RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère d'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Moulay Tahar - Saida
Faculté Des Sciences et de la technologie
Département de chimie

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de Licence en chimie
Option : Chimie Organique

Sous le THÈME

Contribution à l'étude chimique du ROMARIN (*Rosmarinus officinalis* L) ALGÉRIEN

Dirigé par :
Mr. Tahar KEBIR

Présenté par :
Mr khorsi kadda

Soutenu publiquement le 03 - 07 - 2013

Devant le Jury :

Mr. GUENDOUZI A	Maître assistant A à UMTS	**Président**
Mr. BOUTALEB M	Maître assistant A à UMTS	**Examinateur**
Mme. CHABANI M	Maître assistant A à UMTS	**Examinatrice**
Mr. KEBIR T	Maître de conférences B à UMTS	**Encadreur**

Année universitaire 2012 – 2013

DÉDICACES

A mes très chers parents
A ma très chère femme
A mes frères et soeurs
A tous ceux qui me sont chers

REMERCIEMENTS

Ce modeste travail de recherche a été effectué au sein de laboratoire de département de chimie, Faculté des sciences et de la technologie de l'université de Moulay Tahar de Saida - Wilaya de Saida.

Je tiens à remercier en premier lieu **Mr KEBIR tahar** maître de conférences B à l'université de Saida pour avoir accepter de m'encadrer et de me diriger, pour son soutien, ses encouragements ainsi que pour la confiance qu'elle m'a accordée en réalisant ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes Remerciements vont aussi à **Mr GUENDOUZI A** maître assistant B à l'université de Moulay Tahar de Saida pour l'honneur qu'elle m'a fait en présidant mon jury. et pour son aide précieuse au cours de mon parcours.

Mes remerciements vont aussi à **Mr BOUTALEB Miloud**, maître assistant A à l'université de Moulay Tahar de Saida d'avoir accepter d'examiner ce travail.

Je tiens également à remercier **Mme CHABANI Malika** maître assistant -A- l'université de Moulay Tahar de Saida d'être intéressés à ce travail et d'avoir accepté d'en être l'examinatrice.

Enfin, je suis reconnaissante à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

ACRONYMES

MO : Matière Organique
MM : Matière Minérale
MS : Matière sèche
MV : Matériel Végétal
mn : minute
g : gramme
% : pourcentage
cm : centimètre
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
CPG : Chromatographique en Phase Gazeuse.
UV : Ultra-Violet
IR : Infra-rouge (Infrared)
RMN : Résenance Magnétique nucléaire
G3P: glycéraldéhyde-3-phosphate,
PEP: phosphoénolpyruvate,
TCA: cycle de l'acide citrique
DMAP : dimethylallyle pyrophosphate
DPPH$^{\bullet}$: radical 2,2-Diphényl-1-PicrylHydrazyl
CPT : Composés Phénoliques Ttotaux
$AlCl_3$: Chlorure d'aluminium
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CI_{50} : Concentration Inhibitrice 50
CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance (High Performance Liquid Chromatography)
GAE : Equivalent en Acide Gallique
DO : Densité Optique
A : Absorbance
Test LB : Test Liebermann-Burchard
H : Humidité.
µl : Microlitre
Méthode A: Extraction à température ambiante
Méthode B : Extraction à température élevée

Tables des matières

INTRODUCTION GENERALE .....-1-

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBILIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I - LA PHYTOTHERAPIE ET LES PLANTES

I-1 / DEFINITION DE LA PHYTOTHERAPIE.....4
I-2 / DIFFERENTS TYPES DE LA PHYTOTHERAPIE.....4
I-3 / LES AVANTAGES DE LA PHYTOTHERAPIE.....5
I-4 / LES PLANTES MEDICINALES.....5
I-5 / LE POUVOIR DES PLANTES 6
I-6 / EFFICACITE DES PLANTES ENTIERES.....6
I-7/ PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE.....6
I-7-1/ PRESENTATION DE LA FAMILLE DES DES LAMIACEAE.....**6**
I-7-2/ SYSTEMATIQUE DE LAMIACEES 6
I-7-3 / LA PLANTE : ROSMARINUS OFFICINALIS L 7
I-7-4 / NOMENCLATURE DE LA PLANTE 7
I-7-5 / DESCRIPTION BOTANIQU 7
I-7-6/ CLASSIFICATION.....8
I-7-7 / DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE ET HABITAT.....9
I-7-8 / VARIETES DU ROMARIN 9
I-7-9 / PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES ET THERAPEUTIQUES DU ROMARIN.....10
I-7-10 / AUTRES PRINCIPES ACTIFS QUE LES HUILES ESSENTIELLES 10
I-7-11 / USAGE THERAPEUTIQUE 10

CHAPITRE II- PHYTOCHIMIE DES PLANTES AROMATIQUES

II- 1/ INTRODUCTION .....- 13 -
II- 2/ METABOLISMES DES VEGETAUX SUPERIEURS.....- 13 -
II-2-1/ METABOLISME PRIMAIRE .....- 13 -
II-2-2/ METABOLISME SECONDAIRE .....- 14 -
II-2-3/ PRINCIPALE CLASSE DES METABOLISMES SECONDAIRES.....- 15 -
II-3 / INTERETS ET FONCTIONS DES COMPOSES DU METABOLISME SECONDAIRE.....- 32 -

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... - 33 -

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I – MATERELS ET METHODES

I-1/ Matériel végétal .....- 37 -
I-2/ Période de récolte de notre plante .....- 37 -
I-3/ Identification botanique.....- 38 -
I-4/ Préparation des échantillons.....- 38 -
I-5/ Détermination de la teneur en eau.....- 38 -
I-6/ Détermination de la teneur en cendres.....- 39 -
I-7/ Détermination du pH.....- 40 -
I-8/ Test phytochimique.....- 40 -
I-9 / Dosage des composés phénoliques totaux (CPT) .....- 46 -
I-10 / Activité anti-radicalaire contre le radical DPPH.....- 47 -

I-11/ Spectrophotométrie UV-vis.....- 48 -

CHAPITRE II – RESULTATS ET DISCUDDION

II-1/ TENEUR EN EAU.....**- 50 -**
II-2/ TENEUR EN CENDRES.....**- 51 -**
II-3/ LE PH.....**- 52 -**
II-4/ RENDEMENT D'EXTRACTION.....**- 53 -**
II-5/ TESTS PHYTOCHIMIQUE /OU SCREENING CHIMIQUE.....**- 54 -**
II-6/ DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES.....**- 57 -**
II-7/ EVALUATION DU POUVOIR ANTIOXYDANT CONTRE DPPH.....**- 59 -**
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....**- 59 -**

CONCLUSION GENERALE .....**- 60 -**

ANNEXES..... .....**- 61-**

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore, une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites **[1].**

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal recours de la médecine de nos grands parents, malgré l'important développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies souvent mortelles. Environ 80% de la population mondiale profite des apports de la médecine traditionnelle à base des plantes reconnaissant ainsi les savoirs empiriques de nos ancêtres **[2]**.

En effet, les plantes possèdent des milliers de substances actives à l'intérieur de leurs organes (feuilles, fleurs, racines,...) et peuvent, selon des techniques chimiques (extraction, distillation,....), permettre l'isolation du principe actif pour l'utiliser en pharmacie. Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés **[3].** De multiples études, certes dispersées, portent sur la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les huiles essentielles qui ont des intérêts multiples mis en faveur de l'industrie agroalimentaire (additifs, colorants, arômes, agents de conservation) et pharmaceutique, malheureusement l'exploitation et la valorisation de ces ressources naturelles reste très limitée et très artisanale.

L'Algérie recèle d'un patrimoine végétal important par sa richesse et sa diversité dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes : on y trouve plus de 3000 espèces végétales. Parmi ces ressources naturelles les plantes aromatiques et médicinales occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différents domaines : industrie alimentaire, conserverie, pharmaceutique, et phytothérapie **[3].**

Malgré cette biodiversité immense qui contient l'Algérie, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier *Rosmarinus officinalis* L, des labiées très fréquemment employées dans le pourtour méditerranéen.

L'objectif de ce travail vise à étudier une plante médicinale aromatique beaucoup utilisée en pharmacopée médicinale algérienne. Pour cela notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique qui consiste à rechercher des catégories de molécules en fonction de leur appartenance botanique.

Le second aspect est consacré à une détermination quantitative des composés phénoliques, en suite une évaluation de l'activité antioxydante des extraits contre le radical libre DPPH par spectrophotométrie UV-vis.

Ce memoire est scindé en deux grandes parties :

La première partie est un synthèse bibliographique qui tentera de faire une approche de connaissances sur la phytothérapie des plantes médicinales, les principales caractéristiques de notre plante séléctionnée et des substances actives végétales.

La deuxième partie est le travail expérimental, elle est consacrée à :

- la détermination des différentes classes chimiques par criblage phytochimique,
- dosage des phénols totaux par spectrophotométrie,
- l'évaluation de l'effet antioxydant des extraits méthanolique correspondants aux feuilles et fleurs selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH,
- la discussion des résultats obtenus.

Enfin, ce manuscrit se terminera par une conclusion générale, en présentant les résultats acquis qui permettra de dégager des perspectives de prolongement à ce travail.

Références bibliographiques

[1]- Hostettman K., Poteratte O.et Wolfender J.L., 1998. The Potential of Higher Plants as a Source of New Drugs. Chimia International Journal for Chemistry , 52, 10-17.

[2]- El-Rhaffari L. et Zaid A., 2004. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes, 293-318.

[3]- Duraffourd C., Lapraz J.C. et R Chemli., 1997. La plante médicinale de la tradition à la science. 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, 222.

INTRODUCTION GENERALE.....ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE..... **- 2 -**

Première partie :
Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Phytothérapie et les plantes

Chapitre I- LA PHYTOTHERAPIE ET LES PLANTES

Si l'on ne sait pas précisément ce que nos ancêtres mangeaient au début de l'humanité il y'a 5 à 7 millions d'années, il est certain que les plantes faisaient partie de leur alimentation quotidienne. Ils découvraient très tôt dans leur évolution que ces plantes ne représentaient pas uniquement une source d'alimentation mais pouvaient également soulager voire guérir certaines maladies.

Aujourd'hui les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins **[1]**. Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y 'a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon **OMS** (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé **[2]**.

En effet sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique ont des vertus médicinales **[3].**

I-1/ Définition de la Phytothérapie

Traitement ou prévention des maladies par l'usage des plantes, la phytothérapie fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces.

I-2/ Différents types de la Phytothérapie

- ✓ **Aromathérapie :** est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau.
- ✓ **Gemmothérapie :** se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicelles.
- ✓ **Herboristerie :** correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces

préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale.

✓ **Homéopathie :** a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive; les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale.

✓ **Phytothérapie pharmaceutique :** utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats… etc. **[4]**

I-3/ Les avantages de la phytothérapie

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus.

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connait de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite **[5]**.

I-4/ Les plantes médicinales

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses **[2].** Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne **[6].**

I-5/ Le pouvoir des plantes

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, depuis XVIII ème siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent. On considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels.

Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la diagoxine qui soigne le coeur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes **[5]**.

I-6/ Efficacité des plantes entières

La phytothérapie à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi "totum" plutôt que des extraits obtenus en laboratoire. Une plante entière est plus efficace que la somme de ses composants, les plantes contiennent des centaines voire des milliers de substances chimiques actives **[5]**.

I-7/ Présentation de la plante étudiée

I-7-1/ Présentation de la famille des des lamiaceae

La famille des Lamiacées (Lamiaceae) ou Labiées (Labiatae) est une importante famille de plantes dicotylédones, qui comprend environ 4000 espèces et près de 210 genres **[7],** dont un est étudié dans ce présent travail : romarin..

Cette famille comporte de nombreuses plantes exploitées pour les essences ou cultivées pour l'ornementation et la plupart de ces espèces sont aussi bien utilisées dans la médecine traditionnelle que dans la médecine moderne **[7]**.

La famille des lamiacées contient une très large gamme de composés comme les terpénoïdes, les iridoïdes, les composés phénoliques, et les flavonoïdes. Les huiles essentielles et plus précisément les courtes chaines des terpénoides sont responsables de l'odeur et la saveur caractéristique des plantes **[7]**.

I-7-2/ Systématique de lamiacées

C'est une famille très importante dans la flore d'Algérie, ces espèces sont souvent des

plantes herbacées, ou sous-arbrisseaux à poils glanduleux, en général aromatiques. Leur tige est carrée, certaines espèces sont dressées, d'autres couchées portent des feuilles opposées ou verticillées. Les fleurs bisexuées, irrégulières, groupées à l'aisselle des feuilles en inflorescences plus ou moins allongées ou en inflorescences terminales plus ou moins denses, à calice tubuleux ou en cloche persistant, à corolle à tube très développé, ordinairement caduque et à 2 lèvres. Le fruit sec se séparant en quatre articles contenant chacun une graine **[8]**.

I-7-3/ La plante : Rosmarinus officinalis L

Le nom « Rosmarinus » dérive du latin «Ros» = rosée et «Marinus» = marin.

Il existe plusieurs espèces, tous sont remarquables par leur odeur forte et aromatique.

I-7-4/ Nomenclature de la plante

- **Noms français :** Romarin, Encensier, Herbe aux couronnes, Herbe des troubadours
- **Noms locaux (ou vernaculaires arabes):** , Iklil aljabal, Hatssa louban, Hassalban et Klil
- **Noms targui (ou berberes) :** Lazir, Azir, Ouzbir et Touzala.
- **Nom anglais :** Rosmary
- **Nom scientifique**: *Rosmarinus officinalis* L

I-7-5/ 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 (Fig I-1).

La floraison commence dés 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 (Fig I-2) .Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tetrakène

(de couleur brune). Il attire les insectes (entomophile) pour assurer la pollinisation (entomogame).

