



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Med Khider Biskra

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

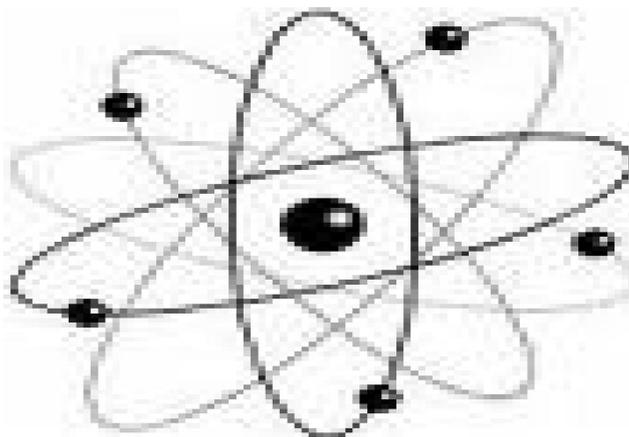


Département des Sciences de la Matière

Domaine des Sciences de la Matière

Filière de Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique



Mémoire de fin d'étude en Master

Intitulé :

**Etude phytochimique et évaluation de l'activité
antibactérienne d'une labiée *rosmarinus officinalis***

Présenté par :

Madjour Sassia

Devant le jury composé par :

Fettah Asma

maitre-assistante classe.A

Présidente

Khamouli Saida

maitre-assistante classe.A

Rapporteur

Laraoui Habiba

maitre-assistante classe B

Examinatrice

Année Universitaire

2013-2014

Remerciement

A

vant tout, mes remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant » de m'avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

Au moment où s'achève ce travail, permettez-moi de remercier du fond du cœur, tous ceux et toutes celles qui, pendant cette période de thèse, m'ont dirigée, soutenue, aidée et encouragée.

Tout d'abord, je tiens particulièrement à remercier mon encadreur M^{me} Khamouli Saida maitre assistante. A à l'université de Biskra qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail.

J'aimerais également remercier Monsieur Mellekmi Nadjib Docteur en chimie à l'université de Biskra pour leurs encouragements ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse.

Je remercie vivement M^{me} Fettah Asma maitre assistante. A à l'université de Biskra pour leur conseil très précieux et leur aide pendant de réaliser ce travail.

Mes remerciements vont aussi aux membres de jury M^{me} Fettah Asma et Laaroui Habiba de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail.

Je remercie tous les membres de laboratoire de bactériologie de l'hôpital Bachir Ben Nacer surtout le médecin « Trichine » et tous l'équipe de laboratoire de chimie organique pour leur aide précieuse.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation et au bon déroulement de ce travail.

Enfin je veux dire merci à tous les enseignants du département de chimie l'université de Biskra pour l'aide pendant ma formation d'étude.

Dédicace

Je remercie dieu tout puissant qui ma permet d'arriver à ce but.

Je dédié ce modeste travail à deux personnes les plus chers à mon cœur :

A mes très chers parents qui ont sacrifié de leur existante pour bâtir la mienne

Qui par leur précieux conseils et contient ont sa me guider ver la voix
de la réussite.

A mes chers frères: *Adel, Abdelfatteh, Said*

A mes chères sœurs : *Soumia, Siham, Hasna, leila*

A mon très chère amie Dalila pour leur aidée et encouragée pendant cette
Période de thèse.

A tous mes amies : *Amel, Fatouma, Wafa, Zohra, Gamra, Naima.*

A toute promotion chimie pharmaceutique 2014.

A tous ceux que j'aime et que je respecte.

REMARCIEMENT

DEDICACE

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Travaux intérieurs

I. la plante sélectionne Rosmarinus officinalis.....	1
I.1.Origine du nom.....	1
I.2.Description botanique.....	1
I.3.Classification.....	1
I.3.1.Classification classique.....	1
I.4.Distribution géographique.....	2
I.5.Principes actifs.....	2
I.6.Composition chimique de romarin.....	2
I.7.Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin.....	3
I.8.Utilisation.....	3

CHAPITRE II : Les huiles essentielles

II. Les huiles essentielles.....	5
II.1. Historique.....	5
II.2.Définition les huiles essentielles.....	5
II.3.Localisation d'une huile essentielle dans la matière végétale.....	6
II.4.Propriétés physiques et chimiques des huiles essentielles.....	6
II.5. Les techniques d'extraction.....	10
II.5.1.La distillation.....	10
II.5.2.Extraction par micro-ondes.....	12

II.5.3.Extractions par les solvants et par les graisses.....	13
II.5.4.Extraction au CO2 supercritique.....	13
II.6 méthodes d'analyses des huiles essentielles.....	15
II.6.1.méthodes chromatographiques.....	15
II.6.1.1.chromatographie sur couche mince (CCM).....	15
II.6.1.2.Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).....	15
II.6.2.méthodes spectroscopiques.....	15
II.6.2.1.spectroscopie Infrarouge.....	15
II.6.2.2.spectrométrie(RMN).....	15
II.7.Rôle des huiles essentielles.....	16
II.7.1. Rôle physiologique.....	16
II.7.2.Rôle thérapeutique.....	16
II.8.Effet thérapeutique des huiles essentielles.....	17
II.9.Activité biologique.....	20
II.10. Domaine d'application des huiles essentielles.....	20
II.10.1.Industrie cosmétiques.....	20
II.10.2.Industrie pharmaceutique.....	20
II.10.3.Industrie agro-alimentaire.....	20

CHAPITRE III : Les flavonoïdes

III. Les flavonoïdes.....	21
III.1.Découverte les flavonoïdes.....	21
III.2. Définition.....	21
III.3. Structure.....	22
III.4.Origine biosynthétique.....	22
III.5.Classification.....	24
III.6.Localisation.....	24
III.7.Distribution.....	25

III.8. Propriétés Physico-chimiques des flavonoïdes.....	26
III.8.1. Solubilité et l'extraction.....	26
III.8.2. Dosage.....	27
III.9. Biodisponibilité des flavonoïdes.....	27
III.10. Consommation des flavonoïdes.....	27
III.11. Distribution les flavonoïdes dans les plantes.....	27
III.12.Rôles des flavonoïdes chez les plantes.....	28
III.13. Propriété des flavonoïdes.....	28
III.13.1. Propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes et effets sur Le système immunitaire.....	29
III.13.2. Propriétés antivirales et antibactériennes.....	29
III.13.3. Propriétés anti-cancérogènes.....	30
III.14. Méthodes et techniques de purification.....	31
III.14.1. Chromatographie sur colonne (C. C).....	31
III.14.2. La chromatographie sur papier (C.P).....	32
III.14.3. La chromatographie sur couche mince (CCM).....	32
III.15. Les méthodes spectroscopiques.....	32
III.15.1. La spectroscopie UV.....	32
III.15.2. La spectrométrie de masse (SM).....	33
III.16. L'utilisation thérapeutiques des flavonoïdes.....	33

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV : Matériels et méthodes

IV.1. L'huile essentielle.....	35
IV.1.1. Matériel végétal.....	35
IV.1.2. Procédé d'extraction.....	35
IV.1.2.1. L'hydrodistillation.....	35
IV.1.2.2. Extraction liquide-liquide.....	35
IV.1.3. Analyse chromatographique sur couche mince.....	37
IV.1.3.1. Principe.....	37
IV.2. Extraction des flavonoïdes.....	38
IV.2.1 .Principe.....	38

IV.2.2.Extraction solide-liquide(Macération).....	38
IV.2.3.Extraction liquide-liquide.....	39
IV.2.3.1.Affrontement par éther de pétrole.....	39
IV.2.3.2.Affrontement par acétate d'éthyle.....	39
IV.2.3.3.Affrontement par MEC.....	39
IV.2.4.Analyse chromatographique sur couche mince(CCM).....	41
IV.3.Etude de L'activité antibactérienne.....	42
IV.3.1.Les souches testées.....	42
IV.3.2.Méthodes utilisées.....	44
IV.3.2.1.Méthode de dilution.....	44
IV.3.2.2.Méthodes des disques.....	44

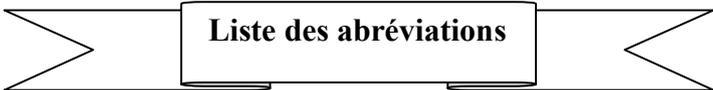
CHAPITRE V : Résultats et discussion

V.1. Extraction de l'huile essentielle.....	46
V.1.1. Teneur et propriétés.....	46
V.1.2.Analyse Chromatographique d'huile essentielle par CCM.....	46
V.2.Extraction des flavonoïdes.....	48
V.2.1.Chromatographie analytique sur couche mince.....	49
V.3. Résultats du test du pouvoir antibactérienne.....	51
V.3.1. Activité antibactérienne d'huile essentielle.....	51
V.3.2. Activité antibactérienne des flavonoïdes.....	51

CONCLUSION GENERALE

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES

Liste des abréviations



Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : degré celcius

UV : ultra-violet

HPLC : Chromatographie à haute performance.

Mg : milligramme

Kg : Kilogramme

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide rébo nucléique

Gp120 : Glycoprotéine

DMBA:(7,12 diméthylbenz (a)anthracène

NMU : (Nnitrosométhylurée)

ODBC : (Ormitine Décarboxylase)

TPA:(12-0-tétradécanoylphorbol-13-acétate)

CC : Chromatographie sur colonne.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CPG : Chromatographie en phase gazeuse.

SO: Superoxyde

MI : millilitre.

G : Gramme.

V : Volume.

H : heure.

MEC : Méthyle éthyle cétone.

S : système.

H.E : Huile essentielle

EtOH : éthanol.

mm : millimètre.

min : minute

FID : détecteur à ionisation de flamme

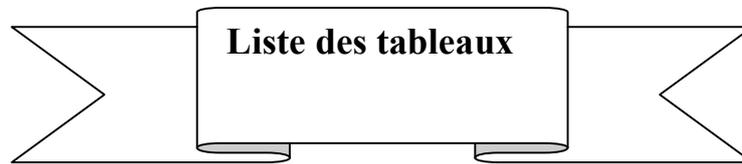
Liste des figures

Liste des figures

Figure I.1: Photo de <i>Rosmarinus officinalis</i>	1
Figure I.2: <i>Rosmarinus officinalis</i> . Djebel Antar, Béchar.....	2
Figure II.3: L'hydrodistillation traditionnelle.....	11
Figure II.4 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.....	12
Figure II.5: Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes.....	13
Figure II.6: Schéma de principe d'extraction par CO ₂ supercritique.....	14
Figure III.7: Squelette de base des flavonoïdes.....	22
Figure III.8 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	23
Figure III.9: Structures des différentes classes des flavonoïdes.....	24
Figure IV.10: Montage d'hydrodistillation (extraction d'huile essentielle).....	35
Figure IV.11 : Extraction liquide-liquide par dichlorométhane.....	36
Figure IV.12: Evaporation de solvant par rotavapor.....	36
Figure IV.13: Macéra de romarin.....	38
Figure IV.14 : Extrait ethanologique	38
FigureIV.15 : Evaporation du solvant	38
Figure IV.16 : Extraction par éther de pétrole.....	39
Figure IV.17: Extraction par acétate d'éthyle	39
Figure IV.18: Extraction par MEC.....	39
Figure IV.19: protocole d'extraction les flavonoïdes.....	40
Figure IV.20: Laboratoire de bactériologie de l'hôpital « Bachir Ben-Nacer ».....	42
Figure IV. 21 : Protocole de dilution des extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i>	44
Figure V.22 : huile essentielle de romarin.....	46

Figure V.23: CCM Par (Dichloromethane- Méthanol) (5/5, V/V).	47
Figure V.24: CCM d'H.E par (éther de pétrole- méthanol) (6/4, V/V).....	47
Figure V.25: CCM d'H.E par (toluène-acétate d'éthyle) (9/1) (V/V).....	47
Figure V.26 : CCM dans S4 (Dichlorométhane-hexane). (9/1, V/V).....	47
Figure V.27 : analyse des chromatogrammes sous UV.....	49
Figure V.28 : CCM dans S1 (N-butanol/acétate d'éthyle/H ₂ O, 6/15/25.....	49
Figure V.29: CCM dans S2 (toluène, EtOH, MEC) (3/3/4).....	49
Figure V.30 : CCM dans S1 (H ₂ O/butanol/EtoH/acide acétique) (50/20/25/2).....	50
Figure V.31: CCM dans S2 (H ₂ O/CH ₄ OH/MEC) (7/3/1).....	50
Figure V.32 : CCM dans S3 (toluène/EtoH/MEC) (4/3/3).....	50
Figure V. 33: Les zones d'inhibition de l'huile essentielle testée.....	51
Figure V. 34: Les zones d'inhibition de l'extrait MEC testée.....	52
Figure V. 35: Les zones d'inhibition de l'extrait EtoAC testée.....	53
Figure V.36 : Histogramme représenté les diamètres des zones d'inhibition des deux extraits.....	54

Liste des tableaux



Liste des tableaux

Tableau II.1 : propriétés thérapeutiques des familles biochimiques des huiles essentielles.....	7
Tableau II.2 : Certaines huiles essentielles et leurs utilisations thérapeutiques.....	17
Tableau III.3 : Distribution alimentaire des principales classes des flavonoïdes.....	25
Tableau IV.4 : les systèmes utilisés pour l'huile essentielle de romarin.....	37
Tableau IV.5 : les systèmes utilisés pour l'extrait d'acétate d'éthyle.....	41
Tableau IV.6 : Les systèmes utilisés pour l'extrait de MEC.....	41
Tableau V.07 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de Rosmarinus officinalis.....	46
Tableau V.08 : Comparaison des Rfs d'huile essentielle de rosmarinus officinalis.....	48
Tableau V.09 : Caractéristiques des extraits de rosmarinus officinalis.....	49
Tableau V.10 : Comportement chromatographique des extraits (acétate d'éthyle et MEC) de Rosmarinus officinalis sur plaque de silice dans le système solvant (toluène/éthanol/méthyle éthyle cétone) (4/3/3).....	50
Tableau V.11 : Diamètre (mm) des zones d'inhibition de l'huile essentielle de romarin.....	52
Tableau V.12 : Diamètre (mm) des zones d' inhibition de l'extrait MEC.....	52
Tableau V.13 : Diamètre (mm) des zones d' inhibition de l'extrait d'EtoAC.....	53

Introduction général

Introduction générale

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

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales folklorique. Ces plantes représentent une nouvelle source des composés actifs. [1]

Le romarin (*Rosmarinus Officinalis*) fait l'objet des récentes recherches dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires. C'est une herbe aromatique de la famille des Labiées, appréciée pour ses propriétés aromatiques, anti-oxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, emménagogues et anti-tumorales, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle. [2]

Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude des molécules anti-oxydantes et antimicrobiennes comme les vitamines, les caroténoïdes et les polyphénols.

En effet, les métabolites secondaires font et reste l'objet de nombreuses recherches in vivo comme in vitro, notamment la recherche des nouveaux constituants naturels tels les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles. [1]

Les flavonoïdes constituent un groupe des produits naturels appartenant à la famille des polyphénols, largement représentés dans la quasi-totalité des plantes, faisant partie intégrante de notre nourriture quotidienne. [2] Ils possèdent potentiellement des activités biologiques, anti- inflammatoires, anti-cancérigènes, antimicrobiennes et anti-oxydantes.

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines des composés, principalement terpéniques. Les terpènes, molécules construites à partir d'entités isopréniques, constituent une famille très diversifiée, tant au niveau structural qu'au niveau fonctionnel. Dans les huiles essentielles, on rencontre généralement des mono et des sesquiterpènes (possédant respectivement 10 et 15 atomes de carbone) et plus rarement des diterpènes (20 atomes de carbone) ainsi que des composés linéaires non terpéniques et des phénylpropanoïdes. [3]

Ce travail vise à une étude phytochimique et activité antibactérienne de la plante *Rosmarinus officinalis*.

