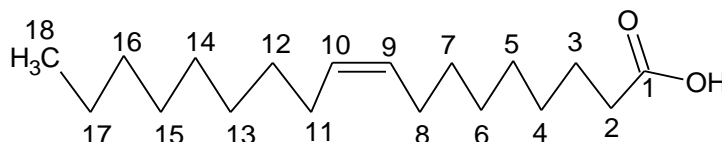


3.2.1.2. Les acides gras insaturés

Ils présentent dans leur molécule une ou plusieurs doubles liaisons. On dit qu'ils sont mono ou polyinsaturés. La présence de ces doubles liaisons leur confère des propriétés physico-chimiques particulières.

Exemple d'un acide gras mono-insaturé :

l'acide oléique en C18 possède une double liaison en position 9 (acide gras ω 9).



3.2.1.3. Les acides gras atypiques

Des acides gras à nombre impair de carbones sont présents dans les graisses animales ou dans des lipides microbiens. On trouve aussi des acides gras avec des modifications de la chaîne carbonée portant sur l'insaturation, ou ayant subi des substitutions, des cyclisations dans le monde végétal, microbien ou animal.

3.2.2. Les lipides simples

Les lipides simples, encore appelés homolipides sont des corps ternaires (C, H, O). Ils sont des esters d'acides gras que l'on classe en fonction de l'alcool :

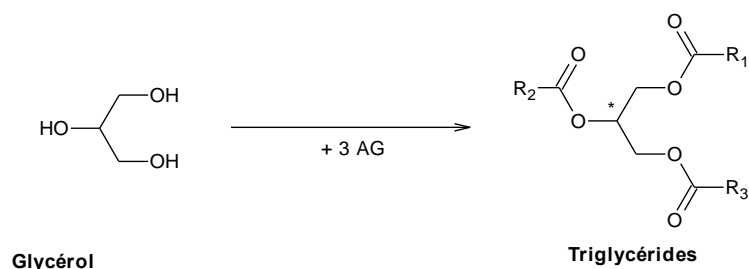
- **acylglycérols** (ou glycérides) sont des esters du glycérol,
- **cérides** sont des esters d'alcools à longue chaîne (alcool gras),
- **stérides** sont des esters de stérols (alcool polycyclique).

3.2.2.1. Les acylglycérols

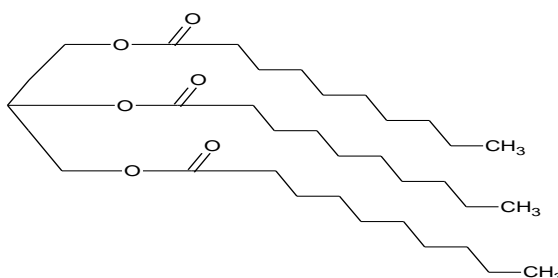
Le glycérol est un triol, il pourra donc par estérification avec des acides gras donner des mono esters (mono glycéride), des diester (di glycéride), et des triesters (triglycéride).

Lorsque les molécules d'acides gras constituant le di ou triester sont identiques, on parlera de diacylglycérol ou triacylglycérol **homogènes**, dans le cas contraire de diacylglycérol ou triacylglycérol **mixtes**.

Ils sont en majeure partie constitués par les *triglycérides* que l'on appelle les graisses neutres. Ils sont formés par des réactions d'estérification du glycérol par 3 molécules d'acides gras.



Exemple d'un triglycéride homogène (les 3 acides gras sont identiques).



Il faut noter que les matières grasses sont des mélanges de nombreux glycérides (homogènes et mixtes). Les glycérides mixtes étant les plus abondants (les acides gras sont différents).

3.2.2.2. Les cérides

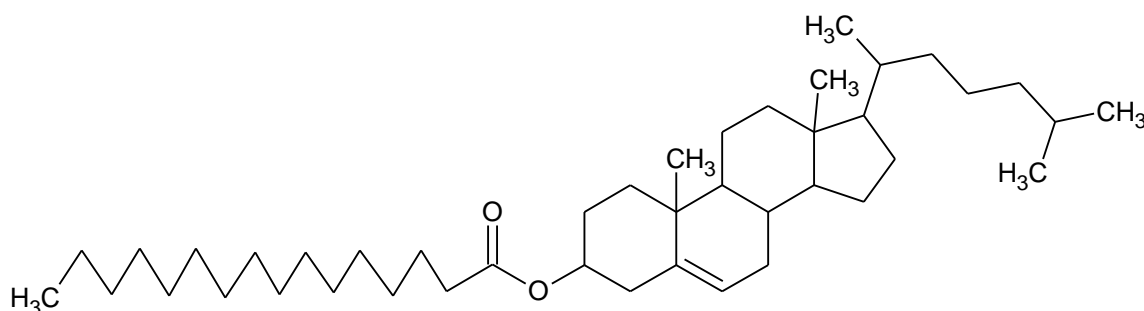
Ils doivent leur nom générique au fait qu'ils sont les principaux constituants des cires animales, végétales et bactériennes.

Les cérides sont des mono esters d'acides gras et d'alcools aliphatiques à longue chaîne qui sont en général des alcools primaires, à nombre pair de carbones, saturés et non ramifiés.

3.2.2.3. Les stérides

Le stéride est formé par estérification d'un AG sur la fonction alcool en 3 du cholestérol.

Le cholestérol est apporté dans l'alimentation et synthétisé par le foie ; il est transporté dans le sang dans les lipoprotéines.



palmitate de cholestéryle

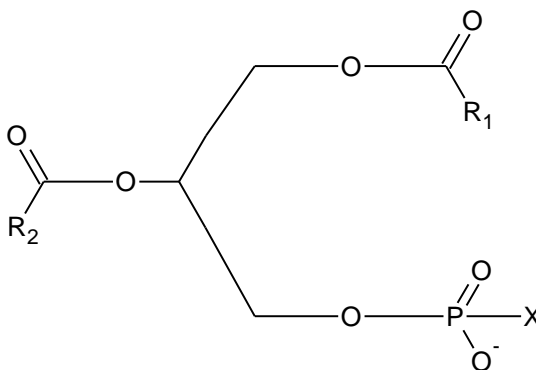
3.2.3. Les lipides complexes

Ces hétéro lipides contiennent des groupes phosphate, sulfate ou glucidique. Ils sont classés par rapport à la molécule qui fixe les acides gras :

- soit le glycérol qui se distingue des acylglycérols par l'hétéro groupe et qui sont subdivisés en :
 - glycérophospholipides,
 - glycéroglycolipides.
- soit une base sphingoïde (dialcool aminé) qui définit les sphingolipides.

3.2.3.1. Les glycérophospholipides

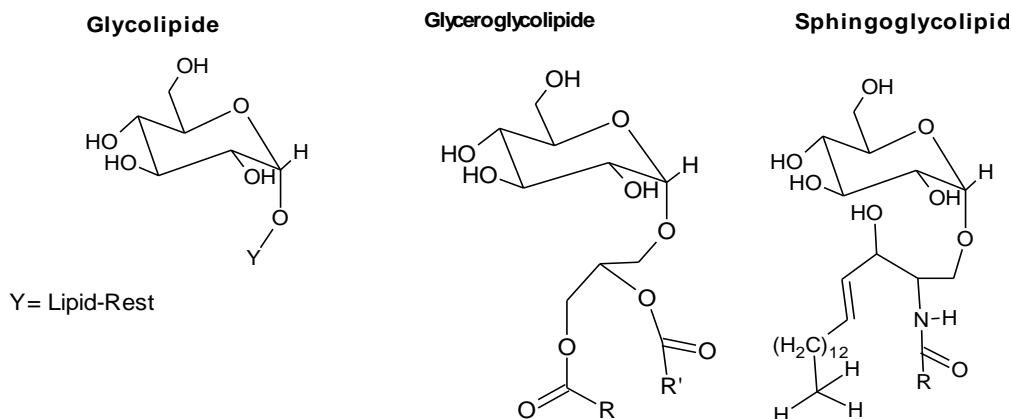
Ce sont les lipides les plus nombreux et les plus représentés qui sont construits à partir du squelette d'un mono ester du glycérol.



Glycérophospholipide

3.2.3.2. Les glycéroglycolipides

Les alcools des carbones C1 et C2 du glycérol sont estérifiés par des acides gras et l'alcool du carbone C3 à la différence des glycérolipides n'est pas estérifié, mais il est lié à un ose par une **liaison glycosidique**.

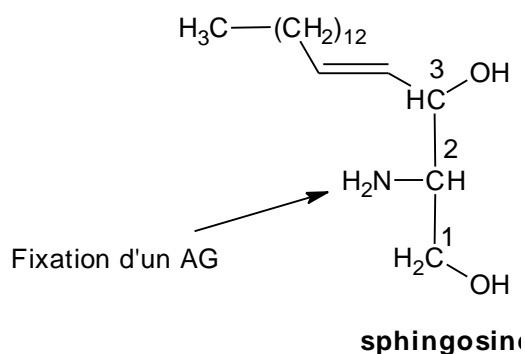


3.2.3.3. Les sphingolipides

Le squelette à partir duquel sont constitués ces lipides n'est pas le glycérol mais un **diol amine** à chaîne longue carbonée de type **sphingoïde**.

La fixation d'un acide gras sur le groupe amine donne une **céramide** qui est la molécule précurseur des lipides de ce groupe.

AG + NH₂ de la sphingosine



Exemple de sphingolipides

3.3. Rôle biologique

- Les lipides représentent environ 20 % du poids du corps.
- Ils sont une réserve énergétique mobilisable : 1g lipides → 9 Kcal
- Ils ont un rôle de précurseurs : stéroïdes, vitamines, prostaglandines.
- Deux acides gras polyinsaturés sont des facteurs nutritionnels essentiels car ils ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent lui être apportés par l'alimentation. Ce sont des acides gras indispensables : acide linoléique et acide linoléique.
- Les membranes ont une structure lipidique.
- Les plaques d'athérome constituées de dépôt lipidique entraînent le durcissement des artères.

CHAPITRE III

Les procédés d'extraction

Les procédés d'extraction

1. Les techniques d'extraction des huiles essentielles

1.1. La distillation

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures [52]. Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydro distillation, l'hydro diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

Beaucoup de confusions règnent autour de l'utilisation de ces trois termes. Quelques éclaircissements s'imposent donc.

Tout d'abord, l'hydro distillation (*water distillation*). Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat.

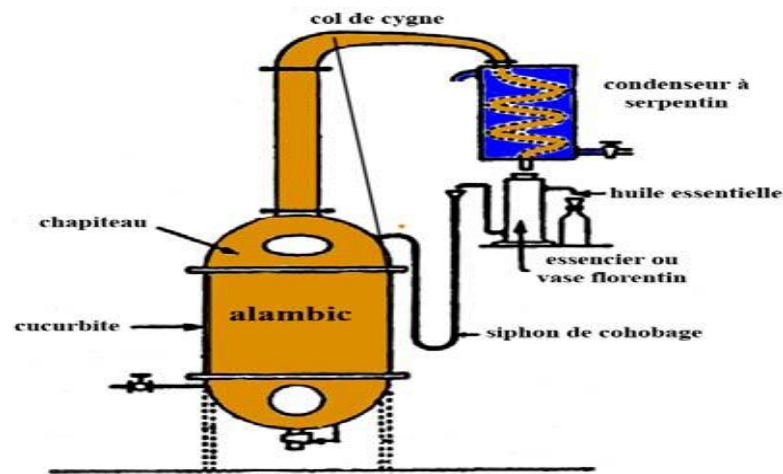


Figure19 : L'hydrodistillation traditionnelle.

Ensuite, la distillation par entraînement à la vapeur d'eau (*steam distillation*). Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau .

La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante [52].

Enfin, la troisième technique est l'hydro diffusion. Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (*perdescendum*) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: « essence de percolation » [52 ; 53].

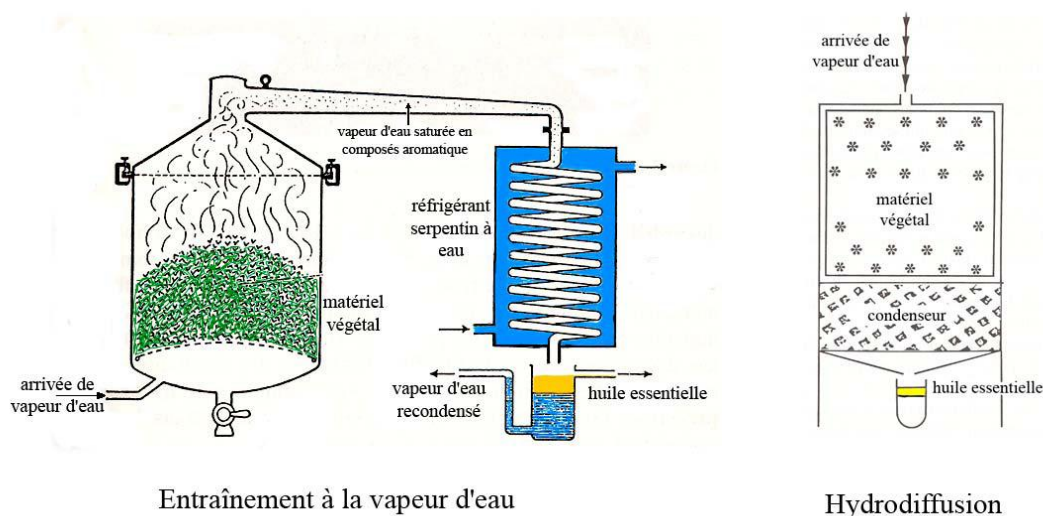


Figure 20 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.