Fig I-2. Rameau feuillé à fleurs Romarin

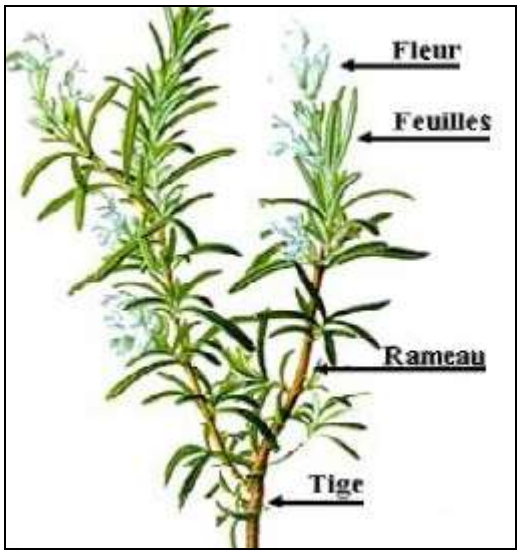


Fig I-1. Tige principale et rameau feuille a fleurs du romarin

I-7-6/ Classification

I-7-6-1/ Classification classique

La classification des lamiacées selon Quezel et Santa **[9]** :

- **Règne** Plantae
- **Embranchement** Spermaphytes
- **Sous embranchement** Angiospermes
- **Classe** Dicotylédones
- **Ordre** Tubiflorales
- **Sous ordre** : Lamiales
- **Familles** Lamiaceae
- **Genre** *Rosmarinus*
- **Espèce** *Rosmarinus officinalis*

I-7-6-2/ Classification phylogénétique

- **Ordre** Lamiales

- **Famille** Lamiaceae

I-7-7/ Distribution géographique et habitat

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 (Fig I-3), exposés au soleil, à l'état sauvage il se trouve sur des sols calcaires.

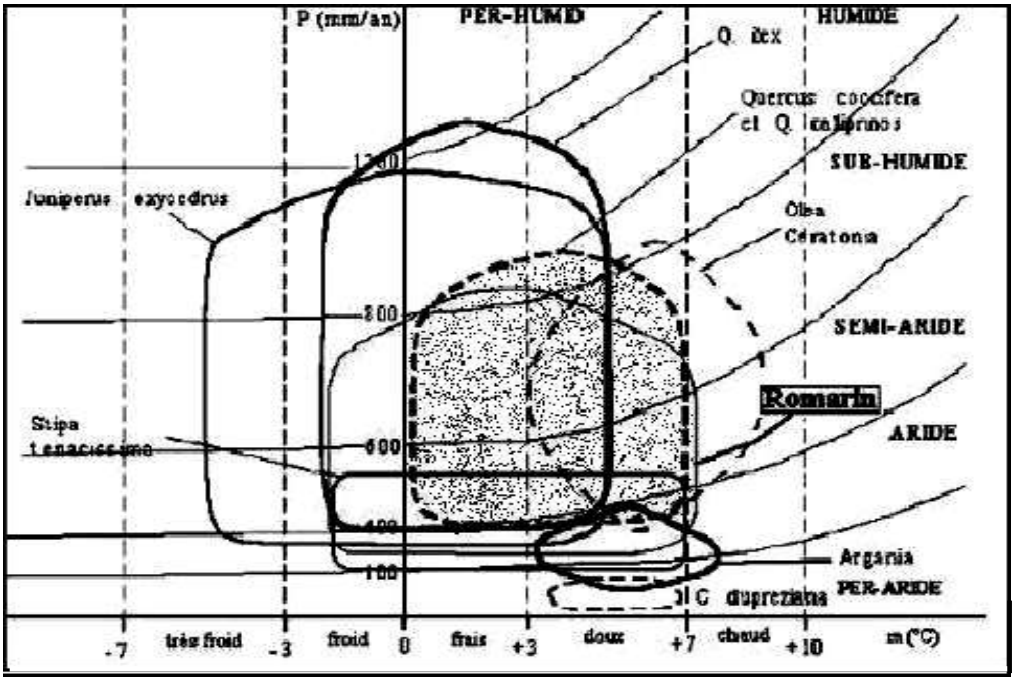


Fig I-3. Bioclimat du romarin dans le climagramme d'Emberger (1955)

La multiplication du romarin se réalise en automne ou au printemps par semis des graines, des boutures ou par rejets des pieds. Plusieurs récoltes peuvent se faire dès le printemps, en mai, juillet et septembre.

On suspend les tiges réunies en bouquets, dont on détache les feuilles après un séchage complet. Il peut y avoir des fleurs toute l'année, mais la période de floraison maximale se situe au printemps (mars à mai), puis, dans une moindre mesure, à l'automne (septembre). Le romarin ne se développe complètement qu'en pleine lumière (héliophile), Il s'accommode de milieux à sécheresse estivale accusée, il est xérophile **[10]**.

I-7-8/ Variétés du romarin

Le romarin se présente en une seule espèce avec de très nombreux chémotypes (sous espèce) **[11]**; C'est à dire tous liés à la nature chimique du constituant majoritaire de l'huile essentielle (Tableau I-1).

I-7-9/ Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin

Le romarin renferme une huile essentielle à laquelle il doit ses propriétés intéressantes (Tableau I-1). Il stimule le fonctionnement de la vésicule biliaire, il agit sur les fermentations intestinales et sur les douleurs abdominales qu'elles entraînent. Il calme aussi la toux et contribue au confort de l'asthmatique **[11].** Il est tonicardiaque, hypotenseur décongestionnant veineux, régulateur hépatique **[12]**.

Tableau I-1. Les différents chemotypes du romarin **[10]**

	Camphoriferum (R.o. à camphre)	**Cineoliferum (R.o. à cinéole)**	**Verbenoniferum (R.o. à verbénone)**
Origine	France	Afrique du Nord (Maroc et Tunisie)	Corse
Principaux principes actifs	Monoterpènes (camphène), oxydes (1,8 cinéole), monoterpénones (camphre)	Monoterpènes, oxydes (1,8 cinéole), monoterpénones	Monoterpènes (alpha-pinène), monoterpénols (bornéol), monoterpénones (verbénone)
Principales propriétés	Action neuromusculaire, mucolytique	Anticatarrahte, expectorante.	Anticatarrahte, mucolipolytique, expectorante, antispasmodique, équilibrante endocrinienne
Principales indications	Crampes, contractures, rhumatismes musculaires	Otites, sinusites, bronchites, refroidissements pulmonaires.	Sinusites, bronchites, insuffisance hépato-biliaire, hépatites virales.
Contre-indications	Aucune connue	Aucune connue.	Sujets hépatiques hypersensibles, jeunes enfants, femmes enceintes (neurotoxique, abortive).

I-7-10/ Autres principes actifs que les huiles essentielles

Les principaux constituants du romarin responsables des différentes propriétés sont :

- ✓ **Les acides phénoliques** : acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique **[13]**.
- ✓ **Les flavonoïdes** : genkwanine, cirsimaritine **[14]**, ériocitrine, hesperédine, diosmine, lutéoline, apigénine **[15]**.

I-7-11/ Usage thérapeutique

I-7-11-1/ Usage Interne [10]

En usage interne, le Romarin est utilisé pour soigner l'asthénie, le surmenage physique et intellectuel, l'hypotension, l'impuissance, la chlorose, les adénites, le lymphatisme, l'asthme, les bronchites chroniques, la coqueluche, et la grippe. On l'utilise aussi pour traiter les infections intestinales, les colites, les diarrhées, les flatulences, l'hépatisme, les cholécystites, les ictères par hépatite et par obstruction, les cirrhoses, la lithiase biliaire, l'hypercholestérolémie, les dyspepsies atoniques, les douleurs gastriques.

Enfin on l'utilise aussi contre les rhumatismes, la goutte, les dysménorrhées, les leucorrhées, les migraines, les affections du système nerveux (hystérie, épilepsie, séquelles de paralysies, faiblesse des membres), les troubles cardiaques nerveux, les vertiges et les syncopes.

Pour tout cela vous pouvez prendre une infusion constituée d'une cuillerée à dessert de feuilles ou de fleurs de Romarin par tasse d'eau bouillante, que vous laisserez infuser 10 min. Cette infusion est à prendre à raison d'une tasse avant ou après les repas. Vous pouvez aussi prendre 3 à 5g d'extrait fluide de Romarin par jour, ou encore 3 ou 4 gouttes d'huile essentielle de Romarin, à raison de 2 à 3 fois par jour, en solution alcoolique ou dans du miel.

I-7-11-2/ Usage Externe [10]

En usage externe, le Romarin est utilisé pour soigner les plaies, les brûlures, les rhumatismes, les douleurs musculaires, les pertes blanches, la pédiculose, la gale, la fatigue générale, la débilité des enfants, et la faiblesse de la vue.

Contre les rhumatismes, vous pouvez vous faire des compresses d'une décoction constituée d'une poignée de Romarin par litre d'eau, que vous laisserez bouillir 10 min. Cette décoction peut être utilisée en injections vaginales contre les leucorrhées, et en lotion pour désinfecter les plaies. Contre les rhumatismes vous pouvez aussi vous faire des frictions avec une solution alcoolique d'essence de Romarin à 2 %, ou avec un liniment constituée de 40g de teinture de Gingembre, 2g d'essence d'Origan, et de 60g d'alcoolat de Romarin.

Contre les douleurs musculaires, vous pouvez vous faire des frictions avec un mélange d'essence de.

D'autres vertus de cette plantes : Antiseptique, cicatrisant des plaies et brûlures, résolutif, Astringent, Antispasmodiques, Anti-inflammatoire, Antioxydant....

Remarque : Un excès de préparation à base de romarin peut provoquer des crampes.

I-7-12/ Formes d'utilisation

Il est utilisé sous diverses formes :

- ✓ **Décoction** : le faire bouillir en même temps avec de l'eau.
- ✓ **Infusion** : le mettre dans un liquide initialement bouillant et le laisser refroidir afin qu'il libère tout les éléments actifs.
- ✓ **Autres** : sous forme d'huiles essentielles(en distillant les feuilles), gélules ou bains.

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBILIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I - LA PHYTOTHERAPIE ET LES PLANTES

I-1 / DEFINITION DE LA PHYTOTHERAPIE 4
I-2 / DIFFERENTS TYPES DE LA PHYTOTHERAPIE 4
I-3 / LES AVANTAGES DE LA PHYTOTHERAPIE 5
I-4 / LES PLANTES MEDICINALES 5
I-5 / LE POUVOIR DES PLANTES 6
I-6 / EFFICACITE DES PLANTES ENTIERES 6
I-7/ PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE.....6
I-7-1/ PRESENTATION DE LA FAMILLE DES DES LAMIACEAE **6**
I-7-2/ SYSTEMATIQUE DE LAMIACEES.....6
I-7-3 / LA PLANTE : ROSMARINUS OFFICINALIS L **7**
I-7-4 / NOMENCLATURE DE LA PLANTE.....7
I-7-5 / DESCRIPTION BOTANIQU.....7
I-7-6/ CLASSIFICATION.....8
I-7-7 / DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE ET HABITAT.....9
I-7-8 / VARIETES DU ROMARIN.....9
I-7-9 / PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES ET THERAPEUTIQUES DU ROMARIN.....10
I-7-10 / AUTRES PRINCIPES ACTIFS QUE LES HUILES ESSENTIELLES.....10
I-7-11 / USAGE THERAPEUTIQUE.....10

Chapitre II :

phytochimie des plantes aromatiques

Chapitre II- PHYTOCHIMIE DES PLANTES AROMATIQUES

II-1/ Introduction

La sauvegarde du patrimoine culturel s'articule autour de l'identification et de la mise en valeur des savoirs et savoir-faire locaux. Parmi ceux-ci, les thérapies coutumières, basées sur la connaissance des plantes, constituent un domaine particulièrement riche à valoriser par une approche participative dans une démarche interdisciplinaire **[16]**.

L'étude phytochimique d'une plante se fait pour déterminer sa nature, pour isoler son principe actif, ou encore pour extraire des constituants qui peuvent être utilisés comme précurseurs d'hémisynthèse de médicaments **[17]** et ce, à l'aide de méthodes chromatographiques (CCM, HPLC, CPG), chimiques (hydrolyse), ou physiques (spectrophotométrie UV et IR, spectrométrie de masse, RMN).

Les constituants chimiques de la plupart des plantes restent encore peu connus **[16].** Il est pourtant, important de connaître les composés chimiques d'une plante pour comprendre son activité biologique. D'un autre côté, la recherche de cette activité pour une plante est souvent orientée par son analyse qualitative et quantitative en composées majoritaires **[17]**, bien que, dans plusieurs cas, elle puisse être due à des composés présents sous forme de trace. On note aussi que les plantes constituent une réserve de molécules originales (propres à la plante) dont la majorité sont biologiquement actives seules ou en association. **[15].**

II-2/ Métabolismes des végétaux supérieurs

Il existe deux voies de métabolisme chez les végétaux : les métabolismes primaires, et les métabolismes secondaires.

II-2-1/ Métabolisme primaire

Au cours de ce que l'on appelle métabolisme primaire, les végétaux synthétisent des molécules indispensables à leur vie. On distingue, comme exemples, la synthèse des facteurs de croissance, des glucides stockés sous forme de saccharose ou d'amidon, des cofacteurs enzymatiques tels que le coenzyme A, le NAD^+, le $NADP^+$ et enfin de nombreux intermédiaires métaboliques comme le pyruvate et l'acétylcoenzyme A qui interviennent dans de nombreuses réactions de catabolisme et d'anabolisme **[18]**.

II-2-2/ Métabolisme secondaire

La majorité des molécules synthétisées par les plantes d'intérêt pharmaceutiques sont extraites directement de la plante entière. Ces molécules, appelées métabolites secondaires, ne constituent pas des espèces chimiques impliquées dans la croissance, aucun rôle spécifique pour la plante ne leur a été assigné **[18]**. Le métabolisme secondaire des plantes est lié au métabolisme primaire par cinq voies métaboliques principales: la voie de l'acide shikimique, de l'acide malonique, de l'acide mevalonique, des acides aminés **[18]** et du glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) via la voie des pentoses phosphates **[19]**. La figure II-1 donne un aperçu sur les interactions entre métabolismes primaire et secondaire. Les précurseurs principaux de la plupart des métabolites secondaires sont l'acétyl-Coenzyme A, l'erythrose-4-phosphate, le phosphoénolpyruvate, les acides aminés, le pyruvate et le 3-phosphoglycérate.

