



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



UNIVERSITE LARBI TEBESSI – TEBESSA –

FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES ET DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIÈRE

**Projet de Fin d'Etude
En vue de l'obtention du diplôme de
Master Académique**

Domaine : Sciences de la matière
Spécialité : Chimie des produits naturels

**Présenté par :
Bouamra Imen
Bourai Hafida**

Thème

***Etude des propriétés d'une fraction retenue de
la plante *Salvia rosmarinus* cultivée***

Soutenu publiquement

Le : ././2022

Devant le Jury :

HARKATI Ibrahim	Professeur	Président	Université de Tébessa
Kalla Ali	MCA	Encadreur	Université de Tébessa
HADJAR Samah	MCB	Examineur	Université de Tébessa

Année Universitaire : 2022/ 2021



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



UNIVERSITE LARBI TEBESSI – TEBESSA –

FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES ET DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIÈRE



**Projet de Fin d'Etude
En vue de l'obtention du diplôme de
Master Académique**

Domaine : Sciences de la matière
Spécialité : Chimie des produits naturels

**Présenté par :
Bouamra Imen
Bourai Hafida**

Thème

***Etude des propriétés d'une fraction retenue de
la plante *Salvia rosmarinus* cultivée***

Soutenu publiquement
Le : ././2022

Devant le Jury :

HARKATI Ibrahim	Professeur	Président	Université de Tébessa
Kalla Ali	MCA	Encadreur	Université de Tébessa
HADJAR Samah	MCB	Examineur	Université de Tébessa

Année Universitaire : 2022/ 2021

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Remerciement

*Nous tenons, avant tout, de remercier Le
Miséricordieux tout puissant, car sans son
aide et sa bienveillance, rien de cela n'aurait
Pas pu être possible.*

*Nous tenons aussi, à exprimer notre gratitude, à M.
Kalla Ali notre promoteur, pour avoir accepté de diriger ce travail et
pour ses précieux conseils.*

*Nous remercions également, M. HARKATI Ibrahim nous avoir
fait l'honneur de présider notre jury, nous remercions aussi,
Mme, HADJAR Sameh pour avoir accepté d'examiner notre
Travail.*

*Nous tenons également à exprimer nos remerciements à tous les
personnes de l'Université Larbi Tébessi - TEBESSA-*

*Nous tenons à remercier tous les enseignants de nos cursus
universitaires, qui ont contribué à nos formations.*

Nous remercions tous nos amis pour leurs aides et leurs assistances.

*En fin, nous remercions toutes les personnes qui de près ou de loin ont
Contribué à la réalisation de cette modeste étude.*



Table de matières

Introduction générale.....	1
<i>Chapitre I : Les plantes médicinales et leurs principes actifs</i>	
1.1- Historique	3
1.2- Les plantes médicinales	4
1.2.1- Définition.....	4
1.2.2- Source des plantes médicinales	4
1.2.3- Plantes de cueillettes	4
1.2.4- Plantes de cultures.....	4
1.3- Conservation des plantes médicinales	5
1.3.1- Dessiccation.....	5
1.3.2- Cryodessiccation ou Lyophilisation.....	5
1.3.3- La Stabilisation.....	6
1.3.3.1- Le but	6
1.3.3.2- Les procédés de stabilisation	6
1.4- Composition de base pour les plantes	6
1.4.1- Composés du métabolisme primaire	7
1.4.1.1- Glucides.....	7
1.4.1.2- Amidon.....	7
1.4.1.3- Lipides	7
1.4.2- Composés du métabolisme secondaire	8
1.4.2.1- Les composés phénoliques	8
1.4.2.2- Les flavonoïdes :	8
1.4.2.3- Les tanins	10
1.4.2.3.1- Tanins hydrolysables	10
1.4.2.3.2- Les tanins condensés :	10
1.4.2.4- Les coumarines.....	11
1.4.2.4.1- Les composés terpéniques.....	11
1.4.2.4.1.1- Les stéroïdes.....	11
1.4.2.4.1.2- Les stérols.....	12
1.4.2.4.1.3- Les terpénoïdes.....	12
1.4.2.4.1.4- Les huiles essentielles	12

1.4.2.5- Les saponosides	13
1.4.2.5- Les composés azotés	14
1.5- Classification des plantes médicinales)	15
1.5.1- Plantes à alcaloïdes.....	15
1.5.2- Plantes à huiles essentielles.....	16
1.5.3- Plantes à glucosides	16
1.5.4- Plantes à principe amer	17
1.5.4.1- Les sucre.....	17
1.5.4.2-Les huiles fixes	17
1.5.4.3- Acides organiques	17
1.5.4.4- Plantes à tanins.....	17
1.6- Utilisation des plantes en médecine traditionnelle	17

Chapitre II : Les méthodes d'extraction et de séparation

II.1- Introduction	18
II.2- Définition.....	18
II.3- Méthodes d'extraction.....	18
II.3.1- Extraction solide / liquide	18
II.3.1.1- Décoction	19
II.3.1.2- Infusion.....	19
II.3.1.3- Macération	19
II.3.2- L'extraction liquide-liquide :(L'extraction par solvant).....	19
II.3.2.1- Principe.....	19
II.3.2.2- Choix du solvant.....	20
II.3.2.3- La décantation	20
II.3.3- Extraction par hydrodistillation.....	21
II.3.4- Extraction par entrainement à la vapeur d'eau.....	21
II.3.5- Extraction par Soxhlet	22
II.3.5.1- Principe	22
II.3.6- Autres méthodes d'extractions	23
II.3.6.1- Extraction par CO ₂ supercritique.....	23
II.3.6.2- Le cryobroyage	24
II.3.6.3- La centrifugation différentielle	24
II.3.7- Méthodes chromatographiques.....	24
II.3.7.1- Chromatographie sur couche mince (CCM).....	25

II.3.7.1.1- Définition.....	25
II.3.7.1.2- Appareillage.....	25
II.3.7.1.3- Principe de la technique.....	25
II.3.7.1.4- Préparation.....	25
II.3.7.1.5- Choix des conditions opératoires.....	26
II.3.7.1.5.1- Choix du support.....	26
II.3.7.1.5.2- Choix de l'éluant.....	27
II.3.7.2. La chromatographie sur colonne (CC).....	28
II.3.7.3- Chromatographie sur papier.....	28
II.3.7.4- Analyse par spectroscopie en ultraviolet (UV).....	29

Chapitre III : Matériels Et Méthodes

III.1- Description de la plante <i>Salvia rosmarinus</i>	31
III.2- Cueillette de la plante.....	31
III.3- Séchage.....	32
III.4- Classification de la plante.....	32
III.5- Utilisation populaire de la plante.....	33
III.6- Réactifs utilisés pour les tests des principes actifs.....	36
III 6-1 Réactif de Dragendorff.....	36
III.6.2- Réactif de Bouchardât.....	36
III.6.3- Réactif de Mayer.....	37
III.6.4- Réactif de Wagner.....	37
III 7- Tests de présence des principes actifs.....	38
III.7.1- Alcaloïdes.....	38
III.7.2- Sels d'alcaloïdes.....	39
III.7.3- Alcaloïdes indoliques.....	39
III.7.4- Cardénolides.....	40
III.7.4.1- Le tétrose.....	40
III.7.4.2- Les trichlorures.....	41
III.7.5- Saponosides.....	41
III.7.6- Tanins.....	42
III.7.7- Stérols et triterpènes.....	42
III.7.8- Flavonoïdes.....	43
III.7.9- Huiles essentielles.....	43
III.8- Extraction.....	44

III.8.1- Macération	44
III.8.2- Filtration et évaporation sous vide.....	44
III.8.2.1-L'extrait d'éthanol	44
III.8.3- Elimination de la chlorophylle	45
III.8.4- Obtention des extraits	46
III.8.4.1-Extraction par chloroforme	46
III.8.4.2-Extraction par l'acétate d'éthyle	47
III.8.4.3-Extraction par n-butanol.....	47
III.8.5- Schéma de l'extraction et de séparation.....	49
III.9- Chromatographie sur couche mince (CCM)	49
III.9.1- Préparation de l'échantillon à analyser.....	50
III.9.1. a- Préparation de plaque CCM.....	50
III.9.1. b- Préparation de la cuve chromatographique	51
III.9.2- Etude des fractions retenues de l'extrait brut "extrait éthanoïque"	51
III .10-l'activité anti oxydante.....	51
III .10.1- Définition.....	52
III.10.2- Test de FRAP.....	52
III.10.2.1- Principe	52
III.10.2.2- Mode Opérateur :.....	53
III.10.3- Test DPPH	54
III.10.3.1- Principe	54
III.10.3.2- Mode Opérateur	55
III.10.3.2. a-Préparation des solutions (extraits éthanoïque)	55
III.10.3.2 .b- Préparation de la solution de DPPH	55
<i>Chapitre IV: Discussion des résultats</i>	
IV.1-Tests de présence des principes actifs	56
IV.2- Rendement des extractions	57
IV.3- Séparation par CCM	59
IV.3.1- Discussion des résultats obtenus pour l'extrait brut " extrait éthanoïque"	59
IV.4 - l'activité anti oxydante	60
IV.4.1- Test de FRAP	60
IV. 4.2- Test de DPPH	63
V. Conclusion.....	69
VI. Les références bibliographiques	70

Liste des figures

Figure 1: Structure de base du phénol	8
Figure 2: Squelette de base des flavonoïdes.....	9
Figure 3: Structure de flavone et de flavonol	9
Figure 4: Structure de flavanone et de dihydroflavonol.....	9
Figure 5: Structure d'isoflavone et de neoflavone	9
Figure 6: Structure de base des tanins hydrolysables.....	10
Figure 7: Structure de base des tanins condensés	10
Figure 8: Structure de base des coumarines	11
Figure 9: Structure de base des stéroïdes	11
Figure 10: Quelques exemples des stéroïdes.....	11
Figure 11: Structure de cholestérol appartenant à la famille des stérols	12
Figure 12: Exemples d'hémiterpènes	12
Figure 13: Exemples de monoterpènes	13
Figure 14: Exemples des sesquiterpènes	13
Figure 15: Structure de spirostane (saponosides à génines stéroïdiques)	14
Figure 16: Exemples des saponosides à géninestriterpènes	14
Figure 17: Les principaux cycles azotés des alcaloïdes.	15
Figure 18: Macération	19
Figure 19: Schéma d'extraction par solvant.....	20
Figure 20: Extraction par hydro distillation	21
Figure 21: Schéma d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau.....	22
Figure 22: Schéma d'extraction par Soxhlet	23
Figure 23: Extraction par CO ₂ supercritique	24

Figure 24: Plaque chromatographique éluée permettant le calcul du R_f	27
Figure 25: Chromatographie sur couche mince	28
Figure 26: Chromatographie sur colonne.....	28
Figure 27: Chromatographie sur papier	29
Figure 28: Spectrophotomètre	30
Figure 29 : Plante de <i>Salvia rosmarinus</i> cultivée.....	31
Figure 30: La plante séchée.....	32
Figure 31: Réactif de Dragendorff	36
Figure 32: Réactif de Bouchardât.....	37
Figure 33: Réactif de Mayer.....	37
Figure 34: Réactif de Wagner	38
Figure 35: Test de présence des alcaloïdes	39
Figure 36: Test de présence des alcaloïdes indoliques.....	40
Figure 37: Test de présence du tétrose	40
Figure 38 : Test de présence des trichlorures	41
Figure 39: Test de présence des saponosides.....	41
Figure 40: Test de présence des tanins	42
Figure 41: Test de présence des stérols et triterpènes	42
Figure 42: Test de présence des flavonoïdes.....	43
Figure 43 :Test de présence des huiles essentielles.....	43
Figure 44: Macération de la plante dans l'éthanol au début de la répartition.....	44
Figure 45: Les étapes de préparation de l'extrait éthanol	45
Figure 46 : Extrait après élimination de la chlorophylle	46
Figure 47: Extraction par chloroforme	47
Figure 48: Extraction par n-butanol	48

Figure 49: Extrait aqueux avant l'évaporation de l'eau	48
Figure 50: Schéma du protocole d'extraction et de séparation.....	49
Figure 51: Préparation des plaques CCM	50
Figure 52: Cuve chromatographique.....	51
Figure 53: Séparation en utilisant le mélange d'éthanol et l'éther de pétrole	51
Figure 54: Séparation en utilisant le mélange d'hexane et d'éthanol.....	51
Figure 55: Solution tampon.....	52
Figure 56: l'incubation et centrifugation	53
Figure 57: Cuve d'absorption par spectrophotomètre UV-V	54
Figure 58: La molécule de diphénylpicrylhydrazyl (DPPH)	54
Figure 59: Réaction radicalaire de DPPH.	55
Figure 60: La solution de DPPH	56
Figure 61: Masses des extraits obtenus et leurs rendements	58
Figure 62: Courbe d'absorption de l'extrait éthanoïque par FRAP	62
Figure 63: Courbe d'inhibition de l'extrait éthanoïque par FRAP	62
Figure 64: Courbe d'absorption de l'extrait butanolique par DPPH.....	63
Figure 65 : Courbe d'inhibition de l'extrait butanolique par DPPH	64
Figure 66: courbe d'absorption de l'acide ascorbique dans le butanol par DPPH.....	65
Figure 67: Courbe d'inhibition de l'acide ascorbique dans le butanol par DPPH	65
Figure 68: Courbe d'absorption de l'extrait éthanoïque par DPPH	66
Figure 69: Courbe d'inhibition de l'extrait éthanoïque par DPPH.....	67
Figure 70 : Courbe d'absorption de l'acide ascorbique dans l'éthanol par DPPH	67
Figure 71: Courbe d'inhibition de l'acide ascorbique dans l'éthanol par DPPH.....	68

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification de la plante	32
Tableau 2: Tests de présence des principes actifs	56
Tableau 3: Les rendements des extraits.....	57
Tableau 4: Résultat de séparation par CCM.....	59
Tableau 5: Résultat d'absorbance de l'extrait éthanoloïque	61
Tableau 6: Résultat d'absorbance de l'extrait butanolique.....	63
Tableau 7: Résultat d'absorbance d'acide ascorbique dans le n-butanol.....	64
Tableau 8: Résultat d'absorbance à 700 nm de l'extrait éthanoloïque	66
Tableau 9: Résultat d'absorbance d'acide ascorbique dans l'éthanol	67

Liste des symboles et abréviations

Abréviations et symboles	Signification
CCM	Chromatographie sur couche mince
CC	Chromatographie sur colonne
°C	Degré Celsius
UV	Ultraviolet
g	Gramme
min,h	minute, heures
%	Pourcentage
DPPH	2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle
FRAP	Pouvoir Antioxydant Réducteur du Fer
R _f	Rapport frontal
ml	Millilitre
l	Litre
(1), (2),.....	Désignation mentionnée dans la partie bibliographique
ABTS	Acide 2, 2'-bis (3éthylbenzthiazoline-6sulphonique
Nm	Nanomètre
L	Liquide
S	Solide
Etp	Ethyle de pétrole
EtoH	Éthanol
He	Hexane
HE	Huile essentielle
n-but	Normale Butanol
Mg	Milligramme
I	Inhibition
DPPH-H	2,2diphényl-1-picrylhydrazyl

ملخص

هذا العمل مخصص لعرض ودراسة بعض خصائص نبات شائع الاستخدام في صناعة الأدوية ومنتجات التجميل. *Salvia rosmarinus* المعروف شعبيا باسم إكليل الجبل هو نوع من عائلة الشفويات و هو عبارة عن نبات بري و زراعته تبقى جد محدودة.

أعمال الفصل الكروماتوغرافي على نبات *Salvia rosmarinus* المزروع أوصلتنا إلى تجزئة مهمة جدًا وهي ثراء هذا النبات بالمادة الفعالة حتى لو لم يكن بمستوى النبات البري الأم.

كما كشفت الدراسة الفيزيوكيميائية (الامتصاصية ونسبة التثبيط) وبالمقارنة مع بيانات الدراسات السابقة عن

ثراء هذا النبات بالمركباتالبوليفينولية ، خاصة الكومارينوفلافونويد.

من منظور مستقبلي، فإن زراعة إكليل الجبل (*Salvia rosmarinus*) لأغراض اقتصادية، لا سيما في مجال

الصيدليات والتجميل، هو موضوع ساعة وحساس لتحسينمواد فعالة معينة للنبات.

الكلمات المفتاحية: *Salvia rosmarinus* ، عائلة الشفويات ، النباتات الطبية ، الفصل الكروماتوغرافي ، اختبارات

أولية... ..

Abstract

This work is devoted to introduce and studying some properties of a plant commonly used in the pharmaceutical industry and of beauty products. *Salvia rosmarinus* popularly known as rosemary is a species of *Lamiaceae*. It is a wild plant; its culture is still very limited.

The separation treatment of cultivated *Salvia rosmarinus* leads us to a very significant fractionation.

The implementation of chromatographic techniques of separation and purification has proven the richness of this plant in active matter even it is not up to the wild mother plant.

The physicochemical study (absorbance and the percentage of inhibition) and by comparing with literature data, revealed the richness of this plant in polyphenolic matter, particularly coumarins and flavonoids.

In perspective the culture of *Salvia rosmarinus* for economic purposes, particularly in the field of drugstore and beauty, is a topical subject to improve some activities of the plant.

Keywords: *Salvia rosmarinus*, *lamiaceae*, medicinal plants, chromatographic separations, preliminary tests

Résumé

Ce travail est consacré à présenter et à étudier quelques propriétés d'une plante couramment utilisée dans l'industrie pharmaceutique et celle des produits de beauté. *Salvia rosmarinus* populairement connu sous le nom de romarin est une espèce des *Lamiaceae*. C'est une plante sauvage, sa culture reste encore très restreinte.

Le traitement de séparation de *Salvia rosmarinus* cultivée nous a conduit à un fractionnement très significatif. La mise en place des techniques chromatographiques de séparation et de purification a prouvé la richesse de cette plante en matière active même si elle n'est pas à la hauteur de la plante mère sauvage.

L'étude physicochimique (absorbance et le pourcentage d'inhibition) et par comparaison avec les données de la littérature, a révélé la richesse de cette plante en matière polyphénolique, particulièrement les coumarines et les flavonoïdes.

En perspective la cultivation de *Salvia rosmarinus* pour des buts économiques, particulièrement dans le domaine de droguerie et de beauté, est un sujet d'actualité pour améliorer certaines activités de la plante.

Mots clés : *Salvia rosmarinus* , *lamiaceae*, plantes médicinales, séparations chromatographiques, tests préliminaires



**Introduction
générale**

Introduction générale

Les plantes médicinales occupent actuellement un rang très important dans la production agricole et dans l'industrie. Elles présentent un secteur économique très fin et soigné dans les pays producteurs. Les plantes médicinales sont les sources principales des principes actifs utilisés dans le domaine pharmaceutique pour la production des médicaments. Elles sont aussi souvent utilisées dans le domaine de fabrication des produits de beauté, les détergents et autres. Les plantes médicinales sont impliquées dans ces différents secteurs sous formes de principes actifs, des huiles, des extraits, des solutions aqueuses ou organiques ou même telles qu'elles sont. Notons là les différentes familles des produits biologiques (hormones, cortisones ...) utilisés avec une très grande importance dans la production des produits pharmaceutiques (1).

Le romarin est une plante, à huiles essentielles, que nous avons choisies pour réaliser notre travail de recherche. C'est une plante de famille des *Lamiaceae*, elle pousse spontanément dans tout le territoire algérien et dans le sud de l'Europe (2).

C'est une plante herbacée toujours verte aux feuilles rigides et linéaires et fleurs bleues pâles ou légèrement blanchâtres.