1.2. Extraction par micro-ondes

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydro distillation par micro-ondes sous vide . Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. En guise d'exemple, l'extraction par micro-ondes de deux kilos de *Mentha piperita* permet d'obtenir environ 1% d'huile essentielle en 15 minutes alors que deux heures d'hydro distillation sont nécessaires pour obtenir un rendement similaire à partir de la même masse de plante [54]. La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par microondes.

Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées [55; 56]. Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées [54; 57].

L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée [58 ; 59; 56].

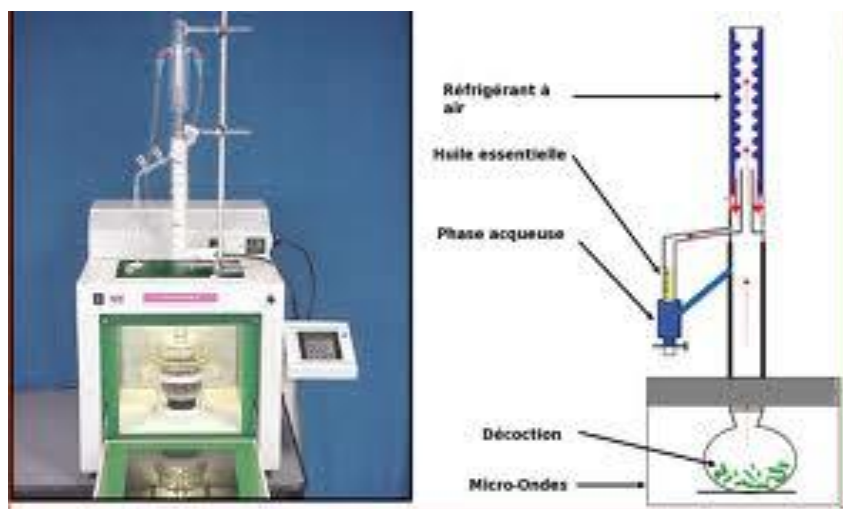


Figure 21: Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes

1.3. Extractions par les solvants et par les graisses

Certains procédés d'extraction ne permettent pas d'obtenir des huiles essentielles à proprement parler mais des concrètes. Il s'agit d'extraits de plantes obtenus au moyen de solvants non aqueux. Ces derniers peuvent être des solvants usuels utilisés en chimie organique (hexane, éther de pétrole) mais aussi des graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par des corps gras) ou même encore des gaz. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres [53; 60]. Dans le cas des extraits à l'aide de corps gras, un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. La solution alcoolique ainsi récoltée est refroidie jusqu'à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour en séparer les cires végétales qui se solidifient. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé "absolu" et sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle [61]. L'extraction à l'aide de solvants organiques pose un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutique et agro-alimentaire [62].

1.4. Extraction au CO₂ supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO₂ supercritique. Au-delà du point critique ($P = 73,8$ bars et $T = 31,1$ °C), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. Cette technique présente énormément d'avantages. Tout d'abord, le CO₂ supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puisqu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation [63]. En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective aux composés odorants et ainsi obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargés en molécules non volatils. Ainsi, la température et la pression à ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est 60 °C et 60 bars [64]. Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité [65] et qui respecterait intégralement l'essence originelle de la plante.

CHAPITRE IV

Les antioxydants et les antimicrobiens

1. Les antioxydants

1.1. Les radicaux libres

1.1.1. Généralités

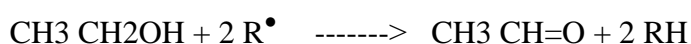
L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes [66]. En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition . Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont: l'oxygène singulet \dot{O}_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les peroxydes alkyles $ROOH$, le radical superoxyde O_2^- , les radicaux hydroxyles HO , peroxydes ROO et alkoxydes RO [67]. Les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines [68].

1.1.2. Mécanismes d'action des radicaux libres

Les radicaux libres peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire. Ce sont des atomes et des molécules dotés d'une forte énergie et qui, avant d'être neutralisés détruisent ce qu'ils rencontrent. Ils sont produits dans toutes les cellules de l'organisme tout à fait normalement et en faible quantité dans les mitochondries. Il s'agit des ions oxygène, hydroxyde et de l'eau oxygénée qui sont libérés lors des réactions biochimiques. Avant d'être neutralisés ils provoquent des lésions sur tous les éléments qu'ils côtoient.

L'organisme sait cependant se défendre contre eux, grâce aux enzymes antioxydantes contenues dans nos cellules. Ces enzymes sont aidées dans leur action antiradicalaire par la vitamine E, C, provitamine A, le zinc et le sélénium. Si ces systèmes de défense sont débordés ou insuffisants, les radicaux libres ont tout le loisir d'être nuisibles : ils s'attaquent alors aux membranes cellulaires dont les acides gras insaturés sont dénaturés (leur structure est modifiée); ils agressent également les protéines.

Le plus simple des capteurs des radicaux libres est l'alcool éthylique, agent de transfert d'hydrogène qui conduit à un composé biologiquement compatible, l'acétaldéhyde, bio-oxydable par la chaîne enzymatique avec production d'énergie.



1.1.3. Principaux radicaux libres

- l'anion super oxyde : la molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion super oxyde O_2^- . Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions.
- le radical hydroxyle : OH^\cdot Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique.
- le radical peroxyde : ROO^\cdot
- l'oxygène singulet : O^1 , forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité [69].

1.2. Les antioxydants

1.2.1. Définition

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques [70], ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs [71].

La raison pour laquelle les antioxydants sont importants vient du fait que l'oxygène est un élément potentiellement toxique puisqu'il peut être transformé en formes plus réactives telles que le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyle, collectivement connu sous le nom d'oxygène actif [70].

1.2.2. Les antioxydants naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposées. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E...etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres [72].

1.3. Le stress oxydatif

1.3.1. Définition

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs [70]. Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire [73].

1.3.2. Origine du stress

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants / prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé «stress oxydant » [74].

2. Les agents antimicrobiens

2.1. Introduction

On désigne par agent antimicrobien tout agent chimique, physique ou biologique inhibant la croissance et/ou la survie des micro-organismes [75]. Ces substances ayant une affinité pour les cellules des parasites et le pouvoir de les tuer plus fort que les dommages qu'elles causent à l'organisme; ce qui rendra possible la destruction des parasites sans perturbation sérieuse de l'organisme [76].

2.2. Mode d'action des agents antimicrobiens

Les agents antimicrobiens agissent par différents mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières, selon les objectifs recherchés et leur spécificité d'action qui peut être germicide ou germistatique.

2.3. Action germicide

Cette action caractérise les agents ayant une action létale sur les microorganismes. En fonction de la catégorie de microorganismes ciblés, les agents antimicrobiens exercent une action bactéricide (agent antibactérien), algicide (agent anti-algues), fongicide (agent anti-champignons), virucide (agent anti-virus) ou antiparasitaire (agent anti- protozoaires) [77].

2.4. Action germistatique (bactériostatique et fongistatique)

Dans ce cas, les agents inhibent la croissance du microorganisme sans le tuer (bactérie ou champignon) [77]. Les substances bactériostatiques inhibent temporairement le développement microbien, les microorganismes recommenceront à se développer dès que la concentration de la substance aura diminué ou dès que l'application du procédé physique sera interrompue [78].

2.5. Types d'agents antimicrobiens

Il existe trois types d'agents antimicrobiens : physiques, chimiques et chimio thérapeutiques.

2.5.1. Agents physiques

De nombreux agents physiques exercent un effet antagoniste vis-à-vis des microorganismes. La chaleur ou certains types de radiations ont une action létale qui permet leur emploi dans la stérilisation de différents milieux. D'autres agents moins agressifs, comme la dessiccation limitée sont utilisés à d'autres fins.

Les principaux agents physiques sont la chaleur (humide ou sèche), les radiations (micro-ondes, rayons ultra-violets, rayons gamma, rayons bêta, rayons alpha ; rayons X). Chaque type de radiation a une longueur d'onde spécifique qui détermine son énergie, son mécanisme d'action et son domaine d'application [77].

2.5.2. Agents chimiques

Ils correspondent aux substances utilisées comme désinfectants et antiseptiques. Les désinfectants sont des agents antimicrobiens utilisés sur les matériaux inertes ; leur action est létale ou inhibitrice de la croissance microbienne. Les antiseptiques ont la même nature chimique que les désinfectants mais leur toxicité plus réduite permet leur emploi sur les tissus vivants. Les désinfectants et antiseptiques les plus largement employés sont les alcools, les composés phénoliques qui agissent par dénaturation des protéines et altération des membranes cellulaires, les aldéhydes, les halogènes et les détergents [77].

Les alcools sont les désinfectants et antiseptiques les plus largement employés, notamment comme désinfectants de la peau. Les composés phénoliques ont une utilisation avantageuse en raison de leur efficacité, de leur persistance dans le temps et de leur insensibilité relative à la présence de matière organique dans le milieu.

L'aldéhyde de plus commun est le formaldéhyde, souvent commercialisé en solution à 40% (formol). Les halogènes sont des composés dérivés du chlore, du brome et de l'iode: hypochlorites et chloramines, hypobromites, iodures, qui ont une action bactéricide par l'oxydation dénaturante des protéines et d'autres composés cellulaires. Les détergents enfin, ont la propriété de solubiliser les résidus normalement peu solubles. Seuls les détergents cationiques sont des désinfectants efficaces [78].

2.5.3. Agents chimio thérapeutiques.

Un agent chimio thérapeutique est un composé chimique ou de synthèse qui inhibe le développement des microorganismes. Ce composé agit à faibles doses, il exerce une action très spécifique sur le fonctionnement cellulaire tout en ayant une toxicité sélective. Il inhibe le développement de sa cible ou la tue tout en étant inoffensif pour l'hôte. Dans ce groupe, on retrouve les antibiotiques, les antifongiques et les antiviraux [79].

Il existe actuellement deux grandes catégories d'agents chimio thérapeutiques antibactériens : les sulfamides et les antibiotiques ; ils ont des modes d'action comparables et se distinguent principalement par leur origine. Les sulfamides sont des produits de synthèse alors que la majorité des antibiotiques sont d'origine naturelle (les plus anciens) d'autres de synthèse ou d'hémi synthèse. Les agents chimio thérapeutiques comprennent cinq groupes selon qu'ils affectent la synthèse de la paroi, les échanges cellulaires, la réplication et la transcription de l'ADN, la synthèse des protéines ou certaines réactions du métabolisme intermédiaire [80].

2.6. Détermination de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est déterminée par plusieurs tests : « le germe-test » ; mesure des doses actives ; porte-germes ; doses minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB).

2.6.1. Notion de germe test

On utilise des microorganismes pathogènes "modèles" comme témoins d'efficacité d'un traitement: *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium botilium*, parfois *almonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et parfois même des virus (virus de la poliomyélite) pour le traitement de l'eau, *Salmonella typhi* pour les désinfectants, *Staphylococcus aureus* pour les

antiseptiques lors de la mesure du coefficient phénol, *Clostridium sporogenes* et *Bacillus stearothermophilus* pour la chaleur [78].

2.6.2. Détermination des doses actives d'un agent antimicrobien

Il s'agit de comparer l'action d'un antiseptique avec celle du phénol en présence d'un germe test selon un protocole bien précis. Le coefficient phénol est égal au rapport entre la dilution du désinfectant et celle du phénol [77].

2.6.3. Méthode des porte-germes

Le porte-germes est constitué d'une bandelette de papier filtre. Il est immergé dans une culture d'un germe test, séché puis mis en contact avec le désinfectant pendant des durées croissantes. La survie ou la destruction du germe est mise en évidence par immersion du préalablement séché dans un bouillon nutritif et par essai de culture [78].

2.6.4. Détermination des doses minimales inhibitrices et bactéricides

La construction des courbes de croissance in vitro en présence de concentration croissante en agents antimicrobiens permet de définir des concentrations limites : c'est-à-dire la concentration pour laquelle on n'observe pas de croissance visible.

La concentration inhibitrice 50 % ou CMI correspond à une croissance égale à la moitié de la croissance du témoin et la concentration minimale bactéricide (la CMB) correspond à la concentration permettant de tuer tous les micro-organismes. Celle-ci est appréciée par étalement après culture. Ces méthodes sont adaptables aussi bien aux antibiotiques qu'à d'autres substances bactéricides [77].

Partie expérimentale

CHAPITRE V

Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

1.1. Récolte de la plante

La plante a été récoltée aux mois de février et mars de la région de Touggourt de la wilaya de Ouargla(Algérie).

La situation géographique de la région:

Altitude: 172m

Latitude: 33° 06' 00" N

Longitude: 6° 04' 00" E

Etage bioclimatique: Saharien

1.2. Conservation

La plante, fraîchement récoltée, est laissée sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Devenue sèche, la partie utilisée est récupérée dans des sacs propres.

2. Screening phytochimique

Ce sont des techniques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques.

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tannins), les saponosides, les stéroïdes, les coumarines, les stérols, les terpènes...etc.

2.1 Test des alcaloïdes

Le réactif de Mayer

○ Réactif de Mayer composition:

Iodure de potassium (KI) 25 g, chlorure mercurique(HgCl_2) 6,8 g , eau distillée (1000 ml).

10g de plante, mise en poudre , est pesé puis mélangé à 50 ml d'une solution HCl (1%). Ce mélange est ensuite filtré puis on y ajoute NH_3 jusqu'à un pH: 8 à 9, on fait ensuite l'extraction par CHCl_3 (3 fois) , on évapore CHCl_3 , on ajoute à l'extrait sec 2 ml HCl (1%) , puis on ajoute 3 gouttes de réactif de Mayer. L'apparition de précipité blanc ou une phase trouble indique la présence des alcaloïdes [81 , 82]

2.2. Test des saponosides

2 g de poudre de la plante est mélangé à 80 ml d'eau distillée puis porté à l'ébullition pendant 5 minutes. On filtre, l'extrait est ensuite refroidi et agité vigoureusement pendant 2 minutes. La formation d'une mousse plus ou moins importante indique la présence de saponosides [81,82].