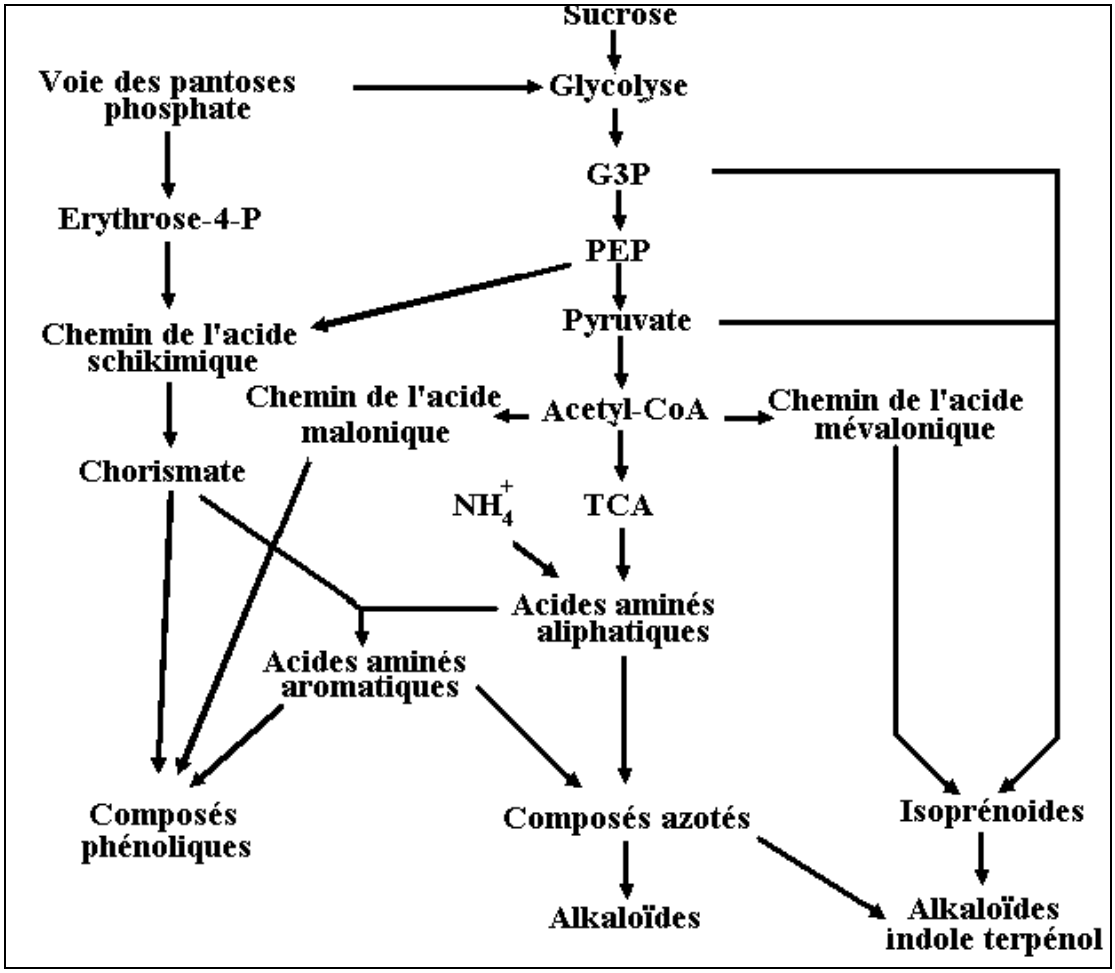


Fig II-1. Relations entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire chez les végétaux.

A l'inverse des métabolites primaires, les métabolites secondaires ne sont pas synthétisés de manière uniforme dans le règne végétal. Un métabolite secondaire particulier est souvent spécifique à quelques espèces.

Ces métabolites secondaires sont classés selon leur structure chimique; on les résume en trois grandes catégories : les composés phénoliques, les isoprénoides et les composés azotés.

II-2-3/ Principale classe des métabolismes secondaires

II-2-3-1/ Les terpénoïdes

Durant le XIX^{ème} siècle, les chimistes, (en particulier le chimiste Wallach) ont mis en évidence un nombre important de structures, généralement provenant de végétaux (les huiles essentielles), qui pouvaient être formellement découpées en unités C5, appelées unités isoprènes. Ces composés, de formule générale $(C_5H_8)_n$ ont été nommés 'terpènes', dont le nom étymologique vient de l'arbre de térébinthe **[20]**.

Le chimiste Ruzicka proposa une nomenclature pour les terpènes en fonction du nombre d'atomes de carbones qui les constituent : les hémiterpènes en C5, les monoterpènes en C10, les sesquiterpènes en C15, les diterpènes en C20, les sesterpènes en C25, les triterpènes en C30, les tétraterpènes en C40 et les polyterpènes **[20]**.

Il faut cependant noter que l'on distingue les terpénoïdes des terpènes : les terpénoïdes étant des dérivés terpéniques portant au moins un atome d'oxygène ou un hétéroatome.

a/ Caractéristiques des terpénoïdes

Le terme terpène inventé par Kekulé **[9]** vient à l'origine de l'huile de «térébenthine» qui a été utilisé pour tous les composés huileux volatils insolubles dans l'eau **[9]**. Les terpènes sont très diversifiés aussi bien du point de vue structural varié que du point de vue de leur activité biologique. Les composés de ce groupe, constitués uniquement des éléments: carbone, hydrogène et oxygène, représentent les constituants des huiles essentielles, résines, stéroïdes et des polymères **[21]**. L'huile, la plus connue et la plus abondante dans les essences des plantes et des fleurs est «le camphre» **[9]**, en arabe «kaphur» signifiant craie ou blancheur de lune **[22]**.

Ces composés qui constituent une famille de composés acycliques ou cycliques **[23]**, sont généralement peu stables à la chaleur et sont sensibles aux phénomènes doxydation **[24]**, ils sont très volatiles et sont considérés comme des substances assez énigmatiques, difficiles à étudier **[23].**

La très grande majorité des terpènes sont spécifiques du règne végétal **[22]** plusieurs sont isolés à partir des feuilles, de fruits, des grains, des racines et des écorces des dicotylédones **[20]**, généralement intense chez les Asteraceae **[23],** on peut en rencontrer chez les animaux, phéromones et hormones juvéniles sesquiterpéniques des insectes, dans les organismes marins **[21]**. Les monoterpènes existent à l'état halogéné chez les algues et sont largement distribués chez les végétaux supérieurs : exemples dordre Astérales, Laurales **[20].**

Les terpènes constituent entre autre le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones. Extraites, ces molécules sont employées comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande). Nombre d'entre eux possèdent aussi des propriétés antiseptiques **[25]**.

b/ Classes des terpénoïdes

Les terpénoïdes des plantes présentent une diversité structurelle et fonctionnelle remarquable. Ils ont une origine biosynthétique dérivé du précurseur «Isopentényl » et sont en majorité considérés comme des substances «lipophiles» **[24]**. Leur chaîne carbonée est constituée d'unités isoprènes (**Fig II-2**) à cinq atomes de carbones, assemblées d'abord en une chaîne insaturée qui est ensuite modifiée par oxydation, réduction ou élimination de carbone.

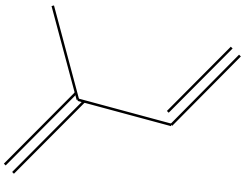


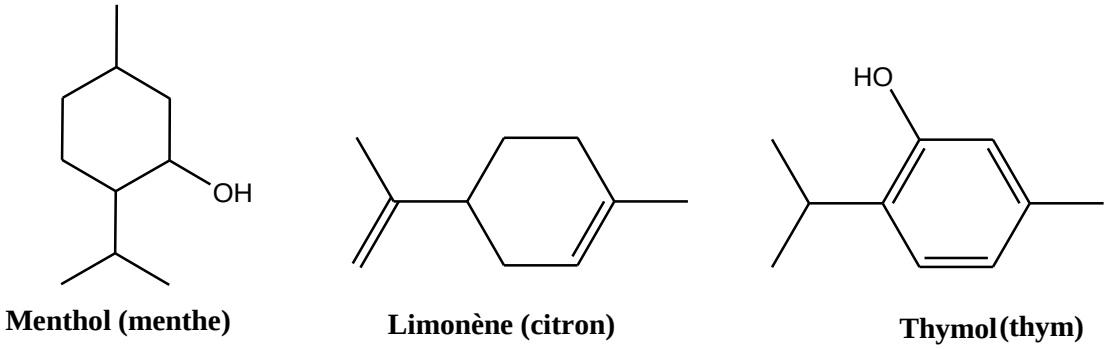
Fig II-2. Unité isoprène (C_5H_8)

L'assemblage des unités isoprèniques donne les différentes classes terpènoïdiques (Tableau II-1). Selon le nombre de ces entités, les terpènes sont classés **[24]** en mono terpènes à 10 carbones, sesquiterpènes à 15 carbones, diterpènes à 20 carbones, etc.

Tableau II-1. Les différentes classes de terpénoïdes

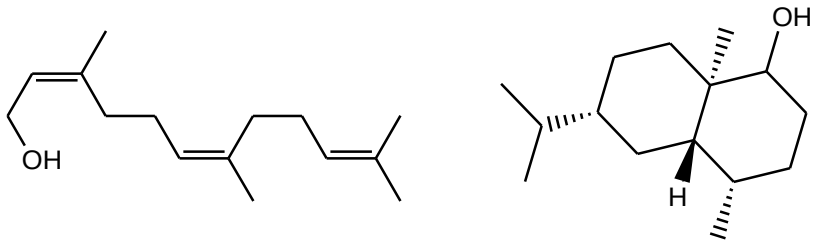
Classe	Formule chimique	Exemple
Isoprène	C_5H_8	
Monoterpènes	$C_{10}H_{16}$	Myrcène
Sesquiterpènes	$C_{15}H_{24}$	Farnésol

Diterpènes	$C_{20}H_{32}$	Terpinol
Triterpènes	$C_{30}H_{48}$	Squalène, Stérols
Tetraterpènes	$C_{40}H_{46}$	Carotène
Polyterpènes	$(C_5H_8)_n$	Caoutchouc



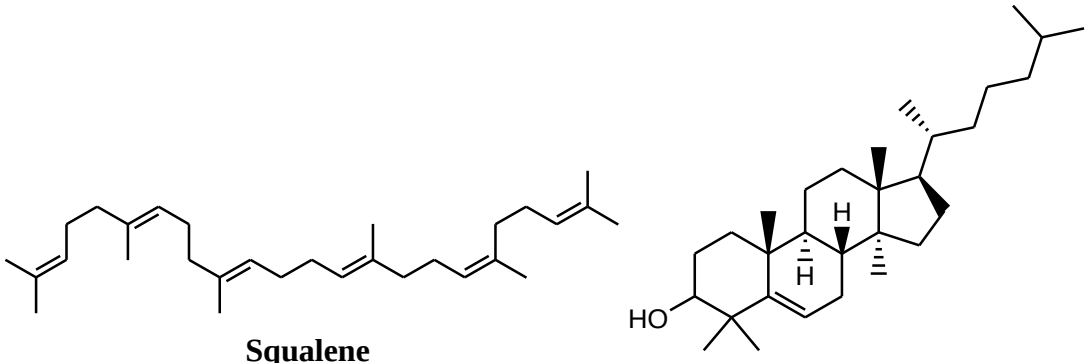
Menthol (menthe) **Limonène (citron)** **Thymol (thym)**

Fig II-3. Exemples des monoterpènes



Farnésol **Eudesmol**

Fig II-3. Exemples de sesquiterpènes



Squalene **Lanosterol**

Fig II-4. Exemples de triterpènes

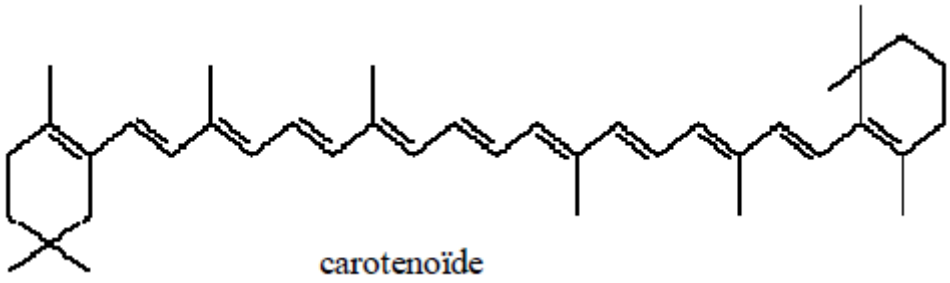


Fig II-5. Exemple de tétraterpènes

Fig II-6. Exemples de polyterpènes

c/ Biosynthèse des terpénoides

Les chimistes peuvent prendre exemple sur la nature, qui a su développer des processus extrêmement sélectifs mais aussi hautement efficaces. Beaucoup de biotransformations aboutissent à des molécules complexes. Pour arriver à synthétiser ces molécules complexes, la nature a développé deux grandes stratégies :

1. La première est de construire une molécule cible par une suite de réactions enzymatiques hautement efficace ;

2. La deuxième est d'utiliser des réactions en cascade. Pour illustrer cette deuxième stratégie, on peut prendre l'exemple de la biosynthèse des stéroïdes à partir de l'époxyde du squalène qui est transformé avec une haute sélectivité en lanostérol **[17]**.

La synthèse de l'acide mévalonique (molécule cible) qui, à la base de tous les terpènes, suit le processus indiqué dans la **figure II-7**. La réduction de trois chaînes acétyle sous forme d'acétyle CoA (1), aboutit a la libération d'acide mévalonique (2), qui par une déshydratation interne et une décarboxylation donne le pyrophosphate d'isoprenyle (3) qui peut s'isomériser en pyrophosphate de diméthylallyl (4).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'isoprène n'est pas l'unité active dans le milieu biologique. L'équivalent de cette entité est en fait l' isoprényle pyrophosphate (3), ou sa forme tautomère, le diméthyle allyle pyrophosphate (4). Le précurseur de ces deux

molécules est l'acide mévalonique qui est, de ce fait, le tronc de l'arbre biosynthétique des terpènes en général schématisé de façon simplifiée dans la figure II-8.