Notre travail sera donc réparti en Cinq chapitres, initié par une recherche bibliographique où nous apportons dans le premier chapitre la plante sélectionnée: *Rosmarinus officinalis*. Dans le deuxième chapitre nous avons développé un abrégé sur les huiles essentielles. Le troisième chapitre nous aborderons les différentes connaissances bibliographiques sur, les flavonoïdes.

La partie pratique est subdivisée en deux chapitres, le premier (4ème chapitre) présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail (Extraction, macération, méthodes chromatographiques et l'activité antibactérienne des huiles essentielles et du contenu extrait flavonoïque à partir des feuilles de *rosmarinus officinalis*).

Enfin le deuxième (5ème chapitre) discute les résultats obtenus dans cette étude.

Partie bibliographique

Chapitre I : **Etude phytochimique sur la plante**

I.1.Origine du nom : le mot romarin (*Rosmarinus*) dérive du latin

«Ros» rosée

«Marinus» : marin ou de marin

I.2.Description botanique :

Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées, peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur, il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril – mai. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches *Rosmarinus officinalis albiflorus*). Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base. Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tetrakène (de couleur brune) [4].



Figure01: Photo de *Rosmarinus officinalis* [4].

I.3.Classification :

I.3.1.Classification classique :

Règne : Plantae

Division : Magnoliopta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *Rosmarinus officinalis*

I.4. Distribution géographique :

Le romarin se trouve dans toutes les contrées mondiales de l'Europe, plus particulièrement sur le pourtour méditerranéen, de préférence dans les lieux secs et arides, exposés au soleil, à l'état sauvage il se trouve sur des sols calcaires.



Figure02: Rosmarinus officinalis . Djebel Antar, Béchar [5].

I.5. Principes actifs :

Les principaux constituants du romarin responsables des différentes propriétés sont :

- **Les acides phénoliques :** acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique [6].
- **Les flavonoïdes :** genkwanine, cirsimaritrine [6], ériocitrine, hespéridine, diosmine, lutéoline [7], apigénine [8].

I.6. Composition chimique de romarin :

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

En plus de l'huile essentielle on trouve dans le romarin : 2 à 4% de dérivés triterpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol ; des lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadial , des acides phénoliques , des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque , des acides gras organiques :

L'acide citrique, glycolique et glycérique, des stérols, de la choline, du mucilage [9] et de la résine [10].

Le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence des flavonoïdes, des tannins et des saponines, et l'absence des alcaloïdes détecté dans l'extrait aqueux. Les flavonoïdes détectés par la chromatographie sur couche

mince (CCM) sont la quercétine et le kaempférol [11].

I.7. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin :

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

- Anti spasmodiques, diurétiques, hépatoprotectrices, soulagement des désordres respiratoires [12].
- Antibactériennes, antimutagéniques, antioxydantes, chémopréventives [13].
- Anti-inflammatoires, antimétastatiques [14].
- Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires [15] et la prolifération des tumeurs cutanées [16].

D'autres études montrent que les composants du romarin inhibent les phases d'initiation et de promotion de cancérogénèse [17]. **Carnosol** du romarin possède une activité antivirale contre le virus du SIDA (HIV) [18] alors que l'acide carnosique a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1 [19].

I.8. Utilisation :

Le romarin est souvent cultivé pour son huile aromatique et considérée utile pour contrôler l'érosion du sol. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique [11].

- ✚ Dans le Mexique et le Guatemala, il est employé principalement comme remède de post-partum et traite également les problèmes respiratoires et les infections de la peau.
- ✚ En Espagne, l'huile du romarin est très populaire pour beaucoup de genres de douleur, y compris les douleurs musculaires rhumatismales et traumatiques [20].
- ✚ Au Maroc, l'infusion des feuilles est utilisée comme apéritif, cholagogue, stomachique et emménagogue. En usage externe, les cataplasmes faits avec les compresses de la décoction concentrée sont appliqués comme vulnéraires. La poudre des feuilles est saupoudrée comme cicatrisant et antiseptique.

La fumigation du romarin est indiquée pour calmer les maux des dents. Depuis quelques décennies, l'huile essentielle du romarin est utilisée en massage sédatif dans les rhumatismes et la sciatique. Les feuilles séchées servent à conserver la laine de l'attaque des mites [9].

- ✚ En Turquie, la décoction de feuilles du romarin a été traditionnellement employée pour traiter les diabétiques [21].

L'infusion des feuilles est tonique, antitussive, carminative, antiasthmatique, fébrifuge, et anti-paralytique [22]. On le recommande dans les asthénies, les troubles du foie, contre les

dyspepsies atoniques ainsi que contre les céphalées et les migraines d'origine nerveuse, les vertiges et les troubles de mémoire [23].

Il a été également employé en tant qu'analgésique, antiépileptique, diurétique, [24] ainsi que pour traiter l'ictère et sa fumée a été employée contre la peste [20].

L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, parfums, désodorisants, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires [22].

Chapitre II: Les huiles essentielles

II. Les huiles essentielles**II.1. Historique :**

L'utilisation des traces d'huiles essentielles destinées à rééquilibrer physiquement et psychiquement l'individu remontent à plus de 3000 ans [25]. Toutefois, vers les débuts du 15^{ème} siècle, l'utilisation des huiles essentielles a subi une chute remarquable suite à la découverte, de la pénicilline [25].

Dans les années 50, l'esthéticienne, biochimiste française Marguerite Maury a introduit le concept des huiles essentielles en massage en créant les premiers services d'aromathérapie en Europe. Ainsi, apparaît une nouvelle exigence relative aux choix des végétaux, aux modalités de cueillette et aux techniques d'extraction et de conservation [26]. Finalement, la médecine aromatique introduite par les auteurs Penel et Franschomme [25]. Qui, il n'y a pas si longtemps, ont étudié au laboratoire, des huiles essentielles issues de différents végétaux, pour dresser un tableau assez précis qui sert actuellement de référence assez importante pour les chercheurs [25]. De nos jours, l'aromathérapie s'impose comme l'une des thérapies complémentaires la plus performante non seulement en matière de santé mais également en matière de beauté et d'esthétique par les soins naturels qu'elle peut apporter à notre peau et à notre corps.

II.2. Définition les huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydro distillation [27], par pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire [28]. Elles sont très utilisées dans l'industrie des produits cosmétiques, pharmaceutiques et agro-alimentaire [29]. Les huiles essentielles se retrouvent dans des glandes minuscules situées dans différentes parties de la plante aromatique : les feuilles, les fleurs, les fruits, les graines, l'écorce et pour certaines plantes dans les racines. Plus de 2000 espèces de plante sont riches en huiles essentielles ; elles sont réparties sur 60 familles dont les principaux sont: Lauraceae, Labiatea, Umbelliferae, Rutaceae, Compositae, Myrtaceae et les Pinaceae [30].

Les huiles essentielles des plantes ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues [31].

II.3. Localisation d'une huile essentielle dans la matière végétale :

Les huiles essentielles se trouvent dans des glandes minuscules situées dans les différentes parties de la plante aromatique [32].

- Dans les feuilles comme le basilic.
- Dans les fleurs comme la rose.
- Dans les fruits comme le citron.
- Dans les graines comme la coriandre.
- Dans l'écorce comme la cannelle.
- Dans les racines pour certaines plantes.

Les huiles essentielles sont souvent localisées sur ou à proximité de la surfaces de la plante. Si l'on écrase la feuille (ou partie concernée) d'une plante aromatique, des petites poches vont se briser laissant s'échapper la substance aromatique. C'est pour cette raison que la récolte se fait au meilleur moment en fonction des substances que l'on veut extraire et des conditions extérieures (climat, période de l'année ...), car la plante ne développe pas les mêmes composants selon la période de l'année.

II.4. Propriétés physiques et chimiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont volatiles ce qui les différencient des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées, leur densité est en générale inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé, solubles dans les solvants organiques usuels [32], elles sont liposolubles, entraînable à la vapeur d'eau. En ce qui concerne leurs propriétés chimiques [33], les huiles essentielles sont constituées de différents composants : Terpènes, aldéhyde esters, cétones, lactones ...

Dans le tableau **01** figurent quelques propriétés biologiques et thérapeutiques des familles biochimiques constituant les huiles essentielles :

Tableau 01 : propriétés thérapeutiques des familles biochimiques des huiles essentielles [33].

Familles biochimiques	Propriétés biologiques et thérapeutiques
Monoterpènes	Stimulant du système immunitaire .Action révulsive sur la peau, utiles en cas de douleurs localisées : ils sont donc antalgiques à action percutanée. Leur utilisation doit être limité dans le temps sinon ils deviennent dermocaustiques et agressif pour les muqueuses
Monoterpénols	Composés anti-infectieux : bactéricides, Virucides et fongicides à utiliser parallèlement aux phénols selon les cas lors d'infection ; également excellents immunostimulants. Moins violents que les phénols, ils sont de remarquables toniques généraux, plus spécifiquement neurotoxiques. Moins hyperthermisants et hypertensif, ils n'ont pas leur toxicité : non dermocaustiques, non hépatotoxiques.
Sesquiterpènes	Légèrement hypotenseur, calmants et anti-inflammatoires. Les azulènes sont spécifique donnant une couleur bleue sombre aux huiles essentielles ; Excellents anti-inflammatoires.
Sesquiterpénols	Bons toniques et stimulant généraux, ils peu anti-infectieux mais surtout immuno-stimulants. Les huiles essentielles contenant des sesquiterpénols agissent principalement sur le terrain d'individus.

<p>Phénols</p>	<p>Fortement anti-infectieux et immunostimulants .Ils agissent en hyper : hyperthermisants, hypertensifs.</p> <p>Toniques à faible dose ils deviennent excitants à dose plus élevée .Les phénols doivent être utilisés prudemment et temporairement car ils sont irritants pour les Muqueuses et hépatotoxiques à dose forte et Répétée. Sur la peau les phénols sont et dermocaustiques ; toujours les utiliser dilués sur une huile végétale.</p>
<p>Diterpénols</p>	<p>Régulateurs hormonaux en raison de leur structure voisine des hormones stéroïdes sexuelles humaines ; ils sont actifs même à faible dose.</p>
<p>Aldéhydes</p>	<p>Intermédiaires entre alcools et cétones .Ce sont surtout de bon anti-inflammatoires, ils agissent en hypo : calmants du système nerveux, hypothermisantet hypotenseurs. Toniques, anti-infectieux,ils peuvent irriter les muqueuses et la peau.</p>
<p>Acides</p>	<p>Les composés les plus anti-inflammatoires du règne végétal, ils sont hypothermisants, hypotenseurs. On les trouve principalement sous forme d'ester, c'est -à-dire combinés à des alcools.</p>
<p>Cétones</p>	<p>Composés très actifs physiologiquement, leur utilisation doit être bien contrôlée sinon elles deviennent rapidement toxiques. A faible dose, les cétones agissent en hypo :elles sont calemantes,sédatives,hypothermisantes.A forte dose ou répétées elles sont</p>

	neurotoxiques, stupéfiantes et épileptisantes, voire abortives.
Esters	Allient les propriétés calmantes des cétones aux propriétés toniques des alcools d'où leurs propriétés anti-spasmodiques et neurotoniques. Excellents rééquilibrant nerveux (antidépresseurs psychiques). Les esters sont très doux sur la peau et décongestionnent en cas de manifestations inflammatoires. On les utilise souvent car ils présentent peu de dangers.
Oxydes	Décongestionnants broncho-pulmonaires : mucolytiques et expectorants. Propriétés assez spécifiques selon leur formule biochimique propre. Nombreux oxydes toxiques : stupéfiants (anéthol), neurotoxiques et hépatotoxique (ascaridol), convulsivants (apiol et myristicine).
Coumarines	Neuro-sédatives, anticoagulantes. Action en hypo : Hypothermisantes, hypotensives. Les furocoumarines ne doivent pas être utilisées sur la peau avant l'exposition au soleil car elles sont photosensibilisantes. Les pyranocoumarines sont hépatotoxiques. Tout dépendra de la proportion et des autres composants qui viendront tempérer ou équilibrer l'essence. Par exemple : Lavandula Vera contient des cétones et des coumarines en faible proportion, qui sont « neutralisées » par les esters aux propriétés relaxantes très importantes.
Lactones	Agissent en hypo : hypothermisantes. Elles ont une action mucolytique plus

	puissante que les cétones.
Diones	Antispasmodique et anticoagulantes. Elles sont moins toxiques que les cétones

-Le pH ou mesure acido-basique pour les huiles essentielles est presque toujours acide, ce qui contraire le développement pathogène évoluant toujours dans des valeurs basiques (7 à 14).

-L'oxydation : ce paramètre indique la tendance ou non des cellules à s'oxyder et donc à former des radicaux libres .Or, les huiles essentielles sont presque toujours dans des valeurs réductrices s'opposant à l'oxydation (0 à 28).

-La résistivité ou résistance ionique, les huiles essentielles ont des taux très élevés de ce facteurs (résistance) [34].

II.5. Les techniques d'extraction :

II.5.1.La distillation

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure aux points d'ébullition des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100 °C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures [35]. Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydro distillation, l'hydro diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau. Beaucoup de confusions règnent autour de l'utilisation de ces trois termes. Quelques éclaircissements s'imposent donc.

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

rare exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat.

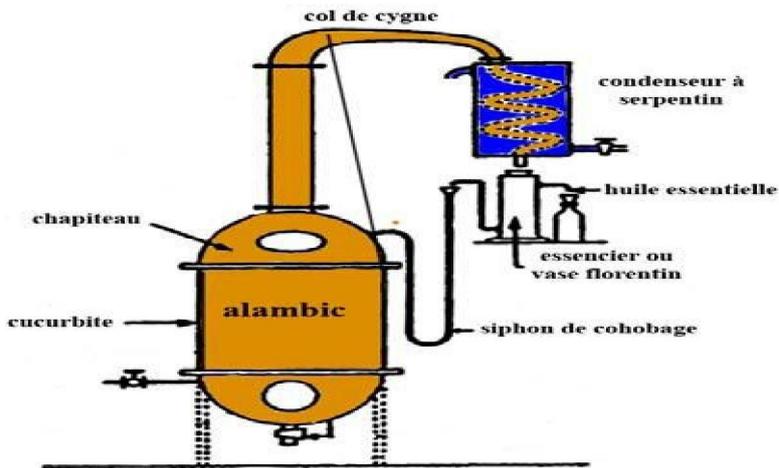


Figure03: L'hydrodistillation traditionnelle.

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

La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante [35].

Enfin, la troisième technique est l'hydro diffusion. Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (perdescendum) et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: « essence de percolation » [35 ; 36].

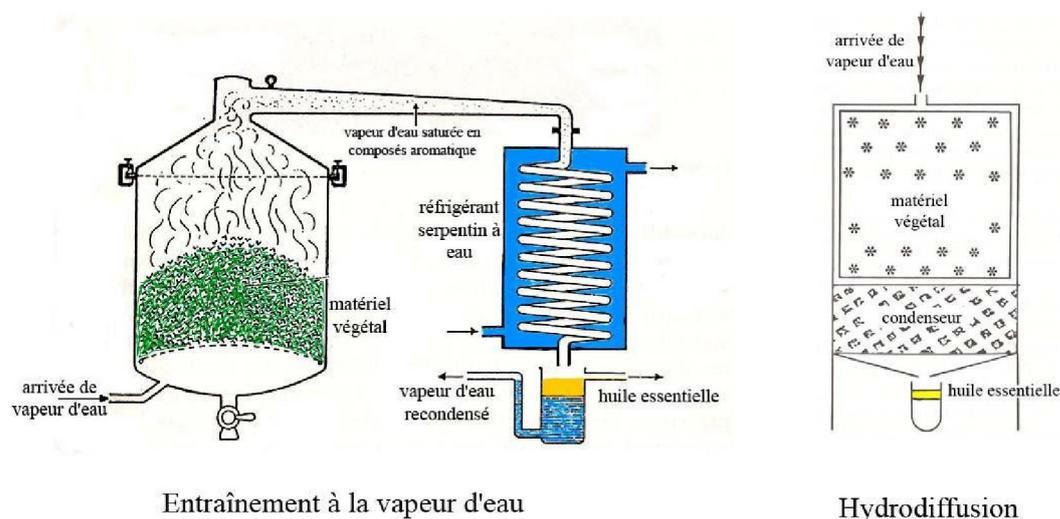


Figure 04 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante.