2.3. Test des flavonoïdes

10g de plante, mise en poudre, est pesé puis mélangé à 100 ml d'une solution HCl (1%). Ce mélange est macéré durant 24 h, après filtration on ajoute NH_4OH au filtrat jusqu'à la basicité. L'apparition d'une couleur jaune claire implique la présence des flavonoïdes [81,82].

2.4. Test des coumarines

On évapore 10 ml de l'extrait Ether di éthylique, l'extrait sec est repris dans 2 ml d'eau. Le mélange obtenu est ensuite partagé dans deux tubes à essais (l'un servira de référence). Au contenu de l'autre, nous avons ajouté 0.5 ml de NH_4OH (10 %). Nous avons bien mélangé et observé la fluorescence sous UV. La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence dans le tube.

2.5. Test des stérols et triterpènes

5g de plante, mise en poudre, a été mis dans 20 ml de chloroforme. Après filtration la solution obtenue est répartie entre deux tubes à essais (l'un servira de référence). On ajoute d'abord anhydride d'acétate (Ac_2O); ensuite nous avons ajouté 1ml d' H_2SO_4 au fond du tube sans agiter. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration violette de la couche surnageante révèlent la présence des stérols et des triterpènes. C'est la réaction de Liebermann-Buchard [81,82].

2.6. Test des Tanins

10g de plante, mise en poudre, on extrait par l'alcool éthylique 50%, puis on filtre, on ajoute au filtrat quelques gouttes FeCl_3 (1%). En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre [81,82].

2.7. Test des glycosides

A 5g de plante, mise en poudre, on y ajoute 50 ml d'une solution de l'acide tartrique 2 % dans l'éthanol, on chauffe à reflux durant 2 h, après filtration et lavage par l'éthanol, on met le filtrat dans l'eau chaude. Dans un tube à essai, on ajoute à 2 ml du filtrat 2 gouttes de la liqueur de Fehling, on chauffe, la réduction de la liqueur de Fehling montre la présence des glycosides [82].

3. Les huiles essentielles

3.1. Procédé d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydro distillation en utilisant l'appareil de clévenger.

- Hydro distillation : 100g de plante sèche est introduite dans un ballon imprégné d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile ; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.

L'huile séparée de l'eau aromatique est déshydratée par le sulfate de sodium (Na_2SO_4), et conservée à + 5°C.

3.2. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter . Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$R = 100m/m_0$$

Tels que:

R: est le rendement en % .

m: est la masse de l'huile essentielle.

m₀: est la masse de la plante.

4. Les lipides:

4.1. Principe d'extraction par soxhlet

Un extracteur Soxhlet est une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique et en chimie organique qui permet de faire l'extraction continue d'un solide par un solvant (figure 22). Il se compose d'un corps en verre (4) dans lequel est placé une cartouche en papier filtre épais (5), d'un tube siphon (6/7) et d'un tube d'adduction (3). Le corps de l'extracteur est placé sur un ballon (2) contenant le solvant d'extraction. Les résidus à extraire sont placés dans l'extracteur surmonté d'un réfrigérant (9).

Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps en verre, faisant ainsi macérer les résidus dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit progressivement en composés solubles. La taille du corps en verre étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives pour récupérer une quantité suffisante d'extraits.

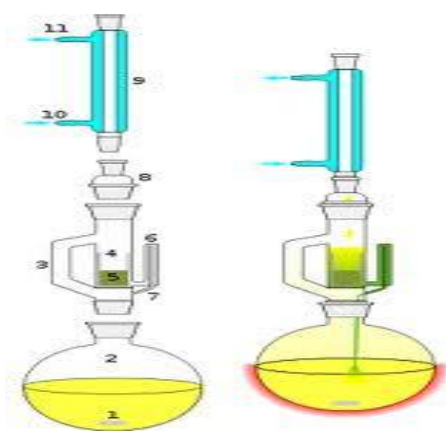


Figure 22 : Un extracteur Soxhlet

4.2. Extraction des lipides

300g de plante sèche rendus en poudre placés dans le corps en verre, où du coton a été introduit en bas du corps afin d'éviter le passage de la matière végétale dans le ballon contenant 300mL du solvant organique (nous avons utilisé un mélange d'hexane et d'essence). Le système est chauffé à reflux pendant 6 heures jusqu'à la décoloration du solvant. Après refroidissement, le solvant est traité par le charbon actif puis filtrer sous vide, enfin pour déshydrater on a ajouté le Na_2SO_4 . Suite à l'hydro distillation des plantes, les résidus d'hydro distillation sont récupérés du ballon, séchés et broyés.

80g de plante sèche rendus en poudre placés dans le corps en verre, où du coton a été introduit en bas du corps afin d'éviter le passage de la matière végétale dans le ballon contenant 300mL du solvant organique (nous avons utilisé l'hexane). Le système est chauffé à reflux pendant 6 heures jusqu'à la décoloration du solvant.

80g de résidus d'hydro distillation sèches rendus en poudre sont aussi subi l'extraction par soxhlet.

4.2.1. Evaporation

Elle est réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif (*Rotavapor*) à une température comprise entre 35 à 45°C.

4.3. Détermination des constantes physico chimiques :

Les constantes physico chimiques déterminent la nature d'huiles et le degré de pureté, on les nomment les constantes d'huiles [83,84,85] et qui sont :

4.3.1. La densité

C'est le rapport du poids d'un certain volume d'huile au poids du même volume d'eau distillée à la température 20°C.

On pèse 2 ml de l'huile étudiée à l'aide d'un pycnomètre taré, puis on calcule la densité par la formule suivante :

$$d_{\theta} = (m_1 - m) / (m_2 - m)$$

m_1 : Poids du pycnomètre avec l'huile,

m_2 : Poids du pycnomètre avec l'eau distillée,

m : Poids du pycnomètre à vide,

d_{θ} : la densité à température ambiante ,

θ : la température ambiante.

$$d_{20} = d_{\theta} + (\theta - 20)0.00068 \quad \text{tel que:}$$

d_{20} : la densité à 20°C,

0.00068 : la variation de la densité quand la température varie de 1°C.

4.3.2. L'indice de réfraction

Il s'agit du rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et celle dans le milieu étudié.

Ainsi l'indice de réfraction est une fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente et de la température. L'appareil qui sert à mesurer l'indice de réfraction des liquides est le réfractomètre qui a un usage assez recommandé.

Pour calculer l'indice de réfraction I_r , on applique la formule suivante :

$$I_r = \eta_{20D} = \eta_{\theta D} + (\theta - 20)0.00045,$$

η_{20D} : L'indice de réfraction à une température à 20°C,

$\eta_{\theta D}$: L'indice de réfraction à une température θ ,

θ : La température à laquelle la substance soit liquide,

D : La raie de sodium (de longueur d'onde 589,6 nm),

0,00045 : la variation d'indice de réfraction quand la température varie de 1°C.

4.3.3. L'indice d'acide

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile.

A 0,2 g d'huile dissoute dans 10 ml d'hexane, on ajoute 2 à 3 gouttes de phénophtaléine. La solution ainsi obtenue est titrée par une solution de KOH (0,01N) dans l'éthanol jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle. L'indice d'acide est calculé par la formule suivante [85]:

$$I_a = N.V.56.1/ m$$

N : la normalité de KOH,

V : Le volume en millilitre de la solution de KOH utilisé,

m : La masse en gramme de la prise d'essai,

56.1 : La masse molaire de KOH.

4.3.4. L'indice de saponification

L'indice de saponification correspond à la masse de potasse (KOH) - en mg - nécessaire pour neutraliser les acides gras libres et pour saponifier les acides gras combinés dans un gramme de corps gras.

La quantité de potasse KOH utilisée varie avec la masse molaire des acides gras. Plus la masse

moléculaire est élevée, plus l'indice de saponification est faible : l'indice de saponification est donc une mesure indirecte de la masse molaire des acides gras [85].

Il s'agit d'un dosage en retour. On fait réagir à chaud une solution d'acide gras avec un excès de potasse KOH. Cet excès est ensuite dosé par une solution d'acide chlorhydrique (HCl).

Si l'on porte à ébullition un corps gras en présence de KOH, les acides gras se saponifient ; c'est une réaction totale lente à température ambiante mais qui prend entre 40 à 60 minutes par chauffage par ébullition douce. La potasse réagit avec les acides gras libérés pour former du savon.

- On introduit dans un ballon 0.4g de corps gras,
- On ajoute 20 ml de potasse alcoolique de concentration 0,2 mol/l,
- On met au bain marie bouillant pendant 45 à 60 minutes à reflux,
- On ajoute 2 à 3 gouttes de phénolphthaléine,
- On dose l'excès de potasse par l'acide chlorhydrique de concentration 0,5 mol/L en agitant constamment jusqu'au virage à l'incolore de la phénolphthaléine.

$$IS = [(V_t - V_e) C_{HCl} \cdot M_{KOH}] / m \quad \text{tels que :}$$

- IS : Indice de saponification,
- V_t : Volume versé au témoin en ml,
- V_e : Volume de l'essai en ml,
- C_{HCl} : concentration de la solution d'acide chlorhydrique en mol/l,
- M_{KOH} : masse molaire du KOH en g/mol,
- m : masse d'huile pesée en g.

4.3.5. L'indice d'estérification

C'est la quantité en mg de KOH nécessaire pour saponifier 1 g d'huile dépourvue d'acide gras [85].

$$IE = IS - I_a$$

IE : Indice d'estérification,

IS : Indice de saponification,

Ia : Indice d'acide.

4.3.6. L'indice d'iode

L'indice d'iode d'un lipide est la masse de diiode (I_2) (exprimée en gramme) capable de se fixer sur les insaturations (double liaison le plus souvent) des acides gras de 100 g de matière grasse.

La méthode de Wijs nous permet de déterminer par expérimentation le nombre de doubles liaisons que possède un acide gras. Cela peut présenter un intérêt pour identifier un acide gras si l'on connaît d'autres de ses caractéristiques.

Dans cette méthode, on utilise le réactif de Wijs qui est une solution de mono chlorure d'iode ICI, composé plus réactif que le diiode, mais strictement équivalent à celui-ci du point de vue du nombre de moles fixées sur les doubles liaisons. On fait alors réagir le réactif de Wijs, que l'on met en excès connu, sur un corps gras non saturé, ICI se fixe sur les doubles liaisons; l'excès de réactif reste en solution, on ajoute alors de l'iodure de potassium en fort excès (ce composé sert également à solubiliser le diiode libéré) qui se combine à ICI en libérant du diiode.

Ainsi le diiode libéré est dosé par une solution de concentration molaire connue de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$), en présence d'empois d'amidon, ajouté en fin de dosage. On réalise un dosage témoin dans les mêmes conditions, mais sans corps gras, afin de pouvoir déterminer la quantité de diiode qui a saturé les doubles liaisons. Il faut utiliser du matériel sec car ICI est détruit par l'eau.

- Dans l'erenmeyer, on introduit :
 - Une masse de corps gras exactement pesée proche de 0,2 g ;
 - 15 ml de chloroforme ;
 - 15 ml de réactif de Wijs ICI 0.1M;
- On bouche et on agite énergiquement.
- On laisse reposer 1h à l'obscurité en secouant de temps en temps.
- On ajoute ensuite :
 - 150 ml d'eau distillée ;
 - 10 ml d'iodure de potassium KI à 100 g.L^{-1} ;

- On bouche et on agite vigoureusement pendant 5 minutes ;
- On dose l'iode formé par le thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0.4 N jusqu'à la disparition totale de la couleur rouge, l'indicateur utilisé est l'empois d'amidon.

On réalise dans les mêmes conditions un témoin en utilisant les mêmes réactifs mais sans corps gras.

$$II = (m_{I_2} / m) \cdot 100 \quad \text{tel que :} \quad m_{I_2} = [C_{S_2O_3^{2-}} (V_t - V_e) \cdot M_{I_2}] / 2$$

V_t : correspond au volume de $S_2O_3^{2-}$ versé au témoin,

V_e : correspond au volume de $S_2O_3^{2-}$ versé à l'essai,

m : masse de l'huile.

4.4. Séparation des lipides

4.4.1. La chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie de manière générale est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile [86, 87]. Selon la technique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successive sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différentes dans chaque phase [87].

La C.C.M. est une chromatographie de partage ; elle est basée sur la différence de solubilité des substances à séparer dans deux fluides parfaitement miscibles. Le facteur principal qui intervient est le coefficient de partage entre chaque phase. Les substances les plus solubles dans la phase mobile se déplacent plus facilement que celles qui le sont moins [86].

La C.C.M. est une technique d'analyse très utile et simple à mettre en œuvre, on l'utilise en général pour suivre l'avancement d'une réaction, pour connaître la composition d'une fraction séparée sur colonne ou pour visualiser la pureté d'un produit [87]. Les adsorbants les plus employés sont par ordre d'importance décroissante: le gel de silice, le kieselguhr et la cellulose.

L'éluant est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants. Un éluant qui entraîne tous les composants de l'échantillon est trop polaire, celui qui empêche leur migration ne l'est pas suffisamment.

Le choix de l'éluant dépend des composés à séparer :

- Pour les hydrocarbures : hexanes, éther de pétrole ou benzène.
- Pour les groupements fonctionnels courants : hexane ou éther de pétrole mélangé en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique forment un éluant de polarité moyenne.
- Pour les composés polaires : éthanoate d'éthyle, propanone ou méthanol.