Le romarin possède des capacités énergisantes qui le rend un véritable stimulant de l'organisme et lutte contre l'hypotension artérielle, les vertiges et les céphalées. (3).

L'intérêt de ce travail consiste à une étude des propriétés d'une fraction retenue de la plante *Salvia rosmarinus* cultivée, particulièrement pour décrire :

- Tests de présence des principes actifs
- Extraction par macération de la plante et de retenir certaines fractions.
- Préparation des échantillons à analyser.
- Etude de quelques activités chimiques et biologiques.

Notre manuscrit est formulé de deux grandes parties :

Après cette brève introduction, nous avons décrit, en premier lieu, l'essentiel bibliographique qui aide à comprendre notre travail. La description des plantes médicinales, leurs métabolites secondaires et les méthodes de leur extraction sont les grands titres de cette première partie.

La seconde partie est réservée à notre travail, proprement dit, suivi par une discussion des résultats obtenus. Le manuscrit est clôturé par une conclusion générale et une perspective pour améliorer les résultats obtenus dans le futur.



**Partie
bibliographie**

Chapitre I

Les plantes médicinales et leurs principes actifs

I .1-Historique

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au taxol, cette source semble inépuisable puisque seul environ 50000 espèces ont été traitées et investiguées parmi les 500000 espèces végétales connues et cela sur les deux plans photochimique et pharmacologique. Rappelons que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs centaines de constituants différents (4).

Dans les civilisations chinoise ou indienne, on trouve la trace d'utilisations médicinales très anciennes. Le premier livre de matière médicale, le Sheng Nung Ben Cao Jiang "Traité des plantes médicinales de l'empereur Sheng Nung", fut rédigé vers 2900 avant J.-C. Les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour se soigner : 600 tablettes d'argiles mentionnent environ 1000 plantes pour leurs vertus curatives et plus de 800 remèdes sont décrits par les égyptiens (5).

Plusieurs constituants d'origines des plantes médicinales sont actuellement mis en vente telle que les huiles essentielles, les poudres, des matières comprimées...etc soit pour une destination pharmaceutique ou aussi pour l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances. Depuis quelques décennies des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des matières issues des plantes dans de différents domaines (6).

I .2- Les plantes médicinales

I .2.1- Définition

On appelle plantes médicinales toutes plantes renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager, guérir des maladies (7).

Ces principes actifs n'appartiennent généralement pas aux constituants fondamentaux qui jouent un rôle essentiel dans les phénomènes vitaux des plantes, ce sont le plus souvent des substances dites secondaires résultant de la photosynthèse et dont on ignore encore la plupart du temps dans le métabolisme végétal (8), (9).

I .2.2- Source des plantes médicinales

Les plantes utilisées en pharmacie sont soit des plantes sauvages (spontanées) dite plantes de cueillette, soit des plantes de culture (10).

I .2.3- Plantes de cueillettes

La récolte des plantes sauvages couvrirait autre fois a presque la totalité des besoins de la thérapeutique, elle est aujourd'hui insuffisante pour beaucoup de drogues, celles-ci présentent des inconvénients suivants :

- Dispersion géographique.
- Irrégularité de leurs croissances, qualité inégale.
- Leurs récoltes nécessitent une main-d'œuvre abondante et qualifiée.

Actuellement, la cueillette reste importante quand :

- Les peuplements naturels sont abondants et dense.
- Les besoins réduits, ne nécessitent pas là culture.
- La culture est difficile ou impossible.

Dans tous les autres cas, on fait appel aux plantes de culture (9).

I .2.4- Plantes de cultures

Certaines plantes médicinales sont cultivées depuis des temps immémoriaux parce que les gites naturels deviennent insuffisants. Malgré certains inconvénients qui peuvent interfères à la qualité de la plante (contamination plus facile par les parasites, plantes.....etc.) offrent de nombreux avantages :

- Matière première abondante, homogène, et de bonnes qualités.

- Récoltes aisées, souvent mécanisée.
- Les frais de main-d'œuvre réduits.

Parfois le traitement du matériel végétal (distillation, extraction) peut se faire au voisinage des champs des cultures en évitant l'altération des drogues et supprimer les frais de transport (11).

I.3- Conservation des plantes médicinales

Les plantes médicinales, rarement utilisées à l'état frais, doivent être conservées dans de bonnes conditions.

Or, une fois récoltée, la plante se fane et meurt ; apparaissent alors des processus de dégradations souvent préjudiciables à l'activité thérapeutique des plantes (12).

Les principes actifs peuvent subir des hydrolyses (ex : hétérosides, alcaloïdes-esters), des oxydations et/ou des polymérisations (tanins, composés terpéniques des huiles essentielles), des isomérisations (alcaloïdes de l'ergot de seigle), des racisations aboutissant à une perte de l'activité de la plante. Ces dégradations, de nature enzymatique, nécessitent la présence d'eau (13).

Elles peuvent être évitées par différents moyens tels que :

I.3.1-Dessiccation (9), (10), (11)

Le but : inhiber l'action des enzymes par élimination d'eau.

Les conditions de bonne dessiccation :

- Il faut agir le plus vite possible après la récolte, pour éviter la destruction des principes actifs par les coenzymes.
- Éliminé l'eau du végétal sans altérer les principes actifs.
- Après toutes dessiccations, contrôler la teneur de l'eau.

Les procédés de dessiccation :

- A l'air libre et au soleil.
- Le séchage à l'ombre de sous abri.
- Le séchage par l'air chaud et sec.
- Le séchage par les rayons infrarouges.
- La dessiccation à l'étuve et sous vide.

I.3.2-Cryodessiccation ou Lyophilisation

C'est une dessiccation par sublimation, procédé permettant l'inhibition enzymatique :

- Par le froid
- Par l'emploi d'inhibiteur limité à cause de ces toxicités

I.3.3- La Stabilisation (9), (10)

I.3.3.1- Le but

Dénaturé irréversiblement les enzymes par action de l'alcool ou de la chaleur.

I.3.3.2- Les procédés de stabilisation

- Destruction des enzymes par l'alcool bouillant.
- Utilisation de la chaleur humide :
- Vapeur d'alcool (procédé Perrot-Gris).
- Vapeur d'eau (Gris - Arnould).
- Emploi de la chaleur sèche.
- Autres techniques : les rayons ultraviolets, courant de haute fréquence.

Le délai de conservation ne doit pas accéder aux limites de l'épuisement.

Le procédé de conservation doivent être adaptés à la nature de l'organe (feuille, racine,...), il dépend généralement de la fragilité des principes actifs.

Une bonne conservation dépend des conditions de stockage et des matériaux employés, elle nécessite certaines précautions pour limiter l'action de certains facteurs tels que (7), (14).

- L'air, favorable aux réactions d'oxydation.
- L'humidité, qui facilite le développement de moisissures sur la drogue et la détérioration des principes actifs.
- La lumière, à l'origine des phénomènes de lumi-altération.
- Il faut aussi protéger les drogues de l'attaque des animaux (rongeurs, insectes, autres parasites).

I.4- Composition de base pour les plantes

Les réactions chimiques qui ont lieu sur le protoplasme vivant des cellules végétales donnent lieu, à deux sortes de métabolismes :

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base : acides nucléiques (ARN, ADN), lipides, protéines, acides aminés et carbohydrates. Ces métabolites primaires sont produits en quantités élevées par les plantes. Quant aux

métabolismes secondaires, chez les plantes, leur présence est une exclusivité du monde végétal. Ces substances ne paraissent pas essentielles à la vie de la plante. Elles sont produites en très faible quantité et sert à soigner la plante elle-même **(15)**.

Ce sont des produits, à structure chimique souvent complexe. Selon les espèces, ces métabolites sont très dispersés et très différents **(16)**.

I.4.1-Composés du métabolisme primaire

Les composés, appelés métabolites secondaires, correspondent à toute les réactions biochimiques. La plante utilise l'énergie solaire via la photosynthèse et active son métabolite primaire afin de produire de glucides, de lipides, des amidons.....etc. **(17)**.

I.4.1.1- Glucides

Les glucides sont des hydrates de carbones ou les saccharides. Ce sont également des composés organiques carbonylés (aldéhydiques, cétoniques), ces molécules sont caractérisées par leur formule de la forme $(CH_2O)_n$ avec $n > 3$. Ce sont aussi des composés qui apparaissent les premiers lors de la photosynthèse.

On distingue deux catégories :

- Les molécules élémentaires non hydrolysables : les oses : ce sont des composés simples, à chaîne carbonée linéaire, de formule brute $C_nH_{2n}O_n$ (avec n compris entre 3 et 7).
- Les composés hydrolysables : les osides : Ce sont des molécules dont l'hydrolyse fournit 2 ou plusieurs molécules d'oses. Ces oses sont identiques ou différents **(15)**.

I.4.1.2- Amidon

L'amidon est la principale forme de réserve glucidique des végétaux. Il est présent dans toutes les parties de la plante et existe sous la forme d'une structure organisée correspondant à un homopolymère presque pur de D-glucose **(18)**.

I.4.1.3- Lipides

Les lipides sont des esters d'alcools et d'acides gras ; ce sont des corps insolubles dans l'eau (hydrophobes), solubles dans les solvants organiques apolaires et ils ne sont pas volatils

(huiles fixes). Les lipides constituent aussi la principale réserve d'énergie, leur métabolisme aboutissant à la combustion complète qui libère une grande quantité d'énergie (19).

I.4.2-Composés du métabolisme secondaire

Ce sont des composés produits par les plantes en fin de leur vie pour s'auto-soignées on distingue plusieurs familles de ces composés. Ils sont essentiellement des composés phénoliques, terpéniques et azotés (20).

I.4.2.1- Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique lié directement par un groupe hydroxyde libre ou engagé dans une fonction : éther, ester, hétéroside (21).

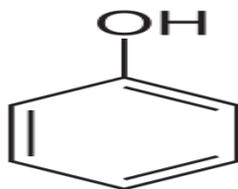


Figure 1: Structure de base du phénol

I.4.2.2-Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par un pont formé de 3 carbones (C). Ces 15 atomes de carbones forment ainsi le squelette de base des flavonoïdes (22).

Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C₆-C₃-C₆ (23).

En formant une structure de type diphenylpropane dont des groupements hydroxylés, oxygénés, méthyles ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (24).

Les figures ci-dessous présentent en plus de la structure de base des flavonoïdes, quelques composés issus de cette famille.

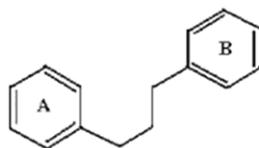
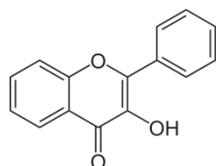
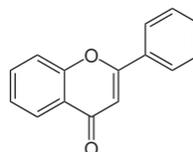


Figure 2: Squelette de base des flavonoïdes

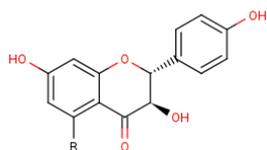


Flavonol

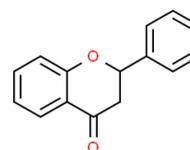


Flavone

Figure 3: Structure de flavone et de flavonol

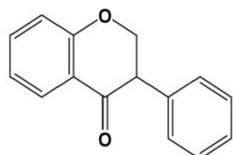


dihydroflavonol

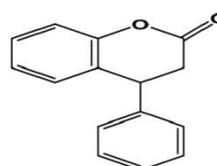


Flavanone

Figure 4: Structure de flavanone et de dihydroflavonol



Isoflavone



Néoflavone

Figure 5: Structure d'isoflavone et de neoflavone

I.4.2.3- Les tanins

La famille des tanins est plus au moins complexe, les principes actifs appartenant à cette famille se retrouve pratiquement dans l'ensemble des végétaux et dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuilles, etc.). Leur structure chimique de base est particulièrement variable, mais comporte toujours une partie polyphénolique ; il existe deux catégories de tanins, d'origine biosynthétiques différentes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (25).

I.4.2.3.1- Tanins hydrolysables

Sont des polyesters de glucides ou d'acide-phénols selon la nature de ces tanins. (Figure 6) :

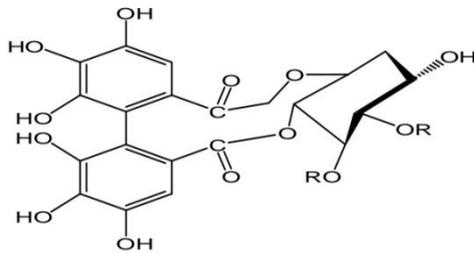


Figure 6: Structure de base des tanins hydrolysables

I.4.2.3.2- Les tanins condensés :

Ce sont des polymères flavanoliques, constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone le plus souvent C₄-C₈ ou C₄-C₆ telle que la catéchine ou l'épicatéchine (Figure7) (26).

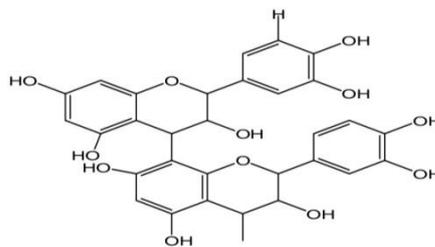


Figure 7: Structure de base des tanins condensés

I.4.2.4- Les coumarines

Les coumarines sont des substances naturelles connues, il s'agit de composés à neuf atomes de carbone possédant le noyau benzo (2H)-1 pyrannone-2. Ces composés dériveraient de la cyclisation de l'acide cis cinnamique oxygéné en C₂ (24).

La structure ci-dessous présente la structure de base des coumarines.

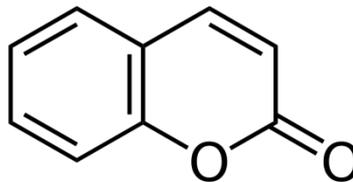


Figure 8: Structure de base des coumarines

I.4.2.4.1-Les composés terpéniques

I.4.2.4.1.1- Les stéroïdes

Le terme stéroïde tire son origine du mot grec "stéréos" signifiant "solide" est désignant toutes les molécules comportant un squelette tétracyclique. (Figure 9)(27).

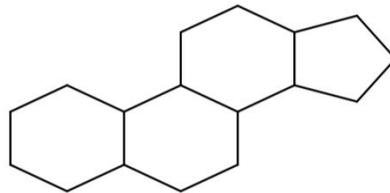


Figure 9: Structure de base des stéroïdes

Les stéroïdes représentent un ensemble de molécules dérivées du cholestérol ou de ses homologues particulièrement abondants dans les végétaux et les animaux. Cette classe de substances naturelles présente une sous-classe de triterpènes (28).

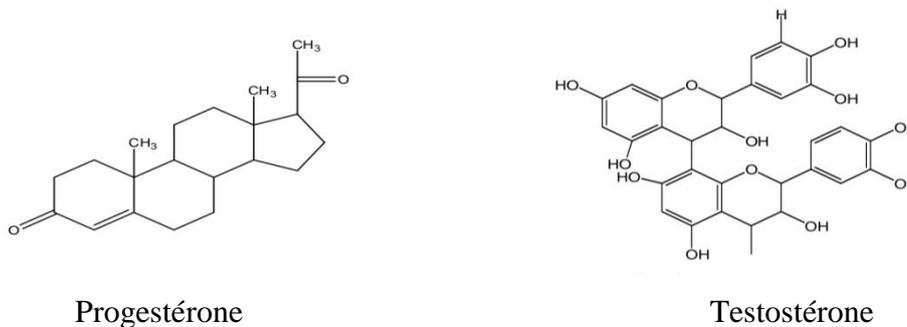


Figure 10: Quelques exemples des stéroïdes

I.4.2.4.1.2- Les stérols

La majorité des stéroïdes sont des alcools, on les appelle stérols (29).

Les stérols sont des stéroïdes dérivant des triterpènes et formant ainsi tout un groupe d'alcools solides (30).

Ce sont des composés tétracycliques comportant les plus souvent 27, 28 ou 29 atomes de carbone (31).

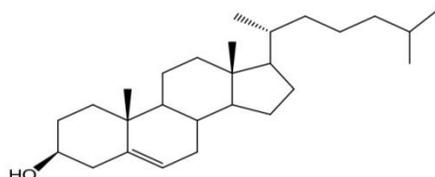


Figure 11: Structure de cholestérol appartenant à la famille des stérols

I.4.2.4.1.3- Les terpénoïdes

Les terpénoïdes, appelés parfois isoprénoïdes, forment une classe large et diverse de composés organiques que l'on rencontre dans la nature, similaires aux terpènes, dérivant d'unité isoprène à cinq carbones assemblés et modifiés de milliers de façons. Ces lipides peuvent être trouvés dans toutes les classes de créatures vivantes, et constituent le plus large groupe de produits naturels (32).

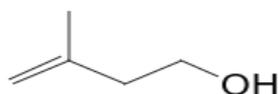
I.4.2.4.1.4- Les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont définies comme étant des extraits volatils et odorants. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Les HE ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers (26).

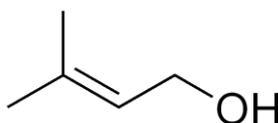
Ce sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveurs généralement fortes et incolores ou jaune pâle (33), (34).

La plupart des huiles essentielles ont une densité inférieure à celle de l'eau (35).

Les principes actifs formant les HE appartiennent généralement à la famille des terpènes :

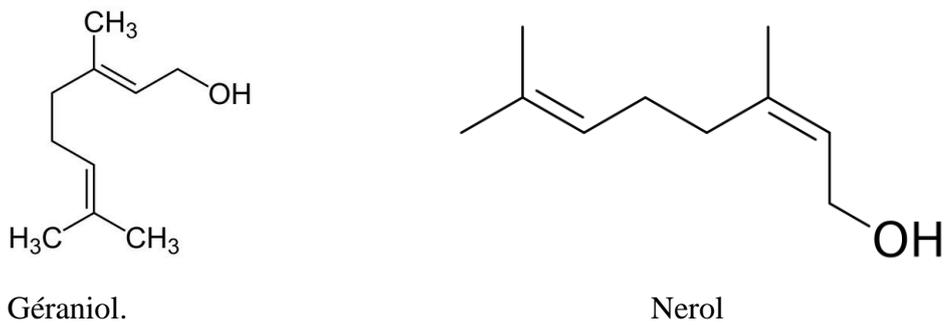
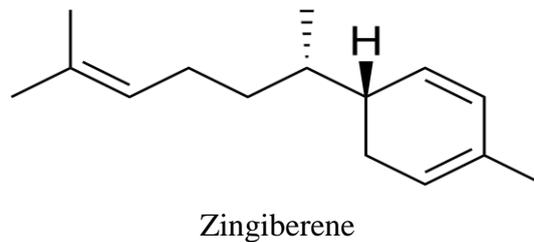
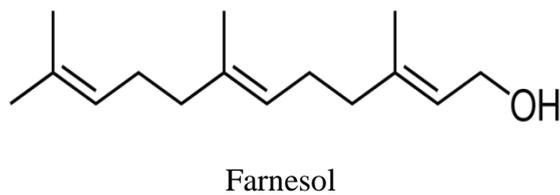


Isoprénol



3-méthylbut-3-ène-1-ol

Figure 12: Exemples d'hémiterpènes

**Figure 13:** Exemples de monoterpènes**Figure 14:** Exemples des sesquiterpènes

I .4.2.5- Les saponosides

On entend par saponosides (mot latin « sapon », savon ; « saponaire », l'herbe à savon), des hétérosides à aglycones de structure stéroïde ou triterpénique qui tiennent une grande place parmi les substances d'origine végétale (36).