II.5.2.Extraction par micro-ondes :

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide. Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. En guise d'exemple, l'extraction par micro-ondes de deux kilos de *Mentha piperita* permet d'obtenir environ 1% d'huile essentielle en 15 minutes alors que deux heures d'hydro distillation sont nécessaires pour obtenir un rendement similaire à partir de la même masse de plante [37]. La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion des composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par microondes.

Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées [38; 39]. Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées [37;40].

L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être

Améliorée [41 ; 42;39].

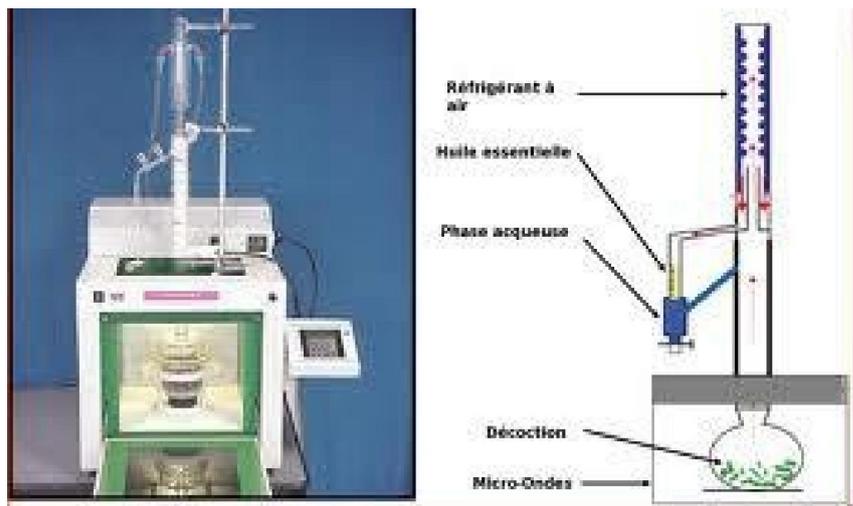


Figure 05: Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes

II.5.3.Extractions par les solvants et par les graisses :

Certains procédés d'extraction ne permettent pas d'obtenir des huiles essentielles à proprement parler mais des concrètes. Il s'agit d'extraits des plantes obtenus au moyen de solvants non aqueux. Ces derniers peuvent être des solvants usuels utilisés en chimie organique (hexane, éther de pétrole) mais aussi des graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par des corps gras) ou même encore des gaz. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre des composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres [36; 43]. Dans le cas des extraits à l'aide de corps gras, un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. La solution alcoolique ainsi récoltée est refroidie jusqu'à $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour en séparer les cires végétales qui se solidifient. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé "absolu" et sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle [44]. L'extraction à l'aide des solvants organiques pose un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutique et agro-alimentaire [45].

II.5.4.Extraction au CO₂ supercritique :

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO₂ supercritique. Au-delà du point critique ($P = 73,8\text{ bars}$ et $T = 31,1\text{ }^{\circ}\text{C}$), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un

bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. Cette technique présente énormément d'avantages. Tout d'abord, le CO₂ supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, inflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu coûteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser de résidus. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait puisqu'aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique point faible est le coût très élevé de son installation [46]. En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective aux composés odorants et ainsi obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargés en molécules non volatils. Ainsi, la température et la pression à ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est 60 °C et 60 bars [47]. Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité [48] et qui respecterait intégralement l'essence originelle de la plante.

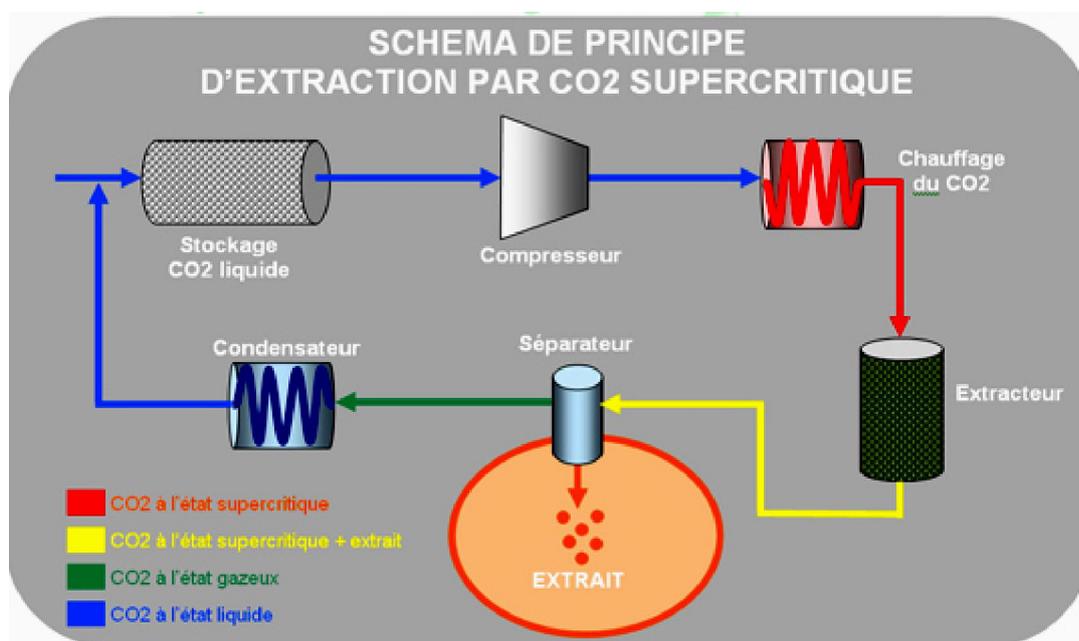


Figure 06: Schéma de principe d'extraction par CO₂ supercritique

II.6. Les méthodes d'analyses des huiles essentielles :

II.6.1. Les méthodes chromatographiques :

II.6.1.1. La chromatographie sur couche mince (CCM) :

La Chromatographie sur Couche mince ou CCM est une méthode analytique couramment utilisée dans les laboratoires de phytochimie pour la séparation et l'identification rapides des constituants d'un extrait donné. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile est un solvant ou un mélange des solvants ; qui progresse le long d'une phase stationnaire qui peut être soit une couche mince de gel de silice ; l'alumine ; ou cellulose. Celle-ci doit être uniformément étalée sur un support en aluminium, sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou sur une plaque de verre. [49]

II.6.1.2. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) :

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition [50]. C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles.

II.6.2. Les méthodes spectroscopiques :

II.6.2.1. La spectroscopie Infrarouge :

La spectroscopie IR est utilisée en générale pour identifier les groupement fonctionnels d'une molécules, cette méthode est très employée dans les laboratoires de chimie, de manière plus simple et routinier sachant que le domaine de fréquence le plus couramment utilisé s'entend de 4000cm^{-1} à 6000cm^{-1} . [49]

II.6.2.2. La spectrométrie (RMN) :

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à

la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton ^1H , le carbone ^{13}C , le phosphore ^{31}P , et l'azote ^{15}N . Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux de certains atomes (^1H , ^{13}C , etc....) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée «le spin». La technique de RMN étudie le comportement des noyaux atomiques en présence d'un champ magnétique externe. Le champ magnétique appliqué aux produits entraîne un dédoublement des niveaux d'énergie du spin nucléaire, de sorte qu'on puisse induire des transitions entre eux, suite à l'absorption d'une radiation électromagnétique adéquate. [49]

II.7.Rôle des huiles essentielles :

II.7.1. Rôle physiologique : [51] [32]

Le rôle physiologique des huiles essentielles est aujourd'hui mis en lumière par les progrès scientifiques :

1-Propriétés antiseptique :

C'est-à-dire microbicide (tue microbes et virus pathogènes) [52].

Elles s'affairement par endroit supérieur aux « antibiotiques » classiques parce qu'elles ont une action bactériolytique [52].

2-Propriétés de défloculation :

Les huiles essentielles sont défloculantes (solvants). C'est-à-dire qu'elles « lysent » collent aux mucosités visqueuses en cristallisant (noyaux durs issus des métabolismes et engendrés par les excès de viande et d'amidons, causes profondes de la plupart des maladies) [53].

3-Propriétés de diurèse :

L'huile essentielle fait fonctionner les 4 grandes émonctoires (peau avec ses 3 glandes, reins, poumons et intestins), facilitant le drainage des déchets et résidus humoraux solubles vers leurs émonctoires spécialisés.

II.7.2.Rôle thérapeutique :

Les huiles essentielles, reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques, agissant sur la personne dans sa globalité [54-55].

Les huiles essentielles possèdent des propriétés thérapeutiques variées :

- Remédient aux problèmes respiratoires.
- Diminuent la tension nerveuse [56].
- Améliorent la circulation sanguine.
- Aident le corps à traiter les impuretés.
- Soulagent la nervosité et les douleurs rhumatismales.

Il semble que les huiles essentielles extraites de certaines aromatiques ont un rôle important dans notre vie soit physiologique ou bien thérapeutique, sans oublier le rôle biologique de ces huiles (inhibiteurs des germinations et protecteurs les plantes des prédateurs insectes, champignons [57]).

II.8.Effet thérapeutique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont largement utilisées en thérapie, les effets thérapeutiques les plus répandues dans les huiles essentielles sont résumées dans le tableau 05.

Tableau 02 : Certaines huiles essentielles et leurs utilisations thérapeutiques [58].

Huile essentielle de la plante	Utilisation thérapeutique
 <p>Basilic</p>	<p>Diminue l’anxiété, améliore la concentration De la digestion, soulager les maux de tête.</p>
<p>Camomille</p>	<p>Contre la dépression et les insomnies, soulager Les problèmes de peau.</p>
 <p>Citron</p>	<p>Améliore la circulation, soulage les problèmes respiratoires.</p>
<p>Coriandre</p>	<p>Soulage la nervosité et les douleurs rhumatismales, améliorer la digestion.</p>

 <p>Eucalyptus</p>	<p>Soulage les rhumes, problèmes respiratoires, Les douleurs.</p>
<p>Fenouil</p>	<p>Améliore la digestion, soulage la constipation et les nausées, les graines sont galactogènes.</p>
<p>Jasmin</p>	<p>Soulage les dépressions, les problèmes Respiratoires, normalise la circulation et améliore la digestion.</p>
 <p>Lavande</p>	<p>Soulage les insomnies, les indigestions, les maux de tête, les douleurs musculaires.</p>
<p>Marjolaine douce</p>	<p>Diminue la tension nerveuse, la pression artérielle, les insomnies, soulage les rhumes.</p>
 <p>Menthe poivrée</p>	<p>Soulage la fatigue, les irritations cutanées.</p>
<p>Pin</p>	<p>Aide aux problèmes avec les reins, soulage les problèmes respiratoires.</p>
 <p>Rose</p>	<p>Soulage les stress, soulage les maux de tête.</p>

 <p>Romarin</p>	<p>Soulage la fatigue, les douleurs musculaires, Les problèmes respiratoires.</p>
 <p>Sauge</p>	<p>Soulage la fatigue, les problèmes respiratoires, améliorer la pression artérielle.</p>
 <p>Thym</p>	<p>Soulage la fatigue, les dépressions, les maux de tête, les douleurs musculaires, améliorer la circulation.</p>

❖ Précautions d'emploi :

La présence des huiles essentielles végétales est très grande, du fait de leur concentration extrême [59]. L'utilisation doit donc prendre des précautions élémentaires, avant tout emploi, particulièrement en ce qui concerne le dosage ainsi que le mode d'application interne ou externe.

-A forte doses, les huiles essentielles de sauge, d'hysope de romarin et de thym peuvent être épileptisantes.

-Les Huiles essentielles de marjolaine et de lavande ont des propriétés hypotensives, à ne pas utilisées si on a déjà une tension artérielle faible [58].

-Chez la femme enceinte, certaines huiles essentielles, les emménagogues, Peuvent induire des troubles sérieux ou des concentrations.

-Les huiles essentielles de romarin et d'hysope ont des propriétés hypertensives, à ne pas utilisées en cas de tendance à l'hypertension artérielle.

-Les huiles essentielles utilisées en bain [56] sont en générale les suivants :

Eucalyptus, Marjolaine, Sauge, Romarin, lavande, Géranium. Lors de l'utilisation il faut

toujours ajouter une tasse de sel de mer avec 30 gouttes de l'huile par bain, le sel de mer sert à neutraliser les terpènes des huiles essentielles.

II.9. Activité biologique

Les huiles essentielles sont employées pour leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums [60].

Activité antimicrobienne et antiparasitaire : les terpénoïdes ont des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires. En 1977 a été signalé que 60% des dérivés des huiles essentielles examinés jusqu'au 1999 sont inhibiteurs de mycètes tandis que 30% inhibent les bactéries. Le triterpénoïde, l'acide betulinique est de juste un de plusieurs terpénoïdes qui ont montrés une action inhibitrice envers HIV. Le mécanisme de l'action des terpènes n'est pas entièrement compris mais on pense qu'il s'agit de la rupture de la membrane par les composés lipophiles [61].

II.10. Domaine d'application des huiles essentielles :

II.10.1. Industrie cosmétiques :

L'utilisation courante d'une huile essentielle en droguerie, savonnerie, parfumerie, met en jeu des produit modifié dont les propriétés olfactives sont plus importantes que la pureté de l'essence, d'où l'essence, d'où un grand nombre d'huile « coupées ». [62]

II.10.2. Industrie pharmaceutique :

La connaissance de la structure chimique et de modalités d'action, conduira rapidement l'industrie pharmaceutique, à préparer des de synthés à activé identique à celle des agents extraits des plantes .L'isolement des principes actifs à contribué à l'tarissement de thérapeutique de plus en plus efficaces. [62]

II.10.3. Industrie agro-alimentaire :

Les huiles essentielles sont souvent utilisées dans les aromes alimentaires sous forme d'essence concentrée au 1/5° ou 1/10eme. D'après le même auteur, l'usage des huiles essentielles comme ingrédients aromatisants est un élément fondamental et traditionnel de la formulation des aromes .En plus du fait que les huiles essentielles entrent bien dans le cadre de la définition des « aromes naturelles »,leur composition chimique est dans la majorité des cas d'une grande complexité, autant que celle des aromes authentiques eux-mêmes (parfois plusieurs centaines de constituants chimique).Et leur présence apporte un élément de perfonctinnement,d'harmonisation permettant de contribuer à la qualité de la reproduction de l'arome que l'on veut imiter.[62]

Chapitre III : Les flavonoïdes

III. Les flavonoïdes**III.1. Découverte des flavonoïdes**

L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C, à la suite des travaux de Szent Gyorgyi en 1938. Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de Paprika et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace.

Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïque. Cette action des flavonoïdes sur la perméabilité vasculaire a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité). Cette notion de vitamine P n'existe plus à l'heure actuelle puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines.

Les flavonoïdes sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils peuvent jouer des rôles antioxydants ou posséder des propriétés biologiques diverses. [63]

III.2. Définition

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange [64], cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) [65].

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E. Chervreul en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes. [66]

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées [67]. Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits [68].

III.3. Structure

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) [69]. Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3- C6 [70], en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule [70].

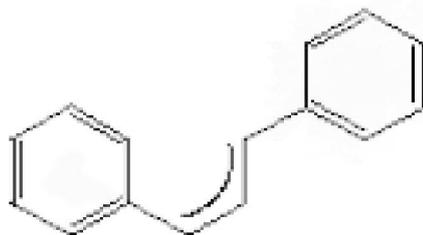


Figure 07: Squelette de base des flavonoïdes. [71]

III.4. Origine biosynthétique

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose, mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA.