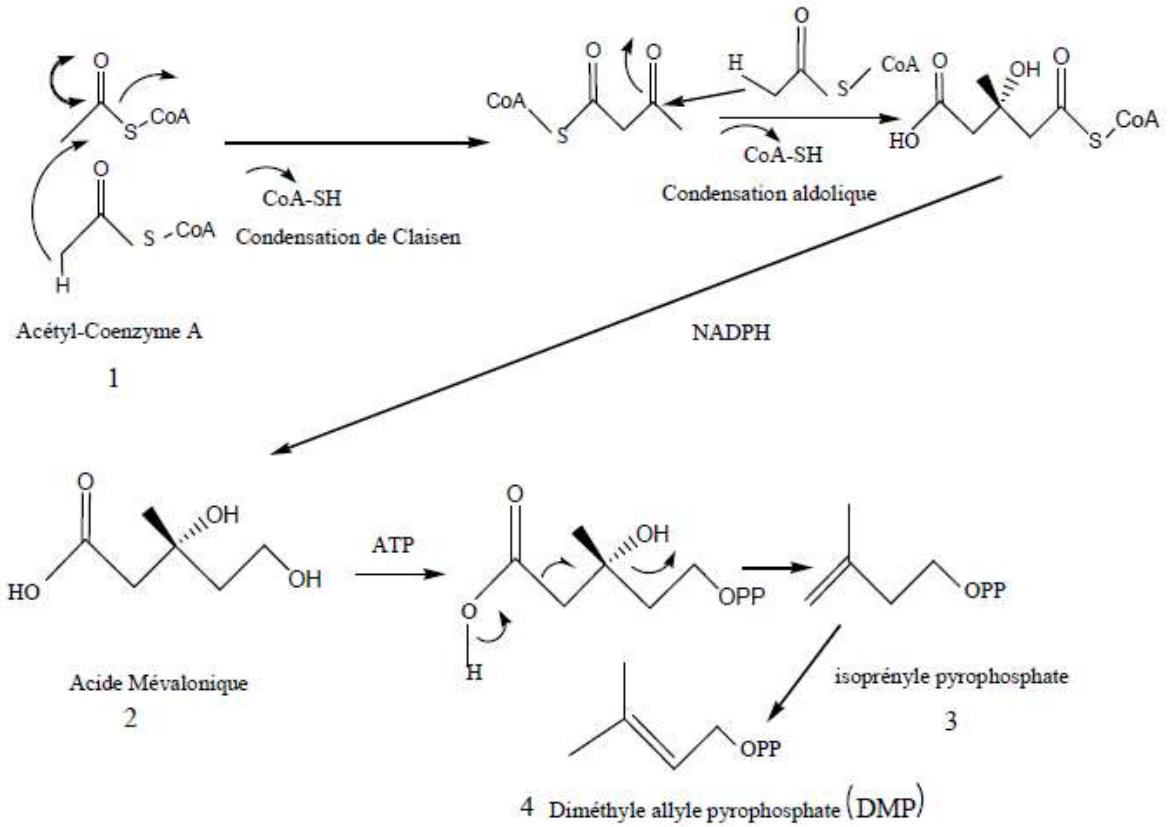


Fig II-7. Biosynthèse de l'acide mévalonique (2) et de l'isoprényle pyrophosphate (3)

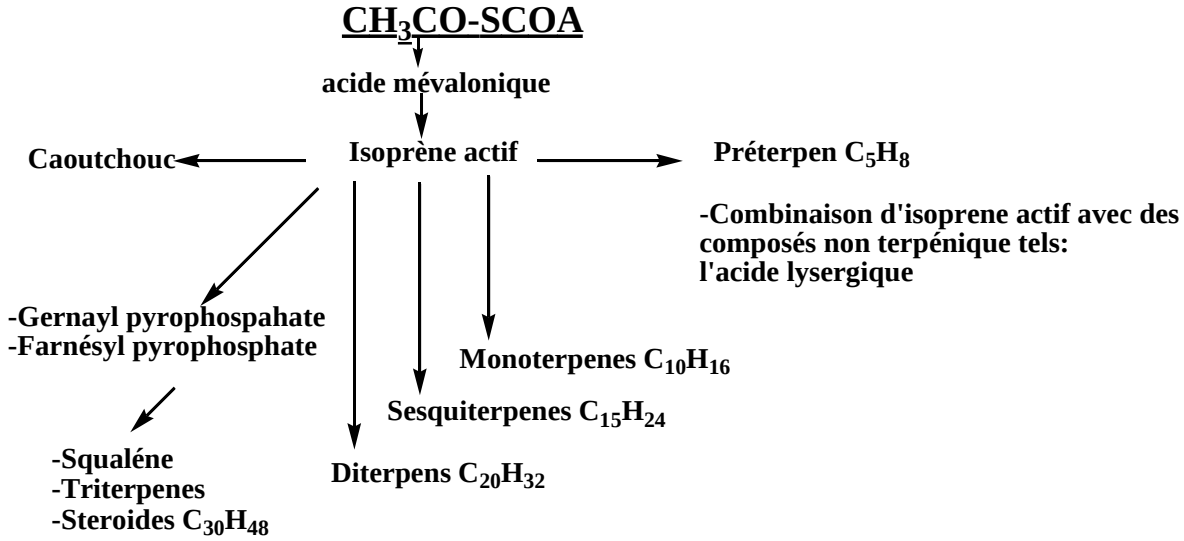


Fig II-8. Biosynthèse des terpénoides

Par condensation dune molécule dimethylallyle pyrophosphate (DMAP) avec une molécule (IPP) (4); on obtient le G.P.P. (en C-10) précurseur des monoterpènes. Une

molécules de G.P.P. peut s'unir à une nouvelle molécules de I.P.P., et donner une molécule de F.P.P. (C-15) sesquiterpène, à laquelle s'ajoute une nouvelle unité en C-5 pour former une G.G.P (diterpènes en C-20) (Fig II-9). Deux molécules de F.P.P. peuvent se lier pour former un triterpène : le squalène (C-30).

A partir du squalène, se formeront, d'une part les stéroïdes, et d'autre part les triterpènes cycliques. L'addition d'unité en C-5 conduit au composé homologue en C-20, le G.P.P joue un rôle particulier dans la biosynthèse des caroténoïdes.

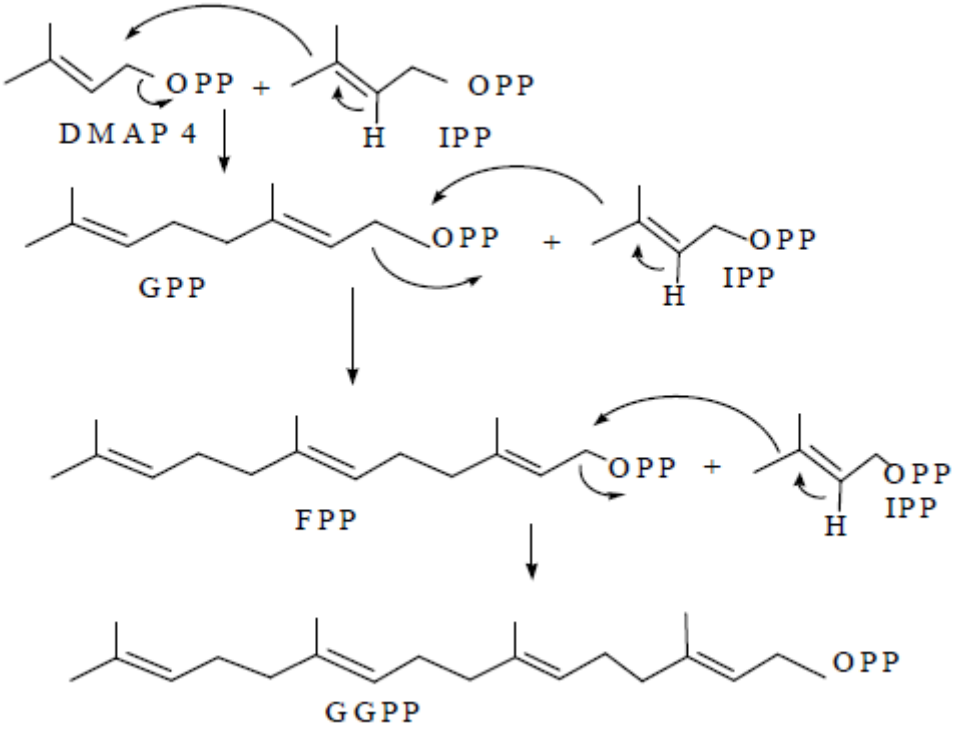


Fig II-9. Biosynthèse des unités de base des différentes classes de terpénoides

L'accrochage successif de nouvelles unités isopentenyl par exemple sur G.G.P.P fait apparaître des poly-isoprènes (polyterpènes), le caoutchouc, gutta-percha et le chiclé qui comportent plus de 2000 à 5000 résidus isoprènes, se situent au terme de cette suite de réactions biosynthétiques **[20, 24]**.

II-2-3-2/ Composés phénoliques

a/ Définition

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui

alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles **[26]**. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées **[26].**

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel **[26]**.

b/ Biosynthèse des composés phénoliques

b-1 / La voie de shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoide **[27].**

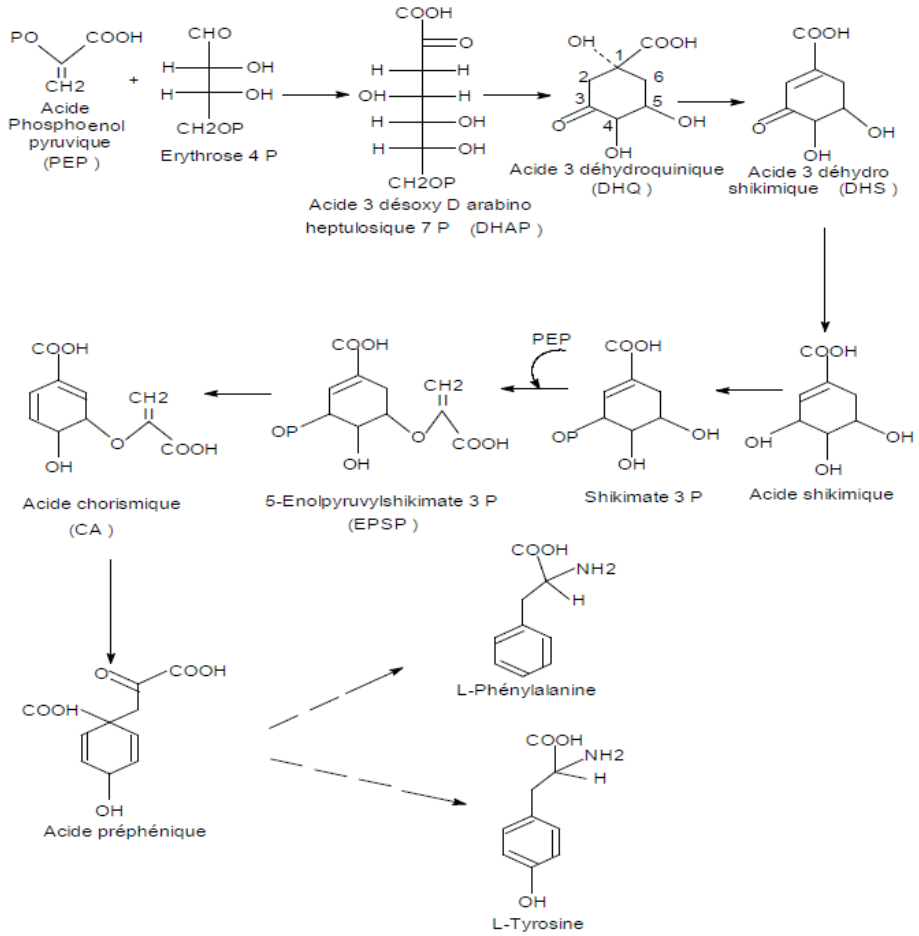


Fig II-10. La voie de shikimate **[27]**

b-2/ La voie de phénylpropanoide

La voie de phénylpropanoide commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose.