Les saponosides sont classés en deux groupes selon la nature de leur structure qui peut être soit stéroïdiques (Figure 14), soit triterpéniques (Figure 15) (37).

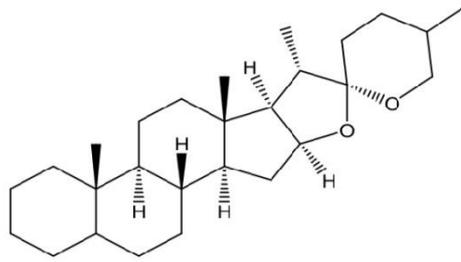
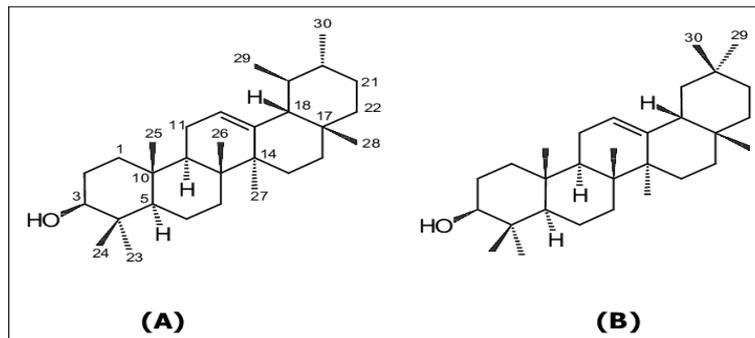


Figure 15: Structure de spirostane (saponosides à géninesstéroïdiques)



Amyrine

Figure 16: Exemples des saponosides à géninestriterpènes

I .4.2.5- Les composés azotés

Les alcaloïdes, forment la famille principale des principes actifs azotés, ce sont des molécules d'origine naturelle. On les trouve principalement chez les végétaux, mais aussi chez les animaux. Leur structure chimique de base est un hétérocycle azoté **(38)**.

Il existe plus de six mille alcaloïdes connus mais ce chiffre est en augmentation constante **(39)**.

Les principaux cycles azotes des alcaloïdes sont de type (figure 8): Indole (a), Quinoléine (b), Isoquinoléine (c), Tropane (d), Pyridine (e), Quinolizidine (f), la Morphine (g) et Smatolanidine (h) **(40)**.

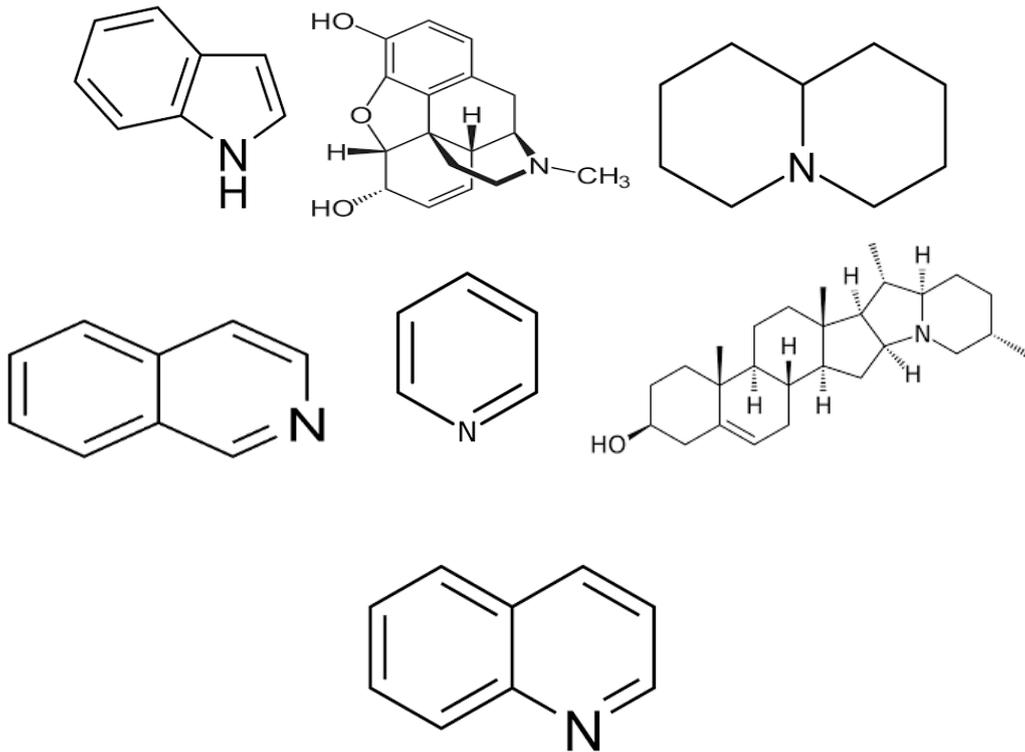


Figure 17: Les principaux cycles azotés des alcaloïdes.

I.5-Classification des plantes médicinales (41)

I.5.1-Plantes à alcaloïdes

Parmi les substances les plus efficaces et les plus importantes sur le plan thérapeutique, les alcaloïdes viennent se placer parmi les plus importants, ils forment un groupe chimiquement divers de substances organiques azotées.

Les alcaloïdes ont un effet thérapeutique très marqué même à très faible dose, ils sont également très toxiques, tels que l'*Aconitine* dont la dose unitaire est de 0,2 mg et la dose mortelle est de 01mg.

Les plantes à alcaloïdes ont une importance très considérable en thérapeutique, ayant une action physiologique très variée :

- Certaines agissent au niveau du système nerveux central (excitant ou dépend).
- D'autres sur le système autonome :
- D'autres ont une activité anesthésique locale et anti tumoral.
- Les alcaloïdes peuvent être présents dans toutes les parties de la plante, comme ils peuvent être retrouvés dans des organes bien précis.

Exemple : l'atropine dans les feuilles de la belladone.

I .5.2-Plantes à huiles essentielles

Les huiles essentielles ou plus communément appelées essences sont généralement des composés organiques volatils, aromatiques et d'un caractère huileux.

Les huiles essentielles agissent à différents niveaux du corps :

- Les stomachiques carminatifs : agissent au niveau du tube digestif. Exemple : essence de bardique et menthe.
- Les anti-inflammatoires, cicatrisants : actifs en usage externe. Exemple : lavande, sauge.
- Au niveau respiratoire : exemple : huile de pin, d'eucalyptus.

La majorité des huiles essentielles sont connues par leur toxicité, exemple : essence d'éthanol à action convulsivante à forte dose. Elles peuvent être rencontrées dans tous les organes végétaux comme dans le fruit d'anis et dans les somites fleuris de lavande.

I .5.3-Plantes à glucosides

Les glucosides sont des produits du métabolisme II des plantes. Ils sont constitués de deux parties :

- Une glucidique : tel que le glucose.
- Un non glucidique : aglycone.

Les glucosides peuvent agir à différents niveaux et de différentes façons :

- Les glucosides cardiaques, qu'on trouve par exemple dans la digitale sans lesquels le traitement du cœur serait impensable de nos jours.
- Les glucides ont un effet laxatif exemple : bourdaine et rhubarbe.
- Les glucosides anti- inflammatoires et antiseptique : aigremoine, souci, petite camomille.

Les glucosides comprennent aussi les saponines qui présentent la caractéristique physiologique frappante de produire une mousse savonneuse.

L'action des glucosides expectorante est très appréciée dans l'inflammation des voies respiratoires exemple primevère.

I .5.4- Plantes à principe amer

Ce type de plantes contient des substances organiques de composition chimique très variée et qui sont très indispensables pour l'homme, à dose thérapeutique précises, elles stimulent la sécrétion gastrique et facilitent ainsi la digestion.

Parmi les principes amers on peut distinguer plusieurs types :

I .5.4.1- Les sucres

Qu'ils soient mono saccharidiques ou poly saccharidiques, ils sont indispensables voire primordiales dans la plupart des préparations médicinales.

I .5.4.2- Les huiles fixes

Ce sont des composés d'acides gras et glycérol, nécessaire à l'emmagasinement de l'énergie.

Ils peuvent être utilisés comme pommade, dans les préparations médicinales et les préparations des produits cosmétiques après leur isolement.

I .5.4.3- Acides organiques

On les retrouve dans toute les plantes, ces acides organiques sont les produits du métabolisme primaire des plantes, exemple : acide tartrique

I .5.4.4- Plantes à tanins

Ce sont des substances organiques de composition très diverse, elles possèdent des propriétés astringentes.

I .6- Utilisation des plantes en médecine traditionnelle

Depuis 150 ans, les plantes médicinales ont fourni à la pharmacie des médicaments très efficaces. Aujourd'hui, de nombreux travaux menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie, nous montrent que les plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont souvent d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part seraient quasiment dépourvues de la toxicité (42) (43).

L'ethnopharmacologie et l'ethnobotanique ont pour finalité la compréhension des pratiques et des représentations relatives à la santé, à la maladie, à la description et à l'évaluation thérapeutique des plantes utilisées dans les pharmacopées traditionnelles. L'usage empirique des différentes préparations traditionnelles des plantes est donc extrêmement important pour une sélection efficace de plantes puisque la plupart des métabolites secondaires de plantes employées en médecine moderne ont été découverts par l'intermédiaire d'investigations ethnobotaniques (43).

Chapitre II

Les méthodes d'extraction et de séparation

Introduction

Il s'agit d'exposer les techniques permettant d'extraire des corps naturels telles que les huiles essentielles et les fractions organiques ou aqueuses contenant des mélanges de principes actifs.

Les extraits et les fractions sont obtenus par macération, infusion et décoction dans un solvant organique, formé par un ou plusieurs solvants. L'élimination de la chlorophylle et le fractionnement en utilisant des solvants non miscibles avec l'eau mène à l'obtention des fractions contenant un nombre minime des principes actifs **(44)**.

II.1-Définition de procédé d'extraction

Un procédé de séparation est une technique ou une technologie permettant de transformer un mélange de substances en deux ou plusieurs composants distincts. Les buts de ce type de procédé peuvent être divers **(45)**, **(46)**.

- Purification : des impuretés doivent être extraites du composé d'intérêt.
- Concentration : élimination d'une partie du solvant.
- Fractionnement : séparation d'un mélange complexe en plusieurs mélanges différents.

Le principe d'un procédé de séparation est d'utiliser une différence de propriétés entre le composé d'intérêt et le reste du mélange. Plus la différence de propriété sera grande, plus la séparation sera aisée. Ainsi le choix du procédé de séparation commence par une bonne connaissance de la composition du mélange et des propriétés des différents composants.

II.3-Méthodes d'extraction

II.3.1-Extraction solide / liquide

L'extraction solide/liquide consiste à extraire une substance (principe actif) présente dans une matière végétale (solide) pour la faire passer dans un solvant (méthanol, l'eau).

Elle permet aussi d'extraire par dissolution et diffusion des composants solubles des matières solides à l'aide d'un solvant **(47)**.

Les cas les plus simples de cette extraction sont : la décoction, l'infusion et la macération :

II .3.1.1-Décoction

Elle consiste à faire bouillir pendant un temps des tiges ou des racines de la plante, dans l'eau afin de les ramollir et d'extraire leurs principes actifs (48).

II .3.1.2-Infusion

Elle consiste à verser de l'eau chaude sur les fleurs, les feuilles ou les herbes (tiges) des plantes choisies. Ensuite il faut laisser reposer quelques minutes. On la boit après (48).

II .3.1.3-Macération

La macération est un procédé qui consiste à laisser séjourner un solide dans un liquide pour en extraire les composés solubles (49), (50).

La macération peut se faire dans une solution aqueuse(l'eau), dans un solvant organique ou dans un mélange des solvants.

La macération peut être considérée comme une méthode plus rapide et efficace. Elle permet, en utilisant une technique simple, d'obtenir un rendement élevé en extrait, avec une durée d'extraction souvent limitée (51).

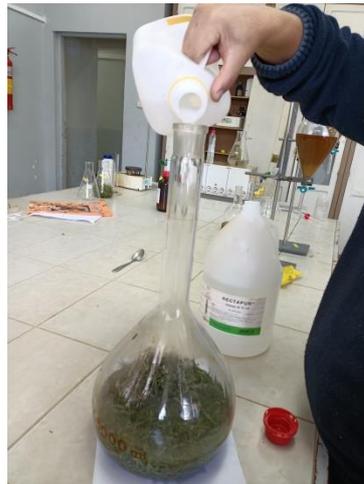


Figure 18: Macération

II .3.2-L'extraction liquide-liquide (L'extraction par solvant) :

II .3.2.1-Principe

L'extraction par solvant consiste à dissoudre le composé recherché dans un solvant non miscible avec l'eau et à séparer la phase organique contenant le composé à extraire de la phase aqueuse (52).

Cette technique fait intervenir trois étapes. La mise en contact du solvant avec la substance contenant le composé à extraire. Elle peut se faire directement dans un réacteur adapté (bécher, erlenmeyer, ballon etc.....)ou en faisant intervenir d'abord l'eau. On fait alors agir le solvant sur une décoction une infusion ou une macération .

L'extraction par solvant, également connue sous le nom d'extraction ou de séparation liquide-liquide, est une méthode pour séparer un composé en fonction de la solubilité de ses parties. Cela se fait en utilisant deux liquides non miscibles, par exemple, l'eau et un solvant organique (53).

II .3.2.2-Choix du solvant

Le choix du solvant est obéi à quatre critères et nécessite la connaissance d'un paramètre physique caractéristique de ce solvant (52).

II .3.2.3-La décantation

Le mélange non miscible eau-huile distillé auparavant est décanté par une simple opération en ouvrant le robinet jusqu'à la séparation un quasi-totale de l'eau et récupérée les huiles extraites dans un flacon spécial.

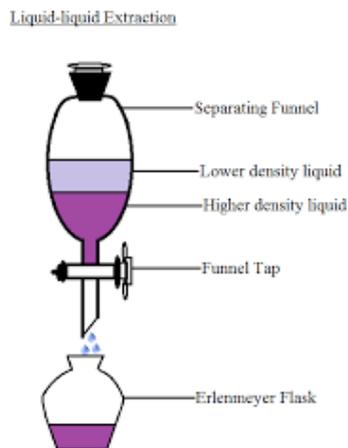


Figure 19: Schéma d'extraction par solvant

II .3.3-Extraction par hydrodistillation

L'hydrodistillation est l'une des méthodes les plus anciennes et les plus simples. Cette méthode est utilisée pour isoler les huiles essentielles de la plante aromatique et médicinale. La méthode conventionnelle d'extraction des huiles essentielles est l'hydrodistillation (HD), dans laquelle les huiles essentielles sont évaporées en chauffant un mélange d'eau ou d'autres solvants et matières végétales suivi de la condensation des vapeurs dans un condenseur. Ce condenseur et un décanteur pour collecter le condensat et séparer les huiles essentielles de l'eau, respectivement (figure 20) (54).

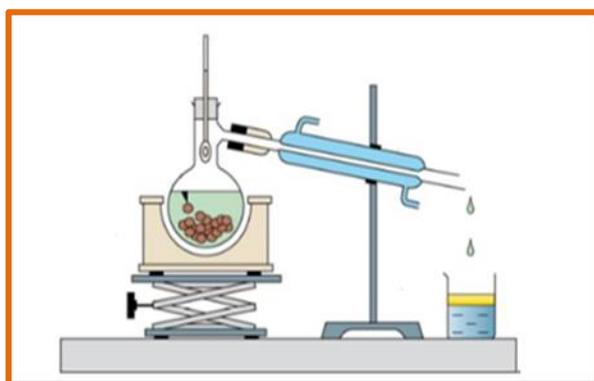


Figure 20:Extraction par hydro distillation

II .3.4-Extraction par entrainement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles figure (21). A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange "eau + huile essentielle". Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique, c'est l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (55).

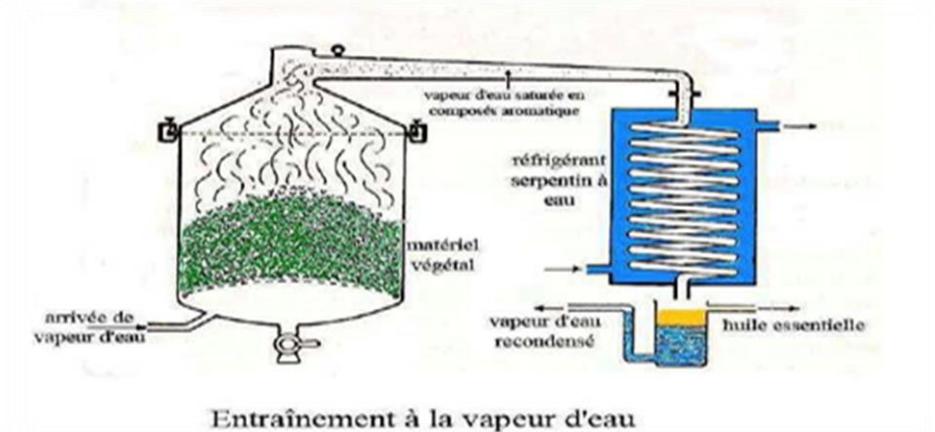


Figure 21: Schéma d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau

II .3.5-Extraction par Soxhlet

L'appareillage de Soxhlet permet l'extraction aux solvants en continu d'espèces chimiques contenues dans une matrice solide. L'échantillon, placé dans une cartouche poreuse à l'intérieur de l'extracteur, est traversé par les vapeurs de solvant. Celles-ci passent du ballon chauffé au tube adducteur puis se condensent dans le réfrigérant. Le condensat s'accumule dans le corps de l'extracteur (figure22) jusqu'à atteindre le sommet du siphon, entraînant alors le retour du liquide dans le ballon. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt (56).

II .3.5.1-Principe

L'extraction par Soxhlet est une méthode utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les plantes fraîches ou séchées.

L'extraction d'une espèce chimique d'une plante par Soxhlet se fait dans une cartouche avec un solvant (extraction solide-liquide), à chaud (selon plusieurs cycles), puis évaporation à sec après refroidissement (47).

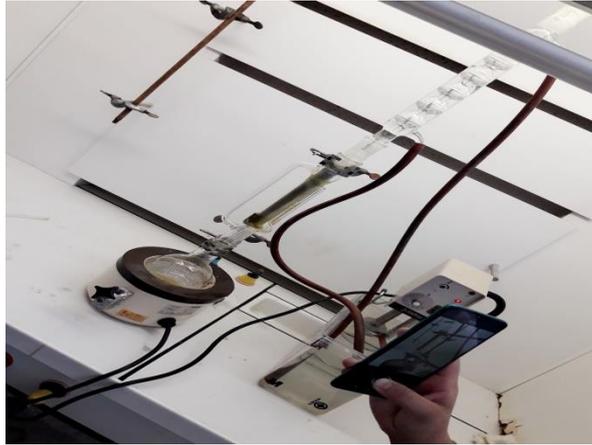


Figure 22: Schéma d'extraction par Soxhlet

II .3.6-Autres méthodes d'extractions

II .3.6.1-Extraction par CO₂ supercritique

Le produit à traiter en extraction est placé dans un extracteur traversé par le flux de CO₂. Le fluide se charge en composé extrait, puis il est détendu, passe en phase gazeuse et se sépare du composé extrait. Ce dernier est recueilli à l'état liquide (ou pâteux) dans un séparateur.

Les extraits CO₂ sont différents de ceux obtenus par les méthodes classiques d'extraction, grâce à la sélectivité du CO₂ supérieure en général à celle des solvants organiques. Il en résulte de nouveaux extraits aux notes aromatiques spécifiques, impossibles à obtenir par des techniques traditionnelles (56).