4.4.2. La séparation par chromatographie sur couche mince (CCM)

Le but de cette étape est d'avoir une idée générale sur le contenu en lipides de l'échantillon à analyser et de choisir le système de solvants adéquat pour la séparation.

L'échantillon est déposé sur la plaque de gel de silice à l'aide d'une micropipette de 10µl ; on laisse sécher puis de placer les plaques dans des cuves contenant l'un des systèmes de solvants suivants :

S1 : hexane / chloroforme / acétate d'éthyle. 2/2/1.

S2 : hexane / chloroforme / acétate d'éthyle. 4/4/1.

S3 : diéthylique / éther de pétrole 1/1.

S4 : diéthylique / éther de pétrole 1/2.

S5 : diéthylique/ éther de pétrole 2/1.

La chromatographie est arrêtée lorsque le solvant a parcouru une distance de 4 cm du bord inférieure de la plaque. Le solvant est éliminé par évaporation à température ambiante.

4.5. Calcul du rendement

Le rendement en lipides est le rapport entre le poids de lipide extrait et le poids de la plante à traiter. Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$R = 100m/m_0$$

5. Les composés phénoliques

5.1. Extraction des polyphénols

La méthode d'extraction des polyphénols correspond à une macération suivie d'une évaporation, puis une extraction par les solvants.

5.1.1. Macération

On a employé les solutions méthanol et acétone pour l'extraction des polyphénols.

-On a mis 40g des feuilles de la plante sèche rendus en poudre placés dans un récipient en verre

(fiolle), couvert de 200ml de MeOH aqueux (8 :2).

-On a mis encore 40g des feuilles de la plante sèche rendus en poudre placés dans un récipient en verre (fiolle), couvert de 200ml d'acétone aqueuse (7 :3).

-Les deux échantillons sont laissés macérer pendant trois jours avec renouvellement du solvant chaque 24 heures (200 ml x 3). Les solutions hydro-méthanolique et acétonique obtenues sont réunies dans deux récipients pour subir une filtration afin d'obtenir une solution limpide.

5.1.2. Evaporation

Elle est réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif (*Rotavapor*) à une température comprise entre 35 à 45°C. L'extrait sec est repris par 100ml d'eau distillée bouillante, il est ensuite laissé pendant 24 heures afin de subir une décantation.

5.1.3. Extraction par les solvants

La phase aqueuse limpide issue des extractions successives est placée dans une ampoule à décanter afin de subir des affrontements successifs par différents solvants.

Pour cela, nous avons utilisé l'acétate d'éthyle.

5.1.3.1. Affrontement à l'acétate d'éthyle

100 ml de phase aqueuse sont déversés dans une ampoule à décanter à laquelle on rajoute 100 ml d'acétate d'éthyle. Après une agitation énergique et un repos de quelques minutes on observe deux phases :

-la phase acétate d'éthyle supérieure .

-la phase aqueuse inférieure .

La phase acétate d'éthyle est récupérée dans un bécher, puis elle est évaporée à sec; l'extrait obtenu est repris par un minimum de méthanol (12ml) pour être utilisé dans les tests phytochimiques et antimicrobiens.

5.2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-visible)

5.2.1. Spectrophotométrie

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce

est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert.

La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier. Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . L'absorbance de la solution est définie comme suit :

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

ou $A = -\log T$

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Avec T (transmittance).

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

Le principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV est illustré dans la figure 23.

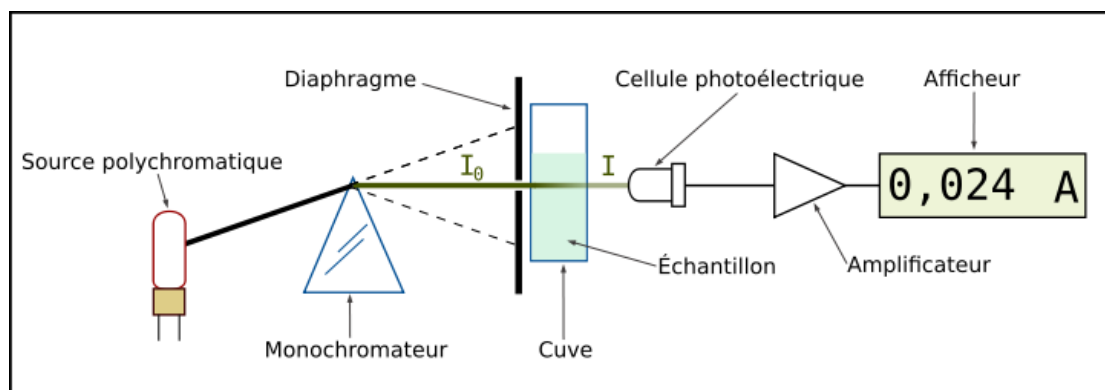


Figure 23: Principe du spectrophotomètre UV-visible mono faisceau

5.2.2. Analyses quantitatives

5.2.2.1. Dosage des polyphénols

Les polyphénols ont été déterminés spectrophotométriquement par la méthode de Folin Ciocalteu [88; 89].

On a additionné à 0.1 ml de l'extrait dilué 50 fois avec de l'eau distillée 2ml de la solution de Na_2CO_3 20 % et 0.5 ml du réactif de Folin Ciocalteu (dilué 10 fois), après 30minutes d'incubation dans l'obscurité, l'absorbance à été mesuré à 760nm contre un blanc sans extrait.

La quantification des polyphénols à été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y= ax$) réalisé par un extrait d'étalon "acide gallique" à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par 1g du poids sec de la plante en poudre.

$$m = A.F.V / K.P$$

tels que:

A: l'absorbance en nm.

F: coefficient de dilution.

V: volume de l'extrait de plante en ml.

K: pente de la courbe d'étalonnage.

P: poids sec de la plante en g.

5.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode au AlCl_3 [90, 91] a été employée pour la détermination de la teneur totale en flavonoïdes des extraits échantillons.

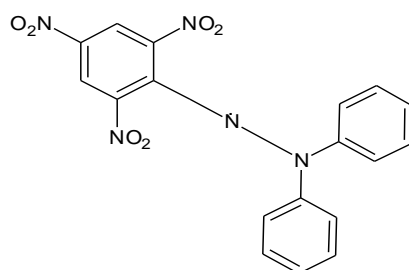
Un millilitre (1ml) de la solution diluée de l'extrait à été ajoutée à 1 ml d'une solution de 10% AlCl_3 (10 g dans 100 ml méthanol) et 1 ml d'une solution d'acétate de sodium CH_3COONa 0.1 N. Le mélange a été vigoureusement agité, et l'absorbance à 410 nm a été lue après 30 minutes d'incubation.

Une courbe d'étalonnage ($y= ax$) réalisée par la rutine à différentes concentrations dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons, servira à la quantification des flavonoïdes.

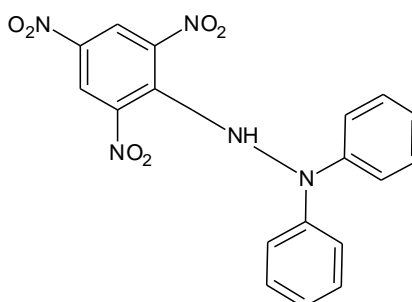
6. - Test antioxydant

6.1.Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été testé par la méthode au DPPH ([92]; [89]). Ce radical libre stable(fig. 24) possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit, la coloration devient jaune pâle.



Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre)



Diphenylpicrylhydrazyl (non radical).

Figure 24: Forme libre et réduite du DPPH [93].

6.1.1. Préparation de la solution DPPH

Le DPPH 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$; $M : 394.33$), 0.0197g de DPPH est solubilisé dans 100 ml méthanol absolu pour en avoir une solution de 0,5 mM.

6.1.2. Solution d'extrait

Pour tous les extraits des polyphénols, on prépare des solutions dans du méthanol absolu. Ces solutions dites solutions mères, subiront ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de microgramme par ml .

6.1.3. L'essai au DPPH

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 1 ml de la solution de l'extrait à tester déjà dilué par une solution tampon Tris(0.1M , pH=7.4) , on ajoute 1ml de solution au DPPH. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité, à la température ambiante pendant 30 minutes.

- La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par un spectrophotomètre.
- Le blanc est constitué de 3ml de la solution tampon Tris.
- Le contrôle est composé de 1 ml de la solution méthanolique au DPPH (0,3 mM) et de 1 ml de

la solution Tris.

- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon test.

6.1.4. Expression des résultats

Pour obtenir la concentration efficace EC₅₀ qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50 % [94], les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition.

$$\% \text{Inhibition} = \{ (\text{Abs controle} - \text{Abs test}) / \text{Abs controle} \} \times 100 \quad [95].$$

Tels que :

Abs : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

La valeur EC₅₀ (autrement appelée la valeur IC₅₀) a été déterminée pour chaque extrait, est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH . Ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de 50 % de l'absorbance de la solution contrôle constitué de Tris et DPPH.

Les valeurs EC₅₀ ont été calculées par les régressions linéaires, où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition [96].

6.2.Méthode de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par (Oyaizu, M. 1986) [97], basée sur la réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe²⁺.

- Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1%.
- L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes ensuite ;
- 2,5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction ;
- Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes ;
- 2,5ml du surnageant sont mélangés à 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparé à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre).

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [98].

7. Tests microbiologiques

7.1. Les souches testées

Les souches utilisées dans les tests font parties de microorganismes, qui sont des pathogènes et des contaminants.

Les microorganismes testés proviennent de laboratoire de Microbiologie et de Parasitologie de la pharmacie Abid Bachir (El-oued) .Ils correspondent aux espèces suivantes:

Catégorie	Genre et espèce
Bactéries Gram-	<i>Escherichia. coli</i>
Bactéries Gram+	<i>Staphylococcus albus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>

7.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des disques

La méthode de diffusion à partir d'un disque a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne .

Des disques de papier Whatman n°1 de (6 mm) de diamètre sont stérilisés dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée puis séchés à l'étuve. Ces disques sont ensuite imbibés de 20µl d'extrait à tester.

Par ailleurs, la gélose de Mueller-Hinton stérile est coulée dans des boites de Pétri de 90 mm de diamètre jusqu'à une épaisseur de 4 mm puis laissées refroidir.

Une suspension bactérienne de 18 à 24h est préparée avec le bouillon nutritif. L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage à l'aide d'un coton-tige stérile en tournant la boite d'environ 60°.

La dernière étape consiste à déposer à l'aide d'une pince stérile à la surface de la gélose ensemencée par la souche à tester d'une boite de pétri des disques imbibés de 20 µl d'extrait à tester.

Les disques sont déposés dans chaque boite. L'incubation dure de 18à 24h. Durant cette période, les substances diffusent dans la gélose à partir des disques selon un gradient de concentration jusqu'à une limite où sa concentration est la plus faible, déterminant ainsi des zones d'inhibition.

Après incubation, le diamètre d'inhibition autour des disques est mesuré et les valeurs sont exprimées en mm.

L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des polyphénols [99].

Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.

Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.

Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.

Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

CHAPITRE VI

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I- Résultats de l'étude phytochimique

1. Rendement en huile essentielle

Par hydrodistillation, nous avons extrait les huiles essentielles des feuilles de notre plante. Le rendement en huile essentielle est très faible, il est égal à **0.025**.

2. Rendements et analyse des lipides

2.1.Lipides sans subir au charbon actif

2.1.1.Rendement des lipides

Par un extracteur Soxhlet, nous avons extrait les lipides de notre plante et les lipides des résidus de l'hydrodistillation de la plante. A savoir que ce sont les feuilles de la plante qui ont subi l'extraction.

Le rendement des lipides de la plante est **1.60** (type 1).

Le rendement des lipides des résidus de l'hydrodistillation de la plante est **1.75** (type 2).

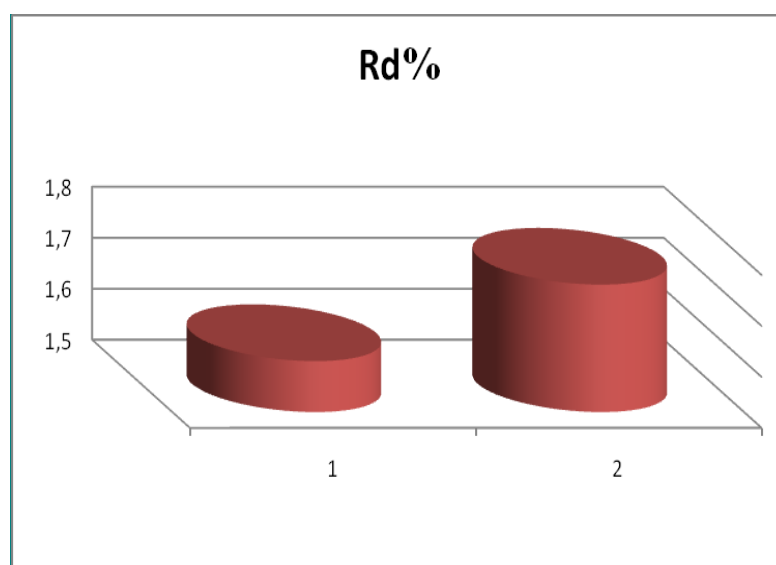


Figure25 : Variation du rendement selon les deux types 1 et 2.

Il est bien évident que le rendement dans les deux cas est faible.

Nous remarquons aussi que les deux valeurs des rendements des lipides sont voisines, et pour cela on peut dire que l'hydrodistillation n'influe pas sur le rendement des lipides.