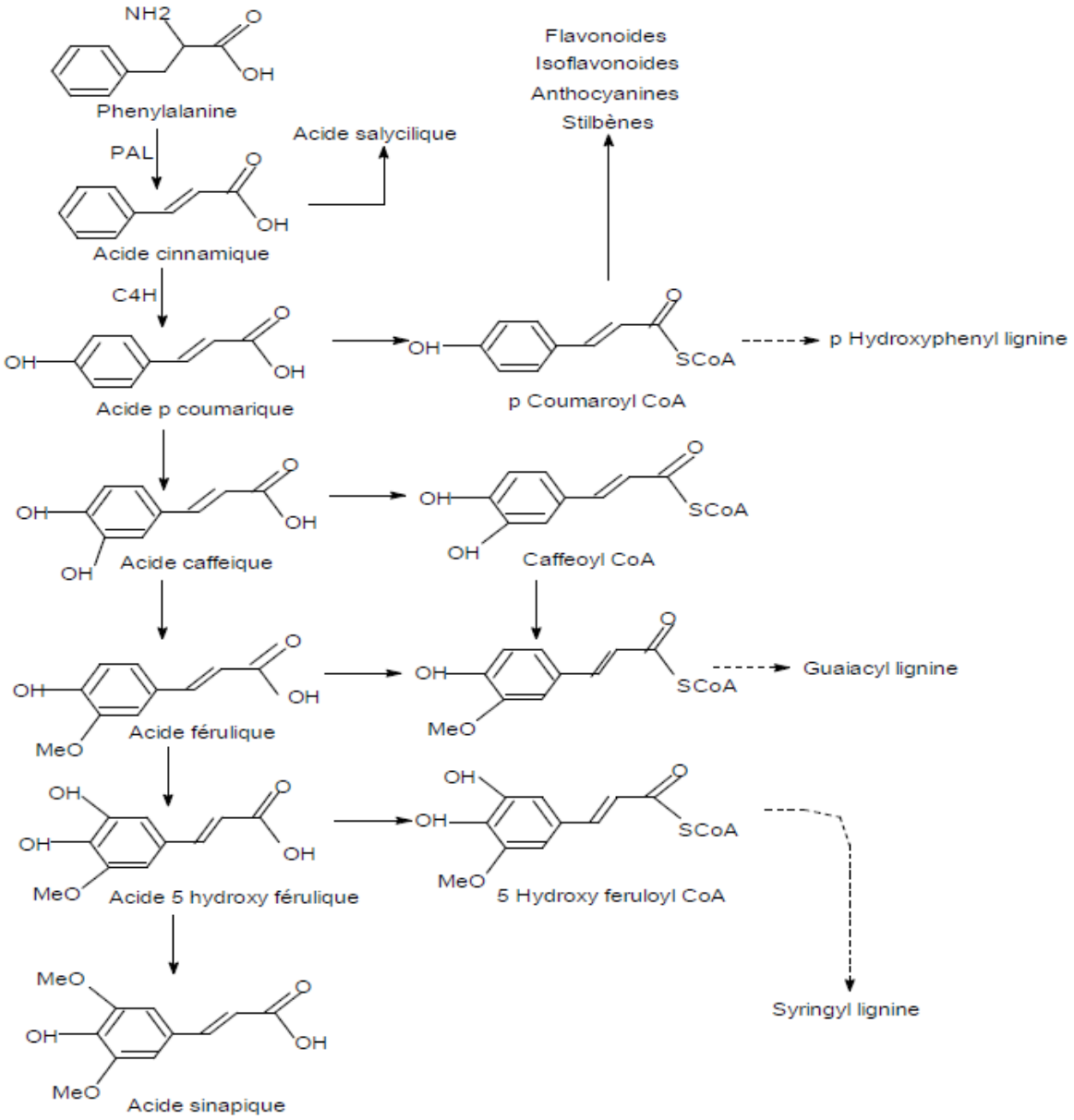


Fig II-11. La voie de phénylpropanoide **[28]**

b-3 / La voie de biosynthèse des flavonoïdes

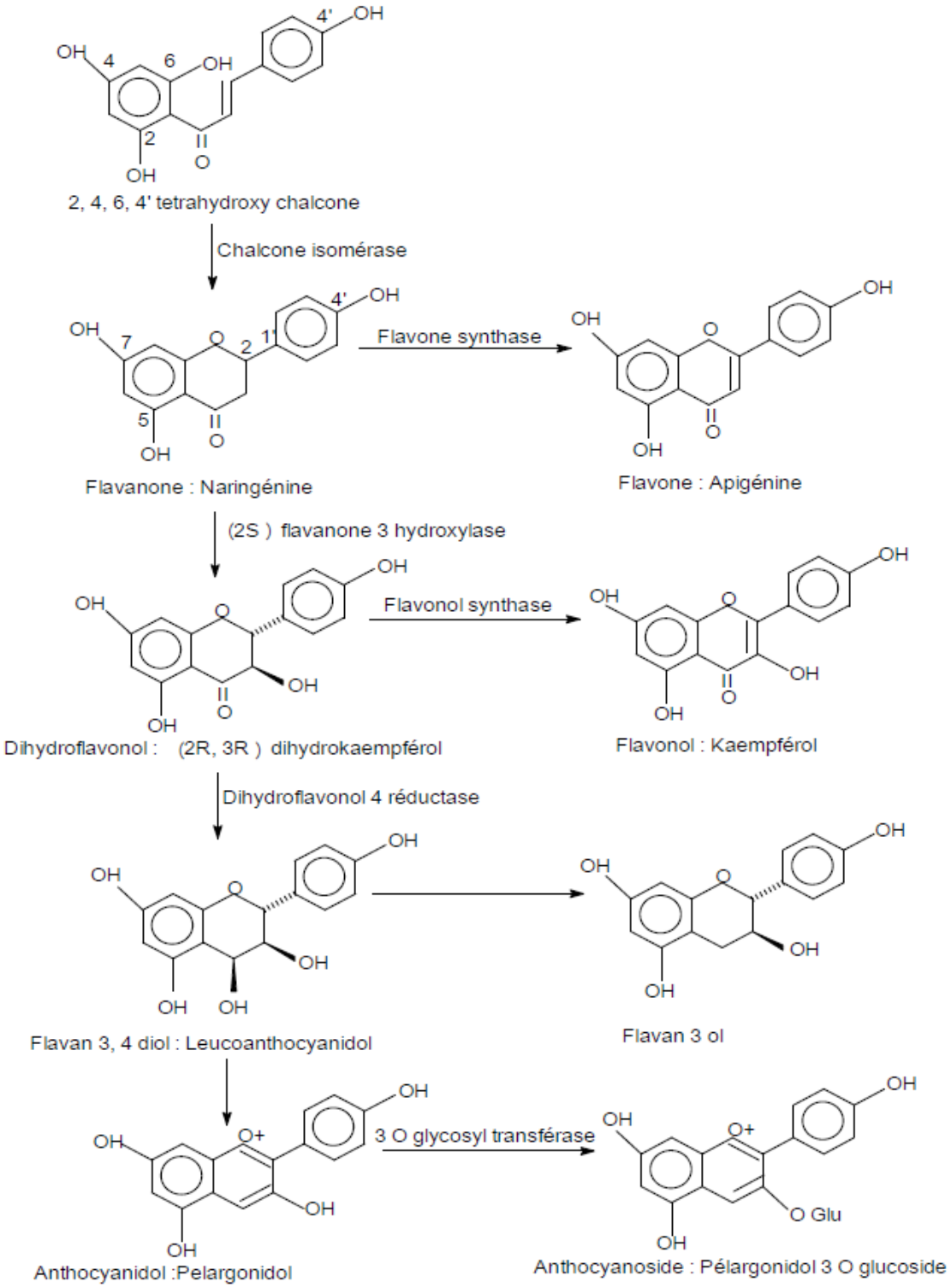


Fig II-12. La voie de biosynthèse des **[26]**

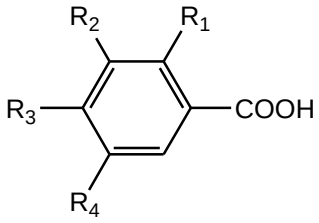
c/ Principales classes des composés phénoliques

c-1/ Les acides phénoliques simples

c-1-1/ Acides hydroxybenzoïques

- ✓ Sont des dérivés de l'acide benzoïque
- ✓ Ont une structure générale de base de type (C6-C1)
- ✓ Existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides
- ✓ Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau II-2.

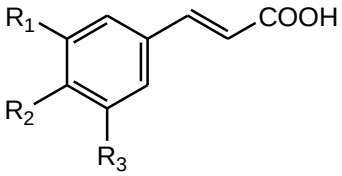
Tableau II-2. Principaux acides hydroxybenzoïques **[26]**

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	**H**	**H**	**H**	**H**	Acide benzoïque
	H	**H**	**OH**	**H**	Acide *p*-hydroxybenzoïque
	H	**OH**	**OH**	**H**	Acide protocatechique
	H	**OCH_3**	**OH**	**H**	Acide vanillique
	H	**OH**	**OH**	**OH**	Acide gallique
	H	**OCH_3**	**OH**	**OCH_3**	Acide syringique
	OH	**H**	**H**	**H**	Acide salicylique
	OH	**H**	**H**	**OH**	Acide gentisique

c-1-2/ Acides hydroxycinnamiques

- ✓ Dérivent de l'acide cinnamique
- ✓ Ont une structure générale de base de type (C6-C3)
- ✓ Existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques
- ✓ Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules, le tableau III-3 représente les principaux acides hydroxycinamiques

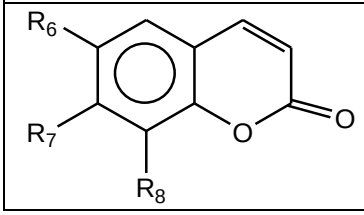
Tableau II-3. Principaux acides hydroxycinnamiques

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	**H**	**H**	**H**	Acide cinnamique
	H	**OH**	**H**	Acide p-coumarique
	OH	**OH**	**H**	Acide caféique
	CH_3	**OH**	**H**	Acide férulique
	OCH_3	**OH**	**OCH_3**	Acide sinapique

c-1-3/ Coumarines

- ✓ Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale
- ✓ Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique

Tableau II-4. Principaux types de coumarines **[29].**

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	**H**	**OH**	**H**	Umbelliférol
	OH	**OH**	**H**	Aescultol
	OCH_3	**OH**	**H**	Scopolétol
	OCH_3	**OH**	**OH**	Fraxétol
	H	**OH**	**OH**	Daphnétol

c-2/ Les flavonoïdes

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange, cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) **[30]**.

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 **[31]**.

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 **[31]**. Prés de 4000 flavonoïdes ont été décrits **[32].**

c-2-1/ 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) **[31].** Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3- C6 **[30]** en formant une structure de type diphényle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule **[31].**

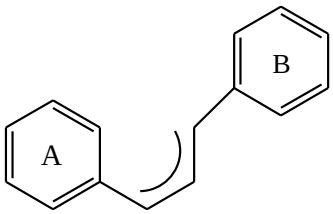
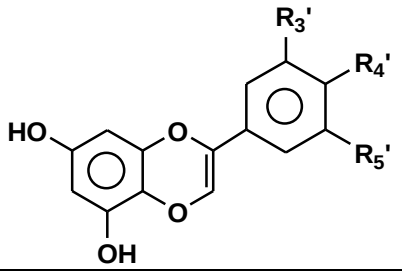
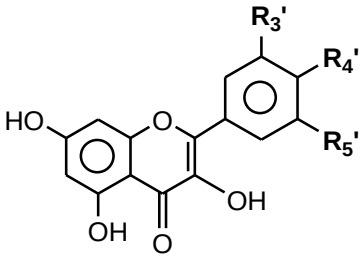
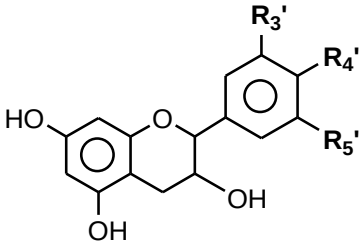
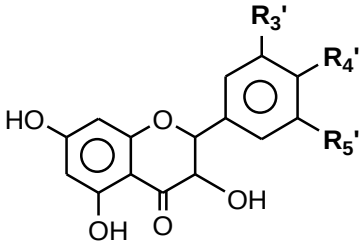
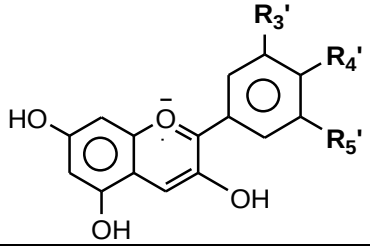
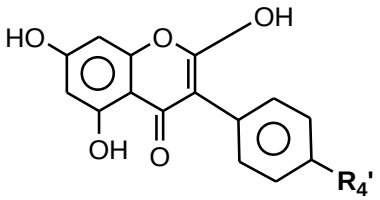


Fig II-13. Squelette de base des flavonoïdes.

c-2-2/ Classification

Tableau II-5. Principales classes des flavonoïdes **[29,30]**

Classes	Structure chimique	R3'	R4'	R5'	Exemple
Flavones		**H**	**OH**	**H**	Apigénine
		OH	**OH**	**H**	Lutéoline
		OH	**OCH_3**	**H**	Diosmétine
Flavonols		**H**	**OH**	**H**	Kaempférol
		OH	**OH**	**H**	Quercétine
		OH	**OH**	**OH**	Myrecétine
Flavanols		**OH**	**OH**	**H**	Catéchine
Flavanones		**H**	**OH**	**H**	Naringénine
		OH	**OH**	**H**	Eriodictyol
Anthocyanidines		**H**	**OH**	**H**	Pelargonidine
		OH	**OH**	**H**	Cyanidine
		OH	**OH**	**OH**	Delphénidine

		R5	R7	R4'	
Isoflavones		**OH**	**OH**	**OH**	Genisteine
		H	**O-Glu**	**OH**	Daidezine

c-2-3/ 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 **[30]**. Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles **[31]**, 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 **[32].**

c-2-4 / Distribution

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens **[33]**, ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages (ex: trèfle) **[32]**. 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 **[34]**.

c-2-5/ Propriétés des flavonoïdes

Propriétés antiradicalaires

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-contre : **FLOH + R• —> FLO• + RH** (réaction de piégeage)

Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle (FLO•) ce dernier va subir un changement de structure par résonance; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R•; en outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs.

FLO• + R• —> FLO-R (réaction de couplage radical-radical)

FLO• + FLO• —> FLO-OFL (réaction de couplage radical-radical) **[33]**

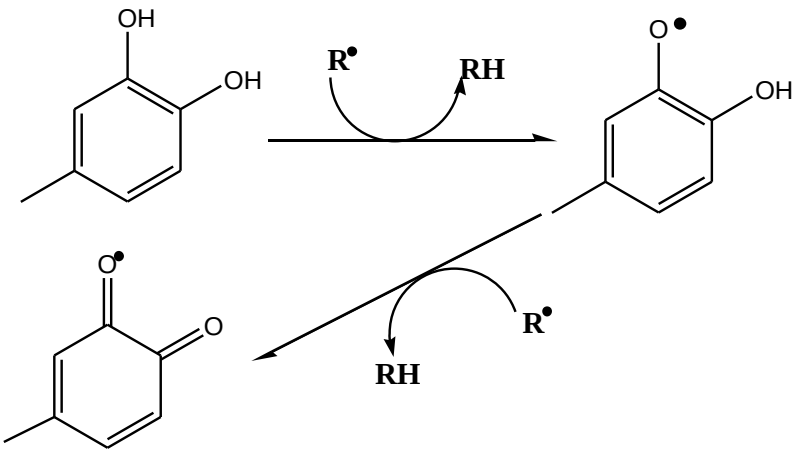


Fig II-14. Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R•) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable **[34]**

La propriété antiradicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques, cette activité nécessite :

- ✓ Structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure), cette structure est importante pour l'activité antiradicalaire des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé.
- ✓ La double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité antiradicalaire.
- ✓ Les groupements hydroxyles libres en C3 et C5 **[33]**. A titre d'exemple ; la quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité antiradicalaire efficace et importante **[34]**.

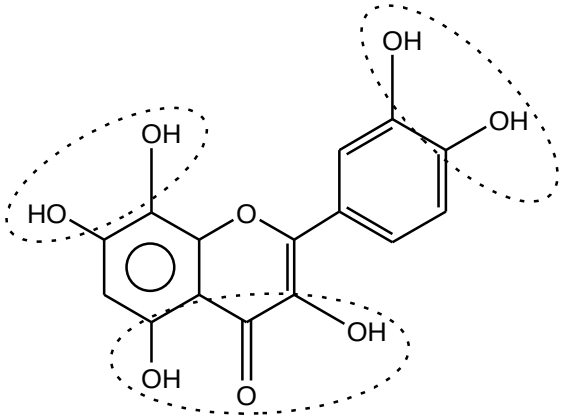


Fig II-15. Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes **[33].**

Autres propriétés des flavonoïdes **[35]**

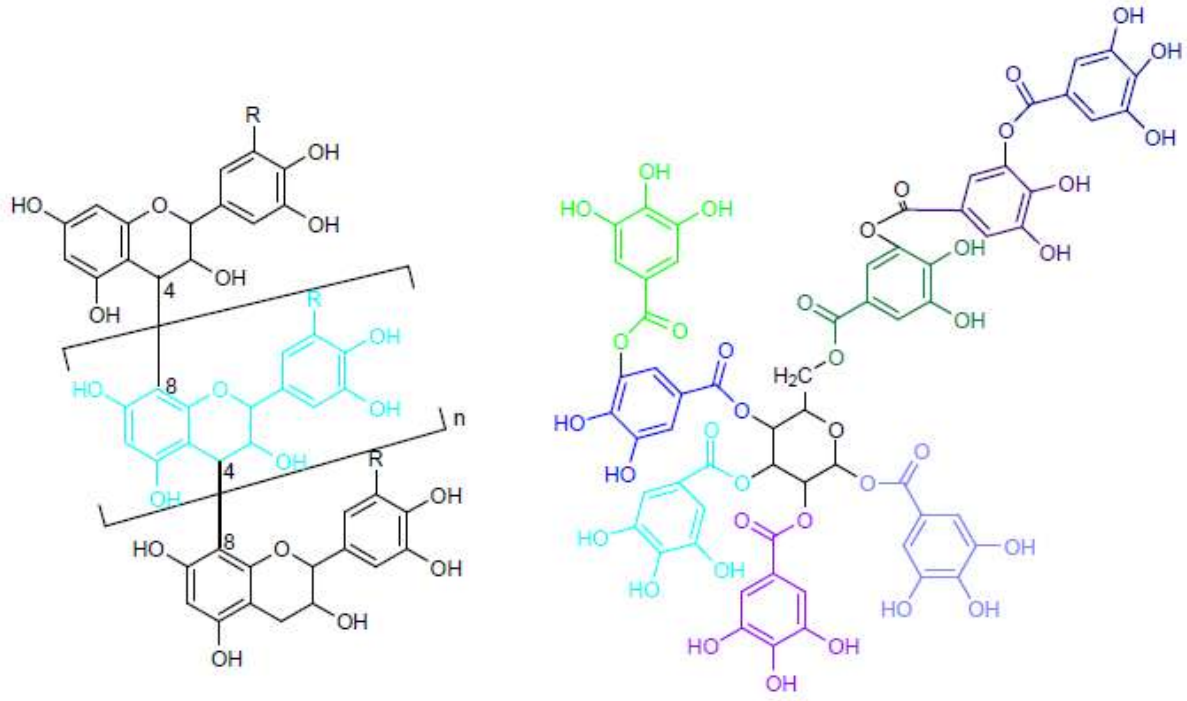
- ✓ Protection des plantes contre les radiations UV.
- ✓ Sont impliqués dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales.
- ✓ Agissent comme des pigments ou des co-pigments.
- ✓ Modulation de la distribution d'auxine.
- ✓ Fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire.
- ✓ Régulation de l'élongation des tiges.
- ✓ Interviennent dans la maturité des fruits.
- ✓ Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores.

c-3/ Les composés quinones et les tanins

Les tannins et les composés simples ont une action protectrice contre les attaques de microorganismes en se déposant dans les parois cellulaires.