Les avantages de cette extraction sont, à la fin du procédé, on obtient des extraits totalement naturels, sans trace de solvant et étant donné la faible température (40°C), tous les composés, même les plus fragiles, sont préservés. De ce fait, les propriétés thérapeutiques du produit final sont très proches du produit brut. L'extraction au CO₂ supercritique est donc actuellement le moyen le plus écologique et technologique d'obtenir des principes actifs végétaux de très haute qualité (48).

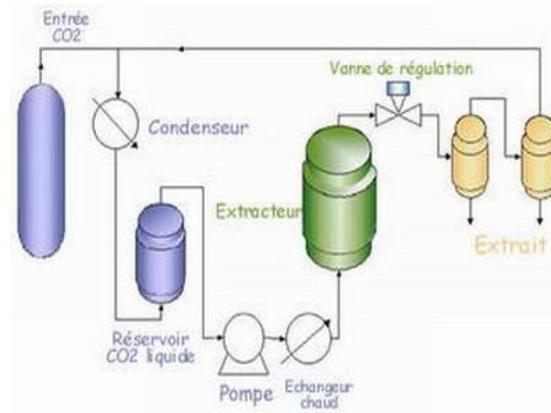


Figure 23: Extraction par CO₂ supercritique

II .3.6.2-Le cryobroyage

Le procédé du cryobroyage consiste à pulvériser la partie active de la plante sèche en la broyant à froid sous azote liquide, à -196°C . Le froid permet de conserver les vitamines, les enzymes et de nombreux principes actifs des plantes sans les détériorer. On recueille ainsi une poudre parfaitement fine et homogène qu'on peut conditionner sous forme de gélules ou insérer à des produits cosmétiques (48).

II .3.6.3-La centrifugation différentielle

Cette technique permet d'exposer des échantillons à de fortes accélérations qui permettent la séparation des constituants. Le champ d'accélération peut être celui de la Terre ($g = 9.81 \text{ ms}^{-2}$) : il ne permet alors que la sédimentation de grosses particules (c'est ce qu'on appelle la décantation) (57).

Cette méthode est identique au procédé de décantation. La force centrifuge accélère la séparation de principes actifs en fonction de leur densité. Les principes actifs les plus lourds se déposent au fond des tubes. La centrifugation différentielle est un procédé qui sépare différentes particules en fonction de leur taille par une succession de centrifugations, dont l'intensité croît au fur et à mesure (48).

II .3.7-Méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques sont généralement utilisées pour l'analyse et la séparation de très faibles quantités de produits, parmi ces méthodes on peut citer : La chromatographie sur colonne, chromatographie sur couche mince... etc. (58).

II .3.7.1- Chromatographie sur couche mince (CCM)

II .3.7.1.1-Définition

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (59).

II .3.7.1.2-Appareillage

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont la cuve chromatographique, la phase stationnaire, l'échantillon et l'éluant (59).

II .3.7.1.3-Principe de la technique

La plaque sur laquelle on dépose l'échantillon est plongée dans la cuve à CCM, le solvant monte par capillarité le long de la phase stationnaire et permet ainsi la migration de chaque composé de l'échantillon, chacun avec sa propre vitesse. Cette dernière dépend d'une part des forces électrostatiques retenant le composé sur la phase stationnaire, d'autre part de sa solubilité dans la phase mobile. L'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption.

En chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires (59).

II .3.7.1.4-Préparation

❖ Préparation de la phase stationnaire :

La chromatographie sur couche mince se réalise sur des plaques pré-étalées de gel de silice ou de polyamide (DC6).

❖ Préparation de la phase mobile :

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques. Pour cela, différents systèmes de solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations.

❖ Le dépôt :

Le dépôt se fait avec des tubes capillaires en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire et linéaire. Chaque phase doit être déposée en solution dans un endroit déterminé (60).

❖ Développement des plaques :

Chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque (60).

❖ Révélation :

Si les constituants sont colorés, ils seront directement visibles sur la plaque, sinon la révélation peut se faire soit aux UV ou bien par des méthodes chimiques :

- Révélation aux UV: elle permet de mettre en évidence sous forme de taches les substances qui absorbent la lumière UV entre 254 et 365 nm.
- Révélation par des méthodes chimiques : ces méthodes consistent à mettre en contact de la plaque un réactif plus ou moins spécifique qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler (61).

II .3.7.1.5-Choix des conditions opératoires

II .3.7.1.5.1-Choix du support

Il en existe trois principaux : silice, alumine et cellulose. Les supports sont généralement montés sur une plaque d'aluminium.

Voici comment orienter son choix :

- Silice : c'est le support le plus courant. Il est conseillé de toujours commencer par celui-là.
- Alumine : on l'utilise généralement pour les composés à caractère basique.
- Cellulose : on l'utilise pour les composés fortement polaires, comme les sucres ou les acides aminés.

II .3.7.1.5.2-Choix de l'éluant

Le choix de l'éluant est essentiel. Il n'est pas toujours fourni avec le mode opératoire et il est important de savoir le choisir. L'éluant est souvent un mélange de plusieurs (2 ou 3) solvants dans des proportions bien établies.

La figure24 illustre plaque chromatographique éluee permettant le calcul du R_f

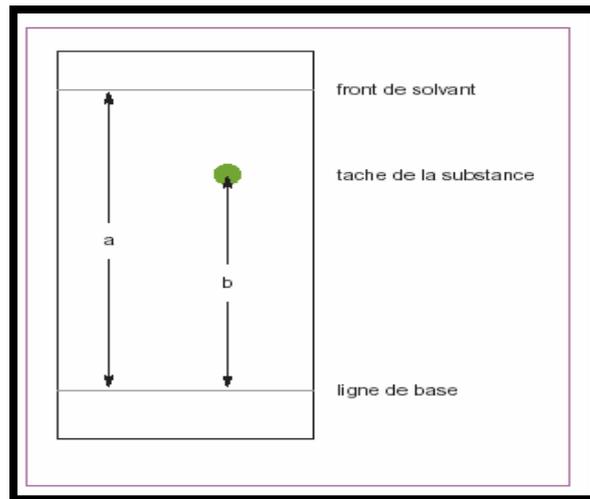


Figure 24: Plaque chromatographique éluee permettant le calcul du R_f

$$\text{Noté } R_f : R_f = \frac{b}{a}$$

a : distance parcourue par l'éluant

b : distance parcourue par le composant.

Le rapport frontal ne dépend pas de la longueur de la plaque utilisée (62).

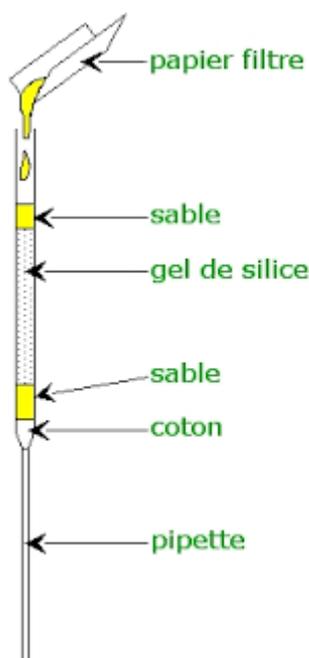


Figure 25: Chromatographie sur couche mince

II .3.7.2. La chromatographie sur colonne (CC)

Alors que toutes les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse, la séparation ou la purification de faibles quantités de produits, la CC peut être une méthode préparative ; elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre parfois jusqu'à plusieurs grammes. Dans notre cas, il a été question d'une CC de gel silice 60 utilisée

En premier lieu, elle permet de dégraisser l'extrait, d'éliminer les pigments chlorophylliens et autre produits ne faisant pas l'objet de ce travail et bien sûr dans la mesure du possible, départager le tout en bloc de composés plus en moins similaires (63).

**Figure 26:** chromatographie sur colonne

II .3.7.3-Chromatographie sur papier

La chromatographie sur papier est une méthode de séparation dont le principe repose surtout sur des phénomènes de partage. La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau ; la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même, absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle. Comme en chromatographie sur couche mince, l'échantillon, mis en solution, est déposé en un point repère du papier et le solvant qui se déplace par capillarité fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité. Généralement, les composés les plus solubles dans l'eau ou ceux qui

forment facilement des associations par liaisons hydrogène sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement. La chromatographie sur papier est employée principalement pour l'analyse de composés très polaires, tels que les acides aminés, les sucres et les composés polyfonctionnels. Ses plus grands inconvénients par rapport à la chromatographie sur couche mince sont :

- Une durée de développement beaucoup plus longue
- Une séparation généralement moins bonne (57).

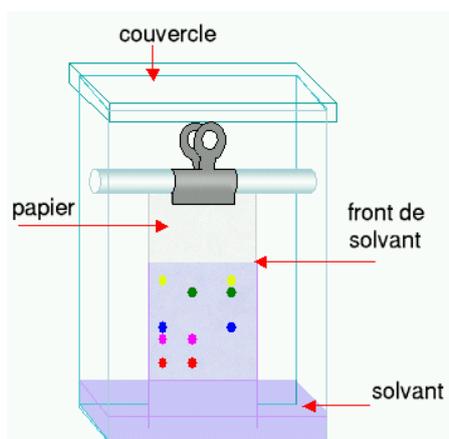


Figure 27: Chromatographie sur papier

II .3.7.4-Analyse par spectroscopie en ultraviolet (UV)

La spectrophotométrie UV-visible est une technique analytique fondée sur l'étude du changement de l'intensité de la lumière traversant une solution colorée, dans un domaine d'application comprise entre 200 et 800 nm pour pouvoir déterminer les concentrations des substances absorbantes (64).

Le résultat correspond à des spectres d'émission ou d'absorption. Qui ressemble à des courbes de variation d'absorption en fonction de la longueur d'ondes, il est obtenu par un spectrophotomètre à une lumière sensiblement monochromatique, ou le chromophore est le site dont la structure de l'élément à étudier possède l'aptitude à absorber les photons UV ou visible. Il est caractérisé par la longueur d'onde la plus absorbée (λ_{max}), et l'aptitude la plus importante à absorber les photons à cette longueur d'onde (λ_{max}) (65).



Figure 28: Spectrophotomètre



**Partie
expérimentale**

Chapitre III

Matériels et méthodes

III -Description de la plante *Salvia rosmarinus*

Salvia rosmarinus populairement connu sous le nom de romarin est un arbrisseau de rocaille à l'état sauvage, le romarin, de la famille des lamiacées, peut atteindre 2 m de hauteur, en culture. On le reconnaît, aisément, toute l'année, érigé au milieu des buissons méditerranéens : ses feuilles persistantes sont enroulées sur leurs bords. Elles sont beaucoup plus longues que larges, d'une couleur vert sombre, luisant sur leur face supérieure et à la teinte blanchâtre sur le dessous. Ses fleurs, le plus souvent d'une teinte bleu violacé (les blanches sont plus rares) s'agrègent en grappes courtes, de février à mai. Leur calice a un aspect duveteux, la corolle est bilabée et dotée de quatre étamines, dont deux dépassent la lèvre supérieure. Le fruit du romarin, de forme globuleuse, est un tétrakène brun. (66).



Figure 29: Plante de *Salvia rosmarinus* cultivée

III .1-Cueillette de la plante

La plante de *Salvia rosmarinus* cultivée est prise de la cote de Tnoukla de Tébessa avec ses racines puis repiquée à nouveau depuis plus de cinq ans. La plante est développée régulièrement pendant ce temps. Elle atteint environ un mètre de hauteur. Ses tiges atteignent plus de 50 cm quelques fois. La tige de base peut avoir jusqu'à 15 dérivationes.

La couleur de la plante à une tendance au vert foncé, elle diffère d'une manière remarquable de la plante mère (sauvage). La floraison de la plante est débuté dès le mois de novembre.....

La fleur est de couleur violette ou même blanche, elle est étalée sur la totalité de la tige.

III .2-Séchage

L'entreposage a été établi dans la même journée de la cueillette, dans un endroit sec et aéré sous une température moyenne de 25 °C. Le séchage a duré pendant une semaine. Devenues sèches, les feuilles de la plante ont été soumises aux différents tests chimiques par l'intermédiaire d'une variété de réactifs, pour confirmer la présence ou l'absence de certaines familles de composés naturels. La masse de la matière sèche utilisée pour le départ est exactement 170 grammes et les 40 grammes restantes sont utilisés ultérieurement.



Figure 30: La plante séchée

1- Classification de la plante

Tableau 1: Classification de la plante

Règne	Plante
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales
Superordre	Asteranae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae

Genre	<i>Salvia</i>
Espèce	<i>Salvia rosmarinus</i>

2- Utilisation populaire de la plante

Le romarin est un aromate apprécié aux utilisations diverses : cuisines, phytothérapie, parfumerie ainsi que l'industrie. Il est réputé pour activer et faciliter les fonctions digestives, en particulier sa propriété cholagogue, facilitant l'évacuation de la bile. Il est également antispasmodique, et son action stimulante sur le système nerveux permet de le recommander pour traiter les divers cas d'asthénie. On l'utilisait autrefois en compresse pour soigner les rhumatismes, ce qui n'est plus le cas aujourd'hui (4).

Le romarin a deux usages thérapeutiques, l'usage interne et externe :

a- Usage interne

Les états dynamiques qui accompagnent les grandes pyrexies (fièvre et grippe), et dans les dyspepsies atoniques chez les malades affaiblis par un surmenage physique ou intellectuel et céphalées.

- Flatulence, ballonnement, spasmes légers du tractus gastro-intestinal, et des voies biliaires.
- Infection broncho-pulmonaire, utilisé en cas de nez bouché, rhume, grippe (par inhalation de vapeurs dégagés lors de la fumigation des branches de romarin).

b- Usage externe

Massage :

- Les douleurs musculaires (rhumatismes),
- Les pellicules et chutes des cheveux (alopécie)
- Traitement de l'acné, dermite et eczéma.

Bain :

Son effet rubéfiant et antiseptique est très apprécié dans le traitement des plaies à cicatrisation lente et des douleurs rhumatismales (elles sont utilisées sous forme d'infusion).

Parfumerie :

L'essence de romarin est un ingrédient essentiel dans l'eau de Cologne et d'autre produit de parfumerie.

Le romarin est la base de plusieurs produits cosmétologiques tels que les shampoings pour les soins de cheveux, des lotions faciales ainsi que son importante utilisation dans les masques en cas d'inflammation, d'enflures et d'éruption.

Industrie alimentaire :

Il entre dans la conservation de viande, poissons et les graisses grâce à sa propriété antioxydant et antiseptique. Utilisé aussi comme épice dans la cuisine des pattes en Italie et en France **(67)**.

Thérapeutique vétérinaire :

Chez l'animal, l'effet est spasmolytique sur les voies biliaires et l'intestin grêle mais aussi inotrope positif avec une augmentation du débit coronarien.

Autres utilisations :

La drogue peut être utilisée en compresse pour éviter les retards de cicatrisation et l'eczéma, d'une façon plus générale comme insecticide, utilisée comme cholagogue et cholérétique pour favoriser l'élimination des déchets en remplaçant l'activité physiologique de l'appareil urinaire et La drogue peut être dans le traitement symptomatique des troubles digestifs par voie locale.

Elle peut être utilisée pour l'hygiène buccale et en cas de rhume sans oublier sa propriété aromatisant. **(68), (69)**.

3- Réactifs utilisés pour les tests des principes actifs

6-1 Réactif de Dragendorff

C'est un réactif constitué de deux solutions :

- Solution A : 0,85 g de nitrate de bismuth dissous dans un mélange de 10 ml d'acide éthanoïque et 40 ml d'eau.
- Solution B : formée de 4g d'iodure de potassium dans 20 ml d'eau.
- Préparation : On verse 20 ml d'acide éthanoïque sur un mélange de 15 ml de la solution A et 15 ml de la solution B on jauge jusqu'à 100 ml avec l'eau distillée (70), (71).

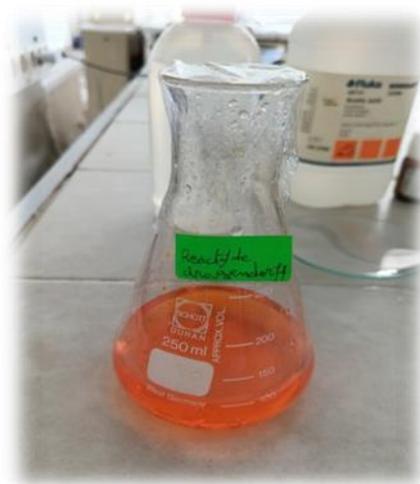


Figure 31: Réactif de Dragendorff

6.2- Réactif de Bouchardât

C'est une solution aqueuse d'un mélange de 25 g d'iode et 50 g d'iodure de potassium jaugée jusqu'à 1000 ml (72).

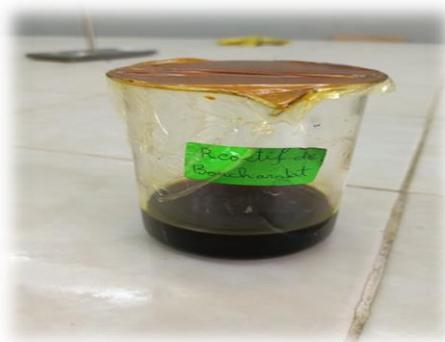


Figure 32: Réactif de Bouchardât

6.3- Réactif de Mayer

Le réactif de Mayer est constitué de deux solutions :

- Solution A : 13.55 g de chlorure de mercure dissous dans 20 ml d'eau distillée.
- Solution B : 49.8 g d'iodure de potassium dissous dans 20 ml d'eau distillée.

- Préparation : On mélange les deux solutions et on jauge jusqu'à 1000 ml par de l'eau distillée (73), (74).



Figure 33: Réactif de Mayer

6.4- Réactif de Wagner :

C'est un mélange composé de 1.27 g d'iode et 2.0 g d'iodure de potassium dissout dans 75 ml d'eau distillée. Ce mélange est jauge jusqu'à l'obtention de 100 ml de la solution (72).



Figure 34: Réactif de Wagner

4- Tests de présence des principes actifs

7.1- Alcaloïdes

L'extrait utilisé pour les tests a été obtenu après une ébullition à reflux pendant une heure de 10 g du matériel végétal dans 60 ml d'éthanol, suivie d'une filtration du mélange.

La détection de ces composés se fait comme suite :

Après évaporation à sec de 20 ml d'extrait éthanoïque, on dissout le résidu obtenu dans 5 ml d'acide chlorhydrique HCl à 10%, puis on le chauffe dans un bain marie à 60 °C.

- On filtre le mélange et on l'alcalinise avec quelques gouttes d'une solution d'ammoniac (NH₄OH à 10%) jusqu'à attendre un pH = 8-9.
- On procède ensuite à une extraction par l'éther éthylique l'opération est répétée trois fois, puis on évapore la phase organique.
- On dissout le résidu obtenu dans du HCl (2 %).
- On teste la présence des alcaloïdes par les réactifs de Mayer ou de Wagner.
- La formation d'un précipité blanc et d'un précipité brun respectivement avec ces réactifs indique la présence des alcaloïdes (75).



Figure 35: Test de présence des alcaloïdes

7.2- Sels d'alcaloïdes

On dissout 50 g de la plante broyée (mélange de racines, tiges et fleurs) dans 300 ml d'éthanol. On agite pendant une heure et on filtre. On évapore 20 ml du filtrat obtenu et on ajoute 5 ml de HCl 10 % au précipité, on chauffe légèrement et on filtre. On ajoute au filtrat quelques gouttes de NH_4OH jusqu'à un $\text{pH} = 9$. On procède à l'extraction par le diéthyléther et on sépare le précipité auquel on ajoute quelques millilitres de HCl 2 % et quelques gouttes des deux réactifs de Mayer et de Wagner. L'apparition d'un précipité est un témoin de présence des sels d'alcaloïdes.