Le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyl-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4, 2',4', 6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone-isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes [72]. Des étapes ultérieures surtout de glycosylation et acylation amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle elles se trouvent *in vivo*. [73]

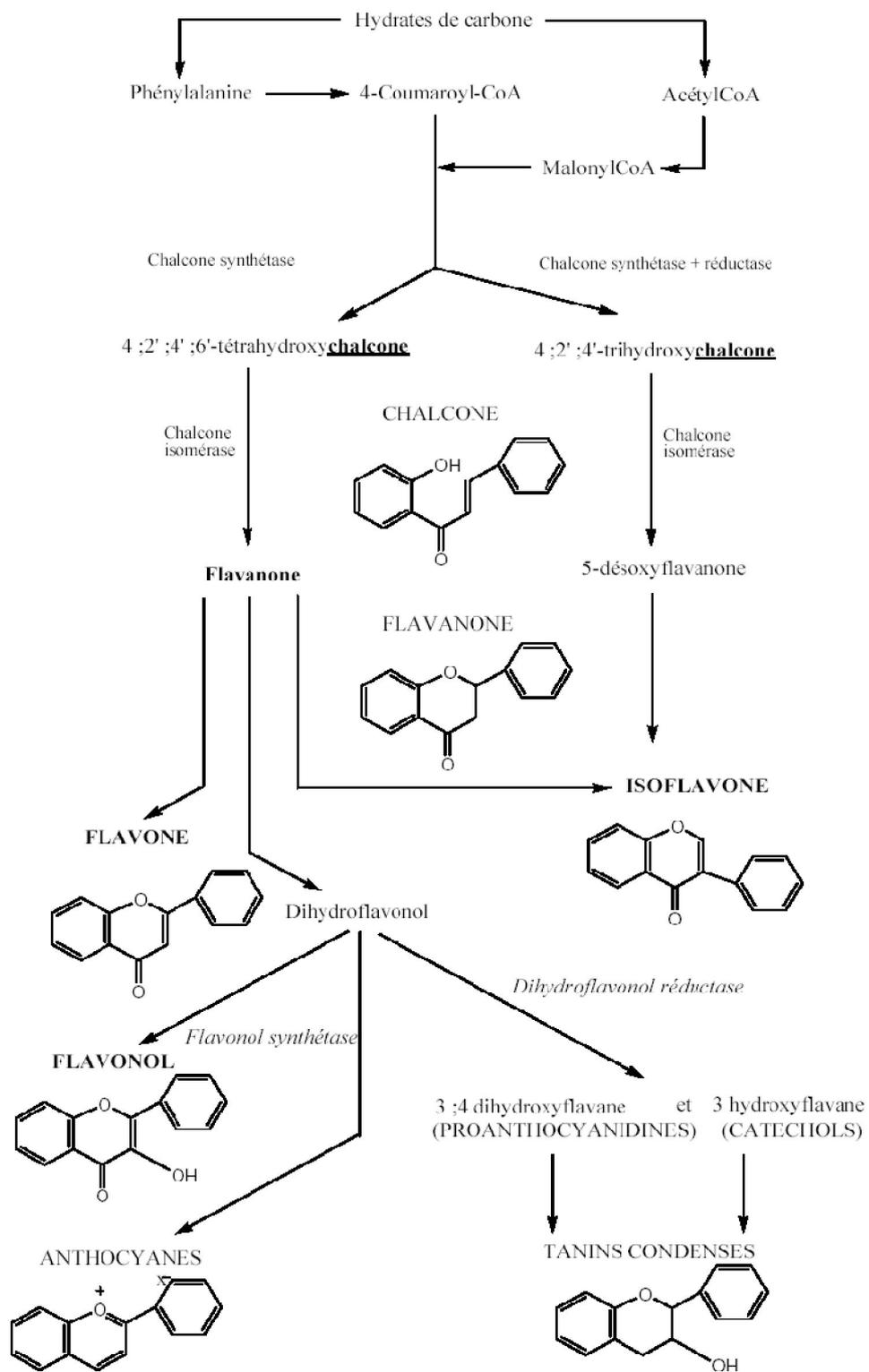
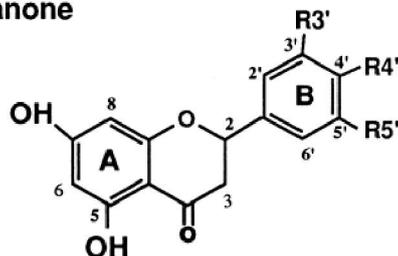


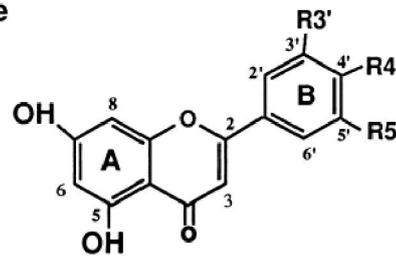
Figure08 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes [63].

III.5. Classification :

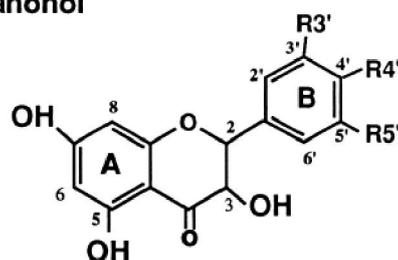
flavanone



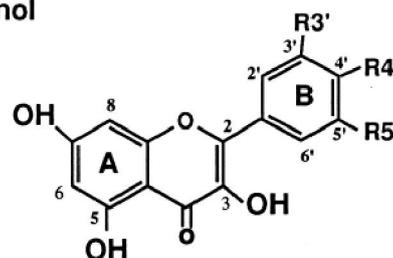
flavone



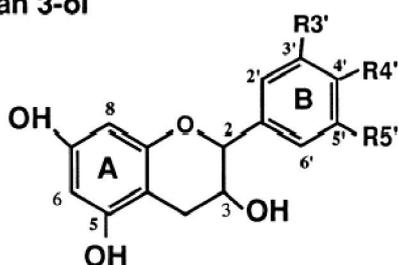
flavanonol



flavonol



flavan 3-ol



isoflavone

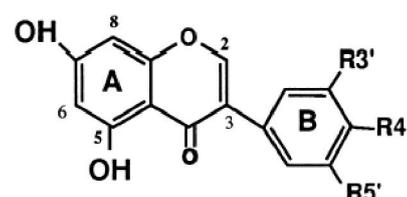


Figure09: Structures des différentes classes des flavonoïdes [74].

III.6. Localisation:

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants[75].

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles [64], la répartition de ces composés montre des

accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique [76].

III.7.Distribution :

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens, ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages (ex: trèfle)[77].

Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eux une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes [77].

Le tableau 06 représente la distribution des principaux flavonoïdes dans certains aliments :

Tableau 03 : Distribution alimentaire des principales classes des flavonoïdes [69].

Flavonoïdes	Exemples	Aliments	Caractéristiques
Flavonols	Quercétine Kaempférol	Oignon, poireau, brocolis, pommes, chou frisé, vin rouge, thé.	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques.
Flavones	Lutéoline Apigénine	Persil, céleri.	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques, les flavones se diffèrent des flavonols seulement par le manque d'un OH libre en C3, ce qui affecte ainsi leur absorption aux UV, mobilité chromatographique et les réactions de coloration

Flavanones	Naringénine Eriodictyol	Fruits du genre Citrus.	Sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3, le flavanone le plus abondant est la naringénine, isolée pour la première fois à partir des écorces de citrus.
Isoflavones	Genisteine Daidzeine	Graines de soja et produits qui en dérivent.	Caractérisés par leur variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C3. Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée.
Flavan3-ols	Catéchine Epicatéchine Epigallocatec- -hine	Vin rouge, thé noire, thé vert, cacao, chocolat.	Flavan3ols ainsi que flavan3, 4diols sont tout les deux impliqués dans la biosynthèse de proanthocyanidines (tanins condensés) par des condensations enzymatiques et chimiques
Anthocyanidines	Cyanidine Delphénidine	Raisins, vin rouge, certaines variétés de céréales.	Représentent le groupe le Plus important des substances colorées, ces pigments hydrosolubles contribuent à la

III.8. Propriétés Physico-chimiques des flavonoïdes :

III.8.1. Solubilité et l'extraction :

Les génines sont pour la plupart, solubles dans les solvants organiques apolaires. Les hétérosides peuvent être extraits, le plus souvent à chaud, par de l'acétone ou par des alcools additionnés d'eau. Il est possible de procéder ensuite à une évaporation sous vide et lorsque le milieu ne contient plus que de l'eau, de mettre en œuvre une série d'extractions liquide-liquide par des solvants non miscibles à l'eau [78]. Si les aglycones sont les cibles, une hydrolyse chimique est habituellement effectuée avec l'acide chlorhydrique ou l'acide formique à des températures élevées, l'hydrolyse enzymatique est également employée. Si

l'intérêt des flavonoïdes-glycosylés intacts, l'hydrolyse devrait naturellement être empêchée [79].

III.8.2. Dosage :

Les méthodes de dosage classiques sont le plus souvent, colorimétriques ou spectrophotométriques. L' HPLC offre maintenant la possibilité d'une estimation rapide et précise de tous les flavonoïdes [78].

III.9. Biodisponibilité des flavonoïdes :

Les flavonoïdes présentent ainsi des propriétés bénéfiques biologiques et anti- oxydantes. Cependant la qualité nutritionnelle et les effets systémiques des flavonoïdes dépendent de leur absorption au niveau du tractus digestif.

Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que leur absorption est faible et implique des mécanismes encore mal connus. Seuls les aglycones sont supposés être absorbables, alors que les glycosides, doivent subir l'hydrolyse de leur liaison osidique par l'action de la microflore intestinale pour leur permettre d'être absorbés au niveau du côlon. Les principaux sites de métabolisme sont la flore intestinale et le foie. Les métabolites glucuro- et sulfoconjugués des flavonoïdes absorbés sont éliminés principalement par la bile, l'excrétion urinaire ne représentant que 3 à 6 % de l'élimination totale [63].

III.10. Consommation des flavonoïdes :

La prise moyenne quotidienne des flavonoïdes est 14.4 mg dont (35.2%) viennent des fruits, (19.1%) des légumes, (16.9%) du vin et (16.0%) du thé [80]. La quercétine est régulièrement consommée par l'homme car c'est le flavonoïde principal trouvé dans le régime alimentaire [81].

Leur ingestion diététique est tout à fait haute, comparé à d'autres antioxydants diététiques comme les vitamines C et E [82].

III.11. Distribution les flavonoïdes dans les plantes :

A de rares exceptions près, seules les plantes ont la capacité de biosynthétiser des flavonoïdes. Les flavonoïdes peuvent être présents dans toutes les parties des plantes. Dans la majorité des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles permettant alors leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et du mésophylle des feuilles, des parenchymes des tiges et racines. Les génines seules sont

présentes dans les exsudats farineux de certaines plantes, dans les cuticules des feuilles, écorces et bourgeons ou sous forme de cristaux dans les cellules de certaines Cactaceae et plantes de régions arides [72].

On les trouve en abondance dans les familles suivantes : Polygonacées; Apiacées; Rutacées; Astéracées; Légumineuses [63].

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin, la quercétine, et de la galangine dans la propolis des abeilles [83]. Il est à noter que les flavanones et les flavones ont été isolés d'un corail marin et d'un petit nombre de champignons [72].

III.12. Rôles des flavonoïdes chez les plantes :

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois feuilles. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de Co-pigments.

Dans certains cas, la zone d'absorption de la molécule est située dans le proche ultraviolet : la coloration n'est alors perçue que par les insectes qui sont ainsi efficacement attirés et guidés vers le nectar et donc contraints à assurer le transport du pollen [78]. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes.

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries [83]. De plus ils sont impliqués dans la photosensibilisation, la morphogenèse, la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes [72].

III.13. Propriété des flavonoïdes :

En effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que seule la myricétine est active sur les lymphocytes B. L'explication est encore inconnue. L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) [84, 85]. Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes [86].

La phagocytose qui accompagne une infection virale ou bactérienne est suivie d'une production d'espèces oxygénées réactives par les neutrophiles ce qui va promouvoir l'inflammation.

D'une manière générale, les espèces radicalaires, quelles que soient leurs origines, peuvent induire des dommages tissulaires, favoriser le processus de vieillissement, voire être à l'origine de certaines pathologies telles que le cancer et l'athérosclérose [87]. Il est intéressant de noter que de nombreux flavonoïdes sont capables de contre cette production d'espèces oxygénées par les neutrophiles [88].

Les flavonoïdes inhibent également l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. L'hispiduline, une méthoxyflavone, diminue par exemple l'agrégation plaquettaire en augmentant les taux intracellulaires en AMPc à la suite d'une inhibition des phosphodiésterases [89]. En effet, l'accumulation d'AMPc plaquettaire semble interférer avec la mobilisation de Ca^{2+} impliqué dans l'agrégation de ces cellules [89].

III.13.1. Propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes et effets sur Le système immunitaire:

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires [90, 91,92] et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire [93]. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T [84,85]. Cet effet des flavonoïdes sur les lymphocytes B ou T peut être variable.

III.13.2. Propriétés antivirales et antibactériennes:

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

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

Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales. Ce mécanisme semble être impliqué dans la protection des souris vis-à-vis d'une infection virale à la suite d'une administration journalière de 3-O-méthylquercétine à raison de 20 mg/kg pendant 9 jours [94]. Mucsi et Pragai en 1985 [95], ont également montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus de

l'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMPc dans des cellules infectées. Des travaux ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). De nombreux agents sont susceptibles d'inhiber la réplication du rétrovirus du SIDA par une inhibition de la reverse transcriptase. Toutefois, ils peuvent être toxiques pour l'organisme. Il a été étudié l'impact des flavonoïdes sur la « reverse transcriptase ». Les flavonoïdes se sont montrés de bons inhibiteurs de cette enzyme [96]. Cependant, leur impact semble plus fort sur l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte que sur la reverse transcriptase virale [97,98]. Récemment, des chercheurs ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV (la gp120), empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte [99]. Enfin, les flavonoïdes seraient susceptibles d'inhiber l'intégrase rétrovirale du virus HIV-1. Cette enzyme permet l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte. Des études structure-activité devraient permettre de montrer quelles sont les molécules les plus actives [100]. En fait, il semble que l'intérêt éventuel des flavonoïdes ou d'autres micronutriments pour combattre le virus du SIDA n'ait pas été suffisamment approfondi.

Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs in vitro de l'ADN gyrase [101]. Une étude a montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un staphylococcus aureus [102]. Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, il faut citer :

- l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes.
- la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer.
- l'inhibition du métabolisme microbien [103].

III.13.3. Propriétés anti-cancérogènes:

La quercétine, par exemple, est capable de diminuer, chez le rat, l'incidence des tumeurs mammaires induites par le DMBA (7,12 diméthylbenz (a)anthracène) ou la NMU (Nnitrosométhylurée) [104]. Les études réalisées chez la souris abondent dans le même sens et mettent en évidence les effets protecteurs des flavonoïdes vis-à-vis des promoteurs des tumeurs [105]. L'action antitumorale de la quercétine pourrait aussi s'expliquer par une interaction de celle-ci avec le complexe calcium-calmoduline [106], qui

jouerait aussi un rôle dans le mécanisme d'action de nombreux promoteurs de tumeur.

C'est ainsi qu'un antagoniste de la calmoduline inhiberait l'induction de l'ODBC (Ornitine Décarboxylase) par le TPA (12-0-tétradécanoylphorbol-13-acétate) [107]. Le complexe calcium-calmoduline pourrait faciliter l'action du TPA en augmentant la synthèse d'ADN dans les cellules de foie [108].

Les flavonoïdes peuvent également interférer avec le métabolisme des xénobiotiques [109], notamment en stimulant les systèmes de détoxification [110].

En donnant à des rats ou à des souris une alimentation contenant de la flavone ou de la quercétine, on peut observer des effets chimiopréventifs à divers niveaux, et en particulier au niveau du foie par une stimulation de la glutathion- S-transférase [111]. Enfin, les flavonoïdes peuvent inhiber les enzymes intervenant dans l'activation des procarcinogènes en intermédiaires mutagènes et carcinogènes [112]. Les résultats dans ce domaine sont difficiles à interpréter car les flavonoïdes semblent avoir des effets divers sur l'activité des enzymes de détoxification [113].