De plus les tanins ayant la propriété de précipiter les protéines réduiraient la valeur nutritionnelle de certains tissus végétaux. Ils affectent également la digestion des insectes en se liant aux mucoprotéines de leur cavité orale **[36]**. Ils sont classifiés en tanins hydrolysables (**Fig II-16/b**), les gallotanins (acide gallique et glucose) et ellagitanins (acide hexahydroxydiphénique) présents uniquement chez les dicotylédones et en tanins condensés (nonhydrolysables, **Fig II-16/a**) plus répandus dans le règne végétal.

Un troisième groupe de tanins les phlorotanins, a été caractérisé chez diverses algues brunes.



a- tanins condensés **b- tanins hydrolysables**

Fig II-16. Structures générales des deux types de tanins végétaux.

Les quinones sont les plus souvent des hydroquinones. Elles peuvent être combinées à des sucres (anthroquinones). Largement mais inégalement réparties chez les végétaux supérieurs, elles proviennent de nombreux processus par différentes voies de biosynthèse. Le potentiel redox du couple quinone-hydroquinone est très important dans de nombreux systèmes biologiques. Les polyprénylquinones (quinones terpénoïdes) dérivent de l'acide 4-hydroxybenzoique, leur noyau benzoquinone porte des chaînes olyisopréniques.

Certains dérivés comme la plastoquinone et l'ubiquinone sont des transporteurs d'électrons. En plus de fournir une source de radicaux libres stables, les quinones sont connues pour complexer irréversiblement avec certains acides aminés, des protéines qu'elles inactivent ou rendent inutilisables.

III-2-3-3/ Alcaloïdes

a/ Définition

Les alcaloïdes sont des molécules d'origine naturelle. On les trouve principalement chez les végétaux, mais aussi chez les animaux et chez certains micro-organismes.

Leur structure chimique de base est un hétérocycle azoté sauf pour quelques substances dans lesquelles l'azote est extra cyclique (c'est le cas de la colchicine et de

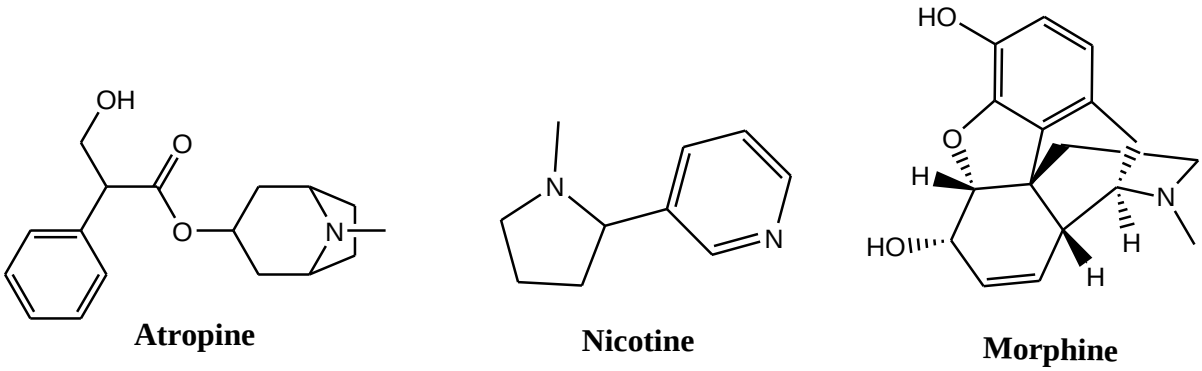
l'éphédrine par exemple). Il existe plus de six mille alcaloïdes mais ce chiffre est en constante augmentation **[7].**

b/ Propriétés biologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes forment un groupe hétérogène du point de vue de leur structure, de leurs propriétés et de leurs effets biologiques.

Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique **[24]**.

Les alcaloïdes sont aujourd'hui nommés d'après la plante qui les a fournis, toujours avec une terminaison en "ine". D'une façon générale, les alcaloïdes sont amers et utilisés comme apéritifs **[24]**.



Atropine **Nicotine** **Morphine**

Fig II-17. Structures de quelques alcaloïdes.

II-3/ Intérêts et fonctions des composés du métabolisme secondaire

Les molécules issues du métabolisme secondaire remplissent des fonctions très importantes à différents niveaux de la vie des plantes; on cite comme exemple :

- Co-piégeurs de photons : Lors de la photosynthèse certains pigments captent l'énergie lumineuse dans les mêmes longueurs d'ondes du chlorophylle **[36]**.
- Guides à nectar en lumière visible ou en UV (exemple les flavonoïdes). **[36]**
- Défense de la plante contre les virus, les micro-organismes, les insectes, les herbivores et les autres plantes pour éliminer la concurrence **[36]**.

On note aussi que des très nombreuses molécules de métabolisme secondaire ont des propriétés thérapeutiques intéressantes comme les alcaloïdes, les hétérosides, les flavonoïdes, les tanins.

Références bibliographiques

[1]- Hans W. K., 2007. 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. p6-7.

[2]-Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z., **1986**. Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé. **64** (2) : 159-164.

[3]- Millogo H., Guisson I.P., Nacoulma O. et Traore A. S., 2005. Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire –Lyon.

[4]- Strang C., 2006. Larousse médical. Ed Larousse.

[5]- Iserin P., Masson M., Restellini J.P., Ybert E., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deelesalle–Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A., 2001. Larousse des plantes medicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.

[6]- Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D., 2007. La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

[7]- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F., 2002. Botanique systématique. Une perspective phylogénétique. 1ére Edition De Boeck Université. Paris, p383.

[8]- Chaaib Kouri F.,2004. Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagarazanthoxyloides* L.) (Rutaceae) », Thèse de doctorat, Faculté des sciences, Institut de Pharmacognosie et Phytochimie, Université de Lausanne.

[9]- Quezel P., Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tomme 1 et 2 Edition du centre national de la recherche scientifique, Paris. p 33-239, 902-948.

[10]- Franchomme P. et Penoel D., 2001. Aromathérapie exactement, Critères à prendre en compte avant tout achat d'huiles essentielles, ATEKOPORA - Domaine Pacha Mama, Editions Roger Jollois - 11300 Ajac. France.

[11]- Lapare M., Collin G., 2000. Parfums du Maroc, et *le vase florentin*. INFO-ESSENCES. Bulletin sur les huiles essentielles. Numéro 14.

[12]- Huang M.T., Ho C.T., Wang Z.Y., Ferraro T., Lou Y.R., Stauber K.,Ma W., Georgiadis C., Laskin J.D. and Conney H., 1994. Inhibition of Skin tumorigenesis by Rosemary and its constituents carosol and ursolic acid. Concer Research; 54, 701-708.

[13]- Pérez M.B., Calderón N.L. et Croci C.A., 2007. Radiation–induced enhancement of antioxidant activity in extracts of Rosmary (*Rosmarinus officinalis L)*. Food chemistry. **104** : 585-592.

[14]- Cavero S., Jaime L., Martin-Ălvarez P. J., Señoráns F. J., Reglero G. et Ibañez E., 2005. *In vitro* antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosmary (*Rosmarinus officinalis* L). European food research and technology. **221**: 478-486.

[15]- 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.

[16]- Baerts M., Lehmann J., Ansay M., Kasonia K., 1996. Quelques plantes utilisées en médecine vétérinaire traditionnelle en Afrique sub-saharienne. Une banque de données, Sous-réseau PRELUDE : Santé, productions animales, environnement, CTA et Presses Universitaires de Louvain, 154 p.

[17]- Tahrouch S., Rapior S., Mondolot C.L., Idrissi H.A., Bessière J.M., et Andary C., 2002. Peganum harmala: Source combinée d'arômes et de colorants. Reviews in Biology and Biotechnology by the Moroccan Society of Biology in Canada, **2** (2):33-37.

[18]- Taiz L. et Zeiger E., 1998. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers, 2nd ed., Sunderland.

[19]- Contin A., Heijden R., Hoopen H.J.G., Verpoorte R., 1998. The inoculum size trigers tryptamine or secologanin biosynthesis in a *Catharanthus roseus* cell culture. Plant Science; **139** : 205-211

[20]- Fouché J.G., A. Marquet., A. Hambuckers.,2000. Les Plantes Médicinales : de la plante au médicament », Exposition temporaire du 19.09.2000 au 30.06.2000, Observatoire du Monde des Plantes, Sart-Tilman, B77. B-4000 Liège**.**

[21]- Abrégé de botanique, 1994, p : 203-204.

[22]- Barrero A.F., Sanchez J.F., Barron A., Corrales F., Rodreguez I., 1989. Resorcinol Derivatives and other Components of Ononis Speciosa", Phytochemistry. **28** (1) :161-164.

[23]- Andrew S., Heathcock J.R., 1986. Introduction à la chimie organique. Edition Marketing, Paris, p401.

[24]- Bruneton J., 1996. Plante toxique, végétaux dangereux pour l'homme et les animaux », Londers Editions Tec et Doc, New york-Paris, p 529.

[25]- Barrero A. F., Cabrera E., Rodriguez I., Palnelle F., 1994. Phytochemistry**. 35**: 493-498.

[26]- Urquiaga I. et Leighton F., 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biological Research., **33** (2) : 55-64.

[27]- Kening Y., Vincenzo D.L. et Normand B., 1995. Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the subsceptibility of potato to Phytophtora infestans. The plant cell. **7 :** 1787-1799.

[28]- Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B.et Legrand M., 2004. Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. Plant cell. **16** (6) :1446-1465.

[29]- Macheix J J., Fleuriet A. et Jay–Allemand C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.

[30]-Ramirez P., Señoráns F. J., Ibañez E. et Reglero G., **2004**. Separation of rosmary antioxidants compounds by supercritical fluid chromatography on coated packed capillary columns. *Journal of chromatography A.,* **1057** : 241-245.

[31]-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.

[32]-Maleš Z., Medić-Šarić M. et Bucar F., 1998. Flavonoïds of Guiera senegalensis J F GMEL–Thin layer chromatography and numerical methods. CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA., **71** (1) : 69-79.

[33]-Verhoeyen M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., De Vos C. H. R. et Colliver S., 2002. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. Journal of experimental botany, **53** (377): 209 -210.

[34]- Pincemail J., Meurisse M., Imet R. L. et Defraigne J. O., 1999. Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. vaisseaux, coeur, poumons., **4** (4) : 234-240.

[35]-Park H.J. et Cha H.C., 2003. Flavonoïds from leaves and exocarps of the grape Kyoho. Korean journal of biological society. **7 :** 327-330.

[36]- Sarni-Manchado P. et Cheynier V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. p2- 10.

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBILIOGRAPHIQUE

CHAPITRE II- PHYTOCHIMIE DES PLANTES AROMATIQUES

II- 1/ INTRODUCTION .....- 13 -
II- 2/ METABOLISMES DES VEGETAUX SUPERIEURS .....- 13 -
II-2-1/ METABOLISME PRIMAIRE .....- 13 -
II-2-2/ METABOLISME SECONDAIRE .....- 14 -
II-2-3/ PRINCIPALE CLASSE DES METABOLISMES SECONDAIRES .....- 15 -
II-3 / INTERETS ET FONCTIONS DES COMPOSES DU METABOLISME SECONDAIRE .....- 32 -

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE..... - 33 -

Deuxième partie :
Etude expérimentale

Chapitre I :

Matériels et Méthodes

Chapitre I- MATERIELS ET METHODES

I-1/ Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes : Feuilles et Fleurs de *Rosmarinus officinalis* L (Photo I-1).

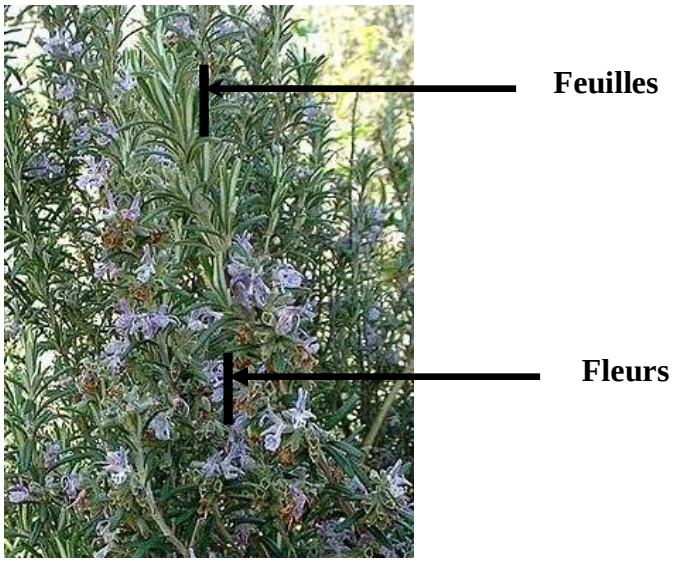


Photo I-1. Matériel végétal

I-2/ Période de récolte de notre plante

La récolte de notre plante a été effectuée au moins d'avril 2013, au niveau de la région d'EIN ELHADJAR de la wilaya de Saida (Fig I-I.).

Fig I-I. Carte géographique montrant la région de la récolte.