2.1.2. Indice d'acide

L'indice d'acide a été calculé d'après la relation mentionnée dans le chapitre matériels et méthodes.

Lipides de la plante:

$$I_a = 2.07 \text{ mg/g}$$

Lipides des résidus de l'hydrodistillation de la plante:

$$I_a = 3.24 \text{ mg/g.}$$

Nous constatons que l'indice d'acide des lipides des résidus de l'hydrodistillation de la plante est supérieur que celui des lipides de la plante, cela veut dire qu'il y a d'avantage d'acides gras libres dans le premier type de lipides, ce qui pourrait s'expliquer par l'effet thermique de l'hydrodistillation.

2.1.3. Indice de saponification

L'indice de saponification a été calculé d'après la relation mentionnée dans le chapitre matériels et méthodes.

Lipides de la plante:

$$IS = 190.16$$

Lipides des résidus de l'hydrodistillation de la plante:

$$IS = 86.30$$

Nous constatons que l'indice de saponification des lipides des résidus de l'hydrodistillation de la plante est beaucoup inférieur que celui des lipides de la plante, cela veut dire qu'il y a moins d'esters dans le premier type de lipides, ce qui pourrait s'expliquer par l'effet thermique de l'hydrodistillation.

2.1.4. Indice d'iode

L'indice d'iode a été calculé d'après la relation mentionnée dans le chapitre matériels et méthodes.

Lipides de la plante:

$$I_i = 331.9$$

Lipides des résidus de l'hydrodistillation de la plante:

$$I_i = 167.3$$

Nous notons que l'indice d'iode des lipides de la plante est très élevé cela indique que les insaturations sont importantes, en outre nous remarquons que cet indice est presque le double de l'indice d'iode des lipides des résidus de l'hydrodistillation de la plante, cela veut dire que l'effet thermique de l'hydrodistillation dégrade les insaturations de la matière grasse.

2.1.5. Indice de réfraction

Nous ne pouvons pas mesurer l'indice de réfraction car les lipides de cette plante sont solides à la température ambiante.

2.1.6. Densité des lipides

Nous ne pouvons pas calculer la densité car les lipides de cette plante sont solides à la température ambiante.

2.1.7. Chromatographie des lipides par CCM

La chromatographie sur couche mince des lipides de la plante et ceux des résidus de l'hydrodistillation dans 5 systèmes a donné une bonne séparation des molécules dans le système S2 (hexane / chloroforme / acétate d'éthyle: 4/4/1).

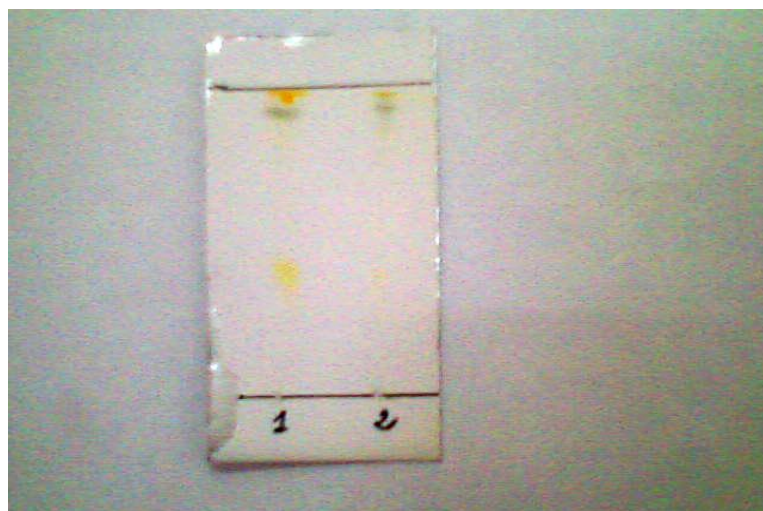


Figure 26. Photographie représentant la plaque chromatographique des lipides 1 et 2 dans le système S1(hexane / chloroforme / acétate d'éthyle : 2/2/1).

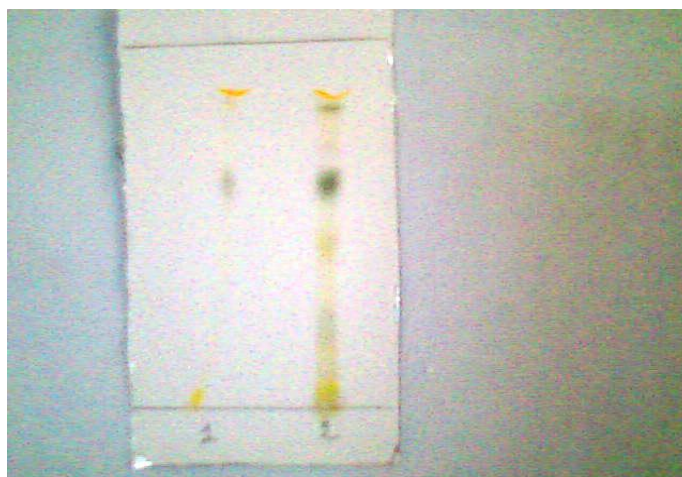


Figure 27. Photographie représentant la plaque chromatographique des lipides 1 et 2 dans le système S2(hexane / chloroforme / acétate d'éthyle: 4/4/1).



Figure 28. Photographie représentant la plaque chromatographique des lipides 1 et 2 dans le système S5(diéthyléther/ éther de pétrole : 2/1).

Dans la plaque CCM du système S2, on observe trois spots pour les lipides de la plante et six spots pour les lipides des résidus de l'hydrodistillation ,dont trois ont les mêmes Rf qu'au premier lipide, cela indique que ce dernier lipide possède trois molécules de plus par rapport le premier. On peut en déduire que l'hydrodistillation dégrade les lipides de la plante.

2.2.Lipides ayant subi au charbon actif

2.2.1.Rendement des lipides

Le rendement des lipides de la plante est de l'ordre **0.81**.

2.2.2. Indice d'acide

L' indice d'acide a été calculé d'après la relation mentionnée dans le chapitre matériels et méthodes: **Ia = 0.22** mg/g.

Nous constatons que l' indice d'acide est petit, cela veut dire qu'il y a peu d'acides gras libres dans les lipides.

2.2.3. Indice de saponification

L' indice de saponification a été calculé d'après la relation mentionnée dans le chapitre matériels et méthodes: **Is = 24.82** mg/g.

Cette faible valeur de l'indice de saponification indique que la masse moléculaire des acides gras de ces lipides n'est pas élevée.

2.2.4. Indice d'iode

L' indice d'iode a été calculé d'après la relation mentionnée dans le chapitre matériels et méthodes: **Ii = 2.44** g/100g.

Nous notons que l' indice d'iode des lipides est faible, cela indique que les insaturations des acides gras sont minimales.

2.2.5. Indice de réfraction

Nous ne pouvons pas mesurer l'indice de réfraction car les lipides de cette plante sont solides à la température ambiante.

2.2.6. Densité des lipides

La densité des lipides a été calculé d'après la relation mentionnée dans le chapitre matériels et méthodes: **0.88**.

2.2.7. Chromatographie des lipides par CCM

La chromatographie sur couche mince des lipides de la plante dans 5 systèmes a donné une bonne séparation des molécules dans le système S4(diéthyléther / éther de pétrole : 1/2) .

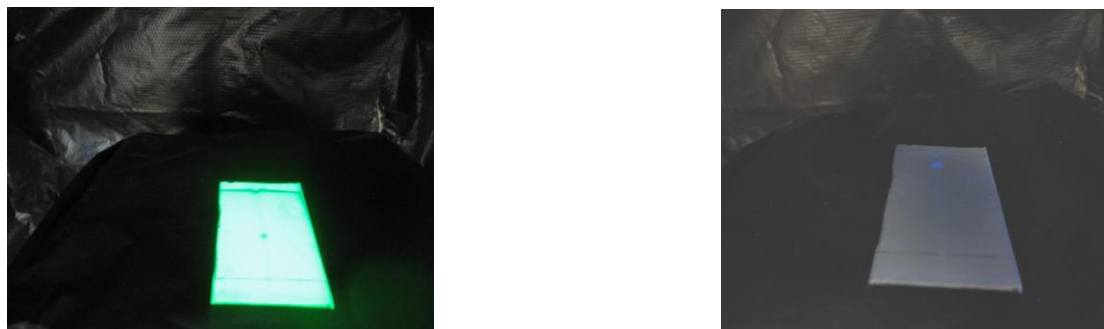


Figure 29. Photographies représentant la plaque chromatographique des lipides dans le système S4 aux deux longueurs d'ondes 365nm et 254nm.

Après la révélation sous lampe UV à 365nm et à 254nm, on observe dans la plaque CCM deux spots de deux Rf différents, et comme un Rf est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé sur un support donné, on peut en conclure que notre lipide contient deux molécules différentes.

3. Composition phytochimique

Les résultats de la composition phytochimique de différents extraits de la plante par screening chimique sont repris dans le tableau 4. De ce tableau, nous remarquons que les extraits sont riches en flavonoïdes, alcaloïdes, saponines, stéroïdes et triterpènes, une quantité moyenne de tanins. L'étude montre que la plante ne contient pas de coumarines et cardenolides.

Tableau 04: Composition phytochimique des feuilles de la plante.

Composés	Abondance
Flavonoïdes	+++
Alcaloïdes	++++
Tanins	++
Saponines	++++
Stérols et triterpènes	+++
Coumarines	-
Triterpènes	+++
Cardenolides	-

++++ Très abondant; +++: abondant; ++: présence modérée; + faible; - absent.

4. Teneur en polyphénols

L'étude quantitative de l' extrait brut méthanolique et acétonique au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols. Une courbe d'étalonnage (fig.30) a été tracée pour cet objectif, une réalisée avec l'acide gallique à différentes concentrations. Des mesures de densité optique pour chaque extrait se sont réalisées à 760 nm .

Les quantités des polyphénols correspondantes ont été rapportées en mg équivalent acide gallique par g du poids sec, sont déterminées par une équation de type : $y = a x$.

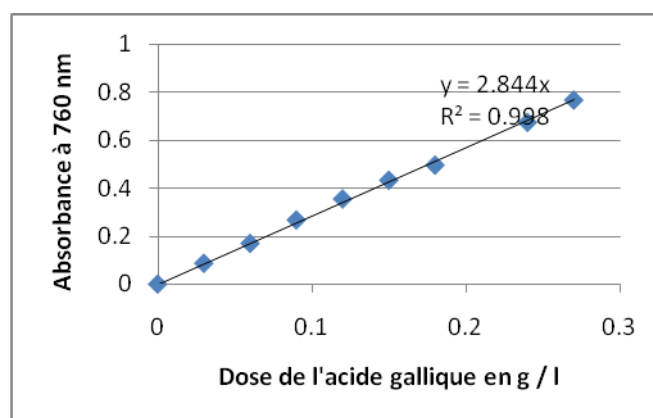


Figure 30 : Courbe d'étalonnage des polyphénols.

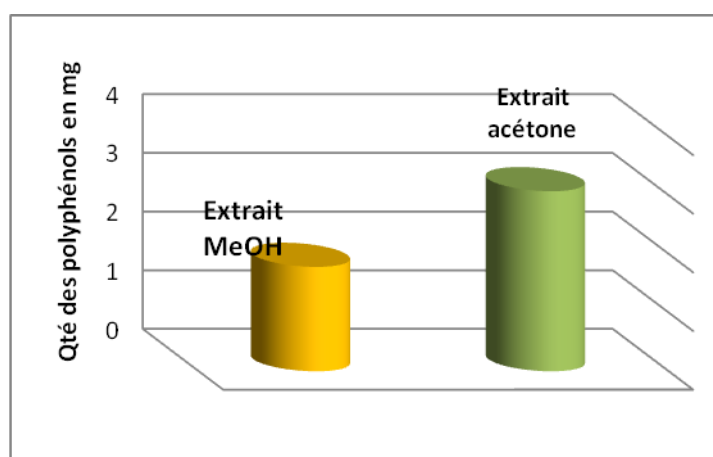


Figure 31: Teneur en polyphénols totaux (mg/g de poids sec de la plante).

Suivant la figure ci dessus, on a enregistré en équivalent acide gallique : **1.78 mg** ; **3.07 mg** par g de matériel végétal sec, respectivement avec les extraits méthanolique et acétonique . L'extrait acétonique représente la teneur la plus élevée en polyphénols.

5. Teneur en flavonoïdes

Des dosages spectrophotométriques ont été effectués à partir des extraits bruts méthanolique et acétonique de la plante afin de déterminer la teneur totale des flavonoïdes.

Une courbe d'étalonnage (figure 32) a été réalisée avec la rutine à une longueur d'onde 410 nm.

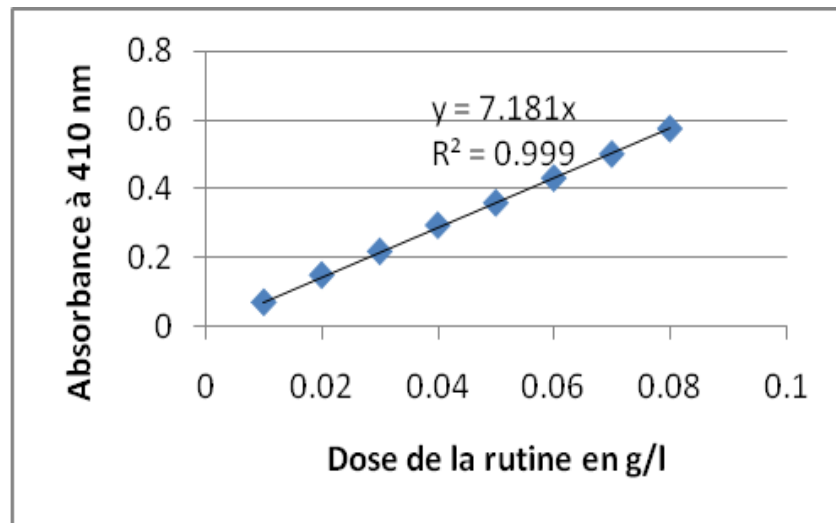


Figure 32 : Courbe d'étalonnage de la rutine.