III.14.Méthodes et techniques de purification:

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile résulte, soit de leur absorption et de leur désorption successive sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase dans le cas où les deux phases sont des liquides.

Il existe plusieurs méthodes de séparation chromatographique en fonction de l'objectif fixé au préalable et de la faisabilité de la méthode. On peut envisager une chromatographie sur colonne (C.C), sur couche mince (C.C.M) ou sur papier (C. papier). Enfin, on peut considérer également la chromatographie liquide à haute pression (C. L. H. P) et la (C. P. G), qui se présentent comme étant des techniques instrumentales basées sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique. [49]

III.14.1.Chromatographie sur colonne (C. C) :

Alors que toutes les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse, la séparation ou la purification de faibles quantités de produits, la C.C 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 autres produits ne faisant pas l'objet de ce travail et bien sur dans la mesure du possible, départager le tout en bloc de composés plus en moins similaires. [49].

III.14.2. La chromatographie sur papier (C.P) :

Il s'agit de la méthode chromatographique la plus ancienne permettant de séparer des mélanges complexes de composés polaires, comme les glycosides. Encore aujourd'hui, malgré l'avènement de technique de purification de pointe (CLHP), la chromatographie sur papier Wattman reste couramment employée, en raison de son faible coût, de sa facilité d'utilisation et de son efficacité de séparation. La CP sert à la fois de technique d'analyse et de méthode de purification des composés présents dans un extrait végétal.[49]

III.14.3. La chromatographie sur couche mince (CCM) :

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction, permet conditions opératoires sont bien déterminées. Elle permet également de suivre la un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les progression d'une réaction étant donné qu'elle indique le nombre de composants dans un mélange réactionnel.[49]

III.15. Les méthodes spectroscopiques :

III.15.1. La spectroscopie UV :

Les techniques de spectroscopie UV visible sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique, les propriétés physico structurales, et les caractéristiques optiques des composés. C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque fonction absorbe à une longueur d'onde bien déterminée. Ceci permet de caractériser les molécules. La mesure de l'absorption UV permet également de connaître ou de déterminer la composition chimique d'un mélange, par comparaison avec

des témoins. [49]

III.15.2. La spectrométrie de masse (SM) :

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer le poids moléculaire d'un produit pur ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus.

Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'ionisation des molécules introduite dans l'appareillage. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, avec formation d'ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. L'ensemble de ces ions constituent le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire. Il existe plusieurs analyses en spectrométrie de masse. Celles généralement utilisées sont énumérées ci-dessous:

- l'électrospray ou l'ionisation par électronébulisation(ESI)
- l'ionisation par impact électronique(IE)
- l'ionisation chimique à pression atmosphérique(APCI)
- le Fast Atom Bombardment(FAB)

Dans cette dernière technique l'ion moléculaire n'est pas toujours observable. On observe généralement, l'ion correspondant au poids moléculaire plus un proton $[M+H]^+$. D'autres ions adduits peuvent se former lorsqu'il existe des impuretés de sel ou par addition de chlorure de sodium NaCl (on obtient l'ion $[M+Na]^+$), ou de chlorure de potassium (on obtient l'ion $[M+K]^+$). Ces informations permettent de déduire le poids moléculaire du composé étudié. [49]

III.16. L'utilisation thérapeutiques des flavonoïdes :

L'utilité thérapeutique de ces composés a été démontrée dans les hémorragies gastro-intestinale, avortement habituel, ménorragie, cystite saignante, tuberculose hémoptysie, la maladie de Meniere, épistaxis, rétinopathie, hémorroïdes et syndrome de Raynaud.

Ils ont été fréquemment combinés avec la vitamine K et l'acide ascorbique. Récemment, Les rutosides hydroxyéthylés s'ont avérés efficaces dans l'allègement des symptômes provoqués par l'insuffisance veineuse chronique des membres inférieurs, varicosis de

grossesse et d'autres maladies veineuses. Le (+)-cyanidanol-3 a été de plus en plus employé dans le traitement de l'hépatite virale aiguë et diverses autres maladies du foie [114].

Une étude clinique a permis de montrer une activité anticancéreuse de la quercétine, administrée par voie intraveineuse chez des patients atteints du cancer. Le resveratrol est actuellement en phase I, d'étude clinique pour son utilisation dans le traitement du sida. Il est également en phase d'études préclinique et clinique pour son utilisation dans le traitement de divers cancers [115].

Partie Expérimentale

Chapitre IV : Matériels et méthodes

IV.1.L'huile essentielle

IV.1.1.Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des feuilles sèches et broyées de romarin, obtenus à partir des phytothérapeutes de la wilaya de Batna.

IV.1.2.Procédé d'extraction

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par la méthode d'hydrodistillation.

IV.1.2.1. L'hydrodistillation :

On verse 100g des feuilles sèches est introduite dans un ballon imprégné d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant 4 heures. Les vapeurs chargées d'huile, en traversant un réfrigérant se condensent et récupère dans un Erleen Mayer.



Figure 10: Montage d'hydrodistillation (extraction des huiles essentielles).

IV.1.2.2.Extraction liquide-liquide : L'extraction liquide-liquide est une mise en œuvre de l'extraction par entre deux phases liquide, dans une ampoule à décanter, les deux liquides séparent les solutés en fonction de leur solubilité dans chaque solvant.

a.Relargage : On ajoute du chlorure de sodium jusqu'à la saturation du distillat, et l'on dissout par agitation. Après le relargage on observe une fine couche de l'huile essentielle à la surface.

b.Décantation : Pour la récupérer; on verse le distillat dans une ampoule à décanter, et on introduit 100 ml de Dichlorométhane (3fois). Après agitation et décantation (l'extraction liquide-liquide), on observe deux phases (organique et aqueuse) la phase

organique est inférieur et la phase aqueuse est supérieur, on récupère la phase organique (Dichlorométhane et l'huile essentielle).

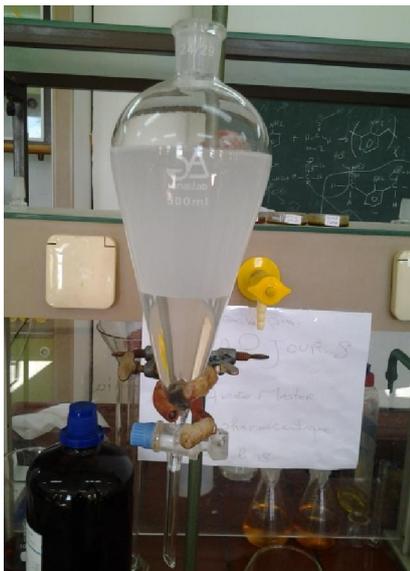


Figure11 : Extraction liquide-liquide par dichlorométhane.

c.Séchage : On ajoute ensuite le sulfate de magnésium anhydre pour éliminer les traces d'eau.

d.Evaporation : Après filtration on obtient une solution, on a fait évaporer le solvant dans un évaporateur rotatif. L'huile essentielle récupérée après l'évaporation est quantifiée (pesée).



Figure12: Evaporation de solvant.

➤ **Calcul le rendement :**

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter. Le rendement est exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante: $R = P_b / P_a \times 100$.

R: Rendement de l'huile en %.

P_b : Poids de l'huile en g.

P_a : Poids de la plante en g.

IV.1.3.Analyse chromatographique sur couche mince :

IV.1.3.1.Principe :

Le principe de la chromatographie repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire [4].

- **Préparation de La phase mobile :** La phase mobile est constituée par un mélange des solvants organiques. Pour cela, différents systèmes des solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations.
- **La phase stationnaire :** La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques d'aluminium constituées de gel de silice.

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

Tableau04: les systèmes utilisés pour l'huile essentielle de romarin.

systèmes utilisées	Volume (V/V)
Dichlorométhane-méthanol	(5: 5)
Ether de pétrole-méthanol	(6: 4)
Toluène-acétate d'éthyle	(9 :1)
Dichlorométhane-hexane	(9 :1)

IV.2.Extraction des flavonoïdes :

IV.2.1.Extraction solide-liquide(Macération) :

le matériel végétal broyé (250 g) est soumis à une extraction par macération dans le mélange éthanol / eau (70/30 : v/v) pendant 48 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures et agitation de temps en temps.



Figure13 :Macéra de romarin

Les macéras sont réunis puis ils sont filtrés sur un papier filtre.



Figure14 :Extrait éthanolique

Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un Évaporateur rotatif.



Figure15: Évaporation du solvant

Le résidu sec est repris dans 100 ml d'eau distillée bouillante (l'intérêt de l'utilisation de l'eau distillée bouillante c'est pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation), après une décantation de toute une nuit on récupère la phase limpide qui va subir des affrontements par des solvants de polarité croissante.

IV.2.2.Extraction liquide-liquide :**IV.2.3.1.Affrontement par éther de pétrole :**

Permet d'extraire les impuretés (composés non phénoliques). Surtout les lipides qui risquent de compliquer les épreuves Chromatographiques. La phase organique est supérieure et la phase aqueuse est inférieure.



Figure16 : Extraction par éther de pétrole

IV.2.3.2.Affrontement par acétate d'éthyle :

Entraîne les aglycones, le mono-O-glycosides et partiellement les di-O-glycosides présents dans les extraits éthanoliques. La phase d'acétate est supérieure et l'aqueuse est inférieure.



Figure17: Extraction par acétate d'éthyle

IV.2.3.3.Affrontement par MEC :

Permet d'extraire les composés organiques et les di-O-glycosides

La phase organique est supérieure et phase aqueuse est inférieure.



Figure18:Extraction par MEC.

Après un repos on récupère séparément la phase aqueuse et la phase organique. Pour chaque solvant, on refait trois fois cette opération pour un entrainement optimal des groupes polyphénolique séparés.

Les phases éther de pétrole ne renfermant pas des composés phénolique sont rejetées .Les autres phases, sont évaporées avec le rota-vapor et en fin récupère les deux extraits et conservé jusqu'à l'utilisation. Le protocole d'extraction est résumé dans l'organigramme suivant :

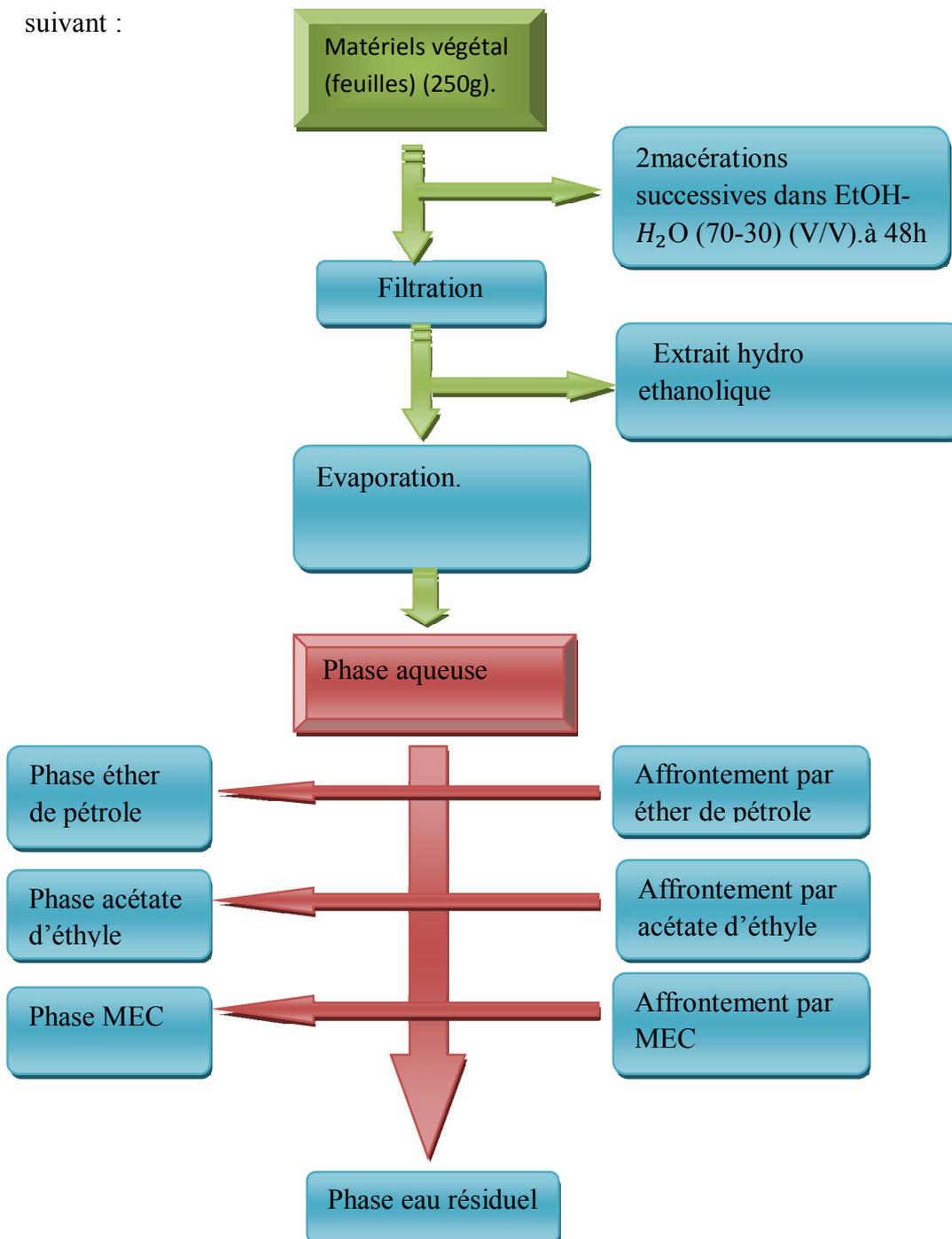


Figure19: protocole d'extraction les flavonoïdes [116].

IV.2.4. Analyse chromatographique sur couche mince (CCM) :

Le but de cette étape est de réaliser la séparation d'une grande quantité des molécules flavoniques.

- **Pour l'extrait d'acétate d'éthyle :**

Tableau05 : les systèmes utilisés pour l'extrait d'acétate d'éthyle.

Systèmes utilisés	Volume (V/V)
Toluène/EtOH /MEC.	(4/3/3)
H2O/Méthanol/MEC	(7/3/1)
H2O/butanol/EtOH/Acide Acétique	(50/20/25/2)

- **Pour L'extrait de MEC :**

Tableau06 : Les systèmes utilisés pour l'extrait de MEC.

Systèmes utilisés	Volume (V/V)
Toluène/éthanol/MEC	(3/3/4)
n-butanol/acétate d'éthyle/H2O	(6/15/25)

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

- ✓ **Le dépôt :** le dépôt se fait avec des pipettes de pasteur en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire et linéairement. Chaque phase doit être déposée en solution diluée dans le méthanol, on peut effectuer plusieurs dépôts successifs du même analyte en même endroit, cette pratique permet de concentrer l'analyte [117].
- ✓ **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 [117].
- ✓ **Révélation :** si les constituants sont colorés, ils seront directement visible sur la plaque, sinon la révélation peut se faire soit aux UV ou bien par des

méthodes chimiques.

- ✓ **Révélation par des méthodes chimiques** : ces méthodes consistent à mettre en contact de la plaque un réactif plus ou moins spécifique qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler [118].
- ✓ **Identification des flavonoïdes** : le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par sa fluorescence sous UV et par son Rf (le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile c'est à dire le front du solvant) qui est compris entre 0 et 1.

IV.3. Etude de L'activité antibactérienne:

IV.3.1. Les souches testées :

Les souches utilisées dans les tests font parties des microorganismes, qui sont des pathogènes et des contaminants. Le support microbien est composé d'Escherichia coli, Staphylococcus aureus et Pseudomonas aeruginosa qui ont été isolées des produits pathologiques provenant de laboratoire de bactériologie de l'hôpital « Bachir Ben-nacer » de Biskra.