On évapore 20 ml du filtrat obtenu et on ajoute 5 ml de HCl 2 N. on chauffe légèrement et on filtre. On divise le filtrat en deux parties. On ajoute à la première quelques gouttes du réactif de Mayer et à la deuxième quelques gouttes du réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité dans les deux cas prouve la présence des sels des alcaloïdes (72).

7.3- Alcaloïdes indoliques

La révélation de ces composés se fait par chromatographie sur couche mince :

- Des plaques CCM contenant des spots d'extrait sont éluées dans un solvant organique convenable.
- La révélation se fait par le réactif de Bouchardât.

- La présence des spots jaunes après un chauffage à 100 °C pendant 5 minutes est une signification de présence des alcaloïdes indoliques (75).



Figure 36: Test de présence des alcaloïdes indoliques

7.4- Cardénolides

7.4.1- Le tétrose

1 g de la plante broyée et séchée est macéré dans 20 ml d'eau distillée. On filtre et on ajoute à 10 ml du filtrat, 10 ml d'un mélange éthanol – chloroforme. On mélange le contenu dans l'ampoule à décanter et on sépare la phase organique. On évapore cette phase et on ajoute au précipité obtenu successivement 3 ml d'acide acétique, quelques gouttes de FeCl_3 et 1 ml d'acide sulfurique.

L'apparition d'une couleur bleue verdâtre prouve la présence des cardénolites (76), (77).



Figure 37: Test de présence du tétrose

7.4.2- Les trichlorures

10 g de la plante est macéré dans l'éthanol à 70 %. On évapore l'extrait obtenu sous vide et on ajoute au précipité le trichlorure. L'apparition d'une couleur violette prouve la présence des cardénolides, (78), (79).



Figure 38: Test de présence des trichlorures

7.5- Saponosides

On agite le filtra obtenu par macération de 2g de la plante dans 80 ml d'eau distillée pendant 20 minutes. L'apparition d'une mousse (calculé de la hauteur de la mousse) dans le milieu prouve la présence des saponosides (75).



Figure 39: Test de présence des saponosides

7.6- Tanins

On agite le filtrat obtenu par macération de 10 g de la plante dans 80 ml d'alcool éthylique à 50 % pendant quelques minutes. On ajoute quelques gouttes de FeCl_3 au milieu. L'apparition d'une couleur verte prouve la présence des tanins (75).



Figure 40: Test de présence des tanins

7.7- Stérols et triterpènes

On agite le filtrat obtenu par macération de 5 g de la plante dans 20 ml de chloroforme pendant quelques minutes. On ajoute 1 ml d'acide sulfurique sur les parois du ballon. L'apparition d'une couleur verte qui se transforme au fur et à mesure au rouge sur les points de contact de l'acide sulfurique avec la solution prouve la présence des stérols et des triterpènes (75).

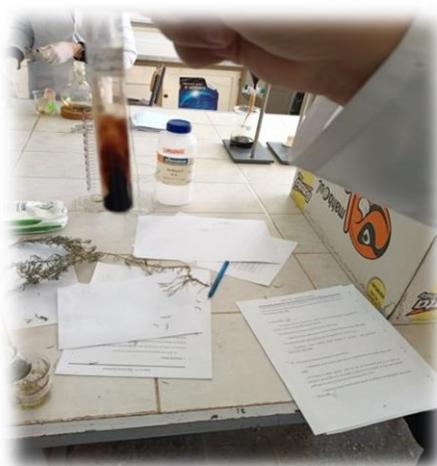


Figure 41: Test de présence des stérols et triterpènes

7.8- Flavonoïdes

On trempe 10 g de la plante dans 150 ml d'acide chlorhydrique à 1 % pendant 24 heures, on filtre et on procède aux tests suivants :

On ajoute à 10 ml du filtrat, du NH_4OH jusqu'au pH basique. L'apparition d'une couleur jaune prouve la présence des flavonoïdes (75).



Figure 42: Test de présence des flavonoïdes

7.9- Huiles essentielles

On trempe 10 g de la plante dans de l'éthanol à 70 % pendant 24 heures. Le filtrat obtenu est entraîné par la vapeur d'eau. On chauffe légèrement la solution pendant 4-5 heures. La couche huileuse qui couvre la surface supérieure est un témoin de présence des huiles essentielles (75).



Figure 43 : Test de présence des huiles essentielles

8. Extraction

8.1- Macération

Après le séchage de la plante, nous avons pesé une quantité de la matière verte $m=170$ g (feuilles), cette quantité est macérée dans 2 litres d'éthanol volume suffisant pour couvrir la totalité de la matière. (Figure44) Le mélange est gardé pendant 48 h à température ambiante à fin d'assurer la dissolution quasi-totale des constituants solubles. Cette opération a été répétée 3 fois avec le même solvant après séparation par filtration.



Figure 44: Macération de la plante dans l'éthanol au début de la répartition

8.2- Filtration et évaporation sous vide

8.2.1- L'extrait d'éthanol

Après la filtration simple sur un coton, on a obtenu une solution d'une couleur verte olive. Une évaporation sous vide a été effectuée à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température inférieure à 60°C pour récupérer le mélange des solvants utilisés durant cette macération (éthanol), en s'assurant de l'élimination totale des solvants. Ainsi on obtient un résidu concentré de couleur verte foncée dont le poids : $m= 18,47636\text{g}$.



Figure 45: Les étapes de préparation de l'extrait éthanol

8.3- Élimination de la chlorophylle

La solution organique obtenue après filtration est évaporée sous vide pour obtenir un extrait brut pour lequel on ajoute de l'eau bouillante (100 °C) et on laisse le contenu du ballon au repos pendant 24h.

En agitant le ballon, la chlorophylle se colle, d'une manière quasi totale, sur les parois du ballon l'extrait est séparé par une simple filtration. L'opération est répétée plusieurs fois afin d'éliminer toute présence probable de la chlorophylle. Quant à nous, trois opérations ont été suffisantes pour se débarrasser de cette matière.

Nous avons divisé l'extrait en deux parties ; la première est utilisée directement alors que la deuxième est utilisée ultérieurement.

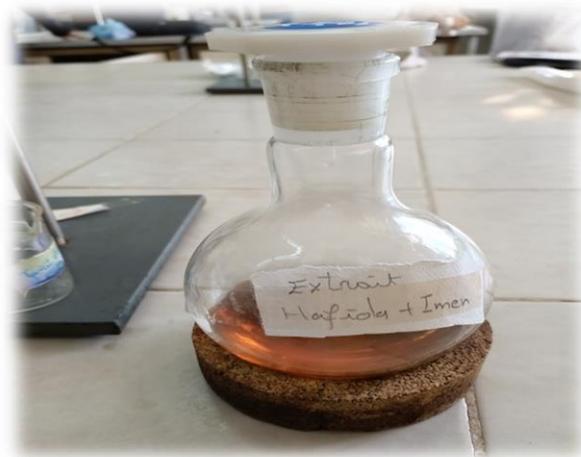


Figure 46 : Extrait après l'élimination de la chlorophylle

8.4- Obtention des extraits

Extraction avec trois solvants organiques de polarité différents :

8.4.1- Extraction par chloroforme

On ajoute au filtrat obtenu précédemment (environ 200 ml), 20 ml de chloroforme, le mélange est bien agité et puis gardé au repos pendant quelques heures. Après, nous avons procédé à une extraction liquide-liquide pour séparer les deux phases formées dans une ampoule à décanter. On observe deux phases ; phase aqueuse supérieure d'une couleur marron foncée et une seconde phase inférieure chloroforme d'une couleur marron claire. Cette opération est répétée 3 fois afin d'assurer la migration totale des constituants qui se dissout dans le chloroforme.

Les fractions retenues sont réunies, séchées par le $Mg SO_4$ et évaporées sous vide à 60 °C

Masse de l'extrait évaporé :

$$M_1 = m(\text{ballon rempli}) - m(\text{ballon vide}) = 71,56 - 71,02 = 0,54 \text{ g.}$$



Figure 47: Extraction par chloroforme

8.4.2- Extraction par l'acétate d'éthyle

Les mêmes opérations précédentes ont été faites avec 60 ml d'acétate d'éthyle. La couleur de la phase organique, dans ce cas, (phase d'acétate d'éthyle) est jaune claire alors que la phase aqueuse a une couleur marron foncée. Après le séché par le $Mg SO_4$, l'évaporation des fractions réunies à $75^\circ C$.

Masse d'extrait : $M_2 = 0,4047 g$

8.4.3- Extraction par n-butanol

Nous avons traité la phase aqueuse récupérée par 60 ml de n-butanol selon les mêmes étapes que nous avons décrit précédemment. L'évaporation à $90^\circ C$. La masse retenue pour cet extrait M_3 est nettement supérieure aux deux premiers ;

Masse d'extrait : $M_3 = 2,4034g$.



Figure 48: Extraction par n-butanol

La phase aqueuse résiduelle est distillée sous vide pour l'obtention de l'extrait aqueux dont la masse $M_4 = 7,570$ g (Figure49).



Figure 49: Extrait aqueux avant l'évaporation de l'eau

8.5- Schéma de l'extraction et de séparation

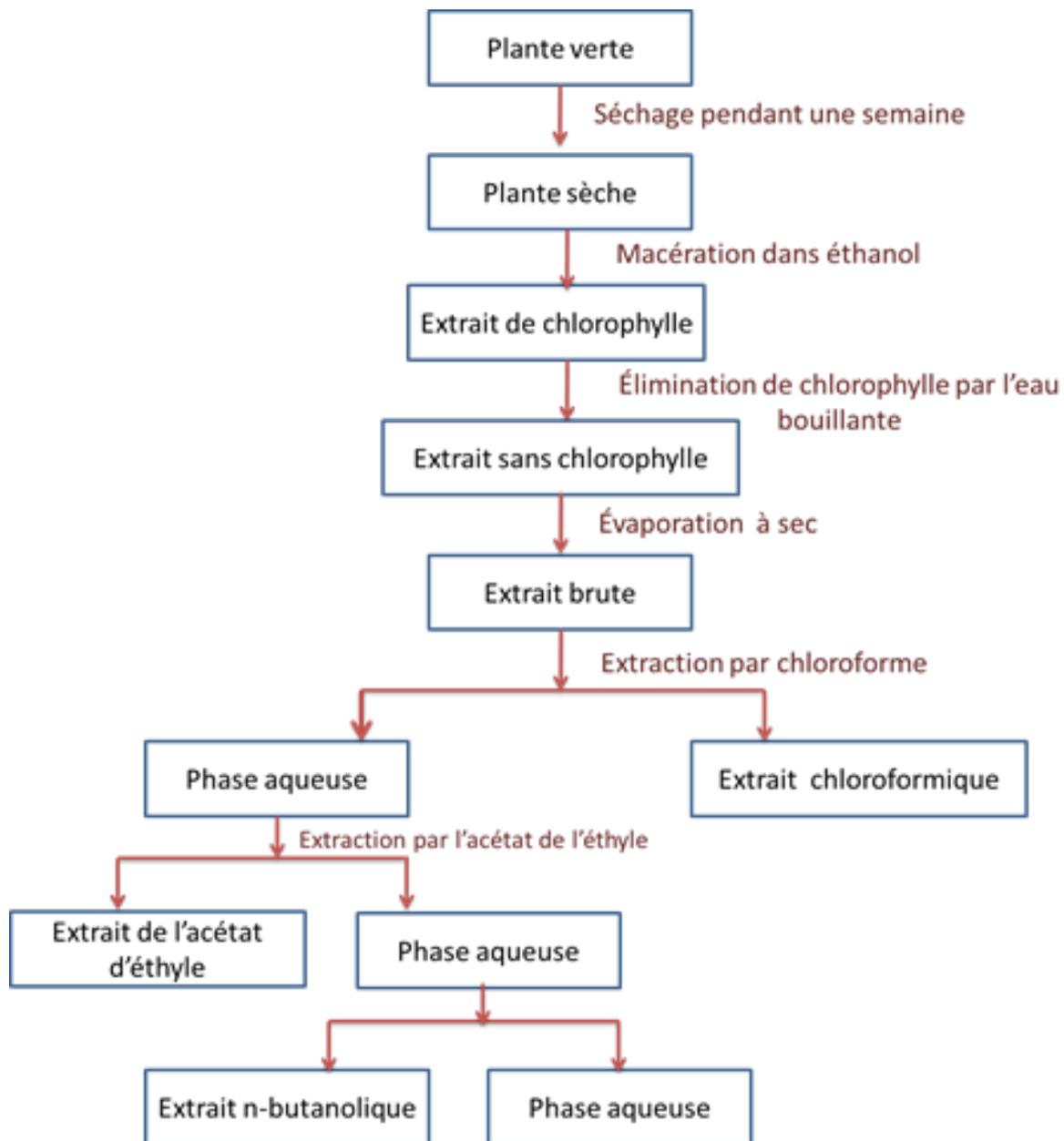


Figure 50: Schéma du protocole d'extraction et de séparation

9- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les extraits obtenus à savoir l'extrait de base (éthanoïque), extrait chloroformique, extrait de n-butanol et l'extrait de l'acétate d'éthyle ont été soumis à une séparation chromatographique sur couche mince afin de connaître l'extrait le plus riche en matière active.

Les extraits obtenus ont été dilués en utilisant des solvants convenables pour avoir des spots aptes à se déplacer le long de la plaque. Plusieurs mélanges d'élutions ont été examinés

afin de prendre le mélange dont les rapports frontaux se situent entre 0,3 - 0,9 Rappelant que le rapport frontal est par définition le rapport entre la distance parcourue par les spots (d) et la distance entre la ligne du dépôt de la tâche est ligne supérieure (D)

$$R_f = \frac{d}{D}$$

R_f : rapport de frontal.

d : distance parcourue par les spots.

D : distance entre la ligne du dépôt de la tâche est ligne supérieure.

9.1- Préparation de l'échantillon à analyser

9.1. a- Préparation de plaque CCM

Les plaques doivent être manipulées avec précaution, sans toucher la silice (manipuler par les côtés) et à ne pas utiliser des plaques abîmées.

Tracer au crayon à papier les références de l'échantillon et les témoins pour chaque marque de la plaque.

Les échantillons à analyser sont pris par un capillaire dans une plaque en céramique et dilué par l'éthanol jusqu'à l'obtention d'une solution convenable.

A l'aide d'un capillaire on dépose une petite quantité (un spot) sur la plaque CCM en laissant s'évaporer le solvant et mettre la plaque dans la cuve appropriée. (Figure 50).



Figure 51: Préparation des plaques CCM

9.1. b- Préparation de la cuve chromatographique

10 ml de l'éluant choisi sont soigneusement introduit dans la cuve chromatographique (bêcher sans bec dans notre cas), la cuve est fermée ensuite par du papier en aluminium et gardée au repos pour avoir un bon équilibre thermodynamique.



Figure 52: Cuve chromatographique.

9.2- Etude des fractions retenues de l'extrait brut "extrait éthanoïque"

Nous avons procédé à une séparation chromatographique par CCM en se basant sur les données décrites précédemment. Les résultats obtenus sont mentionnés sur les figures suivantes :

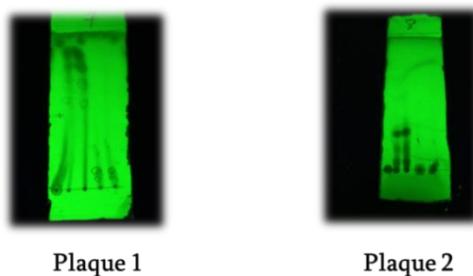


Figure 53: Séparation en utilisant le mélange d'éthanol et l'éther de pétrole

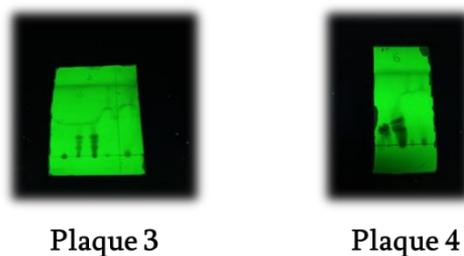


Figure 54: Séparation en utilisant le mélange d'hexane et d'éthanol

10- l'activité antioxydante

10.1- Définition

C'est le pouvoir de l'extrait ou du composé à inhiber est bloquer le phénomène D'oxydation. Cette activité est évaluée par des différents tests à savoir : FRAP/ DPPH /ABTS/ LM/ TRAP.

Ces tests sont basés sur la coloration et la décoloration de la solution dans une longueur d'onde bien définie approprié à chaque test, et dans notre présent travail, nous avons choisi deux tests, tout dépend des réactifs disponibles au laboratoire, il s'agit des tests de FRAP et de DPPH

10.2-Test de FRAP

10.2.1- Principe

L'activité réductrice du fer des extraits et des huiles est déterminée selon la méthode décrite par Oyaizu (1986), Cette méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe^{+3} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe^{+2} [32], la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe^{+++}) ; en couleur bleu verte du fer ferreux (Fe^{++}) l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie 700 nm (80).

La première solution aqueuse est une solution tampon d'acétate de sodium dans un milieu basique (pH = 6.6) : on dissout une mole d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans 34 ml d'acide phosphorique (H_3PO_4). En jauge le contenu jusqu'à 100 ml par de l'eau distillée

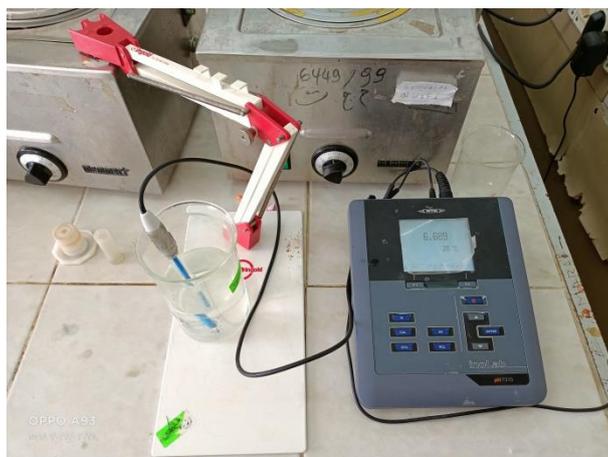


Figure 55: Solution tampon

Solution 2 :

On dissout 10g d'acide trichloracétique (TCA) dans 100 ml d'eau distillée. On obtient ainsi une solution aqueuse à 10 % de TCA.

Solution 3 :

On dissout 1g de ferricyanure de potassium ($K_3[Fe(CN)_6]$) dans 100 ml d'eau distillée. On obtient ainsi une solution aqueuse à 1% de ($K_3[Fe(CN)_6]$).

Solution 4 :

On dissout 0.1g de trichlorure de fer hexa hydraté ($FeCl_3.6H_2O$) dans 100 ml d'eau distillée. On obtient ainsi une solution aqueuse à 0.1% de $FeCl_3.6H_2O$.

10.2.2- Mode Opérateur :

Le pouvoir réducteur du fer dans les extraits préparés précédemment est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (81).

Un millilitre de l'extrait éthanoïque à différentes concentrations (de 1 à 0.0078 mg/ml) est mélangé avec 2.5ml d'une solution tampon de phosphate, 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$, à 1%. Le mélange est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 min ensuite. 5 ml d'acide de trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 tour par minute (tpm) pendant : 10 min. Un aliquote (5 ml) de surnageant est combinée avec 5 ml d'eau distillée et 1ml d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ à 0,1%.



Figure 56: l'incubation et centrifugation

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 permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre (82)).