I-3/ Identification botanique

L'espèce choisie a été identifiée au sein de l'université de Tlemcen, exactement dans le laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels (LEGEN).

I-4/ Préparation des échantillons

La plante récoltée est lavée avec l'eau de robinet suivi par l'eau distillée, séchée à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules.

Après l'opération de séchage, les parties destinées particulièrement les feuilles et les fleurs ont été broyées au mortier. Ses poudres sont ensuite conservées dans des flacons en verre hermétiquement fermés à basse température -18°C en vue de procéder aux différentes manipulations.

I-5/ Détermination de la teneur en eau

I-5-1/ Principe

La teneur en eau a été déterminée par dessiccation d'un échantillon de 2g dans une étuve isotherme à une température de 103° ± 2°C et à la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'une masse constante de l'échantillon. La teneur en eau est égale à la perte de masse subie dans les conditions de mesure **[1].**

I-5-2/ Mode opératoire

- ✓ Sécher des capsules vides à l'étuve durant 15 mn à 103° ± 2°C ;
- ✓ Laisser refroidir dans un dessiccateur
- ✓ Peser dans chaque capsule préalablement tarée 2 g d'échantillon et les placer dans l'étuve réglée à 103 ± 2°C pendant 3 heures ;
- ✓ Retirer les capsules de l'étuve, les placer dans le dessiccateur,
- ✓ Peser les capsules après refroidissement. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant (en réduisant la durée de séchage à 30 mn).

I-5-3/ Expression des résultats

$$H\,(\%) = (M1 - M2)/P * 100$$

Avec :

H % : teneur en eau ou humidité **;**

M1: la masse initiale en g « (matière fraîche +capsule) avant dessiccation ».

M2 : la masse finale en g « (matière sèche +capsule) après dessiccation ».

P : la masse de la prise d'essai.

La teneur en matière sèche est calculée selon la relation :

Matière sèche % = 100 - H %

I-6/ Détermination de la teneur en cendres

I-6-1/ Principe

La détermination de la teneur en cendres est basé sur la destruction de toute matière organique sous l'effet de température élevée qui est de : 500° C **[2]**.

I-6-1/ Mode opératoire

- ✓ Peser 1g de matière sèche dans une capsule préalablement tarée ;
- ✓ Répéter l'opération 6 fois pour chaque variété de datte ;
- ✓ Mettre les capsules au four à la température de 500° C pendant 5 à 6 heures ;
- ✓ Après refroidissement retirer les capsules et prendre leurs poids.

I-6-2/ Expression des résultats

MO (%)(= (M1- M2)/P*100

Soit :

MO % : la teneur en matière organique ;

M1 : masse initiale en g « (capsule + matière sèche) avant incinération » ;

M2 : masse finale en g « (capsule + cendres) après incinération ;

P : masse de la prise d'essai.

La teneur en cendres est calculée selon la relation suivante :

Cendres (%) = 100 - MO %

I-7/ Détermination du pH

I-7-1/ Principe

Détermination en unité pH de la différence de potentiel existant entre deux électrodes plongées dans une solution aqueuse des feuilles et fleurs broyées par un rapport 1/5 (masse de prise d'essai (g) /volume d'eau (mL))

I-8/ Test phytochimique

L'espèce sélectionnée fait l'objet d'une étude phytochimique qui consiste à détecter les différents groupes de composés, à savoir: stérols, polyterpènes, alcaloïdes**,** tanins, flavonoïdes**,** quinones et saponines contenus dans les extraits, Leurs révélation a été fait selon les méthodes décrites par **[3]** et **[4].**

Les tests de révélation de ces groupes chimiques ont été réalisés dans des tubes et les résultats sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation. La traduction de ces résultats selon l'apparition en :

- ✓ réaction positive : +
- ✓ réaction négative : -

I-8-1/ Epuisement MV avec MeOH à température ambiante (Méthode A)

Cette préparation est effectuée conformément à la méthode décrite par Bidié **[5]**. En effet, cinquante grammes (50g) de broyat des feuilles et des fleurs de plantes ont été mélangés avec 300 mL de MeOH 96%. Le mélange obtenu est agité pendant 48 heures à température ambiante (25°C) à l'aide d'un agitateur magnétique. Ensuite, le mélange été filtré trois fois sur coton et sur papier filtre. Le filtrat est évaporé à pression réduite et à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. La poudre obtenue a servi à faire les différents tests.

Remarque : le marc été conservé pour déterminer le rendement d'extraction.

I-8-2/ Epuisement MV avec MeOH à chaud (Méthode B)

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, mettre 50g de matériel végétal en présence de 300 ml de Méthanol 96%. On Porte l'ensemble à une température qui ne dèpasse pas 50°C pendant 1h. Ensuite après refroidissement, le mélange est filtré trois fois sur coton et sur papier filtre. Le filtrat est évaporé à pression réduite et à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. La poudre obtenue a servi à faire les différents tests. Le marc aussi a été conservé pour déterminer le rendement de l'extraction.

Ensuite nous avons soumis ces extraits méthanoliques aux tests de caractérisations cités ci-dessous.

I-8-3/ Calcul du rendement d'extraction

Le pourcentage en extrait brut sec méthanolique a été calculé par la formule suivante :

$$R\ (\%) = M/M_0 \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M: Masse en gramme de l'extrait sec résultant

M_0 : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

I-8-4/ Réactions de caractérisation

I-8-4-1/ Les stérols et des polyterpènes

Pour mettre en évidence les stérols et les polyterpènes, nous avons utilisé le réactif de **LIEBERMANN- BURCHARDT**. En effet, cinq (5) mL de chacun des extraits de plante a été évaporé à sec dans une capsule sur bain de sable ou bain marie. Le résidu est dissout à chaud dans 1 mL d'anhydride acétique. Nous avons ajouté 0,5 mL d'acide sulfurique concentré au triturât. La réaction est effectuée à froid.

L'apparition, à l'interphase, d'un anneau rouge brunâtre ou violet, virant au bleu puis au vert, avec coloration de la couche surnageante de vert ou de violet, traduit la présence de stérols et de triterpènes.

Cet essai a été effectué avec une solution chloroformique témoin de cholestérol (ou de sitostérol).

I-8-4-2/ Les polyphénols

Pour mettre en évidence les polyphénols, la réaction au chlorure ferrique ($FeCl_3$) a été utilisée. Ainsi, à 2 mL de chaque solution, est ajoutée une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivés polyphénoliques l'apparition d'une coloration bleue noirâtre ou vert plus ou moins foncée.

Le témoin est effectué avec la solution alcoolique d'acide gallique.

I-8-4-3/ Les tanins

Dans des tubes à essai, nous avons introduit 1 mL de chacun des extraits alcoolique, on a ajouté 2 mL d'eau et 2 à 3 gouttes de la solution aqueuse de $FeCl_3$ à 2 %. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue - noire, verte ou bleue - verte et un précipité, selon la nature des tanins : cathéchiques, galliques ou éllagiques.

Pour différencier entre les tanins nous avons utilisé le réactif de **STIASNY** dont le principe est le suivant :

✓ les tannins catéchiques sont identifiés par le réactif de **STIASNY** (Formol 30%, HCl concentré : 1/0,5). Cinq (5) mL de chaque extrait a été évaporé à sec. Après ajout 15 mL du réactif de **STIASNY** au résidu, le mélange a été maintenu au bain- marie à 80° - 90° C pendant 15 min.

L'observation d'un précipité rouge en gros flocons confirmant la présence des tanins catéchiques dans le milieu.

✓ les tannins galliques sont identifiés par ajout de $FeCl_3$ à 2 %. En effet, nous avons filtré la solution précédente. Le filtrat est recueilli et saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de $FeCl_3$ à 2 % provoque l'apparition d'une une teinte bleue noire intense dénotant la présence de tanins galliques.

Une solution alcoolique d'acide gallique ou de catéchine est utilisée pour servir comme témoin.

I-8-4-4 / Les flavonoïdes

Pour mettre en évidence les flavonoïdes, la réaction dite ''la cyanidine'' a été utilisée. Deux (2) mL de chaque extrait ont été évaporés et le résidu a été repris dans 5 mL d'alcool chlorhydrique (éthanol à 95°, eau distillée, acide chlorhydrique concentré à parties égales en volumes). En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, il y a un dégagement de chaleur puis une coloration rose orangée (flavones**)** ou rose violacée (flavonones) ou rouge cerise (flavonols, flavanonols) dans la couche surnageante du mélange indique la présence d'un flavonoïde libre (génines). L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique a intensifié cette coloration qui a confirmé la présence de flavonoïdes. Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques.La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les aurones, les catéchines et les isoflavones.

Une solution alcoolique de la quercétine a été utilisée pour servir de témoin.

I-8-4-5/ Les saponosides (ou saponines)

Pour mettre en évidence les saponines, nous avons introduit 5 mL de chacun des extraits dans un tube à essai, ensuite on a complété tous les tubes à 10 mL par l'eau distillée.

Une agitation vigoureuse a été appliquée sur ces tubes dans le sens de la longueur pendant 15 secondes.

Après un repos de 15 minutes, la hauteur de la mousse est mesurée. L'évaluation de présence des saponosides est comme suit :

- ✓ Pas de mousse = test négatif
- ✓ Mousse moins de 1cm = test faiblement positif
- ✓ Mousse de 1-2cm = test positif
- ✓ Mousse plus de 2cm = test très positif

I-8-4-6 /Les dérivés anthracéniques

a- anthraquinones libres

A 1g de poudre, ajouter 10 ml de chloroforme et chauffer pendant 3 minutes. Filtrer à chaud et compléter à 10 ml si nécessaire. A 1 ml de l'extrait chloroformique obtenu ajouter 1mL de NH_4OH dilué et agiter. La coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

b- Anthracéniques combinés

Pour la mise en évidence les anthraquinones combinés trois essais ont été effectués :

- ✓ **Essai 01 : O-hétérosides**:

Préparer un hydrolysat à partir du résidu de la drogue épuisée par le chloroforme auquel il faut ajouter 10 mL d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré puis maintenir le tube à essai au bain-marie bouillant pendant 15 minutes. 5 mL de l'hydrolysat sont agités avec 5 mL de chloroforme. A la phase organique, ajouter 1 mL de NH_4OH dilué. La présence d'anthraquinones est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense. La réaction ne peut être plus poussée par addition à 5 mL d'hydrolysat de 3 à 4 gouttes de $FeCl_3$ à 10%, puis agitation avec 5 mL de chloroforme. A la phase chloroformique ajouter 1 mL de NH_4OH dilué et agiter. En présence de produits d'oxydation des anthranols ou des anthrones, la coloration rouge est plus intense que précédemment.

✓ **Essai 02 : <u>C-hétérosides</u>**

Reprendre la phase aqueuse qui a été conservée par 10 mL d'eau, ajouter 1 mL de $FeCl_3$ à 10%. Après ébullition au bain-marie pendant 30 minutes agiter avec 5 mL de chloroforme et ajouter à la phase chloroformique 1 mL de NH_4OH dilué. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines *C*-hétérosides.

✓ **Essai 03 : Différenciation des Quinones**

A 1g de poudre humectée avec H_2SO4 10% sont ajoutés 20 mL d'un mélange à volume égal d'éther et de chloroforme. Après une macération de 24 heures, 5 mL du filtrat obtenu sont évaporés à l'air, puis le résidu est repris par quelques gouttes d'éthanol à 95º.

Ajouter goutte à goutte une solution aqueuse d'acétate de nickel à 5%.

I-8-4-7/ Les composés réducteurs

Deux essais ont été réalisés:

✓ **Essai 01 :**

1 mL de chaque extrait méthanolique de notre plante ont été additionnés : 2 mL d'eau distillée, 1 mL de la liqueur de **Fehling A** et 1mL de la liqueur de **Fehling B** puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge - brique.

✓ **Essai 02 :**

✓ 1 mL de chaque extrait méthanolique a été ajouté le réactif de **KELLER KILIANI.** Un test positif est révélé par la formation d'un anneau brun - rouge et la solution acétique se colore lentement en bleu - vert.

I-8-4-8/ Les alcaloïdes

Un test fondé sur la capacité qu'ont les alcaloïdes à se combiner avec les métaux lourds ou avec l'iode est généralement effectué **[6].**

Pour mettre en évidence les alcaloïdes, les réactifs de **MAYER** et de **WAGNER** ont été utilisés. En effet, 20 mL de chaque solution ont été évaporés à sec. Le résidu est repris dans 5 mL d'HCl 10 % à 60°C dans un bain marie. le mélange a été Filtré et l'alcalinisé avec quelques gouttes d'une solution de NH_4OH 10% jusqu'à pH 9. une extraction liquide-liquide

avec solution avec l'éther diéthylique ($C_2H_5OC_2H_5$) a été effectuée, ensuite la phase organique a été concentrée à sec et dissoute dans d'HCl 2%. L'addition de quelques gouttes du réactif de Mayer à la solution provoque un précipité ou une coloration orangée. L'ajout de quelques gouttes du réactif de Wagner à la solution obtenue provoque un précipité de coloration brun-rougeâtre et indiquait une réaction positive.

I-8-5/ Réactifs et réactions de caractérisations

I-8-5-1/ Tanins catchéniques

Réactif de **STIASNY :** Formol 30%,HCl concentré : 1/0,5

I-8-5-2/ Composés réducteurs

LIQUEUR DE FEHLING :

La liqueur de Fehling est un mélange de deux solutions:

Fehling A: dissoudre x g de $CUSO_4.5H_2O$ dans 50 mL d'eau distillée.

Fehling B: dissoudre 6,5g de NaOH, 17,3g de tartrate de sodium et potassium dans 35 mL d'eau distillée puis compléter le volume à 50 mL.

Les composés réducteurs donnent avec le réactif de Fehling un précipité rouge brique.

REACTION DE KELLER- KILLIANI :

L'addition de 5 mLd'acide sulfurique concentre contenant des traces de sels ferriques a une solution de volume 5 mL d'hétérosides dans l'acide acétique concentre contenant également des sels ferriques conduit a la formation d'un anneau brun- rouge. La solution acétique se colore lentement en bleu-vert.

I-8-5-3/ Alcaloïdes

Réactif de **MAYER** (mercuri-tétra-iodure de potassium) :

Dissoudre 1,358g de **$HgCl_2$** dans 60 ml d'eau. Dissoudre 5g de KI dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif une trouble plus un précipité blanc.

Réactif de **WAGNER** (iodo-ioduré) :

Dissoudre 2g de KI et 1,27g de I_2 dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun

I-8-5-4/ Stéroïdes, hétérosides stéroïdiques et triterpéniques

réaction de **LIEBERMANN BURCHARDT**

Mélanger 5 ml de solution à tester avec 5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser la solution reposée 30 mn à 21°C. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert. D'autre part, cette réaction donnent avec les hétérosides stéroïdiques et tritèrpèniques respectivement des colorations : verte -bleue et verte -violette.