Suivant la figure ci dessus, on a enregistré en équivalent rutine : **1.26 mg** ; **3.27 mg** par g de matériel végétal sec, respectivement avec les extraits méthanolique et acétonique . L'extrait acétonique représente la teneur la plus élevée en flavonoïdes.

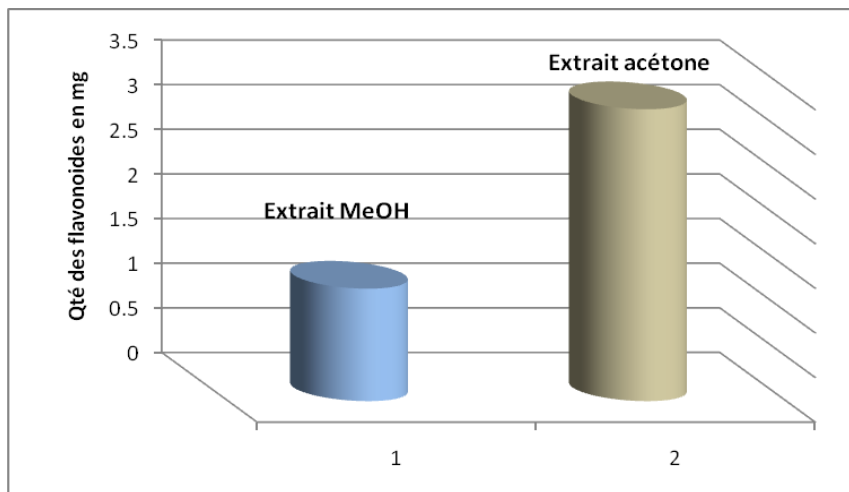


Figure 33: Teneur en flavonoïdes totaux (mg/g de poids sec de la plante).

6. Comparaison des teneurs des polyphénols et des flavonoïdes

D'après les résultats précédents, on constate que dans l'extrait méthanolique, la teneur en polyphénols est supérieure que celle des flavonoïdes. Par contre dans l'extrait acétonique, la teneur en polyphénols est inférieure que celle des flavonoïdes.

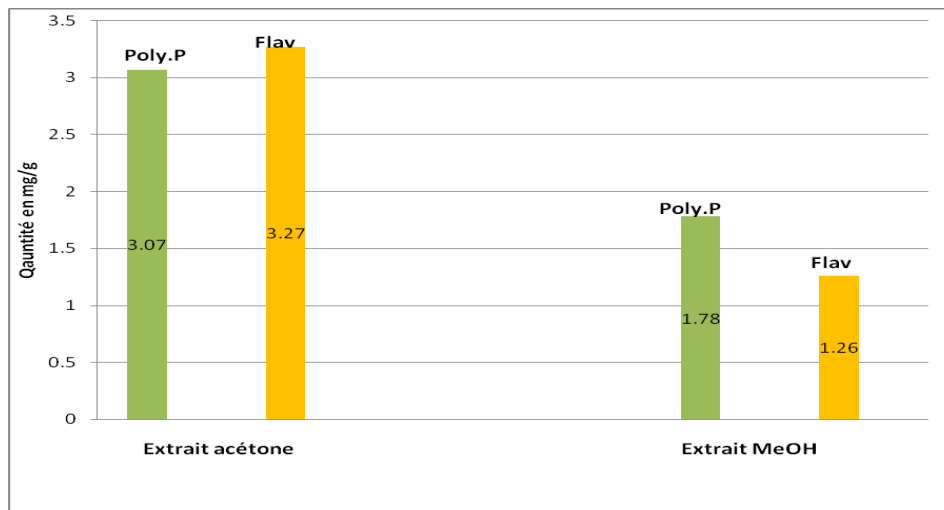


Figure 34: Comparaison des teneurs des polyphénols et des flavonoïdes

II- Résultats du test du pouvoir antioxydant

1. Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode au DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits de la plante vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune, mesurable à 517nm .Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires [100].

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit le paramètre IC_{50} . IC_{50} : il définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution.

Les valeurs de IC_{50} des différents extraits ont été estimées en utilisant la courbe de régression linéaire : $y = ax + b$.

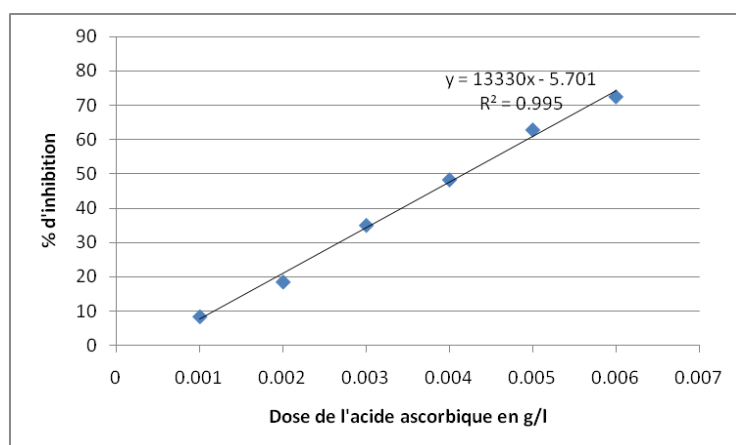


Figure 35 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de acide ascorbique.

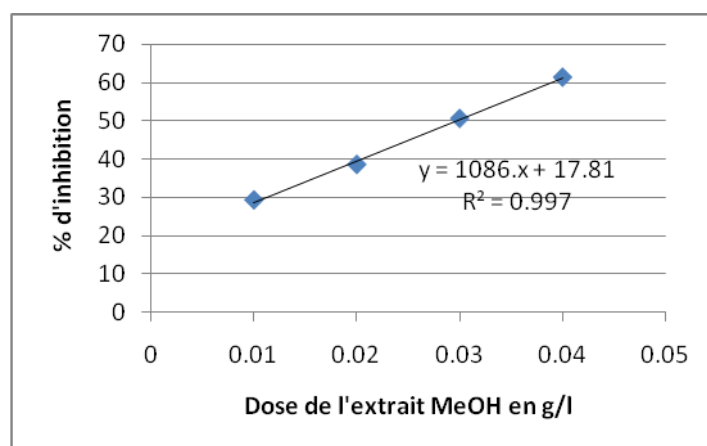


Figure 36 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique.

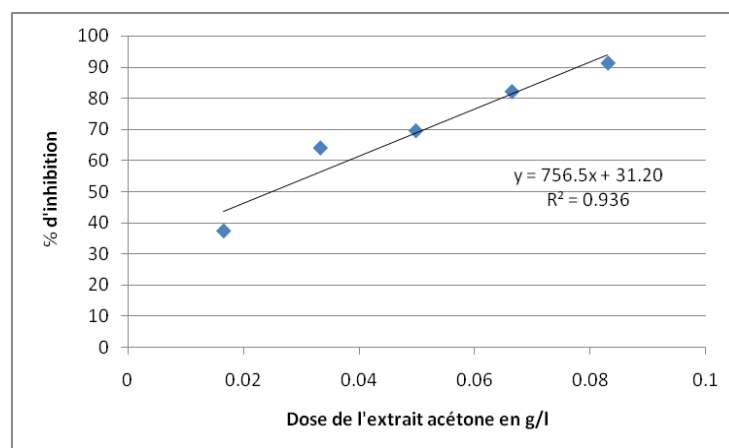


Figure 37 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait acétonique.

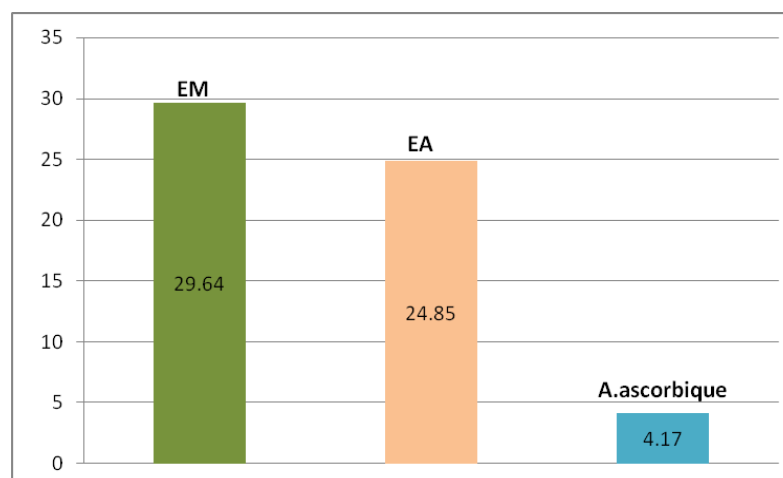


Figure 38 : IC₅₀ de l'acide ascorbique, de l'extrait acétonique et méthanolique.

À des fins comparatives un antioxydant standard est utilisé : l'acide ascorbique. Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec IC₅₀ de l'ordre de **4.17** mg/l.

Pour les deux extraits, l'extrait acétonique est le plus actif, sa IC₅₀ est de **24.85** mg/l, suivi de l'extrait méthanolique avec une IC₅₀ de l'ordre de **29.64** mg/l.

1.1. Comparaison des IC₅₀ avec les teneurs en polyphénols et flavonoïdes

Dans l'extrait acétonique, la teneur en polyphénols est égale à 10 g/l, c'est-à-dire elle représente presque 400 fois la IC₅₀. D'autre part dans l'extrait méthanolique la teneur en polyphénols est égale à 6 g/l, c'est-à-dire elle représente presque 200 fois la IC₅₀.

Dans l'extrait acétonique, la teneur en flavonoïdes est égale à 11 g/l, c'est-à-dire elle représente presque 440 fois la IC₅₀. D'autre part dans l'extrait méthanolique la teneur en flavonoïdes est égale à 4 g/l, c'est-à-dire elle représente presque 135 fois la IC₅₀.

2. Méthode de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

L'activité antioxydante des extraits de la plante étudiée a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP (Ferric reducing antioxidant power). Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible [101]. Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux [102]. La présence des réducteurs dans les extraits de la plante provoque la réduction de Fe³⁺/ complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm [103].

Les figures 39,40,41,42 représentent le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique, des extraits méthanolique et acétonique de la plante, et celui de BHA (Hydroxyanisole butylé) à différentes concentrations.

Nous avons évalué le pouvoir réducteur de deux extraits et celui de BHA par rapport l'acide ascorbique en calculant les rapports K_i/K , tel que K_i représente les pentes des courbes des extraits et de BHA, alors que K est la pente de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

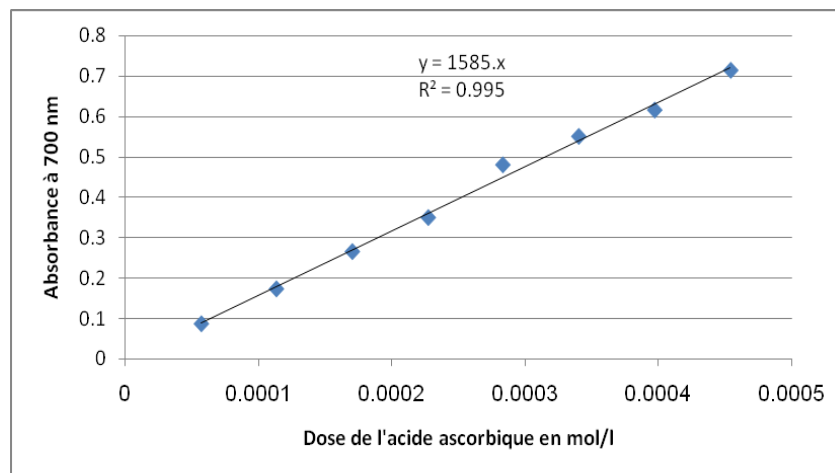


Figure 39 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

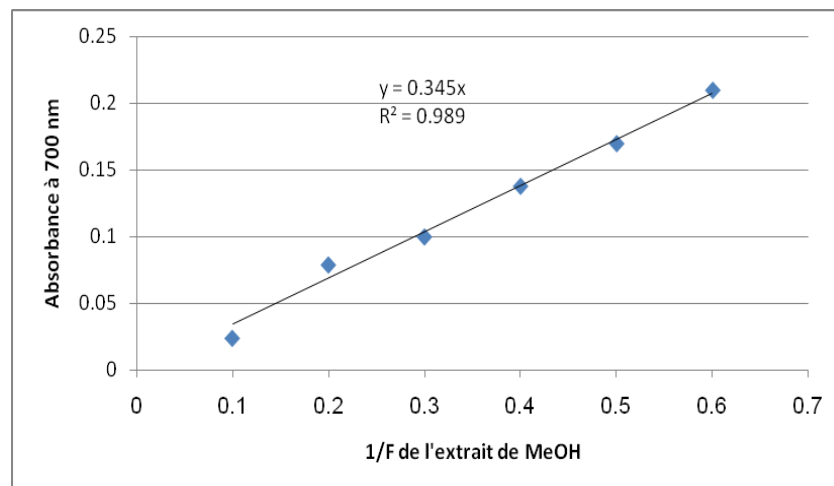


Figure 40 : Pouvoir réducteur de l'extrait MeOH.