Figure 57: Cuve d'absorption par spectrophotomètre UV-V

10.3- Test DPPH

10.3.1- Principe

C'est un test anti radicalaire, défini depuis plus de cinquante ans par Palois (plus précisément en 1958) en se basant sur des calculs portés sur les phénomènes anti oxydants. La molécule de DPPH a une formule chimique donnée sur la figure :

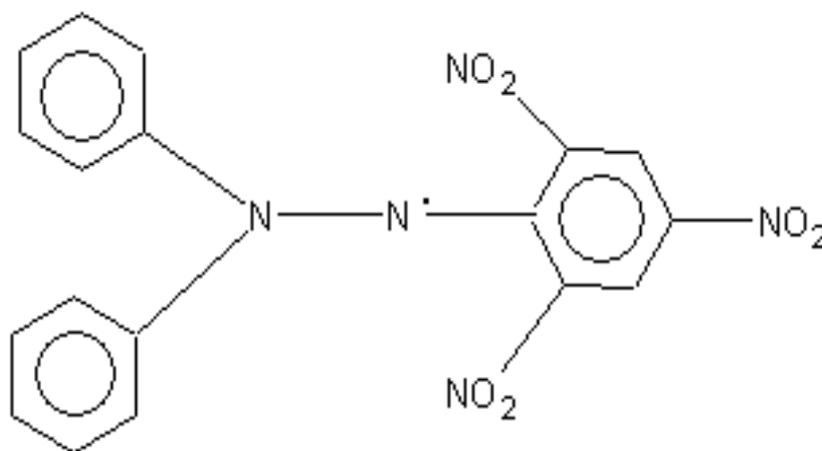


Figure 58: La molécule de diphénylpicrylhydrazyl (DPPH)

Le diphénylpicrylhydrazyl (DPPH) est un produit solide de couleur violette- noircie, dérivé de diphénylpicrylhydrazine qui est un corps solide jaune **(83)**.

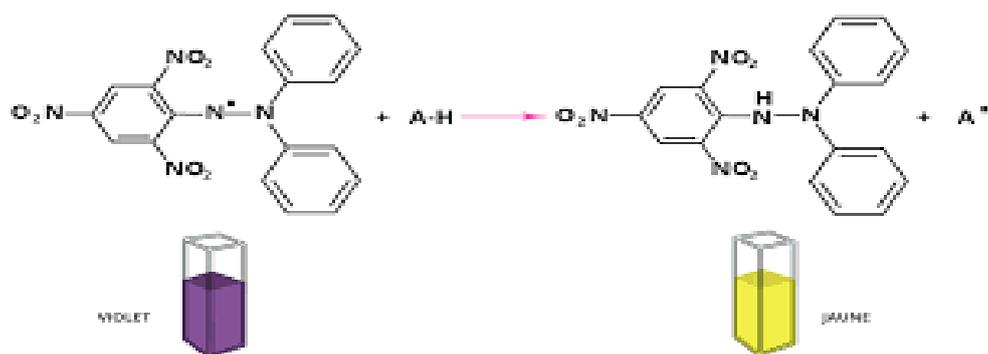


Figure 59: Réaction radicalaire de DPPH.

L'inhibition des radicaux libres est faite en gardant le DPPH avec les extraits en études pendant 30 minutes. Le DPPH est un corps stable qui réagit avec une entité moléculaire anti-radicalaire pour donner le DPPH-H avec une perte d'absorption à une longueur d'onde maximale $\lambda_{ma} = 517 \text{ nm}$ (84).

10.3.2-Mode Opératoire

10.3.2. a-Préparation des solutions (extraits éthanoïques)

On prépare de différentes concentrations diluées (de 1 à 0.0078mg/ml) à partir des extraits éthanoïques préparés précédemment en versant ces extraits dans de l'éthanol absolu.

10.3.2. b- Préparation des solutions d'acide ascorbique

On dissout 20 mg d'acide ascorbique dans 4 ml d'extrait, ce volume est réparti en deux (soit 2 ml dans chaque flacon marron). On rajout 2ml de n- butanol à un des deux flacons et on prend 2ml de cette solution et on rajoute 2 ml de n- butanol.

Ainsi on obtient une série des solutions d'acide ascorbique de mêmes concentrations des échantillons

10.3.2 .c- Préparation de la solution de DPPH

On dissout 0.0049 g de DPPH dans 50 ml de l'éthanol absolu. La masse moléculaire de DPPH égale à $M_{DPPH} 394 \text{ g/mol}$.



Figure 60: La solution de DPPH

On ajoute 1ml de chaque solution éthanoïque des extraits à différentes concentrations, et on ajoute à 3 ml de la solution éthanoïque de DPPH, le mélange est bien agité pour homogénéiser le milieu. On garde le mélange obtenu à l'obscurité totale pendant 30 minutes et on procède à la lecture d'absorption par spectrophotomètre UV-V à la longueur d'onde $\lambda_{\max} = 517 \text{ nm}$.

Pour des raisons comparatives, on détermine par la même manière et dans les mêmes conditions l'absorption de l'acide ascorbique.

Résultat du test :

Le pourcentage d'inhibition (I %) est calculé par la formule suivante :

$$I \% = \frac{(A_0 - A_i)}{A_0} \times 100$$

Avec : A_0 = Absorbance de la solution de DPPH, en absence d'extrait ou de l'acide ascorbique.

A_i = Absorbance de la solution de DPPH, en présence de l'extrait ou de l'acide ascorbique.

Chapitre IV

Discussion des résultats

1- Tests de présence des principes actifs

Les résultats des tests préliminaires testant la présence des principes actifs sont regroupés dans le tableau ci-dessous

Tableau 2: Tests de présence des principes actifs

Principes actifs		Feuilles
Alcaloïdes	Dragendorff	+
	Mayer	+
	Bouchardât	+
Flavonoïdes		+
Alcaloïdes indoliques		+
Saponosides		+
Tanins		+
Cardenolides		-
Sels alcaloïdes		+
Stérols et triterpènes		+
Huiles essentielles		+

Seuls les cardénolides qui sont absent dans l'extrait éthanoïque. Le reste des principes actifs testés ont donné le signe de présence dans l'extrait de départ de la plante de *Salvia rosmarinus* cultivée.

En espérant, à partir de ces tests, que les extraits de subdivision chromatographique seront, eux-mêmes, riches en plusieurs principes actifs.

Les tests de présence ont été répétés plusieurs fois pour confirmer et s'assurer de notre étude.

2- Rendement des extractions

Le rendement des extraits (extrait de départ et les extraits de subdivision) est exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de matière végétale sèche du départ (170 g) issue de la partie aérienne de la plante *Salvia rosmarinus* cultivée. La loi de calcul utilisée dans notre cas est la suivante :

$$R = \frac{m_e}{m_p} \cdot 100$$

Avec : R = rendement d'extraction

M_e = masse de l'extrait

M_p = masse de la plante sèche (170 g)

Le tableau suivant illustre les rendements d'extraction pour les extraits étudiés.

Tableau 3: Les rendements des extraits

Extrait	Masse	Rendement (%)
Extrait brut	18,47636g	4,37
Extrait brut sans chlorophylle	7,5700 g	2,12
Extrait de chloroforme	0,5400g	0,31
Extrait d'acétate d'éthyle	0,4047 g	0,23
Extrait de n-butanol	2,4034 g	1,41
Extrait aqueux restant	4 ,2220 g	2,48

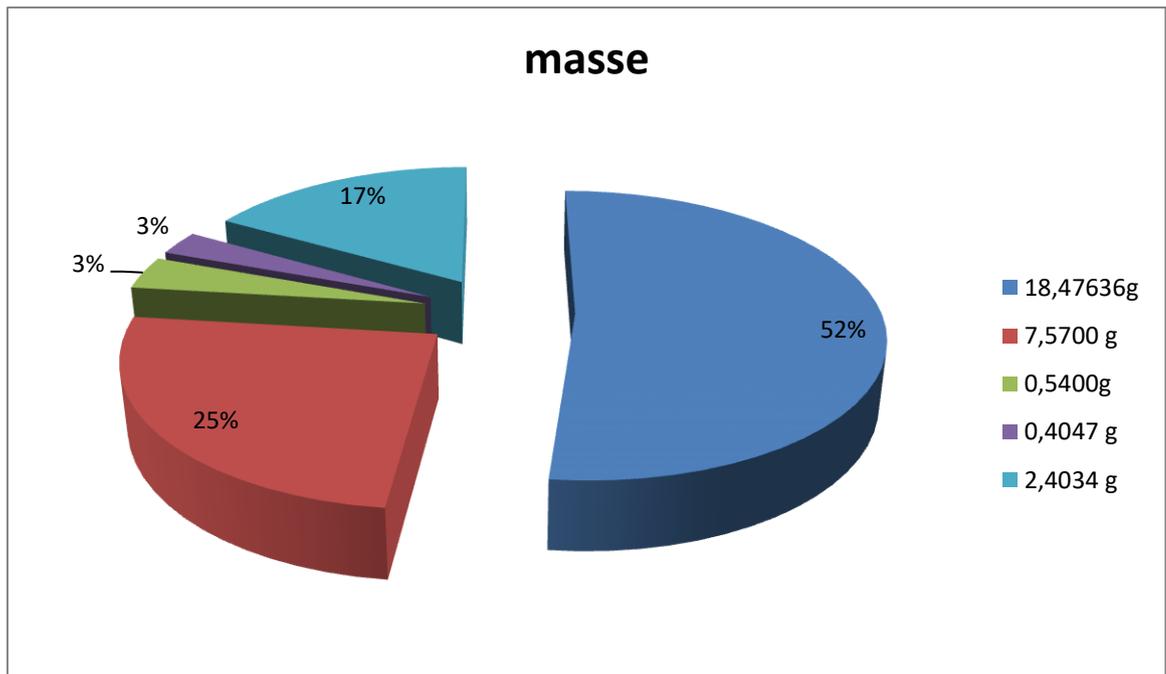


Figure 61: Masses des extraits obtenus et leurs rendements

Le rendement le plus élevé est tout à fait normal pour l'extrait brut (4,37%), suivi par l'extrait sans chlorophylle (2,12%), la majorité des principes actifs contenus dans l'extrait de départ a été migré dans le butanol normal (1,41%), l'extrait du chloroforme en troisième rang avec un rendement de (0,31%) et finalement l'extrait de l'acétate d'éthyle avec un rendement plus au moins faible (0,23%).

Notons la difficulté envisagée pour sécher totalement l'extrait aqueux restant. Le chiffre de 2,48% ne reflète pas la masse des métabolites secondaires restante dans cet extrait. Néanmoins ce chiffre montre clairement qu'une partie des métabolites secondaires se trouve dans la phase aqueuse restante et qui sera étudiée ultérieurement. La quantité de ces métabolites supposée gardée dans la phase aqueuse peut être calculée par la formule suivante :

$$m_{aq} = m_{eb} - (m_{chlor} + m_{ae} + m_{nb})$$

Avec : m_{aq} = masse de l'extrait aqueux

M_{eb} = masse de l'extrait sans chlorophylle

M_{chloro} = masse de l'extrait de chloroforme

M_{ae} = masse de l'extrait d'acétate d'éthyle

M_{nb} = masse de l'extrait de n-butanol

Donc: $m_{aq} = 7,570 - (2,4034 + 0,4047 + 0,54) = 4,222\text{g}$ avec un rendement $R = 2,483\%$

On peut considérer que le résultat est acceptable parce que les métabolites secondaires ne sont présents qu'en très petites quantités dans les plantes médicinales malgré qu'une partie de la matière active reste encore dans l'extrait aqueux non étudié.

Vu ce résultat, des études chimique, électrochimique et biologique devient importantes pour cet extrait aqueux restant.

3- Séparation par CCM

3.1-Discussion des résultats obtenus pour l'extrait brut " extrait éthanoïque"

Cette partie de notre étude est réalisée juste pour une confirmation de la présence de certaines familles des métabolites secondaires. Le choix des éluants était délicat vu la qualité des solvants utilisés. Parmi ces éluants, les mélanges d'éther de pétrole et l'hexane dans l'éthanol ont donné des séparations acceptées pour notre étude car les rapports frontaux se trouvent dans une zone relativement visible et lisible.

Tableau 4: Résultat de séparation par CCM

	mélange	Piqure 1 : Extrait l'acétate	Piqure 2 : Extrait n-but. (I)	Piqure 3 : Extrait n-but. (s)	Piqure 4 : Préparation chloroforme	Piqure 5 : chloroforme dilué
Plaque1:	EtP - EtOH 7-3 ml		$R_{f1}=0,42$ $R_{f2}=0,615$ $R_{f3}=0,69$ $R_{f4}=0,69$	$R_{f1}=0,519$ $R_{f2}=0,63$ $R_{f3}=0,769$ $R_{f4}=0,86$ $R_{f5}=0,96$	$R_{f1}=0,08$ $R_{f2}=0,06$ $R_{f3}=0,21$ $R_{f4}=0,96$	$R_{f1}=0,038$ $R_{f2}=0,096$ $R_{f3}=0,25$ $R_{f4}=0,096$
Plaque2	EtP - EtOH 8-2 ml		$R_{f1}=0,06$ $R_{f2}=0,127$ $R_{f3}=0,218$	$R_{f1}=0,05$ $R_{f2}=0,127$ $R_{f3}=0,236$		
Plaque3	He- EtOH 7-3ml	$R_{f1} = 0,47$	$R_{f1}=0,90$ $R_{f2}=0,18$ $R_{f3}=0,25$ $R_{f4}=0,36$ $R_{f5}=0,86$	$R_{f1}=0,11$ $R_{f2}=0,18$ $R_{f3}=0,25$ $R_{f4}=0,31$ $R_{f5}=0,38$ $R_{f6}=0,47$	$R_{f1}=0,52$ $R_{f2}=0,75$ $R_{f3}=0,95$	$R_{f1}=0,68$ $R_{f2}=0,77$
Plaque4	He- EtOH 6-4 ml	$R_{f1}=0,2$	$R_{f1}=0,14$ $R_{f2}=0,2$ $R_{f3}=0,28$	$R_{f1}=0,2$ $R_{f2}=0,257$ $R_{f3}=0,31$	$R_{f1}=0,02$	$R_{f4}=0,35$

Plaque 1 :

Cette plaque a été éluée par un mélange d'EtP -EtOH 7-3 ml. La piqure 1 correspond à l'extrait de la plante dans l'acétate. Nous n'avons observé aucun résultat considérable. Les piqures 2, 3, 4 et 5 qui correspondent successivement aux extraits n-butanolique (s ; l), l'extrait chloroforme et chloroforme dilué. La migration est faite le long de la plaque en donnant un enchainement de spots allant du $R_f = 0,03$ jusqu'à $R_f = 0,90$ ce qui indique la richesse des extraits correspondants en métabolites secondaires. La première ligne du tableau 4 illustre les différents spots et leurs rapports frontaux de cette plaque.

Plaque 2 :

Cette plaque a été réalisée par un mélange EtP-EtOH 8-2 ml. Les piqures 1, 4, 5 correspondent successivement aux extraits de la plante dans l'acétate et le chloroforme. Aucun résultat important à signaler pour ces trois piqures. Les piqures 2 et 3 qui correspondent successivement aux extraits n-butanolique (s ; l) migrent le long de la plaque en donnant un enchainement de spots allant du $R_f = 0,05$ jusqu'à $R_f = 0,2$ ce qui indique la richesse de cet extrait en métabolites secondaires. La deuxième ligne du tableau 4 illustre les différents spots et leurs rapports frontaux de cette plaque.

Plaque 3 :

Cette plaque a été réalisée par un mélange de He -EtOH 7-3 ml. Nous avons observé pour toutes les piqures une migration le long de la plaque en donnant un enchainement de spots allant du $R_f = 0,11$ jusqu'à $R_f = 0,90$ ce qui indique la richesse de ces extraits en métabolites secondaires. La troisième ligne du tableau 4 illustre les différents spots et leurs rapports frontaux de cette plaque.

Plaque 4 :

Cette plaque a été réalisée par un mélange de He -EtOH 6-4 ml. Nous avons remarqué une similitude dans la migration avec la plaque 3 néanmoins les rapports frontaux sont différents

4- l'activité anti oxydante**4.1- Test de FRAP**

Une évaluation de l'activité anti-oxydante de l'extrait éthanolique de *Salvia rosmarinus* est faite en utilisant la méthode de FRAP décrite par Oyaizu (1986). La réduction des ions Fe^{+3} en

ions Fe^{+2} est évaluée en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm.

Le pouvoir réducteur décrivant l'absorbance de l'extrait éthanoloïque de la plante *Salvia rosmarinus* à 700 nm en fonction des différentes concentrations est présentée par la courbe 1,

La courbe d'absorbance en fonction de la concentration de l'extrait éthanoloïque à une allure logarithmique, l'absorbance augmente rapidement pour les concentrations faibles et devient pratiquement constante avec les grandes concentrations. Cela vérifie la richesse de la plante en matière polyphénolique qui est dû probablement à la forte présence des groupements hydroxyles.

Au passage de l'absorbance à l'inhibition en pourcentage par application de la loi qui détermine l'inhibition ;

$$I \% = \frac{(A_0 - A_i)}{A_0} \times 100$$

Avec : A_0 = Absorbance de la solution de DPPH, en absence de l'extrait éthanoloïque.

A_i = Absorbance de la solution de DPPH, en présence de l'extrait éthanoloïque.

Nous remarquons que le pouvoir inhibiteur de l'extrait éthanoloïque de *Salvia rosmarinus* cultivée diminue d'une en fonction de la concentration. Ce qui confirme la richesse de la plante en matière polyphénolique.

Notons aussi qu'une minorité d'essais diverge de la courbe et cela est dû aux prises des volumes par les pipettes.