Figure20: Laboratoire de bactériologie de l'hôpital « Bachir Ben-Nacer »

➤ **Staphylococcus aureus** :

Les staphylocoques sont des cocci à gram positif qui tendent à se grouper en amas [119], irrégulier à la façon d'une grappe de raisin [120]. Staphylococcus aureus est un germe aérobic - anaérobic facultatif [120], doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales, possède une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de staphylocoques. La bactérie est très répandue chez l'homme et dans de nombreuses espèces animales. Chez

l'homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses et des zones cutanées humides. Il développe rapidement des résistances aux antibiotiques et les souches hospitalières ne sont souvent sensibles qu'aux glycopeptides [119].

➤ **Pseudomonas aeruginosa :**

Le genre pseudomonas est fait de bacilles mobiles aérobies stricts, se cultive facilement sur les milieux usuels. Pseudomona aeruginosa (ou bacille pyocyanique) se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ses colonies. [119]. C'est une bactérie ubiquiste qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et des divers animaux. Considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales [120].

➤ **Escherichia coli :**

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. Escherichia coli est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers [119]. Le groupe Klebsiella, Enterobacter, Serratia, dit K.E.S, sont rassemblés des enterobacteriaceae qui ont en commun les caractères suivants :

- La réaction de Voges-Proskauer (VP) est généralement positive.
- Ce sont des bactéries pathogènes.
- Ces espèces sont souvent multi-résistantes aux antibiotiques [120].

IV.3.2.Méthodes utilisées

IV.3.2.1.Méthode de dilution :

Une quantité convenable des extraits dilués dans le méthanol selon le protocole de dilution suivant :

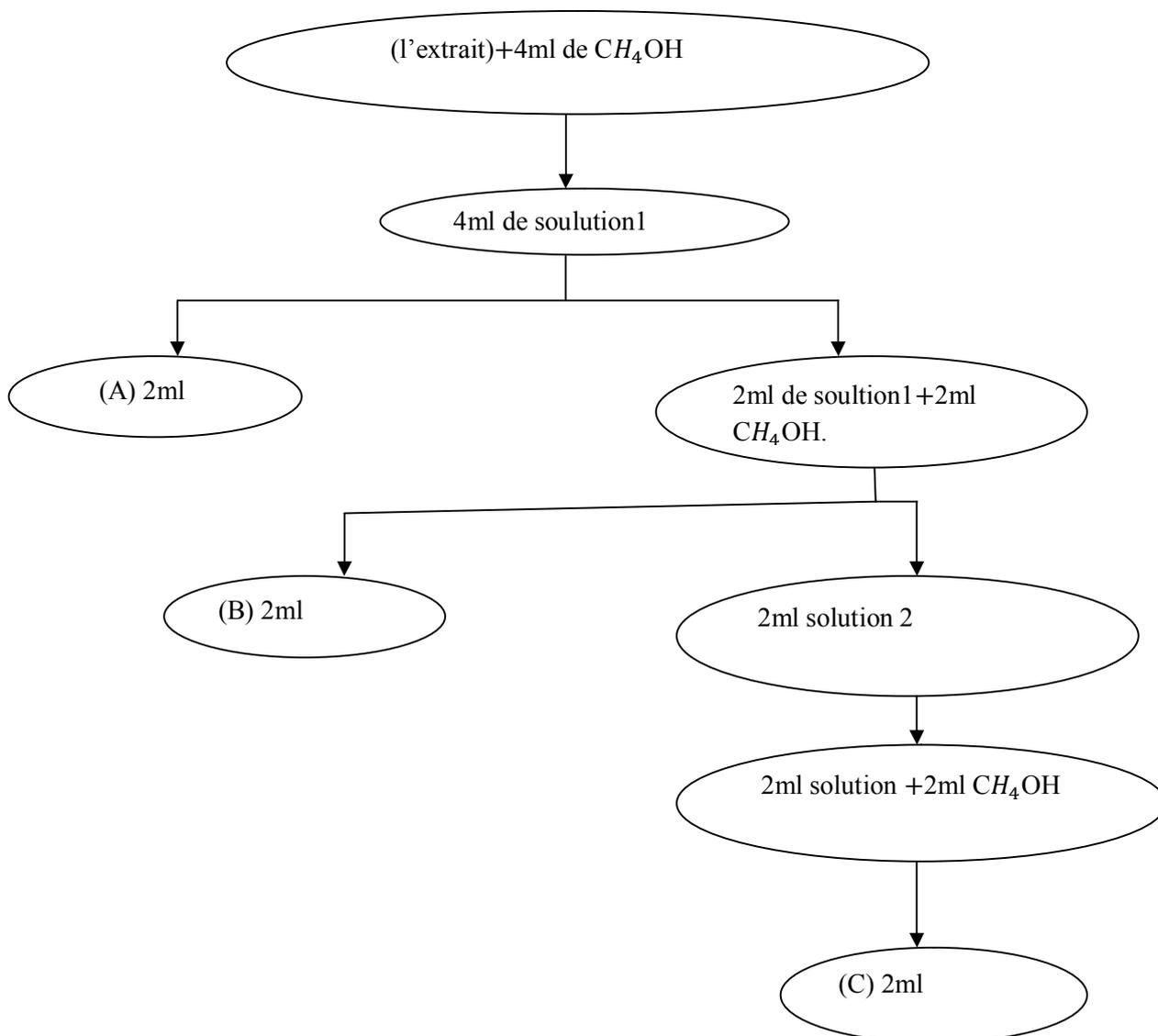


Figure 21 : Protocole de dilution des extraits de Rosmarinus officinalis.

IV.3.2.2.Méthodes des disques :

La méthode de diffusion à partir d'un disque a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne. Des disques de papier Wattman de (6 mm) de diamètre sont stérilisés dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée puis séchés à l'étuve. Ces disques sont ensuite imbibés de 20µl d'extrait à tester des concentrations différentes (A, B, C).

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

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

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

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

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

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

➤ **Lecture**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des polyphénols [121].

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

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

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

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

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Extraction de l'huile essentielle

V.1.1. Teneur et propriétés organoleptiques :

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est extraite par technique d'hydrodistillation, les caractéristiques organoleptiques sont regroupées dans le tableau07.

Tableau07 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Huile essentielle de <i>rosmarinus</i> <i>officinalis</i>	Caractéristiques organoleptiques		
	Aspect	Couleur	Odeur
	Liquide mobile	Jaune foncé	Camphrée

❖ Détermination du rendement en huile essentielle de romarin :

- Le Poids d'huile essentielle=[le poids de ballon + d'huile essentielle]- [le poids de ballon]
- Le poids d'huile essentielle =92,4(g)-91,6(g)=0,8(g).
R=0, 8/100×100=0, 8%.



Figure22 : huile essentielle de romarin.

V.1.2. Analyse Chromatographique d'huile essentielle par CCM :

La chromatographie sur couche mince d'huile essentielle de la plante se fait dans 4 systèmes a donné une bonne séparation des molécules dans le système (Dichlorométhane/hexane : 9/1/V/V).

- Pour l'huile de *rosmarinus officinalis* qui extraite on a les chromatogrammes suivants :



Figure23: CCM d'H.E Par (Dichloromethane-Méthanol) (5/5, V/V).



Figure24: CCM d'H.E par (éther de pétrole- méthanol) (6/4, V/V)



Figure25: CCM d'H.E par (toluène-acétate d'éthyle) (9/1) (V/V).

Le but de l'utilisation de plusieurs systèmes d'éluant, pour obtenir l'éluant qui donne une bonne séparation. Dans la plaque CCM du système (dichloromethane-hexane, 9/1), on observe trois spots coloré pour l'huile essentielle extraite par l'hydrodistillation, pour l'huile commerciale possède trois spots colorés dans le même système d'éluant. On peut déduire que les deux huiles contiennent les mêmes composés.

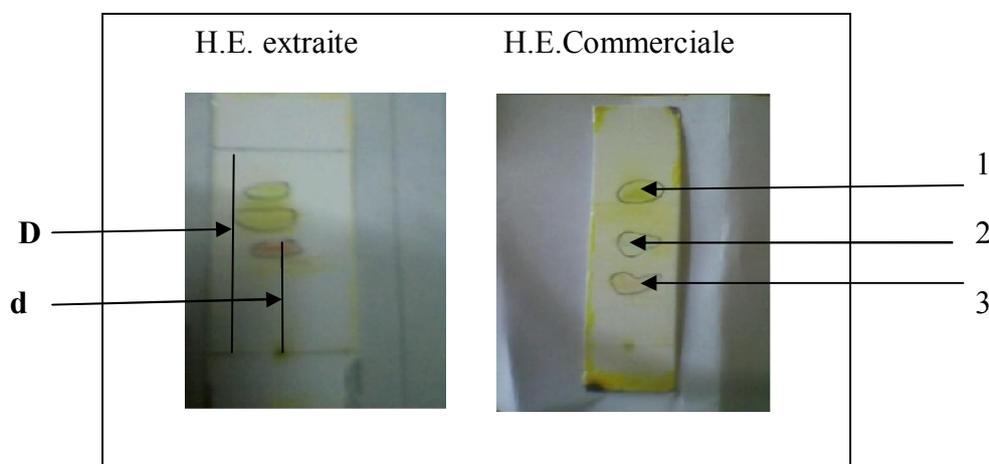


Figure26 : CCM d'H.E par (Dichlorométhane-hexane). (9/1, V/V).

- **Calcul des rapports frontaux :**

La disposition des substances (spots) sur la chromatographie est exprimée le plus souvent en rapport frontal; $R_f = d / D$.

D: la distance parcouru par le front du solvant.

d: distance entre la ligne de dépôt et le centre de spot.

Tableau08 : Comparaison des Rfs d'huile essentielle de rosmarinus officinalis.

Huile essentielle extraite	Huile essentielle commerciale
0,46	0,5
0,66	0,66
0,8	0,83

D'après les résultats des Rfs pour les deux huiles (extraite, commercial) presque les même

V.2.Extraction des flavonoïdes :

L'extraction des feuilles de Rosmarinus officinalis par macération dans le mélange éthanol / eau (70/30 : v/v) et la partition entre les différents solvants nous ont permis d'obtenir les phases suivantes :

- **Phase éther de pétrole :** obtenue après affrontement par l'éther de pétrole mais elle est éliminée car elle ne contient que des matières grasses, des chlorophylles, et des impuretés.
- **Phase acétate d'éthyle :** obtenue après affrontement par l'acétate d'éthyle, ce dernier qui permet d'extraire les flavonoïdes, en entraînant les aglycones, les mono-O- glycosides et partiellement les di -O- glycosides [122].
- **Phase méthyle éthyle cétone (MEC) :** obtenue après affrontement par méthyle éthyle cétone, elle est permet d'extraire les composés organiques et les composés plus polaire.
- **Phase eau :** c'est la phase résiduelle. Le mélange des deux phases (phase acétate d'éthyle et la phase MEC) sera consacré aux analyses chromatographiques de séparation (CC M) et test biologique.

Tableau09 : Caractéristiques des extraits de rosmarinus officinalis.

Caractéristiques organoleptique					
L'extrait MEC		L'extrait d'acétate		Ether de pétrole	
Couleur	Teneur	Couleur	Teneur	Couleur	Teneur
Marron foncé	1,8mg/g	Couleur de miel	2,27mg/g	Vert clair	0,4mg/g

V.2.1.Chromatographie analytique sur couche mince :

Pour avoir les empreintes flavoniques de nos extraits, et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant des systèmes solvants moyennement polaires. Sous lumière UV les différentes taches des produits qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées. Les couleurs des spots et leurs Rf observés sous UV suite à une analyse par chromatographie sur couche mince, nous ont permis de révéler la présence des flavones et des flavonols.

**Figure27** : analyse des chromatogrammes sous UV.

❖ Pour MEC :

**Figure28** : CCM par (n-butanol/ EtoAC, H₂O)(6/15/25).**Figure29**:CCM par (touluène/éthanol/MEC, 3/3/4).

❖ Pour l'acétate d'éthyle :



Figure30 : CCM par (H₂O/butanol/EtoH/acide acétique) (50/20/25/2).



Figure31 : CCM par (H₂O/CH₄OH/MEC) (7/3/1).



Figure32 : CCM par (toluène/EtoH/MEC) (4/3/3).

Après la révélation sous lampe UV, on observe la bonne séparation dans la plaque CCM du système S2 (pour MEC quatre spots de quatre R_f différents) pour l'acétate d'éthyle la bonne séparation dans la plaque CCM du système S3 (trois spots de trois R_f différents). Les résultats représentent dans le tableau13 suivant :

Tableau10 : Comportement chromatographique des extraits (acétate d'éthyle et MEC) de *Rosmarinus officinalis* sur plaque de silice dans le système solvant (toluène/éthanol/méthyle éthyle cétone) (4/3/3).

Rosmarinus officinalis			
L'extrait MEC		L'extrait d'acétate d'éthyle	
Spot coloré sous UV(234).	Rf	Spot coloré sous UV(234).	Rf
Marron	0.23	Jaune	0,5
bleu	0.48	Marron	0.76
Jaune	0.75	Vert	0.86
violet	0,84	/	

Structure-Rf

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

- Les polyhydroxyflavones ont des faibles valeurs de Rf (0,00-0,25).
- Les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones ont des valeurs de Rf comprises entre (0,3-0,5).
- Les flavanones, les flavonols, méthoxyflavones ont les valeurs les plus élevées de Rf (0,5-0,75) [123].

D'après les résultats des Rfs on remarque que cette plante est riche en flavonoïdes de type flavones et est flavonols.

La quantité des composés phénoliques des extraits de la plante étudiée dépend essentiellement : de leur origine [124], la variété, la saison de culture, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante [125] et la durée de conservation.

V.3. Résultats du test du pouvoir antibactérienne :

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des flavonoïdes et de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton).

L'activité antibactérienne de nos extraits et de l'huile essentielle est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits à tester vis-à-vis de trois germes pathogènes d'origine hospitalière (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*) après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C.

V.3.1. Activité antibactérienne d'huile essentielle :

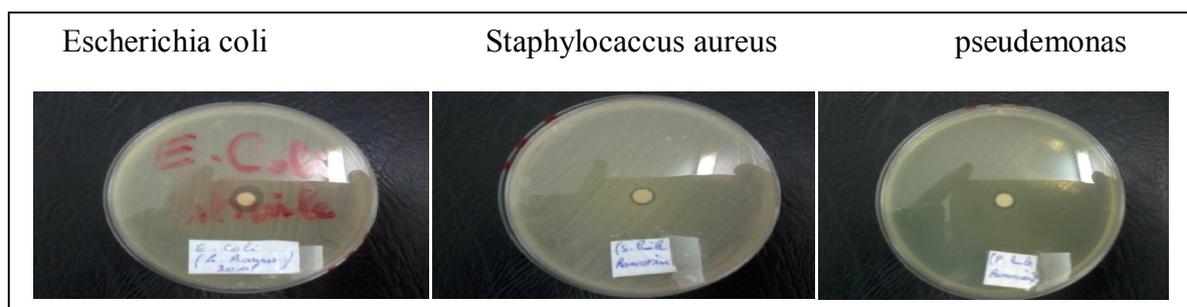


Figure 33: Les zones d'inhibition de l'huile essentielle testée.

Tableau11 : Diamètre (mm) des zones d'inhibition de l'huile essentielle de romarin.

	Escherichia. Coli	Staphylococcus aureus	Pseudomonas
Zone d'inhibition (ø mm)	12	8	9
Sensibilité	sensible	Moins sensible	Moins sensible

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'Escherichia coli apparait sensible vis-à-vis d'huile testé, ces mêmes résultats développent des zones d'inhibition moyennement importantes vis-à-vis de Staphylococcus aureus et pseudomonas dont les diamètres des zones d'inhibition varient (12) mm pour Escherichia coli, (8-9) mm pour Staphylococcus aureus et pseudomonas.