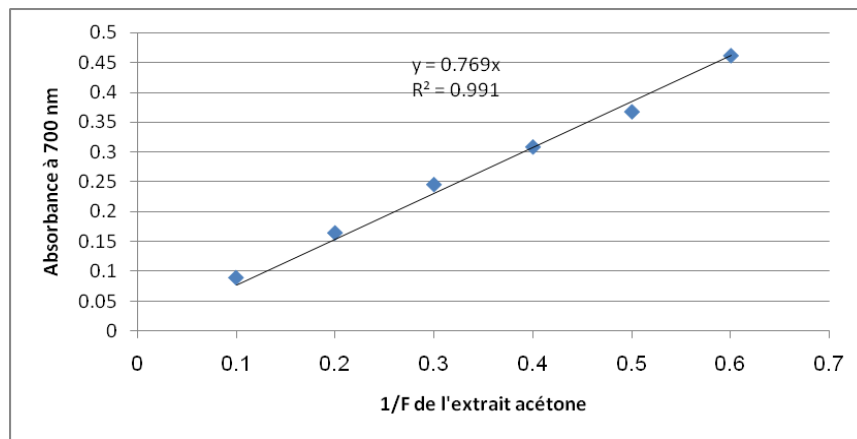


Figure 41 : Pouvoir réducteur de l'extrait acétone

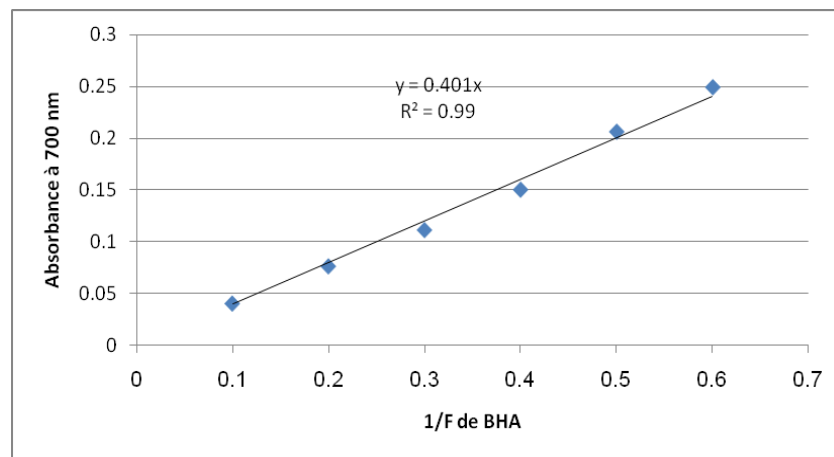


Figure 42 : Pouvoir réducteur de BHA.

Les valeurs des rapports K_i/K pour les extraits méthanolique , acétonique et pour le BHA sont respectivement : **0,21** ; **0,48** ; **0,25mM** équivalent acide ascorbique.

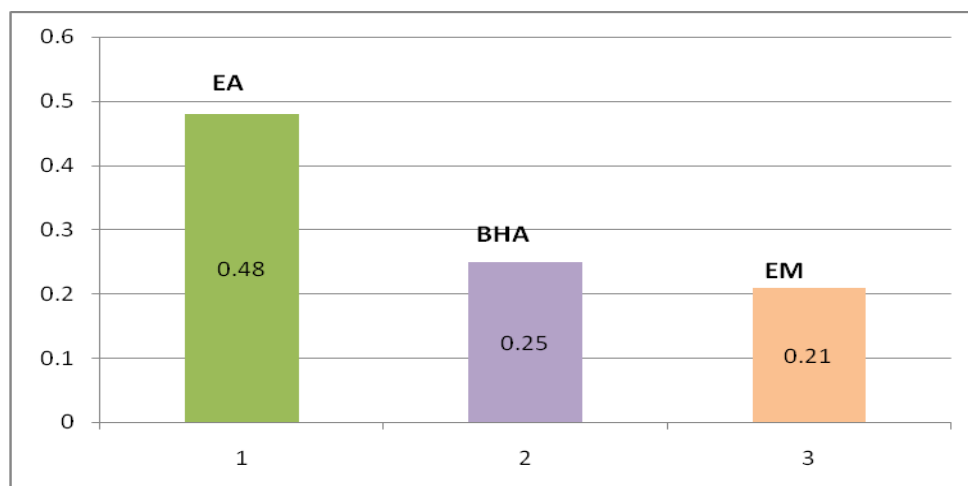


Figure 43 : Pouvoir réducteur des extraits méthanolique , acétonique et de BHA

D'après ces valeurs, on constate que l'extrait acétonique possède une bonne action vis-à-vis Fe^{3+} présent dans la solution testée, suivi de BHA puis l'extrait méthanolique.

Le pouvoir réducteur des deux extraits est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électrons. Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants [104]. Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle [105].

2.1.Comparaison des rapports K_i/K avec les teneurs en polyphénols et flavonoïdes

Dans l'extrait acétonique, la teneur en polyphénols est égale à 10 g/l, c'est-à-dire elle représente presque 120 fois le K_1/K . D'autre part dans l'extrait méthanolique la teneur en polyphénols est égale à 6 g/l, c'est-à-dire elle représente presque 160 fois le K_2/K , sachant que $K_1/K= 0.084$ g/l et $K_2/K= 0.037$ g/l représentent les pouvoirs réducteurs des extraits acétonique et méthanolique respectivement.

Dans l'extrait acétonique, la teneur en flavonoïdes est égale à 11 g/l, c'est-à-dire elle représente presque 130 fois le K_1/K . D'autre part dans l'extrait méthanolique la teneur en flavonoïdes est égale à 4 g/l, c'est-à-dire elle représente presque 108 fois le K_2/K .

2.2.Comparaison des rapports K_i/K avec IC_{50}

Pour l'extrait acétonique le rapport $K_1/K= 0.084$ g/l, il est supérieur à $IC_{50}= 0.024$ g/l, donc l'extrait acétonique manifeste un pouvoir réducteur plus actif vis-à-vis le DPPH que les ions Fe^{3+} .

Pour l'extrait méthanolique le rapport $K_2/K= 0.037$ g/l, il est supérieur à $IC_{50}= 0.029$ g/l, donc l'extrait méthanolique manifeste également un pouvoir réducteur plus actif vis-à-vis le DPPH que les ions Fe^{3+} .

III- Résultats du test du pouvoir antimicrobien

1.Pouvoir antimicrobien

Face aux problèmes de la résistance bactérienne aux antibiotiques synthétiques, beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antimicrobien des produits naturels extraits des plantes.

Lors de cette étude, nous avons testé l'action de deux extraits méthanolique et acétonique de la plante vis-à-vis de quelques souches bactériennes.

2. Pouvoir antimicrobien de l'antibiotique

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques.

Les résultats de l'évaluation antimicrobienne des extraits sont repris ci-dessous (tableaux 5, 6). Dans ces tableaux sont inclus les valeurs en (mm) zones ou diamètres d'inhibitions, représentant la grandeur du halo formé par les microorganismes inhibés par l'activité antimicrobienne.

Tableau 05 : Détermination de la zone d' inhibition de l' extrait méthanolique.

	<i>Escherichia.coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus albus</i>
Zone d'inhibition (ø mm)	11	9	7
Sensibilité	sensible	sensible	résistante

Tableau 06 : Détermination de la zone d' inhibition de l' extrait acétonique.

	<i>Escherichia.coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>staphylococcus albus</i>
Zone d'inhibition (ø mm)	18	17	14
Sensibilité	très sensible	très sensible	sensible



Effet de deux extraits sur
S.albus



Effet de deux extraits sur
S.aureus



Effet de deux extraits
sur *E.coli*

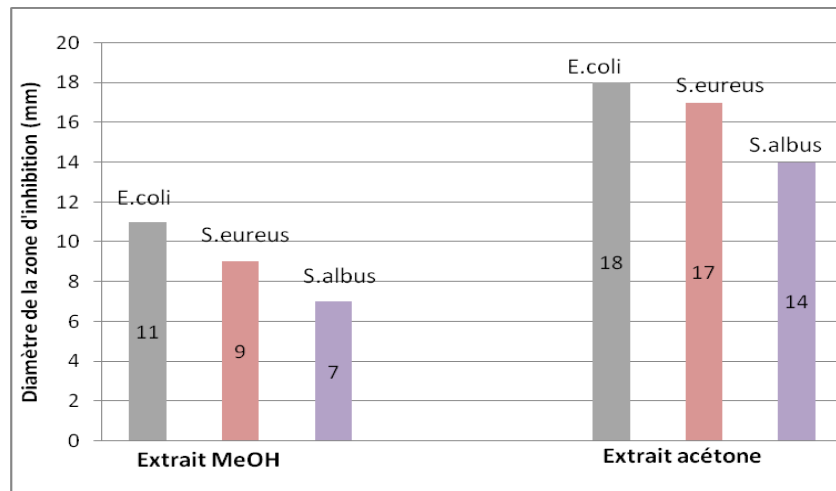


Figure 44 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des extraits méthanolique et acétonique relatives aux différentes souches bactériennes.

La figure 44 montre que l' extrait méthanolique a manifesté une activité modérée contre *E.coli* et *S.aureus*, et une faible activité contre *S.albus* . En revanche l'extrait acétonique a présenté une bonne activité vis-à-vis les trois bactéries.

Pour ces deux extraits, nous remarquons que l'extrait acétonique montre une activité plus élevée que l'extrait méthanolique.

CONCLUSION GENERALE

La découverte de ressources naturelles du règne végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques.

La présente étude a porté sur l'espèce *Limoniastrum guyonianum*. Elle a permis de mettre en évidence à travers un criblage phytochimique la présence des tanins, des flavonoïdes, des stérols et triterpènes, des huiles volatiles, des saponines et des alcaloïdes.

Le dosage des phénols totaux des deux extraits méthanolique et acétonique a révélé des teneurs **1.78 mg** et **3.07 mg** par g de matériel végétal sec respectivement. L'extrait acétonique représente la teneur la plus élevée en polyphénols.

D'autre part, le dosage des flavonoïdes a montré que les deux extraits méthanolique et acétonique présentent des teneurs de l'ordre de **1.26 mg/g** ; **3.27 mg/g** respectivement. L'extrait acétonique représente la teneur la plus élevée en flavonoïdes.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer des extraits méthanolique et acétonique comparés avec le BHA, a montré que l'extrait acétonique possède une bonne action (**0,48mM**) vis-à-vis Fe^{3+} présent dans la solution testée, suivi de BHA (**0,25mM**) puis l'extrait méthanolique (**0,21mM**).

D'autre part, l'étude du pouvoir antioxydant de nos extraits par la méthode de piégeage du radical libre DPPH s'est montré modérée dont les valeurs de **IC₅₀** sont classées dans l'ordre du pouvoir antioxydant suivant : l'extrait acétonique(**24.85mg/l**) > l'extrait méthanolique(**29.64mg/l**).

La comparaison de ces valeurs avec celle de l'antioxydant standard, l'acide ascorbique (**4.17mg/l**), nous a permis de déduire que le pouvoir antioxydant de deux extraits testés est beaucoup plus faible que celui de l'acide ascorbique, autrement dit, les deux extraits sont des mauvais antioxydants.

En ce qui concerne le pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion de disque, l'extrait méthanolique a manifesté une activité modérée contre *E.coli* et *S.aureus*, et une faible activité contre *S.albus*. En revanche l'extrait acétonique a présenté une bonne activité vis-à-vis les trois bactéries. Pour ces deux extraits, nous remarquons que l'extrait acétonique montre une activité plus élevée que l'extrait méthanolique.

L'étude comparative, entre les lipides extraits des feuilles de la plante et les lipides extraits des résidus de l'hydrodistillation, a permis de visualiser des différences concernant les constantes physico-chimiques et le nombre de molécules contenues dans ces deux lipides. Leurs rendements sont voisines.

Les lipides extraits et ayant subi au charbon actif, sont identifiés par chromatographie sur couche mince (CCM), ces lipides contiennent deux molécules différentes. Leur rendement a été calculé, il est de l'ordre **0.81**.

Les huiles essentielles sont extraites par hydrodistillation. Le rendement est très faible, il est égal à **0.025**.

L'espèce *Limoniastum guyonianum* est riche en composés phénoliques, une exploitation de ses propriétés antioxydante et antimicrobienne implique une recherche plus poussée de ses principes actifs.

Un travail complémentaire s'impose en vue d'identifier les différentes molécules en particulier les composés phénoliques présents dans les extraits bruts et les purifier en utilisant diverses techniques chromatographiques notamment la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et des méthodes spectrales pour l'élucidation structurale.

Références bibliographiques

Références

- [1] Bahorun T. (1997) Substances Naturelles Actives: La Flore Mauricienne, Une Source D'approvisionnement Potentielle. AMAS. Food and Agricultural Research Council. Réduit. Mauritius.
- [2] Teixeira da Silva J-A. (2004) Mining the essential oils of the Anthemideae. African Journal of Biotechnology. 3 (12), 706-720.
- [3] Farombi E. O. (2003) African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. African Journal of Biotechnology. 2 (12), 662-671.
- [4] <http://fr.wikipedia.org/wiki/Plumbaginaceae>.
- [5] <http://www.sahara-nature.com/plantes.php?plante=limoniastrum%20guyonianum&aff=nom>.
- [6] Saoussen Hammami¹, Asma Nguir, Dhouha Saidana, Jihène Cheriaa and Zine Mighri. Chemical analysis and antimicrobial effects of essential oil from *Limoniastrum guyonianum* growing in Tunisia. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(12), pp. 2540-2545, 18 June, 2011
- [7] Fintelmann V, Weiss RF (2004). Practical Handbook of Phytoterapie. Vigot. 184.
- [8] Chang ST, Chan SPF (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and components from *Cinnamomum osmophloeum*. J. Ethnopharmacol., 77: 123-127.
- [9] Gill AA, Delaquis P, Russo P (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed Ham. Food Microbial., 73: 83-92.
- [10] Saïdana D, Mahjoub MA, Boussaada O, Chriaa J, Cheraif I, Daami RM, Mighri Z, Helal AN (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamaryx boveana* (tamariaceae). Microbiol. Res., 163: 445-455.
- [11] Hartmann T., 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Photochemistry* 68: 2831 - 2846.
- [12] Epifano F., Genovese S., Menghini L., Curini M., 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* 68:939 - 953.
- [13] Brzozowska J., Hanower P., 1976. Recherches sur les composés phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers. *Annales de l'université d'Abijan, série C (Science)*, tome XII: 65 - 80.
- [14] Smallfield 2001 Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crop & Food Research. Number 45, 4p.
- [15] Bruneton J. (1993) Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. Paris, Fance:Lavoisier. 278-279.