Tableau 5: Résultat d'absorbance de l'extrait éthanoloïque

Concentration en mg/ml	1	0,5	0,25	0,125	0,625	0,3125	0,015625	0,0078125
Absorbance à 700 nm	0,99	0,88	0,58	0,11	0,098	0,024	0,001	0,017
Inhibition en %	00	10,41	40,41	87,89	89,10	96,57	98,90	97,28

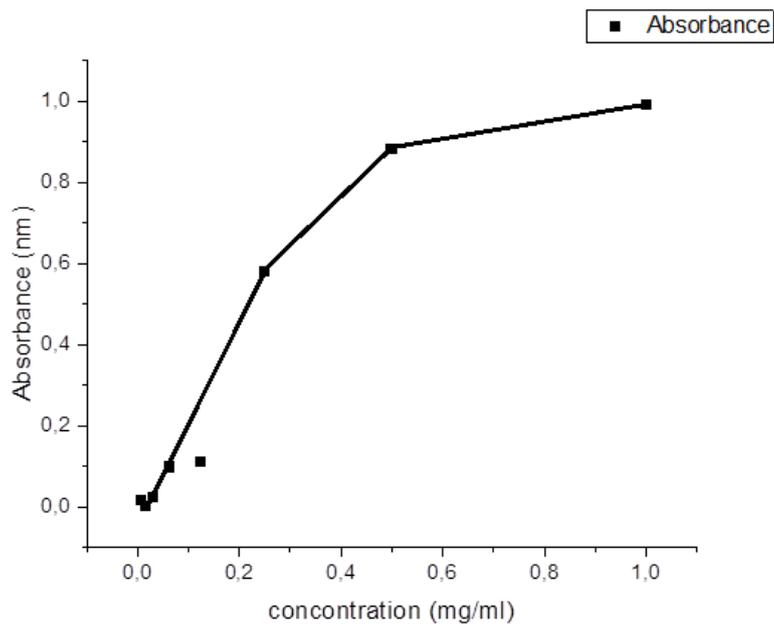


Figure 62: courbe d'absorption de l'extrait éthanoïque par FRAP

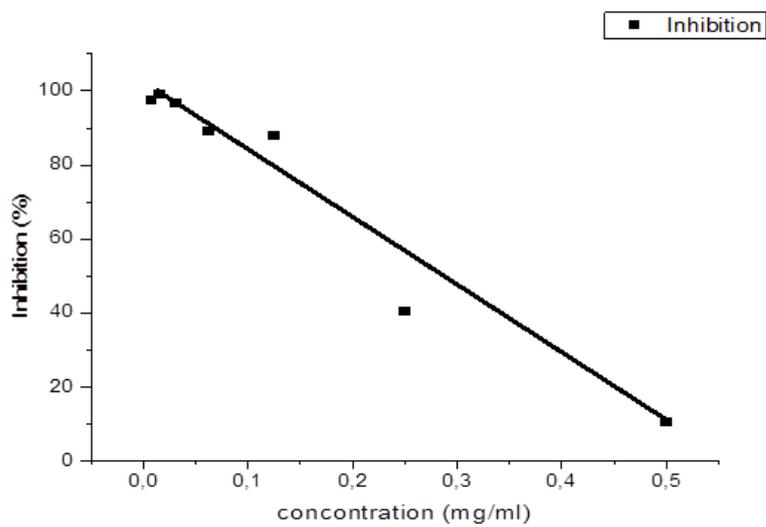


Figure 63: courbe d'inhibition de l'extrait éthanoïque par FRAP

4.2- Test de DPPH

Le test de l'activité anti oxydante par DPPH a été réalisé en premier lieu sur l'extrait butanolique issu de l'extrait éthanoïque par séparation chromatographique en le comparant avec l'extrait de l'acide ascorbique dans le même alcool suivi par des essais sur l'extrait mère avec une comparaison avec l'acide ascorbique dissout dans l'éthanol. Le suivi de la réduction de la molécule de DPPH[•] vers la molécule de DPPH-H est observé puis évalué avec un passage de la couleur violette vers le jaune. La mesure de l'absorbance est faite à une longueur d'onde évaluée à 510 nm.

Le pourcentage d'inhibition (I %) est calculé par la même formule utilisée auparavant

Les résultats obtenus sont décrits dans les tableaux suivants et illustrés sous forme de courbes correspondantes.

Tableau 6: Résultat d'absorbance de l'extrait butanolique

Concentration en mg/ml	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,156
Absorbance à 510 nm	0,240	0,012	0,0077	0,0036	0,0018	0,0010
Inhibition en %	00	50,00	70,83	85,00	92,50	95,83

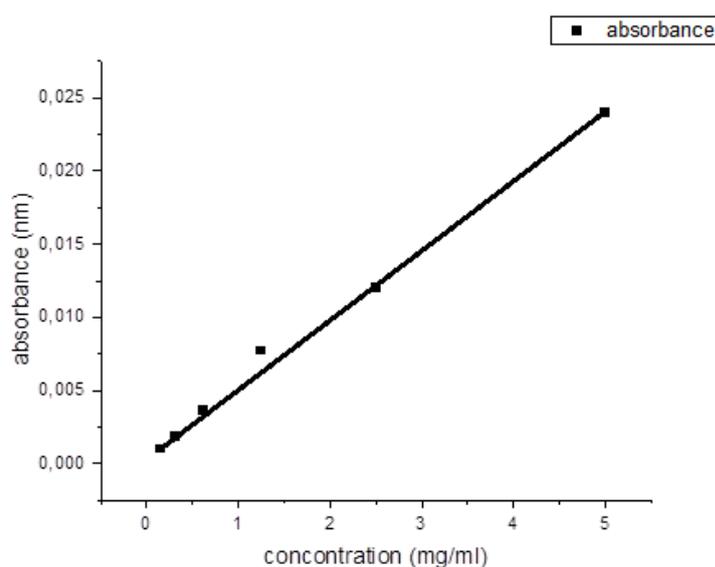


Figure 64: courbe d'absorption de l'extrait butanolique par DPPH

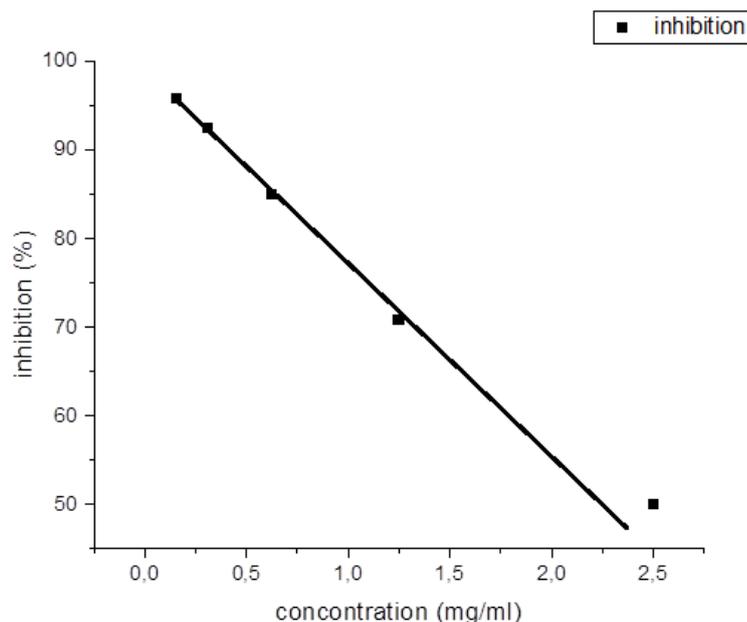


Figure 65 : courbe d'inhibition de l'extrait butanolique par DPPH

Selon les courbes issues des valeurs d'absorption et par suite le pourcentage d'inhibition de l'extrait butanolique et la solution de l'acide ascorbique dans le butanol comme antioxydant standard, nous remarquons que l'activité antioxydante, évaluée par spectrophotométrie, de l'extrait de la plante *Salvia rosmarinus* vis-à-vis du radical DPPH, de couleur initiale violette, qui se réduit en radical DPPH[•] avec une couleur jaune de la molécule DPPH-H. La capacité de cette réduction est prouvée par l'augmentation de l'absorbance ou par une diminution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des molécules polyphénoliques dans l'extrait. En comparant cet extrait avec l'extrait standard de l'acide ascorbique, nous remarquons que l'extrait de la plante *Salvia rosmarinus* cultivée à une teneur plus au moins forte. Nous remarquons aussi que le pouvoir antioxydant devient important à des concentrations faibles.

Tableau 7: Résultat d'absorbance d'acide ascorbique dans le n-butanol

Concentration en mg/ml	5	2,5	1,25	0,625	0,3125
Absorbance à 510 nm	0,224	0,045	0,06	0,032	0,013
Inhibition en %	00	79,91	73,21	85,71	94,19

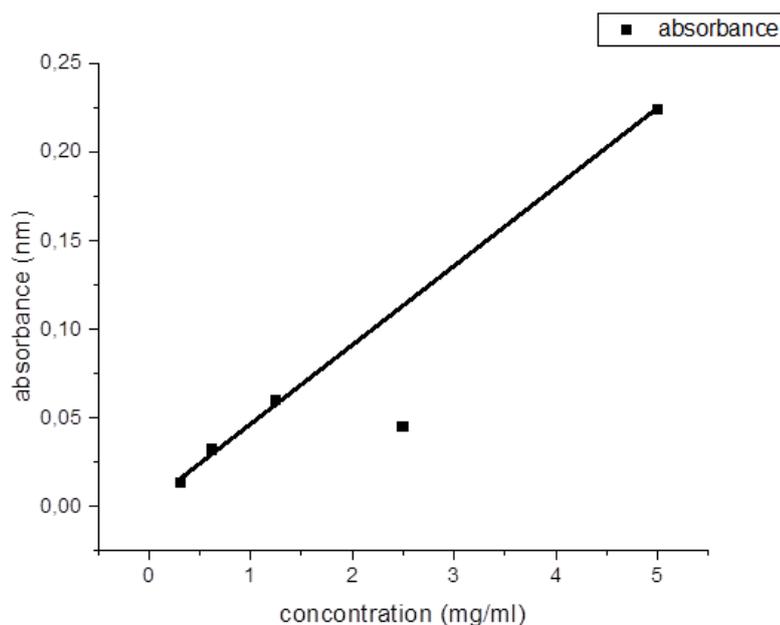


Figure 66: courbe d'absorption de l'acide ascorbique dans le butanol par DPPH

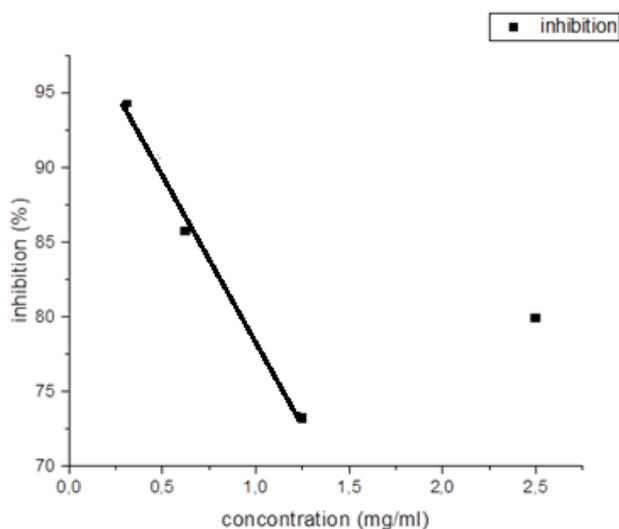


Figure 67: courbe d'inhibition de l'acide ascorbique dans le butanol par DPPH

Vu que la dissolution du DPPH dans le butanol a été faite partiellement et par suite ne reflète pas d'une manière totale l'effet antioxydant des molécules actives de la plante *Salvia rosmarinus*, nous avons tenté de reprendre cette étude avec l'extrait éthanoïque mère. Les résultats de l'absorbance et par suite le pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations

de l'extrait de *Salvia rosmarinus* cultivée sont illustrés dans le tableau 8 et traduit sous forme de figure (68). Les résultats obtenus pour la solution standard sont décrits dans le tableaux 9 et repris comme allure dans la figure (69).

Malgré que le nombre de prises volumétriques incorrectes est plus au moins important, l'allure générale des courbes d'absorption et du pourcentage d'inhibition montrent clairement l'importance de cet extrait par rapport à celui butanolique. Le pouvoir antioxydant de l'extrait éthanoïque à des valeurs importantes au précédentes. Ces valeurs restent toujours supérieures à celles de l'extrait standard de l'acide ascorbique.

Tableau 8: Résultat d'absorbance à 700 nm de l'extrait éthanoïque

Concentration en mg/ml	0,500	0,250	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008
Absorbance à 510 nm	0,4500	0,2264	0,0782	0,0455	0,025	0,0104	0,0033
Inhibition en %	00	49,68	82,62	89,88	94,44	97,68	99,26

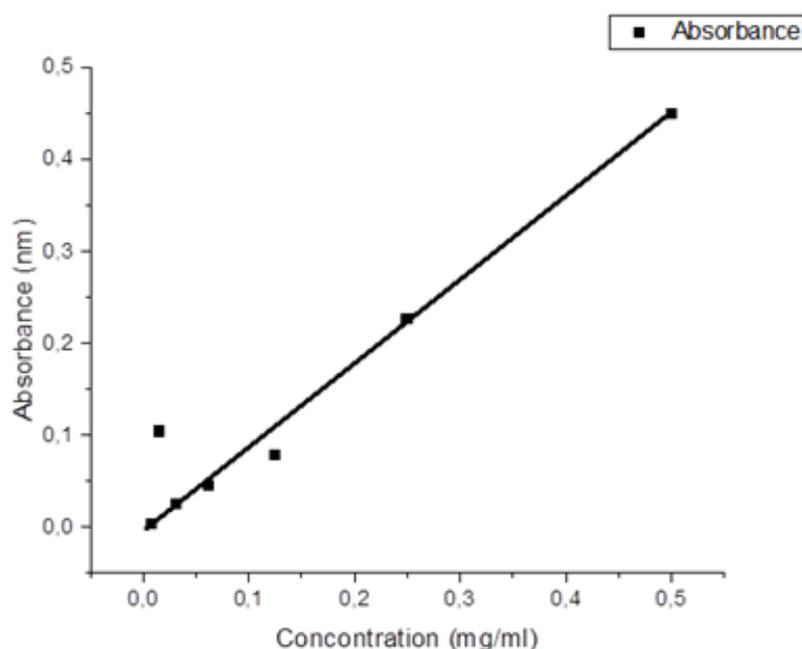


Figure 68: courbe d'absorption de l'extrait éthanoïque par DPPH

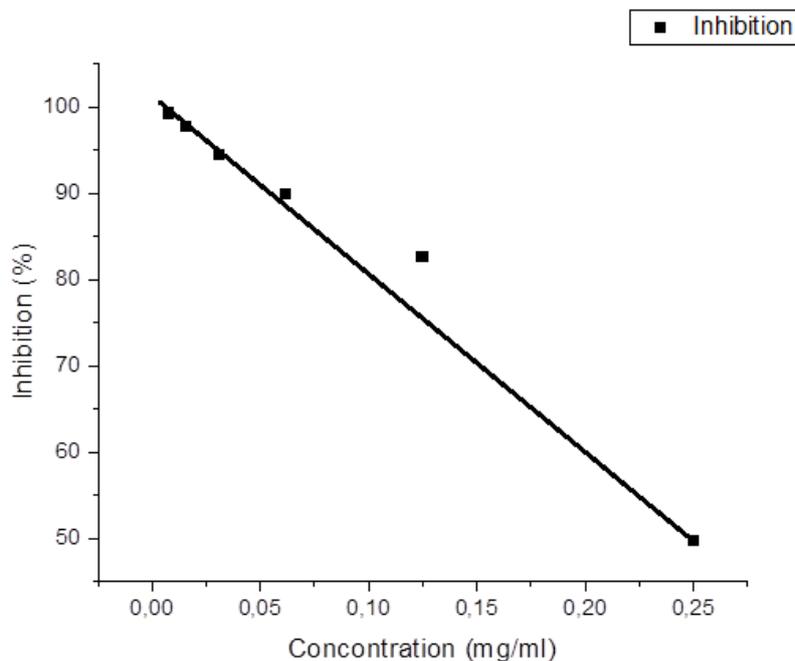


Figure 69: courbe d'inhibition de l'extrait éthanoïque par DPPH

Tableau 9: Résultat d'absorbance d'acide ascorbique dans l'éthanol

Concentration en mg/ml	0,500	0,250	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008
Absorbance à 510nm	0,6080	0,39	0,188	0,1566	0,0730	0,0673	0,057
Inhibition en %	00	35,85	69,07	74,24	87,99	88,93	90,62

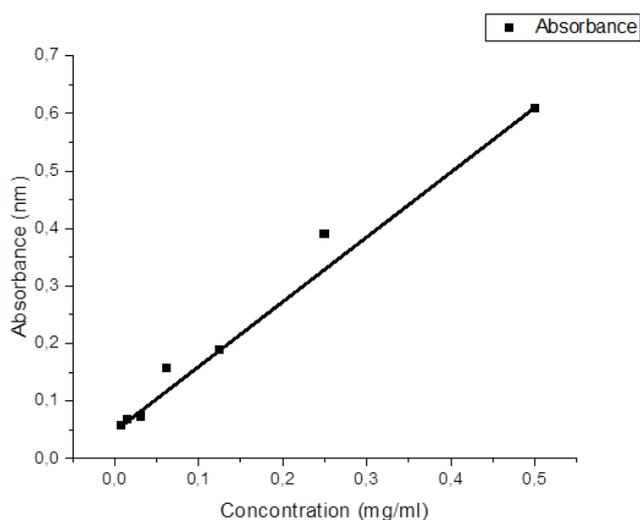


Figure 70 : courbe d'absorption de l'acide ascorbique dans l'éthanol par DPPH

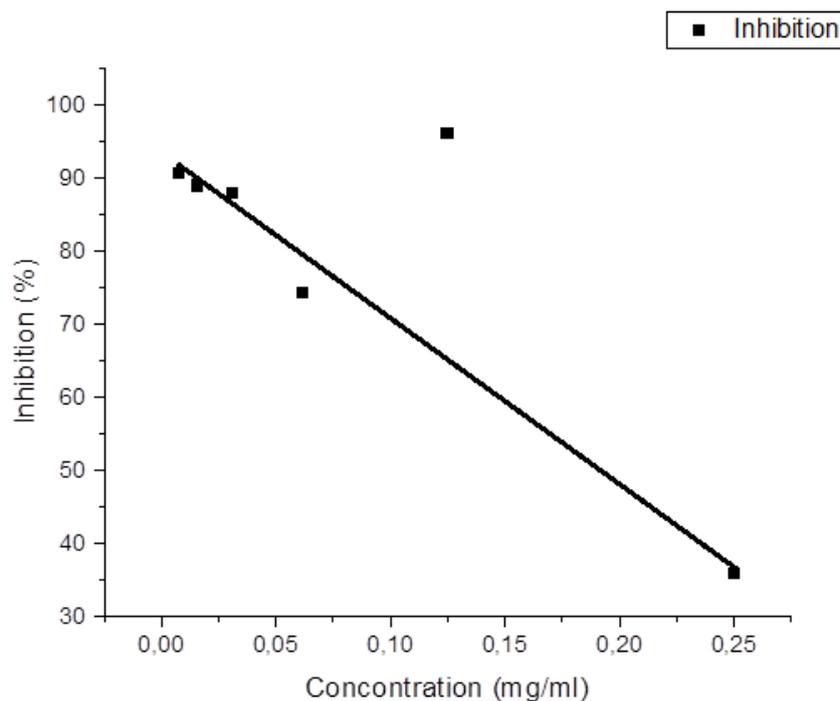


Figure 71: courbe d'inhibition de l'acide ascorbique dans l'éthanol par DPPH

En conclusion l'étude de l'activité antioxydante des deux extraits, éthanoïque et butanolique, de la plante *Salvia rosmarinus* cultivée a montré l'importance de cette activité vis-à-vis à l'extrait ascorbique standard et l'importance du pouvoir d'inhibition même à des faibles concentrations. La plante *Salvia rosmarinus* cultivée et ses différents extraits pourraient constituer un moyen important de plusieurs aditifs commerciaux, tant sur le plan pharmaceutique, de produits de beauté ou autres. Des études approfondies sur cette plante sur le plan chimique ou plan de culture sont indispensables pour une meilleure identification de ces éléments chimiques et de conditions de culture pour une bonne rentabilité.



**Conclusion
générale**

V. Conclusion

Notre travail est porté sur une étude d'une plante couramment utilisée dans la médecine traditionnelle et même dans d'autres secteurs. Il s'agit de *Salvia rosmarinus* populairement connu sous le nom du romarin, elkil en langue arabe et azir dans les zones berbères.

Après une brève présentation bibliographique sur l'importance des plantes médicinales, leurs principes actifs et les différentes méthodes de leurs extractions, nous avons procédé à décrire la plante choisie avec un bref regroupement des études antérieures réalisées sur ce sujet.