V.3.2. Activité antibactérienne des flavonoïdes:

Lors de cette étude, nous avons testé l'action de deux extraits MEC et acétate d'éthyle de la plante vis-à-vis de quelques souches bactériennes.

Les résultats de l'évaluation antibactérienne des extraits sont repris ci-dessous :

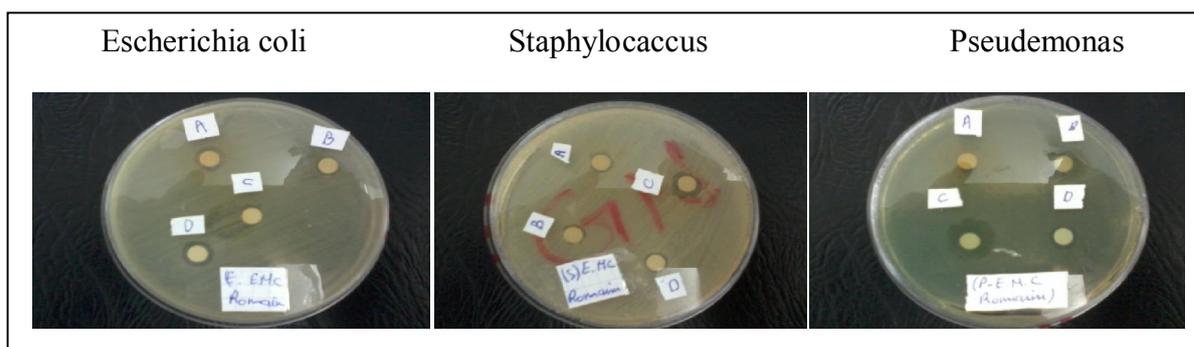


Figure 34: Les zones d'inhibition de l'extrait MEC.

Tableau 12 : Diamètre (mm) des zones d' inhibition de l'extrait MEC.

Souches bactérienne	Zones d'inhibition (mm) De MEC			Zone d'inhibition de CH ₄ OH
	A	B	C	
E .coli	9	8	15	10
Staphylococcus	8	8	11	8
Pseudomonas	9	12	17	10

Le tableau 12 montre que l'extrait MEC a une bonne activité vis-à-vis de pseudomonas et Escherichia coli (très sensible). Dont les diamètres des zones d'inhibition(17) mm pour pseudomonas et (15) mm pour E. Coli.

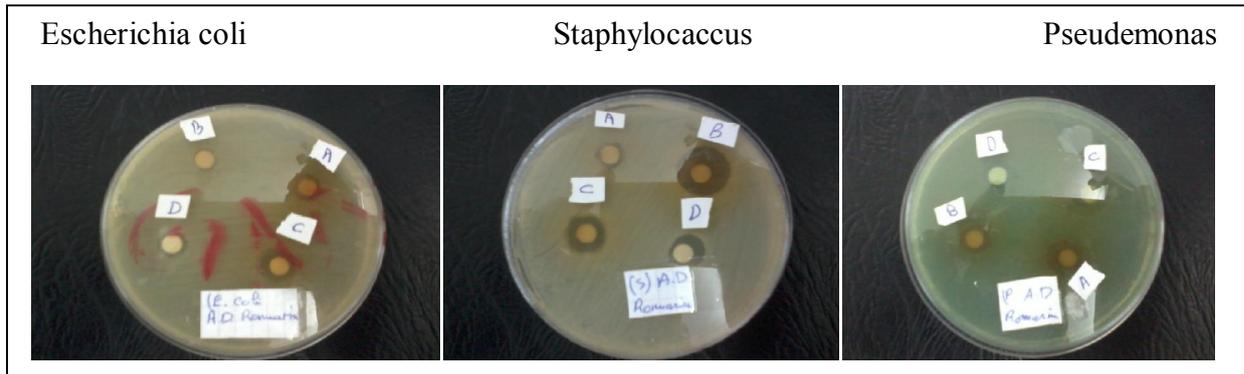


Figure 35: Les zones d'inhibition de l'extrait d'EtoAC.

Tableau 13 : Diamètre (mm) des zones d' inhibition de l'extrait d'EtoAC.

Souches bactérienne	Zones d'inhibition (mm) D'EtoAC			Zone d'inhibition de CH ₄ OH
	A	B	C	D
E .coli	11	9	13	9
Staphylococcus	8	18	13	11
Pseudomonas	15	12	18	11

D'après le tableau 13 on a observé une bonne activité avec l'extrait d'EtoAC vis-à-vis à Staphylococcus et pseudomonas dont les diamètres des zones d'inhibition de 18mm (très sensible).

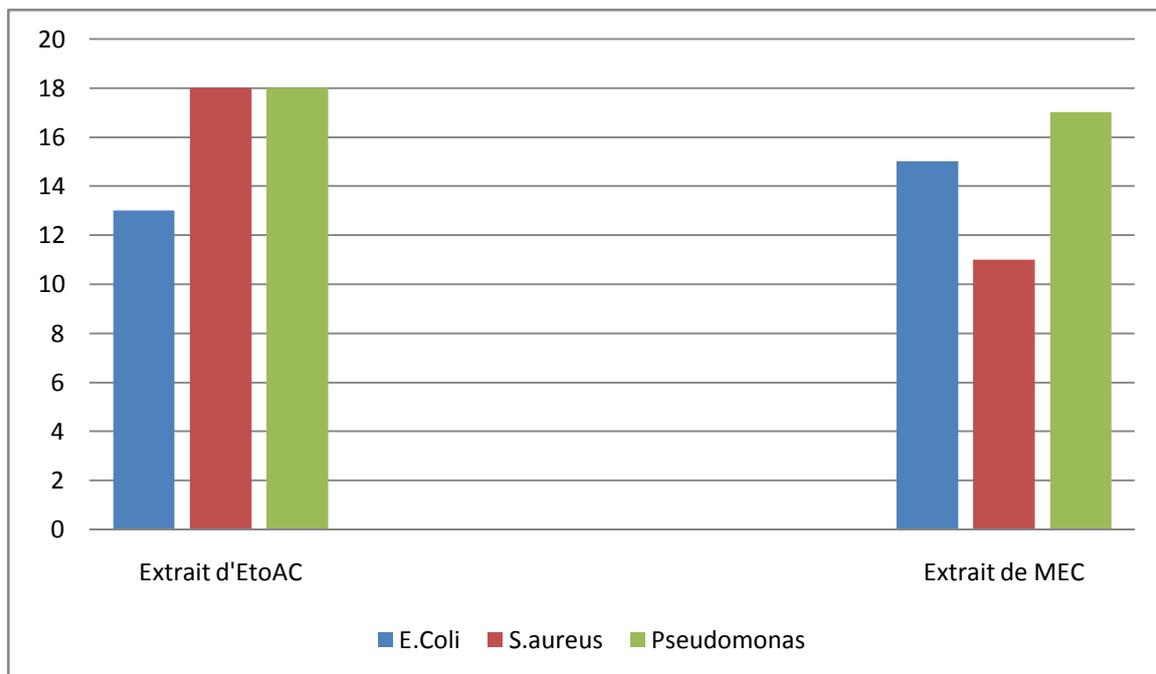


Figure36 : Histogramme représenté les diamètres des zones d'inhibition des deux extraits.

Pour ces deux extraits, nous remarquons que l'extrait d'acétate d'éthyle montre une activité plus élevée que l'extrait MEC.

Conclusion général

Conclusion général

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Dans ce travail nous avons entrepris une étude phytochimique et biologique sur l'huile essentielle et les flavonoïdes dans l'espèce *rosmarinus officinalis*.

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation. Le rendement obtenu à partir des feuilles est de 0,8%.

Ce rendement est conforme avec les normes internationales (0,5-2%), cela peut être dû aux différents facteurs qui rentrent en jeu, parmi on cite la nature du sol, la période de la récolte, la durée de séchage, le mode d'extraction et la situation géographique. L'analyse effectuée par la chromatographie sur couche mince a montré l'existence de trois composés chimiques majoritaires qui constituent l'HE de romarin.

L'étude du pouvoir antibactérien par la méthode de diffusion des disques, l'huile essentielle a manifesté une activité modérée contre *E. coli* et une faible activité contre *Staphylococcus* et *Pseudomonas*.

D'autre part, l'analyse des extraits (MEC, EtoAC) de romarin par la chromatographie sur couche mince de gel de silice, ont montré sous l'étude directe au spectrophotomètre UV-Vis la présence d'une multitude de composés différents. Après de calcul les rapports frontaux on obtient que cette plante est riche en flavonoïdes de types flavones et flavonols.

L'activité antibactérienne des extraits a été déterminée par les méthodes de dilution et de diffusion des disques dont les résultats montrent que l'extrait MEC a manifesté une activité modérée contre *E. coli* et *Pseudomonas*, et une faible activité contre *S.aureus*. En revanche l'extrait d'acétate a présenté une bonne activité vis-à-vis de *S.aureus* et *Pseudomonas*. Pour ces deux extraits, nous remarquons que l'extrait d'acétate d'éthyle montre une activité plus élevée que l'extrait MEC.

Au cours de cette étude nous avons conclu que l'espèce *Rosmarinus officinalis* est riche en flavonoïdes et huiles essentielles, Sachant que notre pays possède une biodiversité

immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important des métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose de :

Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.

Développer des médicaments antibactériens à base des plantes.

Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antibactérienne des composés polyphénoliques en général et des flavonoïdes en particulier.

Références bibliographique

Référence bibliographique

[1] : Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de magister en chimie organique présenté par Hamidi Abdelrazeg .Université kasdi Merbah-Ourgla.promotion 2013.

[2] :Atik bekkara, F., Bousmaha, L., Taleb bendiab, S.A., Boti, J.B., Casanova J. (2007) Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé*. 7: 6-11.

[3] :J.Paolini université de corse. (Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de corse .Discipline .Chimie organique et analytique.12-12-2005).

[4] :**Wikipédia**.2008.L'encyclopédie libre (enligne)<http://www.wikipédia.com>

[5] : Thèse présentée à l'université aboubaker belkaid faculté des sciences laboratoires produits naturels par MR Makhloufi Ahmed pour obtenir le grade de doctorat d'état en biologie.

[6] : **Ibañez E., Kubátová A., Señoráns F. J., Caveró S., Reglero G. et Hawthorne S. B.** 2003. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary Plants. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, **51** (2): 375-382.

[7]: **Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto K. ET Yaghi A.** 1994. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*, **37** (5): 1463-1466.

[8]: **Yang R. Y., Lin S. et Kuo G.** 2008. Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species. *Asia of pacific journal of clinical nutrition*. **17** (S1): 275-279.

[9]:Bellakhdar, J. (1997) La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis Press (Ed). Paris,764 p.

[10]: Beloued, A. (1998) Plantes médicinales d'Algérie. 2^{ème} Edition. Office des publications universitaires (Ed). Alger, 274p.

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

[12] :**Lemonica I. P., Damasceno D. C. et Di-Stasi L. C.** 1996. Study of the embryo toxic effects of an extract of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Brazilian journal of medical and biological research*. **29** (2): 223-227.

[13] : Ibañez E., Cifuentes A., Crego A. L., Señoráns F. J., Cavero S. et Reglero G. 2000. Combined use of supercritical fluid extraction, Micellar electrokinetic chromatography and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from Rosmary (*Rosmarinus officinalis* L). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 48 (9): 4060-4065.

[14]: Cheung S. ET Tai J. 2007. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosmarinic acid from *Rosmarinus officinalis*. *Oncology reports*. 17 (6): 1525-1531.

[15]: Singletary K. W. et Nelshoppen J. M. 1991. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) induced mammary tumorigenesis and of in vivo formation of mammary DMBA-DNA adducts by rosemary extract. *Cancer letters*. 60 (2) : 169-175.

[16]: Huang M. T., Ho C. T., Wang Z. Y., Ferraro T., Lou Y. R., Stanber K., Ma W., Hoffman L., Besseau S., Geoffroy P., Rizenhaler C., Meyer D., Lepierre C., Pollet B. et Legrand M. 1994. Silencing of Hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell*. 16 (4): 1446-1465.

[17]: Offord E. A., Macé K., Ruffieux C., Malnoë A. ET Pfeifer A. M. 1995. Rosmary components inhibit benzo [a] pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis*. 16 (9): 2057-2062.

[18]: Aruoma O. I., Spencer J. P., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A., Butler J. et Halliwell B. 1996. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosmarinic acid and provençal herb. *Food and Chemical Toxicology* 34 (5):456.

[19]: Paris A., Strukelj B., Renko M., Turk V., Pukl M., Umek A. et Korant B. D. 1993. Inhibition effects of carnosic acid on HIV-I protease in cell free assays. *Journal of natural products*. 56 (8): 1426-1430.

[20] : Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M. (2006) Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol*. 107: 157-160.

[21]: Bakirel, T., Bakirel, U., Ustuner Keles, O., Gunes Ulgen, S., Yardibi, H. (2008) In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol*. 116: 64-73.

[22] : Arnold, N., Valentini, G., Bellomaria, B., Laouer, H. (1997) Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. From Algeria and *R. Officinallis* L. from other countries. *J.essent.Oil Res*. 9: 167-175.

- [23]: Poletti, A. (1988) Fleurs et plantes médicinales. 2^{ème} Edition. Delachaux & Niestlé (Ed). Paris, 222p.
- [24]: Soyak, D., Jindal, A., Singh, I., Goyal, P.K. (2007) Modulation of radiation-induced biochemical alterations in mice by rosemary (Rosemarinus officinalis) extract. *Phytomedicine*. **14**: 701-705.
- [25]: Pierre de Laroche-piquet, « La Nature au service de la vie, les essences végétales naturelles », Paris, 2^{ème} édition. Paris, 1999.
- [26]: Lesley Bremness, « Les plantes aromatiques et médicinales », collection l'œil nature, édition Bordas. Paris, 1996.
- [27]: Oakes R. S., Clifford A. A., Rayner C. M. The use of supercritical fluids in synthetic organic chemistry, *J. Chem. Soc.*, 1, 2001, 917-941.
- [28]: Angus S., Armstrong B., de Reuck K. M., "International thermodynamic table of the fluid state: carbon dioxide", vol. 3, 1976, IUPAC, Pergamon Press, Oxford.
- [29]: Eckert C. A., Knutson B. L. Molecular charisma in supercritical fluids. *Fluid Phase Equilibria*, 83, 1993, 93-100.
- [30]: Luque de Castro M.D., Valcarcel M., Tena M.T., in *Analytical supercritical fluid extraction*. Springer laboratory, Berlin, p 321 (1994).
- [31]: Jitaru M., Lowy D. A., Toma M., Toma B. C., Oniciu L. Electrochemical reduction of carbon dioxide on flat metallic cathodes, *Journal of Applied Electrochemistry*, 27, 1997, 875-989.
- [32]: BRUNETON, J. (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, techniques et documentation*, 2^{ème} édition. Lavoisier (France), 422-266.
- [33]: HOUCHIT, J. (1992). *Pharmacie naturelle*, Ed. Aubanel.
- [34]: CRETTE, L. (1981). *Les plantes aromatiques médicinales*, Ed. Atlas. 68-15.
- [35]: Franchomme, P.; Pénéol, D. 1990. *L'aromathérapie exactement*. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.
- [36]: Richard, H. 1992. *Épices et Aromates*. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339 p.
- [37]: Mengel, P.; Beh, D.; Bellido, G.M.; Monpon, B. 1993. VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums Cosmétiques Arômes* 114, 66-67.