- [16] Rai M.K., Acharya D. et Wadegaonkar P. (2003) Plant derived-antimycotics: Potential of Asteraceous plants, In: Plant-derived antimycotics:Current Trends and Future prospects, Haworth press, N-York, Londin, Oxford. 165-185.
- [17] Porter N(2001) Essential oils and their production. Crop & Food Research. Number 39.
- [18] Belaïche P. (1979) Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome I. l'Aromathérapie. Ed. Maloine S.A. Paris.
- [19] Svoboda Hampson J.B. (1999) Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.
- [20] Smallfield 2001 Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crop & Food Research. Number 45, 4p.
- [21] Cowan M. M. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical biology Reviews. 12 (4), 564–582.
- [22] Schwämmle B., Winkelhausen E., Kuzmanova S. et Steiner W. (2001) Isolation of Carvacrol Assimilating Microorganisms. Biotechnol. 39 (4), 341- 345.
- [23] Belghazi L., Lahlou N., Alaoui Ismaili M., Abousaouiria T., Habti N.,Tantaoui Iraki A., Talbi M., Blaghen M. et Fellat-Zarrouck K. (2002) Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la Menthe pouliot. Test antifongique. Congrès de Biochimie.Casablanca. Biochimie et Santé, 38-40.
- [24] Stefanovits-Bányai É., Tulok M. H., Hegedős A., Renner C. et Varga I. S. 2003) Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. Acta Biologica Szegediensis. 47 (1-4), 111-113.
- [25] Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J., 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.
- [26] Jutiviboonsuk A., Zhang H., Tan T.G., Ma C., Van Hung N., Cuong N.M., Bunyapraphatsara N., Soejarto D D., Fong H H S., 2005. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry* 66: 2745 - 2751.
- [27] Guignard J.L., 1996. Abrégé de biochimie végétale, Ed. *Masson*, Paris, 160 p.
- [28] Stöckigt J., Sheludko Y.,Unger M.,Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D., 2002. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A* 967: 85-113.
- [29] De Rijke E., Out P., Niessen W M A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U A T., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112: 31 - 63.
- [30] Ribereau G P, 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris, 254 p.

- [31] Harbone J B, 1967. Comparative biochemistry of the flavonoids. Academic press. New York, 1-130 p.
- [32] Brouillard R, 1986. The flavonoids Advances. *Research science*: 525-538 p.26 Harbone J B, Grayer R J, 1988. The flavonoids, Advances. *Research science*: 1-20 p.
- [33] Harbone J B, Grayer R J, 1988. The flavonoids, Advances. *Research science*: 1-20 p.
- [34] Alkurd A., Hamed T. R., Al-Sayyed H., 2008. Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4: 265 - 274.
- [35] Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. (2001) Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 33, 2-16.
- [36] Didry N., Pinkas M. et Torck M. (1982) Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de grindelia. *Pl. Med. Phytother.* XVI, 7 -15.
- [37] Ravn H., Andary C., Kovacs G. et Molgaard P. (1984) Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochem. Syst. Ecol.* 17, 175 - 184.
- [38] Hayase F. et Kato M. (1984) Antioxidant compounds of sweet potatoes. *J. Nutri. Sci. Vitaminol.* 30, 37 - 46.
- [39] Mabry T.J et Ulubelen A. (1980) Chemistry and utilization of panoids including flavonoids, coumarins and lignans. *J. Agric. Food Chem.* 28, 188 - 196.
- [40] Stavric B. et Matula T. I. (1992) Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health. p. 274 - 294. In : ONG ASH et Packer L eds. *Lipid soluble and antioxidants: Biochemistry and clinical applications*. Basel : Birkhauser Verlag.
- [41] Das H.C., Wang J. H et Lien E. J. (1994) Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids : A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. p. 133 – 136. In : Jucker E ed. *Progress in Drug Research* . Basel : Birkhauser Verlag. Das H. C. et Weaver G. M. 1972. Cellulose thin-layer chromatography of phenolic substances. *J. Chromatogr.* 67, 105 – 111.
- [42] Bidet D., Gagnault J. C., Girard P et Trotin F. (1987) Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : Les flavonoïdes. *L'actualité chimique*. 89 - 97.
- [43] Bruneton J. (1993) Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. Paris, France : Lavoisier. 278-279.
- [44] Masquelier J., Dumon M C. et Dumas J. (1979) Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. *Acta therapeutique*. 1, 101 - 104.
- [45] Bahorun T, Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. et Pinkas M. (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel- forschung/Drug Research*. 46 II (11), 1086 - 1089.

- [46] De Oliveira M. M., Sampaio M. R. P., Simon F., Gibert B. et Mors W. B. (1972) Antitumor activity of condensed flavenols. *An. Acad. Brasil.* 44, 41 - 44.
- [47] Brownlee H. E., Hedger J. et Scott I. M. (1992) Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*. *Phys. Mol. Plant Pathol.* 40, 227 - 232.
- [48] Kreofsky T., Schlager J. W., Vuk-Pavlovic Z., Abraham R. T. et Rohrbach M.S. 1992. Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophages. *Am. J. Resir. Cell. Mol. Biol.* 7, 172 - 181.
- [49] Okuda T., Kimura Y., Yoshida T., Hatano T., Okuda H. et Arichi S. (1983) Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria and microsome of liver. *Chem. Pharm. Bull.* 31, 1625 - 1631.
- [50] Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M. et Takahara Y. (1993) Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochem.* 33, 557 – 561.
- [51] sites.univ-provence.fr/wabim/d_agora/.../lipides.pdf.
- [52] Franchomme, P.; Pénoël, D. 1990. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.
- [53] Richard, H. 1992. Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339 p.
- [54] Mengel, P.; Beh, D.; Bellido, G.M.; Monpon, B. 1993. VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums Cosmétiques Arômes* 114, 66-67.
- [55] Bendahou, M.; Muselli, A.; Grignon-Dubois, M.; Benyoucef, M.; Desjobert, J.M.; Bernardini, J.F.; Costa, J. 2007. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* 106,132-139.
- [56] Lucchesi, M.E.; Smadja, J.; Bradshaw, S.; Louw, W.; Chemat, F. 2007. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food Engineer.* 79,1079- 1086.
- [57] Lucchesi, M.E.; Chemat, F.; Smadja, J. 2004. Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A* 1043, 323-327.
- [58] Chemat, F.; Lucchesi, M.E.; Smadja, J.; Favretto, L; Colnaghi, G.; Visinoni, F. 2006. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Anal. Chim. Acta* 555,157-160.
- [59] Flamini, G.; Tebano, M.; Cioni, P.L; Ceccarini, L; Ricci, A.S.; Longo, I. 2007. Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L and a novel method which uses microwaves applied *in situ*, without resorting to an oven. *J. Chromatogr. A* 1143, 36-40.
- [60] Robert, G. 2000. Les Sens du Parfum. Osman Eroylls Multimedia. Paris. 224p.
- [61] Proust, B. 2006. Petite Géométrie des Parfums. Éditions du Seuil. Paris. 126 p.

- [62] P Bruneton, J. 1999. Pharmacognosie. Phytochimie des plantes médicinales. 2eme édition. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 915 p.
- [63] Pellerin, P. 1991. Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour and perfume industry. *Perfum. Flavor.* 16,4, 37-39.
- [64] Richard, H. 1992. Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339 p.
- [65] Wenqtang, G.; Shufen, L.; Ruixiang, Y.; Shaokun, T.; Can, Q. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food chem.* 1001,1558-1564.
- [66] Ekoumou C., 2003. Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako, 145p.
- [67] Cavin A., 1999. Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinospora crispa* (Menispermaceae) *Merremia emarginata* (Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae). Thèse Université de d'Indonésie.
- [68] Ahamet S., 2003. Etudes phytochimiques et des activités biologiques de *Balanites aegyptica* (Balanitaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, 117 p.
- [69] HADI M. (2004) La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur Domaine : Pharmaco chimie. 155p.
- [70] BOYD B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S. et McAnalley B. (2003) Étude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrition.* 4 (6), 7p.
- [71] Vansant G.(2004) Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.
- [72] Svoboda K.P. et Hampson J.B. (1999) Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.
- [73] Morel Y. et Barouki R. (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.* 342 (3), 481-496.
- [74] Favier A . (2003) Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique.* 108-115.
- [75] Asada Y., Oshikawa T., Welli. (1998). Antimicrobial flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Planta medica.* 64(8): 746-747.
- [76] Perry J., Staley J., Lory S et al. (2002). Microbiologie. Cours et question de révision. Dunod: 159-160.
- [77] Bousseboua H. (2001; 2006). Eléments de microbiologie générale. 32, 160- 167.

- [78] Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. P 71-75.
- [79] Guillaume, 2000: Wwww. Second euro-bioweb.com/microbiologie/ microbiologie cours. Html.
- [80] Prescott., Harley & Klein (1995). *Microbiologi*. Bruxelles. DeBoeck Université.
- [81] K.Benzahi, Contribution à l'étude des flavonoides dans la Plante cynodn Dactylon-L <<chindent>>, mémoires de Magister. Université de Ouargla 2001,P,15-17.
- [82] N. Chaouch, Etude des alcaloides dans le coloquinte *Colocynthis vulgaris* (L) Schrad (cucurbitacées) Région de Oued N'sa (Wilaya de ourgla). Mémoire de magister. Université de Ouargla 2001, 44.
- [86] Audigié C.L., Dupont G., Tonszain F. (1995). (Chromatographie) principes des méthodes d'analyses biochimiques. Tome 1 Doin. 44-85.
- [87] Edith A., Robert M., Jean. U. (1988). Chromatographie: Theorie.26 et 28 Janvier. Lycée louis vincent – METZ.
- [88] Singleton V. L., Ortofer R., Lamuela-Raventos R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. In: Packer L. (ed). *Methods in Enzymology*. Orlando. Academic Press. 152-178.
- [89] Chen C-N, Weng M-S, Wu C-L et Lin J-K. (2004) Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. *eCAM*. 1(2), 175-185.
- [90] Lamaison et Carnet A. (1990). Teneurs en principaux flavonoids des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la vegetation. *Pharm. Acta. Helv.* 65, 315-320.
- [91] Huang D-J., Lin C-D, Chen H-J. et Lin Y-H. (2004) Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57' constituents *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45, 179-186.
- [92] Leitão G.G., Leitão S. G. et Vilegac W. (2002) Quick Preparative Separation of Natural Naphthopyranones with Antioxidant Activity by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Z. Naturforsch.* 57c, 1051-1055.
- [93] Molyneux P. 2004The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26 (2), 211-219.
- [94] Heilerová L., Bučková M., Tarapčík P., Šilhár S. et Labuda J. (2003) Comparison of Antioxidative Activity Data for Aqueous Extracts of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.), Oregano (*Origanum vulgare* L.), Thyme (*Thymus vulgaris* L.), and Agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.) obtained by Conventional Methods and the DNA-Based Biosensor. *Czech J. Food Sci.* 21 (2), 78–84.
- [95] Wang J. et Mazza G. (2002) Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor α in LPS/IFN- γ - Activated RAW 264.7 Macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4183-4189.

[96] Mensor L. L., Menezes F. S., Leitão G. G., Reis A. S., Santos T. C., Coube C. S. et Leitão S. G. (2001) Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method. *Phy- tother. Res.* 15, 127-130.

[97] Oyaizu, M. ; 1986. Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**, 307–315.

[98] Hubert J. ; 2006. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à l'Institut Nationale Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries.

[99] PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C. & ROURA S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic*, 36, 679-684.

[100] Majhenic L., Kerget M.S., Knez Z. ; 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104, 1258–1268.

[101] Benzie I.F.F., Strain J.J. ; 1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.

[102] Li H-B. , Wong C-C., Cheng K-W., Feng C. ; 2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensmittel- Wissenschaft and Technology*, 41(3), 385–390.

[103] Chung Y-C., Chang C-T., Chao W-W., Lin C-F., Chou S-T. ; 2002. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2454–2458.

[104] Siddhuraju P., Becker K. ; 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10-19.

[105] Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., Lee S.C. ; 2004. Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 3389–3393.

Références arabes

- [83] فؤاد عبد العزيز احمد الشيخ ؛ صناعة الزيوت و الدهون ، دار النشر للجامعات المصرية الطبعة الأولى 1993 .
- [84] الهيئة العربية السعودية للمواصفات والمقاييس، طرق الاختبار الفيزيائية و الكيميائية للزيوت والدهون النباتية المعدة للطعام.
- [85] تقرير البرنامج الوطني لتقييم جودة تحاليل المواد الغذائية ، الدورة الأولى 2011، هيئة الطاقة الذرية، مكتب ضمان الجودة، الجمهورية العربية السورية.