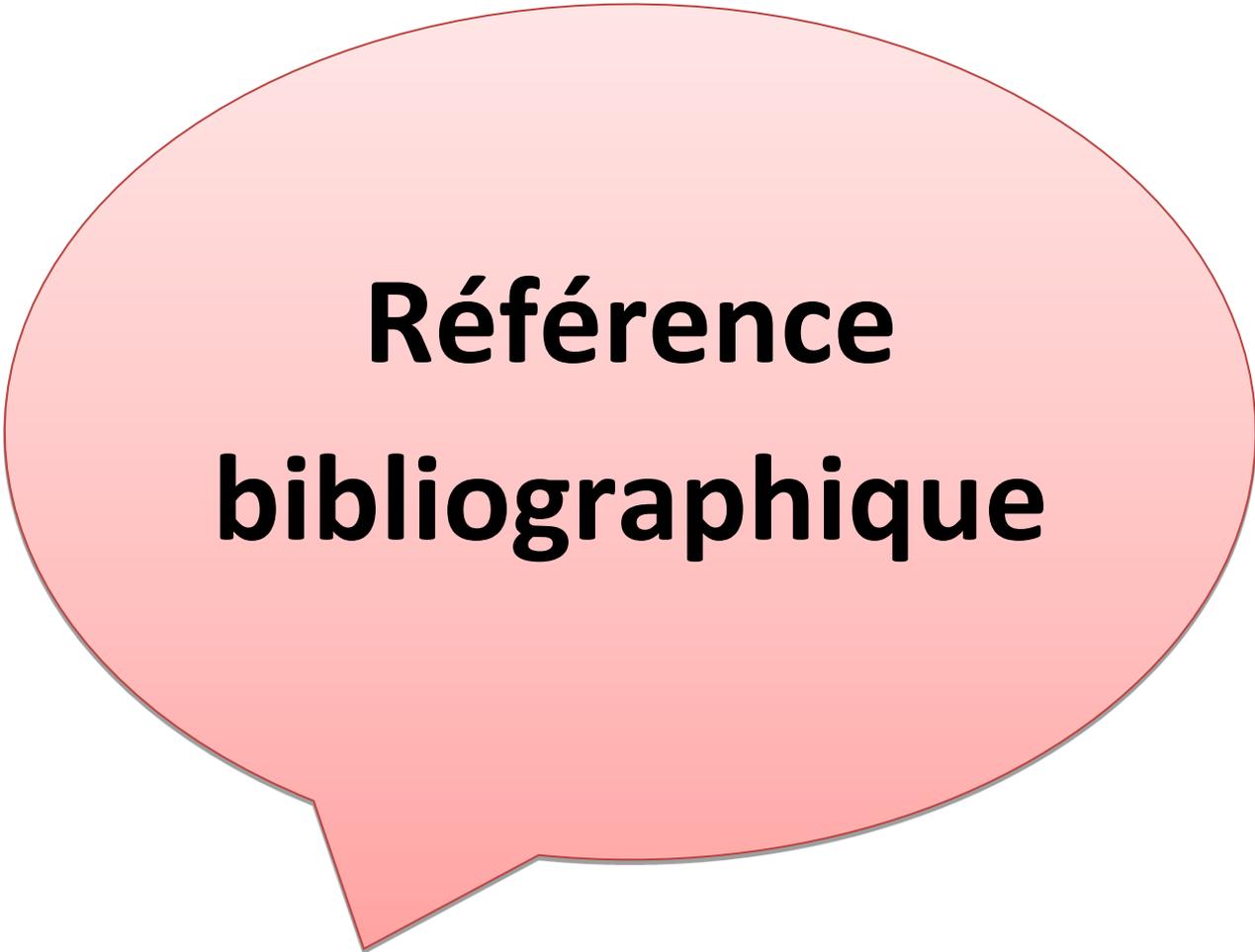
Nous avons ensuite testé la présence des molécules actives dans l'extrait éthanolique de *Salvia-rosmarinus* cultivée. Ces tests ont confirmé la présence de la majorité des familles connues.

Les rendements en matière actives prouvent le déplacement de ces dernières vers le n-butanol vis-à-vis au chloroforme et à l'acétate d'éthyle. Une matière active reste encore dans l'extrait aqueux non étudié ce qui donne une importance pour une étude ultérieure de cette partie de la plante.

Une étude chromatographique par CCM a confirmé la richesse de l'extrait par des différentes molécules actives.

Les analyses chimiques de l'extrait mère et de l'extrait butanolique ont prouvé une présence importante des polyphénols par ces différentes formes telles que les flavonoïdes, coumarines....

En perspective et en conclusion la cultivation de *Salvia rosmarinus* pour des buts économique est un sujet d'actualité pour améliorer certaines activités de la plante.



**Référence
bibliographique**

Références bibliographiques

- (1) الدكتور أحمد فرج العطييات ، (1995) ، النباتات الطبية و العطرية في الوطن العربي زراعة و تصنيع النباتات الطبية في الوطن العربي . المؤسسة العربية للدراسات و النشر ص21-22 .
- (2) P.Iserin, M. Masson et J.P. Rossellini, (2001), Encyclopédie des plantes médicinales: Identification, préparations, soins, Larousse. Paris. Pp:10,14-17, 21,128.
- (3) J .Bruneton, (1993), Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales. 2eme édition TEC and DOC-Lavoisier. Paris. Pp: 406-417.
- (4) K. Hostettmann, O. Potterat, J. L. Wolfender. Chimia, vol.52, (1998), Pp: 10-17.
- (5) Scora (K.M.), Scora (R.W.), (1998), - Effect of volatiles on mycelium growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, and *P. ulaiense*. J. Basic Microbiol, 38(5-6), 405- 413.
- (6) Zhiri, Nutra News, (2006), 12, 8.
- (7) J. Bruneton, (1993), Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales. 2eme édition TEC and DOC - Lavoisier. Paris. Pp : 406-417.
- (8) P. Franchomme. et D. Penoel, (1990), L'aromathérapie exactement Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jollois Editeur, Limoges, France. P : 394.
- (9) S .Halimi. et M. Adjroud, (2006), Etude ethnobotanique et caractérisation Chimique des huiles essentielles de romarin dans la région de M'Daourouche W. Souk Ahras. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention d'un diplôme d'état de pharmacie. Département de pharmacie, Faculté de médecine, Université BADJI MOKHTAR. Annaba. Pp : 22.
- (10) P .Crete, (1965), Précis de botanique. Tome 2 : systématique des angiospermes Masson and Cie éditeurs. Paris. p : 371.
- (11) P. Iserin, M. Masson et J.P. Restellini, (2001). Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparations, soins, Larousse, Paris. Pp : 10,14-17, 21,128.
- (12) M. Paris, M. Hurabielle, (1980), Abrégé de Matière Médicale (Pharmacognosie), Tome 1 Paris.
- (13) A. Kalla., (2012), thèse doctorat de « Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien : *Pituranthos scoparius*, *Rantherium adpressum* et *Traganum nudatum* » ; Pp :17 .
- (14) H. Gouasmia. Et N. Boutouata, (2005), Etude ethnobotanique et thérapeutique des plantes médicinales dans l'est Algérien (cas de la wilaya de Tébessa). Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention d'un diplôme d'état de pharmacie, Département de pharmacie, Faculté de médecine, univ. Badji Mokhtar. Annaba. Pp : 31.
- (15) P. Faure, (2011/2012), Biochimie métabolique, Université Joseph Fourier – Grenoble, 1,5-7.

- (16) K. Bouhadjera, (2005), Thèse de doctorat, Université Abou BekrBelkaid.
- (17) D. Zerguine, (2017), Thème de master 'Etude phytochimique de la plante Marrubium vulgare L et l'effet des extraits issus de la plante sur les calculs rénaux' Université Larbi Tébessi-Tébessa. Pp : 04.
- (18) S. berrada, (05. 5 et 6 mai 2009), Biochimie appliquée dans les filières sbssa. Les glucides : structure, propriétés et applications. Technologiques. Les polysaccharides. Biotechnologies, académie de Montpellier. Pp : 01.
- (19) A. Bouakal, (2014), Mémoire de master. Chimie organique et matériaux organiques. Université de Tébessa.
- (20) D. Zerguine, (2017), Thème de master « Etude phytochimique de la plante Marrubium vulgare L et l'effet des extraits issus de la plante sur les calculs rénaux » Université Larbi Tébessi-Tébessa. Pp : 05.
- (21) J. Macheix, A. Fleuriet, C. Jay-Allemand, Lausanne, (2005), Presses polytechniques et Universitaires romandes, 06,07.
- (22) J.W. Erdman, J.D. Balentine, L. Arab, G. Beecher, J.T. Dwyer, J. Folts, J. Harnly, P.Hollman, LC. Keen, G. Mazza, M. Messina, A. Scalbert, J. Vita, G. Williamson, J. Burrowes, Nutrition, (2007), 137, 718 -737.
- (23) V.P. Emerenciano, K.O. Barbosa, M.T. Scotti, M.J.P. Ferrero, (2007), Brazilian Chemical Society, vol 18(5), pp. 891-899.
- (24) K.R. Narayana, (2001), M.S. Reddy, M.R. Chaluvadi, D.R. Krishna, Indian journal of pharmacology, 33, 2-16.
- (25) V. Paolini, Ph. Dorchies, H. Hoste, Alter. Agri, (2003), 17-19.
- (26) J. Bruneton, (1999), « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentation », 3ème Ed, Lavoisier, Paris, , 199-388-1120.
- (27) J.C. Gaignautl, D. Bidet, M. Gaillard, J. Perronnet, (1997), Stéroïls et stéroïdes, Paris, 1-31.
- (28) A. Bahar, (2007), Chemistry of natural products, 2, 1-26.
- (29) S. Rahal, (2004), Chimie des Produits Naturels et des Etres Vivants, 39,39-44.
- (30) W. Klyne, N.D. Tame, (1966, 13), « La chimie des stéroïdes », Gauthier-Villars, Paris,
- (31) J.C. Donald et S.H. Gearge, (1968), « Chimie organique », 2ème Edition, Gautier Villars, Paris.
- (32) S. Youcef, B. Lakhdar, (2014), Université Mohamed Boudiaf - Oran.

- (33) M. Wichtel, R. Anton, (1999), « Plantes thérapeutiques : tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques », Ed Tec et Doc, Paris.
- (34) J.L. Salle, J. Pelletier, (1991), « Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie », Ed Frison-Roche. Pp : 19-45.
- (35) M. Paris, M. Hurabielle, (1981), « Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome », Ed,Masson . Pp : 339.
- (36) W.S. Judd, C.S. Campbell, E.A. Kellogg, P.F. Stevens,(2002), « Botanique systématique, Une perspective phylogénétique », Iéreed, Boeck Université, Paris . 383.
- (37) T.N. Kaipnazarov, K.K. Uteniyazov, Z. Saatov, (2004), Institute of soil science and plant cultivation. Pp: 82.
- (38) F-G. Robinet, (1951), Thèse de Docteur, Ecole Polytechnique Fédérale, Zurich (Suisse).
- (39) J. Bruneton, (1993), « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, Techniques et Documentation », 2ème Ed Lavoisier. Paris. 274-915.
- (40) R. Seghiri, (2009), Thèse de doctorat, Université Mentouri – Constantine.
- (41) P. Iserin, Masson M. et Restellini J.P, (2001), Encyclopédie des plantes médicinales: Identification, préparations, soins, Larousse, Paris. Pp:10,14-17, 21,128.
- (42) A. Lhuillier; (2007), Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: agauriasalicifoliahook.f ex oliver, agauriapolyphyllabaker (ericaceae), tambourissatrichophyllabaker (monimiaceae) et embeliaconcinabaker (myrsinaceae), Toulouse, France.
- (43) A.Gurib-Fakim; (2006), Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow, *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93
- (44) M. Abdelaziz ; 'Efficacité anticorrosive des extraits de la plante *Pituranthos scoparius* par la méthode gravimétrique : Etude comparative. Pp : 1.
- (45) G. Mahuzier, (1978), Méthodes de separation, ed. Maçon.
- (46) H.A. Hesham et al, (2016), Techniques for Extraction of Essential Oilsfrom.
- (47) B .Lwiza, (2022), TP « de méthodes d'extraction » Master 01 Chimie produit naturel.
- (48) Z. Cheraiet, (2022), « cours de pharmacognosie et photochimie » Master 02 Chimie produit naturel.
- (49) *Dictionnaire de la langue française*, (1989), lexis, Paris, Larousse, (1^{re} éd. 1979) (ISBN 2-03-320211-9). Pp : 2. MACERER.
- (50) *Dictionnaire de l'Académie française*, (2005), t. 2, Paris, Imprimerie nationale/Fayard, éd.

- (51) M.I. Melecchi, M. M. Martinez and F.C. Abad, P.P.Zini, (2002), Chemical composition of *Hibiscus tiliaceus* 1. Flowers: A study of extraction methods. *J. Sep. Sci.* 25, 86-90.
- (52) N. Bouzouita and al, *Oll Res*, (2005), 17, 584.
- (53) V. Toulemonde, (1995), Cinétique d'extraction liquide-liquide du nitrate d'uranyle et des nitrates d'actinides (III) et de lanthanides (III) par des extractions a fonction amide, thèse de doctorat, Université de Paris VI. Pp : 15.
- (54) N. Venturini, (2012), Contribution chimique a la definition de la qualite : exemples des spiritueux de myrte (*Myrtus Communisl.*) et de cedrat (*citrus medical*) de corse, thèse de doctorat en chimie Université de corse-pascal Paoli. Pp : 12-13.
- (55) H.A. Hesham et al, (2016), Techniques for Extraction of Essential Oils from Plants: A Review, *Australian journal of basic and applied science*. Pp.: 119-120.
- (56) (2001), Commission des Communautés Européennes, propositions de la commission en matière de lutte contre la résistance antimicrobienne, Bruxelles, vol 885.
- (57) K.Atmania, (2014), Thème de master « séparation et purification des composés d'une fraction méthanoïque de la plante *Haloxylon scoparium* » Pp : 33-35.
- (58) D .Helmut, (1969), chromatographie sur gel, 25-27.
- (59) Stage Mafpen, (1998), Des cours en chromatographie. Lycée Louis Vincent Metz.
- (60) J.P. Sine, (2003), Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques cours et exercices, Ellipses éditions marketing S A. Pp : 99-101.
- (61) L. Latifou, (2005), Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées des plantes béninoises. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur de Strasbourg.
- (62) G. Vernin, (1970), La chromatographie en couche mince, *Techniques et application en chimie organiques*, Dunod, Paris.
- (63) A. Boutiti, Etude phytochimique de l'espece *globularia*, thèse de Magister en sciences, Université de Constantine. Pp : 18.
- (64) S. Ramdani et al, (2003), Détermination simultanée de l'aluminium et du fer par spectrophotométrie dérivée à l'aide de la méthode Zero- Crossing, mémoire ingénieur, Université A. M Bejaia.
- (65) Meyer et Denier, (1996), spectroscopie pratique dans le domaine du visible et de l'ultraviolet, *Bull. Un. Phys*, vol 784. Pp : 895- 908.
- (66) Description de la plante par internet.
- (67) F .Baghloul, (2007), Caractérisation chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle du romarin. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de magistère en biochimie appliquée, option environnement et santé. Université Larbi Tebessi - Tébessa. Pp : 39,60.

- (68) G. Guillaume. Et M. Chien, (1987), Pharmacopée et médecine traditionnelle chinoise : plantes chinoises- plantes occidentales. Edition des IRIS, France. Pp : 18.
- (69) British pharmacopoeia, (2007), CD - ROM version 11.0, London.
- (70) M. Javillier, M. Polonvski, P. Boulanger, M. Lemoigne, J. Roche, R. Wurmser; (1959), Traité de Biochimie Générale, tome I, éd. Masson, 1309-1359.
- (71) G. Richter; (2001), Métabolisme des végétaux, éd. Romandes, 306-454.
- (72) K. Alli, (2012), thèse doctorat « Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien : *Pituranthos scoparius*, *Rantherium adpressum* et *Traganum nudatum* » Université de Constantine Pp :83-88.
- (73) N. Gherraf; (1997), Reinvestigation of Alkaloid content of *peganunharmala*, mémoire de magister, Université de Guelma 27.
- (74) W. Heller et H. Geiger ;(1988). The Flavonoids, Advances in Research since 1980, éd. J. B. Harborne, Chapman and Hall, London, 399-425.
- (75) B. Sameh, (2022), tp de 'test le Principe actif' Master 02 Chimie produit naturel.
- (76) I.F.F. Benzie, S J.J. Tain; (1996), the ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power, *ehe FRAP essay Anal Biochen.* 239, 70-76
- (77) J.F. Lesgerds; (2000), Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme aspects chimiques et biochimiques, *thèse de doctorat Université d'Aix Marseille.*311.Pp :85.
- (78) K. Benwqhi; Contribution à l'étude des flavonoïdes dans la plante cynodon Dactylon-L chiendent, *mémoire de magister. Université d'Ouargla.* Pp : 15 – 17.
- (79) J.F. Lesgerds; (2000), Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme aspects chimiques et biochimiques, *thèse de doctorat Université d'Aix Marseille.*311.Pp :86.
- (80) M. Perry. Herboristerie, (2013), Enquete Sur Les Principales Demandes A L'officine. University De Lorraine.
- (81) M. Oyaizu, (1986), Studies on products of browning reaction Ant oxidative activities of products of browning reaction prepare from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition. 44, 307-315.
- (82) V.L.Singleton. ET J.A. Rossi, (1965), Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. American Journal of Technology and Viticulture. 16, 144-153.
- (83) J. De Graeve, F. Berthou, M. Prost, (1985), Méthodes Chromatographiques Couplées à la spectrométrie de masse, *Ed. Masso Paris.*

(84) W. Brand Williams, C. Berset, M.E. Cuvelier; (1995), Use of free radical method to evaluate antioxidant activity *Lebens.Wissen. U. Tech*, 28-28-30.



Université Larbi Tébessi- Tébessa
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département de *science de la matière*
Filière : *chimie*
Année universitaire 2021/2022



Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
(A joindre obligatoirement avec le mémoire)



Je, soussigné(e)

Nom et prénom : *Bouamra Imer*

Régulièrement inscrit (e) : *Master*

N de carte d'étudiant : *1F 1734022268*

Année universitaire : *2021/2022*

Domaine : *chimie produit naturelle*

Filière : *chimie*

Spécialité : *chimie produit naturelle*

Intitulé : *Etude des propriétés d'une fraction retenue de la plante Salvia rosmarinus cultivée*

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité, je certifie également que je n'ai ni copié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité de plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de refaire sur un sujet différent.
- L'exclusion d'une année de Master.
- L'exclusion définitive.

2022 جويلية 20

Fait à Tébessa, le :

Signature de l'étudiant (e)

[Handwritten signature]
[Red circular stamp]

[Handwritten signature]
[Red rectangular stamp]



جامعة العربي التبسي - تبسة
Université Larbi Tébessi - Tébessa

Université Larbi Tébessi- Tébessa

Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie

Département de

Filière :

Année universitaire 2021/2022



جامعة العربي التبسي - تبسة
Université Larbi Tébessi - Tébessa



Déclaration sur l'honneur de non-plagiat
(A joindre obligatoirement avec le mémoire)

Je, soussigné(e)

Nom et prénom : *Hajida Boumai*

Régulièrement inscrit (e) :

N de carte d'étudiant : *161634023133*

Année universitaire : *2022*

Domaine : *Sciences de la matière*

Filière :

Spécialité : *Chimie produit Naturel*

Intitulé :

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité, je certifie également que je n'ai ni copié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets.

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité de plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de refaire sur un sujet différent.
- L'exclusion d'une année de Master.
- L'exclusion définitive.

2022 20

Fait à Tébessa, le :

Signature de l'étudiant (e)

من رئيس المجلس الأعلى
رئيس المجلس الأعلى
مضام السيده بن
كتيب راسن



Su B