- [38] : Bendahou, M.; Muselli, A.; Grignon-Dubois, M.; Benyoucef, M.; Desjobert, J.M.; Bernardini, J.F.; Costa, J. 2007. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* 106,132-139.
- [39]: Lucchesi, M.E.; Smadja, J.; Bradshaw, S.; Louw, W.; Chemat, F. 2007. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food Engineer.* 79, 1079- 1086.
- [40]:Lucchesi, M.E.; Chemat, F.; Smadja, J. 2004. Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A* 1043, 323-327.
- [41]:Chemat, F.; Lucchesi, M.E.; Smadja, J.; Favretto, L; Colnaghi, G.; Visinoni, F. 2006. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Anal. Chim. Acta* 555,157-160.
- [42]:Flamini, G.; Tebano, M.; Cioni, P.L; Ceccarini, L; Ricci, A.S.; Longo, I. 2007. Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *J. Chromatogr. A* 1143, 36-40.
- [43] : Robert, G. 2000. *Les Sens du Parfum*. Osman Erolyle MultiMedia Paris.224p.
- [44] : Proust, B. 2006. *Petite Géométrie des Parfums*. Éditions du Seuil. Paris. 126p.
- [45] :PBruneton, J. 1999. *Pharmacognosie. Phytochimie des plantes médicinales*. 2eme édition. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 915 p.
- [46] : Pellerin, P. 1991. Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour and perfume industry. *Perfum. Flavor.* 16,4, 37-39.
- [47] : Richard, H. 1992. *Épices et Aromates*.Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339 p.
- [48]:Wenqtang, G.; Shufen, L.; Ruixiang, Y.; Shaokun, T.; Can, Q. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food chem.* 1001, 1558-1564.
- [49]:Mémoire pour obtenir le grade de magister en chimie organique option phytochimique présenté par BENGRBA ADLEN université de constantine Mai 2008.
- [50]: Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, Masson, Paris, 1995.

[51]: BHASKARA, R.M.V ET COL. (1998).Characterisation and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits phytochemistry 47(8), 1520-1515.

[52]: BEZAGER, L ET COLL. (1992).Les plantes dans la thérapeutique modern, 6ème édition, Ed.Mloire.4200

[53] : BERNADET, M. (1983).Phyto-aromathérapie pratique. Ed .Masson, 89-78.

[54] : ORANGES, R, PASSET, G.TEULADE. (1973).Les plantes médicales à essences et chimiotaxonomie, 17ème journée de l'aromate lourd ,12 mai 1973.

[55] : ABRASSART, J.L. (1992).Guide pratique d'aromathérapie : usages et biens faits des huiles essentielles des plantes .95-98.Ed .Masson.

[56] : LEMIRE, N. (2000).Gazette thérapeutes, 26-30, Ed. Atlas.

[57] : PONOEL, D.Urgences et soins intensifs en médecine aromatique intégrée.255

[58] : PARIS, M, HURABIELLE, M.(1981).Abrégé de matière médicale (pharmacognosie),TonneI.Ed.Masson (Paris ,New York). 259. Lavoisier(France).

[59] : BAUDOUX, D. (2000).L'aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles .58-59, Ed.Maloire.

[60]:Smallfield 2001 Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crop & Food Research. Number 45, 4p.

[61]: Cowan M. M. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical biology Reviews. 12 (4), 564–582.

[62] :Mémoire Elaborée en vue de l'obtention du diplôme de (D.E.S) option biologie végétale. Université de Biskra. (Promotion 2009/2010).

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

[64] :PiquemalG.2008.Les flavonoïdes (en ligne) :[http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=15'](http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=15)

[65] : Karaali A., Boyacioğlu D., Güneş G. et Özçelik B. 2004. Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food quality, nutrition and health–STREP or CA. European commission's the 6th framework programme for research. Istanbul technical university. Turkey.

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

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

[68]: Medić-Šarić M., Jasprica I., Smolčić-Bubalo A. ET Monar A. 2004. Optimisation of chromatography of flavonoids and phenolic acids. CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA. **77** (1-2): 361-366.

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

[70]: Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R. 2001. Bioflavonoid classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian journal of pharmacology. **33**: 2-16.

[71] : Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (3^{ème} Éd.). Paris: Editions médicales internationales, éditions Tec & Doc Lavoisier, **1999**, 1120p.

[72]: Lhuillier, A. (2007) Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse.

[73] : Bouakaz, I., 2006. Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Batna.

[74]: Gamet-Payrastré, L., Manenti, S., Gratacap, M.P., Tulliez, J., Chap, H., Payrastré, B. (1999) Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. General Pharmacology. **32**: 279-286.

- [75]: Hutzler P., Fishbach R., Heller W., Jungblut T. P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenböck G. et Schnitzler J. P. 1998. Tissue localisation of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of experimental botany.*, **49** (323) : 953-965.
- [76]: Boud et A. M. 2000. L'usine chimique. 9^{ème} conférence de l'université de tous les savoirs. France. P1-16.
- [77]: Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., Fillastre, J.P. (2004) The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipide-peroxydation and increasing liver glutathione concentration. *Pathologie Biologie.* **52**:314-322.
- [78]: Bruneton, J. (1999) *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.* 3^{ème} Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, 575p.
- [79]: De Rijke, E., Out P., Niessen, W. M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.T. (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatography A*. **1112**: 31-63.
- [80]: Ramassamy, C., (2006) Emerging role of polyphenolic compounds in treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *European J Pharmacology.* **545**: 51-64.
- [81]: Tieppo, J., Vercelino, R., Dias, A.S., Silva Vaz, M.F., Silveira, T.R., Marroni, C.A., Marroni, N.P., Henriques, J.A.P., Picada, J.N. (2007) Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food and Chemical Toxicology.* **45**: 1140-1146.
- [82]: Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Golino, A., Mastellone, C., Oriano, P., Monaco, P. (2007) Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Flavone Glycosides from *Melilotus neapolitana*. *Molecules.* **12**: 263-270.
- [83]: Marfak, A. (2003) Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de Leur reactivite avec les radicaux issus des Alcools: formation de depsides. Thèse de doctorat. Limoges.
- [84]: Mookerjee.B.K, Lee.T.P, Logue.G.P, Lippes.H.A, Middleton.E. The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Prog. Clin. Biolo. Res.* 1986 **213**: 511-20.
- [85]: Namgoong.S.Y, Son.K.H, Chang.H.W, Kang.S.S, Kim.H.P. Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* 1994 **54**(5): 313-20.
- [86]: Middleton.E.J, Drzewiecki.G. Flavonoid inhibition of human basophil histamine

release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol.* 1984;33(21): 3333-8.

[87]: Ward.J. Free Radicals, antioxidants and preventive geriatrics. *Austr. J. Physic.* 1994 23(7): 1297-301.

[88]: Limasset.B, Le doucen.C, Dore.J.CH, Ojasoo.T, Damon.M, De pault.A. C. Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 1993 46(7): 1257-71.

[89]:Roengsumran.S, Petsom.A, Ngamrojanavanich.N, Rugsilp.T, Sittiwicheanwong.P, Khorphueng.P, Cherdshewasart.W, Chaichantipyuth.C. Flavonoid and flavonoid glycoside from *Butea superba* Roxb. and their cAMP phosphodiesterase inhibitory activity. *J.Scient.c Research of Chulalongkorn University* 2000 25(1): 169-176.

[90]: Da silva.E.J.A, Oliveira.A.B, Lapa.A.J. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 1994 46(2): 118-22.

[91]: Galati.E.M, Monforte.M.T, Kirjavainen.S, Forestieri.A.M, Trovato.A, Tripodo.M.M. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco.* 1994 40(11): 709-12.

[92]: Read, M. A. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents
Vascular. *Am. J.Pathol.* 1995 147(2): 235-7.

[93]: Middleton.E.J. Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int. J. Pharmacol.* 1996 34 (5): 344-348.

[94]: Vrijssen.R.E.L, Van hoof.L.M, Vlietinck.A.J, Vanden berghe.D.A, Boeye.A. The poliovirusinduced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. *Antivir. Res.* 1987 7(1): 35-42.

[95]: Mucsi.I, Pragai.B.M. Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. *Experientia* 1985 41(7):930-1.

[96]: Spedding.G, Ratty.A, Middleton.E.J. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antivir. Res.* 1989 12(2): 99-110.

[97]: Ono.K, Nakane.H, Fukushima.M, Chermann.J.C, Barre-sinoussi.F. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur. J. Biochem.* 1990
190(3): 469-76.

[98]: Ono.K, Nakane.H. Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. *J. Biochem.* 1990 108(4): 609-13.

- [99]: Mahmood.N, Pizza.C, Aquino.R, De tommasi.N, Piacente.S, Colman.S, Burke.A, Hay.A.J. Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir. Res.* 1993 46(7): 1257-71.
- [100]: Fesen.M.R, Pommier.Y, Leteurtre.F, Hiroguchi.S, Young's, Kohn.K.W. Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem.Pharmacol.* 1994 48(3): 595-608.
- [101]: Ohemeng.K.A, Schwender.C.F, Fu.K.P, Barrett.J.F. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1993 3(2):225-30.
- [102]:Sato.M,Tsuchiya.H, Takase.I,Kureshiro.H,Tanigaki.S,Iinuma.M.Antibacterial activityofflavanoneisolatedfromSophora exigua against methicillin-resistant Staphylococcus aureus anditscombinationwith antibiotics. *Phytother. Res.* 1995 9(7): 509-12.
- [103]: Mila.I, Scalbert.A. Tannin antimicrobial properties through iron deprivation: a new hypothesis. *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance*, 1994 381(2): 749-755.
- [104]: Verma.A.K, Johnson.J.A, Gould.M.N, Tanner.M.A. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by the dietary flavonol quercetin. *Cancer Res.* 1988 48(20):5754-8.
- [105]:Kato.R,Nakadate.T, Yamamoto.S, Sugimura.T. Inhibition of 12-OtetRadecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis* 1983 4(10):1301-5.
- [106]: Nishino.H, Naito.E, Iwashima.A, Tanaka.K, Matsuura.T, Fujiki.H, Sugimura.T. Interaction between quercetin and calcium-calmodulin complex: possible mechanism for anti-tumor-promoting action of the flavonoid. *Gann* 1984 75(4): 311-16.
- [107]:Verma.A.K, Boutwell.R.K.Intracellular calcium andskin tumor promotion: calcium regulation of induction ofepidermalornithine decarboxylase activity by the tumor promoter 12-tetRadecanoylphorbol-13- acetate. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 1981 101(2):375-83.
- [108]: Boynton.A.L, Kleine.L.P, Durkin.J.P, Whitfield.J.F, Jones.A. Mediation by calcicalmodulin and cyclic AMP of tumor promoter-induced DNA synthesis in calcium deprived rat liver cells. *Biol. Sci. Div.*, 1982 417-31.
- [109]: Wattenberg, Lee.W. Anticarcinogenic effects of several minor dietary components. *Foods, Proc. Int. Conf.* 1983 157-66.
- [110]: Bu-abbas.A, Clifford.M.N, Ioannides.C, Walker.R. Stimulation of rat hepatic UDPglucuronosyl transferase activity following treatment with green tea. *Food chem. Toxicol.* 1995 33(1): 27-30.

- [111]: Nijhoff.W.A, Bosboom.M.A, Smidt.M.H, Peters.W.H. Enhancement of rat hepatic and gastrointestinal glutathione and glutathione S-transferases by alpha-angelicalactone and flavone. The Netherlands Carcinogenesis 1995 16(3): 607-12.
- [112]: Obermeier.M.T, White.R.E, Yang.C.S. Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. Pharm. Res. 1995 25(6): 575-84.
- [113]:Lasker.J.M, Huang.M.T, Conney.A.H. In vitro and in vivo activation of oxidative drug metabolism by flavonoids. J.pharmacol. exp. ther. 1984 229(1):162-70.
- [114]:Parmar, N.S., Ghosh, M. N. (1980) Current trends in flavonoid research. *Ind. J. Pharmac.*12:213-228.
- [115] : Martin S., Andriantsitohaina R. (2002) Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie.* 51:304-315.
- [116] :Merghem R., Jay M., Viricel M. R., Bayet C. et Voirin B. 1995. Five 8-C benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry.*, 38 (3) : 637-640.
- [117] :Sine J. P. 2003. Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques cours et exercices. Ellipses editions marketing S A. p 99-101.
- [118] :Latifou L. 2005. Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes beninoises. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur de Strasbourg.
- [119] :Nauciel, C. (2000) Bactériologie médicale. Masson (Ed).Paris, 276p.
- [120] : Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. (2000) Bactériologie clinique. 3^{ème} édition Ellipses (Ed) Paris, 602 p.
- [121] : PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C. & ROURA S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologic*, 36, 679-684.
- [122] :Benkiki N. 2006. Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*. Thèse de doctorat de l'université Haj Lakhdar de Batna.
- [123] :Bandyukova V. A. et Shinkareako A. L. 1973. The thin layer chromatography of flavonoids. *Chemistry of natural compounds.* 9 (1) : 17-21.
- [124] :Ebrahimzadeh M. A., Pourmmorad F. et Hafezi S. 2008. Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish journal of biology.*, 32 : 43-49.
- [125] :Park H. J. et Cha H. C. 2003. Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean journal of biological society.*, 7 : 327-330.

RESUME :

Dans le cadre de notre étude des plantes médicinales, nous avons réalisé une étude phytochimique et biologique dans la plante *rosmarinus officinalis*.

L'extraction d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* à été effectuée par hydrodistillation le rendement obtenu à partir des feuilles est 0,8%. L'analyse par CCM a révélé la présence de trois composés majoritaire. L'H.E de romarin présente une activité antibactérienne contre l'*Escherichia coli* par sa zone d'inhibition (12mm).

L'analyse par CCM et spectroscopie d'absorbance ultraviolette des deux extraits (EtoAC, MEC) de la plante à montré leur richesse en composés flavonique. L'étude antibactérienne a montré que les extraits (EtoAC, MEC) du romarin agissent différemment sur les espèces bactériennes testées. Pour l'extrait d'EtoAC possède une bonne action vis-à-vis de *pseudomonas* et *E. coli*, avec des zones d'inhibition (17mm-15mm). Et d'autre part l'extrait d'EtoAC a révélé activité antibactérienne intéressante contre les souches *Staphylococcus* et *pseudomonas* avec des zones d'inhibition de 18mm.

ABSTRACT

As part of our study of medicinal plants, we performed a phytochemical and biological study in plant *Rosmarinus officinalis*.

The extraction of essential oil of *Rosmarinus officinalis* was performed by hydrodistillation yield obtained from the leaves is 0.8%.

TLC analysis revealed the presence of three compounds prevails. The essential oil of rosemary exhibits antibacterial activity against *Escherichia coli* by its inhibition zone (12mm).

TLC analysis and UV absorbance spectroscopy of the two extracts (EtOAc MEC) of the plant to show their wealth flavonic compounds.

The study showed that bacterial extracts (EtOAc, MEC) rosemary act differently on the bacterial species tested. For the MEC extract has good action vis-a-vis *pseudomonas* and *Escherichia coli*, with zones of inhibition (17mm - 15mm). And secondly, the EtOAc extract showed interesting antibacterial activity against stem *Staphylococcus* and *pseudomonas* with inhibition zones 18mm.

المخلص

كجزء من دراستنا للنباتات الطبية , أجرينا دراسة نباتية و بيولوجية على نبتة الإكليل, حيث تم استخراج الزيت العطري من الإكليل بواسطة تقنية التقطير تم الحصول عليها من الأوراق وتقدر ب 0,8.

كشفت تحليل الكروماتوغرافيا عن وجود ثلاث مركبات أساسية كما بينت الدراسة البيولوجية التي أجريت على ثلاث أنواع من البكتيريا بان الزيت العطري للإكليل له نشاط ضد الإشريشيا كولي و قطرها 12مم.

التحليل بواسطة الكروماتوغرافيا والتحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية الامتصاصية من مقتطفات اثنين (ميثيل ايثيل سيتون, اسيتات ديثيل) من النبتة بينت ثروتها بالمركبات الفلافونية. و اظهرت الدراسة ضد النشاط البكتيري أن مستخلصات الإكليل له نشاط مختلف على الأنواع البكتيرية التي تم اختيارها. بحيث أن ميثيل ايثيل سيتون له نشاط مضاد للبكتيريا من نوع البسودو والإشريشيا و قطرها (15-17مم) على التوالي اما بالنسبة للاسيتات له نشاط ضد البكتيريا من نوع البسودو و ستافيلو و قطرها (18مم).

Mots clés : *Rosmarinus officinalis*, flavonoïdes, huile essentielle, CCM, activité antibactérienne.