I-9/ Dosage des composés phénoliques totaux (CPT)

I-9-1/ Principe

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits, fractions et sous-fractions sont déterminées au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu **[7]**. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (acide gallique), permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présente dans un extrait. Elle est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par g de matière sèche.

I-9-2/ Mode opératoire adopté

La teneur en phénols totaux des extraits méthanoliques des plantes qui font l'objet d'analyse a été déterminée par la méthode décrite par **[7].** Une quantité de 200 microlitre des extraits de chaque échantillon est mélangé avec 1mL du réactif de **Folin–Ciocalteu** fraîchement préparé (10 fois dilué) et 0,8 mL de carbonate de sodium à 7,5% Na_2CO_3. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm.

Une courbe d'étalonnage (y=ax+b) a été réalisée en parallèle par l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons.

Le blanc est représenté donc par 200 µl de méthanol, additionnée de 1 ml du réactif de **Folin-Ciocalteu** et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7,5 %.

I-9-3/ Préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique

Une gamme de 9 concentrations d'acide gallique allant de 0 à 0,17 mg /ml a été préparée à partir d'une solution mère de 0,2 mg/ml de concentration.

I-9-4/ Expréssion des résultats

Les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme du poids sec ou matière sèche (Ms) de la plante en poudre en appliquant la formule suivante :

$$T = (C \times V) / m$$

T : La teneur en phénols totaux (mg d'ac. gallique/ g de matière sèche).

C : La concentration de l'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

V : Volume de l'extrait méthanolique

m : Le poids de la matière sèche (g).

I-10/ Activité anti-radicalaire contre le radical DPPH

Il se résume en la réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle par les substances antiradicalaires (nos extraits métanoliques).

Pour évaluer l'activité antioxydante, nous avons utilisé la méthode du DPPH selon le protocole décrit par **[8]**.

Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

Cinquante microlitres de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations ou de standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,0025g/l). En parallèle, un contrôle négatif (blanc) est préparé en mélangeant 50µl de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH.

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

I-10-1/ Expression des résultats

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule

suivante : **d'inhibition % = [(Abs c – Abs e)/ Abs c] x 100**

avec :
Abs c : Absorbance du contrôle (ou témoin).

Abs e : Absorbance de l'échantillon à tester.

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur Cl_{50} qui est la concentration d'extrait de plante ou de la l'acide ascorbique responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH, est déterminée sur le graphique représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits et de l'acide ascorbique.

Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance antiradicalaire .

ARP= 1/ CI50

Avec : **ARP** : Puissance antiradicalaire

I-11/ Spectrophotométrie UV-vis

I-11-1/ Définition

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une structure chimique donnée en solution, plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer– Lambert .

I-11-2/ Principe

Le principe repose sur l'absorption de la lumière par les espèces chimiques, l'appareil comporte une source de lumière blanche, un système dispersif permettant de sélectionner la longueur d'onde de la radiation et un système détecteur permettant la mesure de l'intensité lumineuse de la radiation monochromatique traversant la solution. Le spectrophotomètre effectue une comparaison entre les intensités lumineuses incidentes et transmises et permet par l'intermédiaire d'un circuit électronique d'afficher l'absorbance.

$$A = \varepsilon.L.C$$

Avec :

A = absorbance (sans unité)
ε = coefficient d'absorption molaire ou d'extinction ($dm^3 . mol^{-1} . cm^{-1}$)
C = concentration molaire ($mol. dm^{-3}$)
L = longueur de la cuve (cm) ou trajet lumineux

Pour valider la loi de Beer-Lambert il faut travailler en lumière monochromatique, les solutions utilisées doivent être diluées, homogènes, et le soluté ne doit pas donner de réactions sous l'effet de la lumière incidente.

I-1/ MATERIEL VEGETAL ..... - 37 -

I-2/ PERIODE DE RECOLTE DE NOTRE PLANTE ..... - 37 -

I-3/ IDENTIFICATION BOTANIQUE ..... - 38 -

I-4/ PREPARATION DES ECHANTILLONS ..... - 38 -

I-5/ DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU ..... - 38 -

I-6/ DETERMINATION DE LA TENEUR EN CENDRES ..... - 39 -

I-7/ DETERMINATION DU PH ..... - 40 -

I-8/ TEST PHYTOCHIMIQUE ..... - 40 -

I-9 / DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX (CPT) ..... - 46 -

I-10 / ACTIVITE ANTI-RADICALAIRE CONTRE LE RADICAL DPPH ..... - 47 -

I-11/ SPECTROPHOTOMETRIE UV-VIS ..... - 48 -

Chapitre II :

Résultats et Discussion

Chapitre II- RESULTATS ET DISCUSSION

II-1/ Teneur en eau

Le taux d'humidité nous permet d'exprimer nos résultats en pourcentage de matière sèche (voir tableau II-1).

Tableua II-1. Teneur en eau et en matière sèche (MS) dans les feuilles et les fleurs

Paramètre	Organe	
	Feuilles	Fleurs
Humidité (H) %	11	2,5
Matière sèche (Ms) %	89	97,5

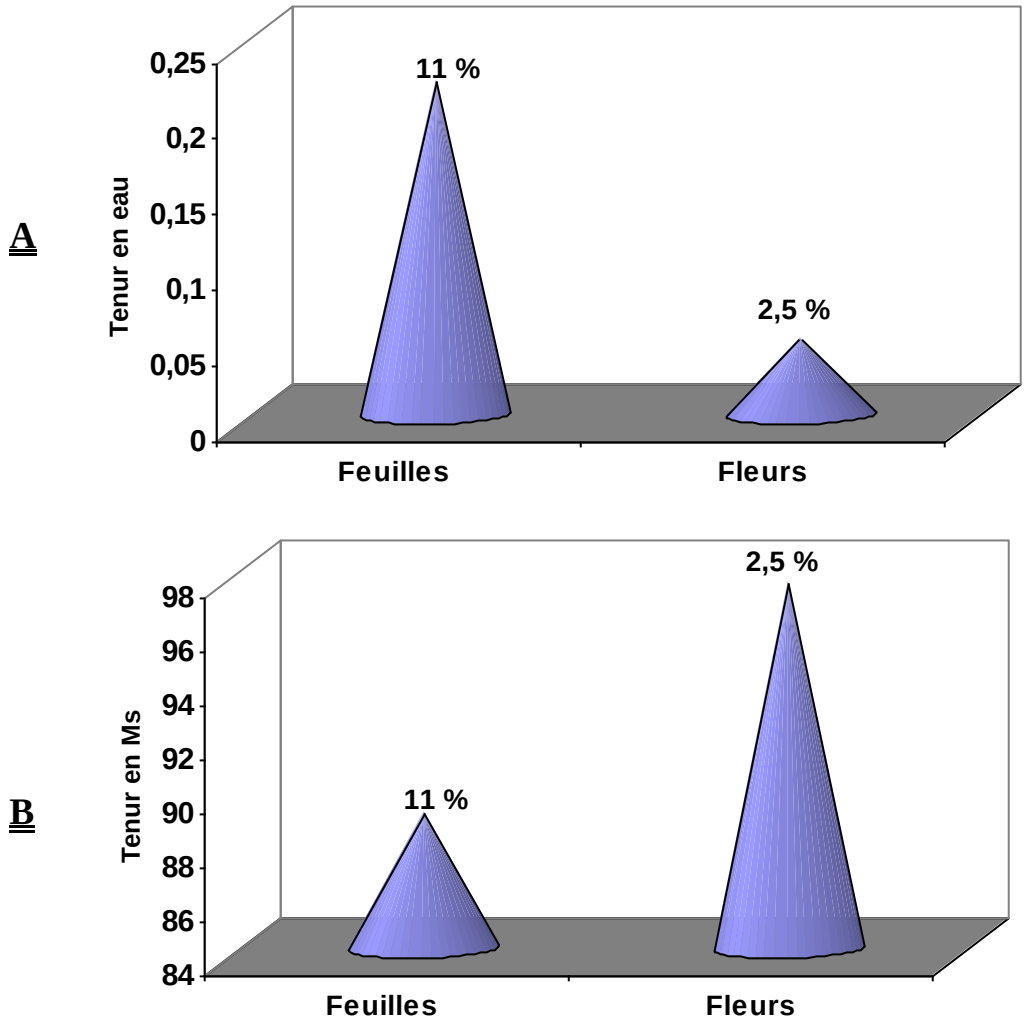


Fig II-1. Histogrammes illustrant la teneur en eau **A** et en matière sèche **B**

La lecture du tableau II-1, montre que la teneur en eau varie d'un organe à l'autre, elle est de 11 % pour les feuilles et de 2,5 % pour les fleurs.

On remarque que la teneur en eau dans les feuilles beaucoup plus grande que celle trouvée dans les fleurs, celui-ci en accord avec beaucoup des résultats cités dans la littérature **[3]**.

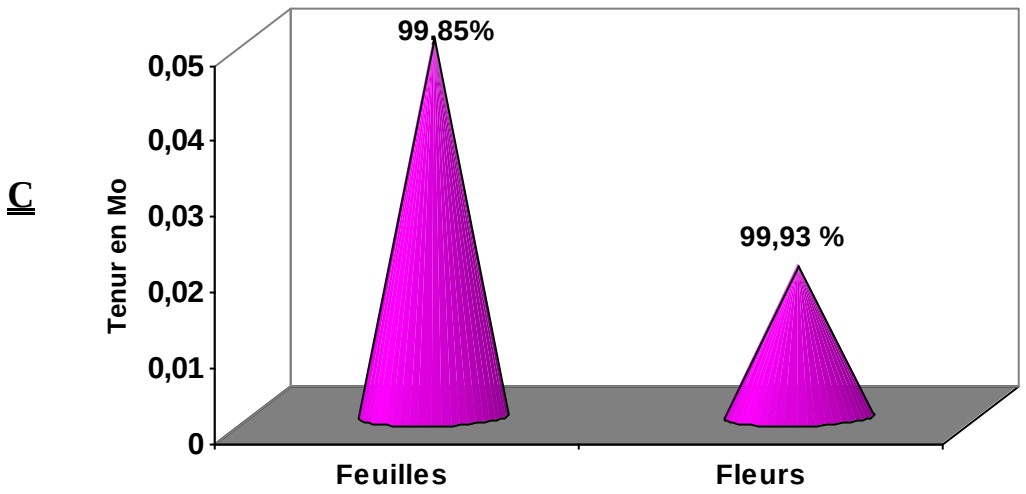
II-2/ Teneur en cendres

La teneur en cendres représente la quantité totale en sels minéraux, éléments mineurs à savoir : Zn, Mn, Cd, Pb,...etc, présents dans l'échantillon analysé. Elle est exprimée en % de la matière sèche.

Les teneurs en cendres et en matières organiques obtenues pour les fleurs et les feuilles sont indiquées dans tableau II-2 et représentées dans la figure II-2.

Tableau II-2. Teneur en eau et la matière sèche dans les feuilles et les fleurs

Paramètre	Organe	
	Feuilles	Fleurs
Matière organique %	99,85	99,93
Cendre %	0,15	0,07



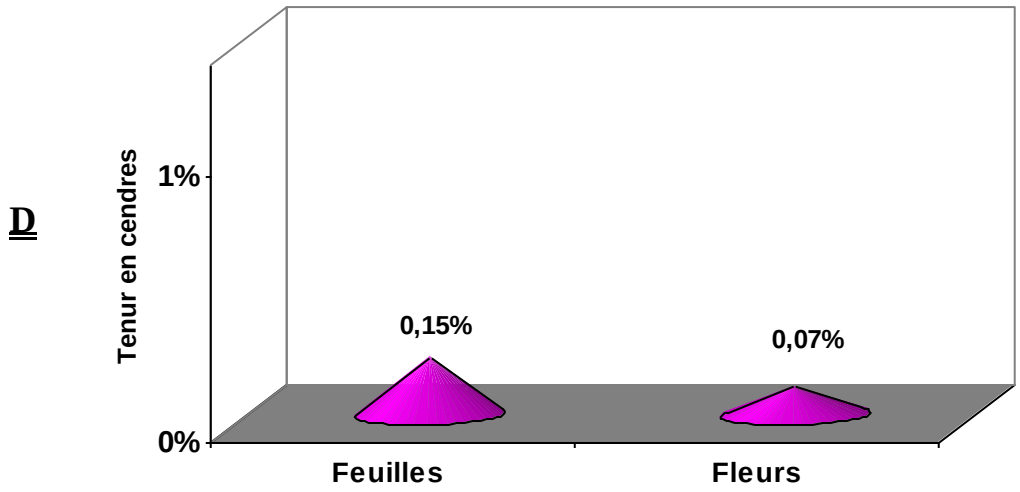


Fig II-2. Histogrammes illustrant la teneur en MO ‘‘**C**’’et en cendres ‘‘**D**’’.

D’après les résultats obtenus dans le tableau II-2 et la figure II-2, on constate que les teneurs en matière minérale (ou les cendres) dans les feuilles (0,15%) et deux fois plus grande que celle trouvées dans les fleurs (0,07 %).

Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux publiés à la littérature.

II-3/ Le pH

Le pH des extraits **aqueux** est mesuré pour permettre l’interprétation de certains résultats de l’activité biologique Les valeurs obtenues des pH des extraits aqueux des deux parties choisies sont données dans le tableau II-3.

Tableua II-3. pH des différents extraits aqueux des deux organes étudiés.

Paramètre	Organe	
	Feuilles	Fleurs
pH	6,60	6,72

Les valeurs des pH obtenus pour les deux parties utilisées en médecine traditionnel sont légèrement acides, comprises entre 6,60 et 6,72.

II-4/ Rendement d'extraction

Les résultats obtenus (Tableau II-4 et Fig II-3) montrent que les rendements en extraits méthanoliques à température élevée des feuilles et des fleurs sont supérieurs à ceux des extraits à température ambiante. Taux d'extraction dans les feuilles sont toujours élevés par rapport à ceux des fleurs,

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide : la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant.

Il a été démontré que pour l'extraction par les solvants à température élevée permettait d'obtenir des rendements plus élevés en extraits secs que lorsqu'ils sont obtenus à température ambiante **[9,10].**

Tableau II-4. Rendement (%) en extraits bruts méthanoliques des parties étudiées

Organe	Extrait méthanolique	Rendement (%)
Feuilles	**à température ambiante**	**20,4**
	à température élevée	**39**
Fleurs	**à température ambiante**	**36,3**
	à température élevée	**38,9**

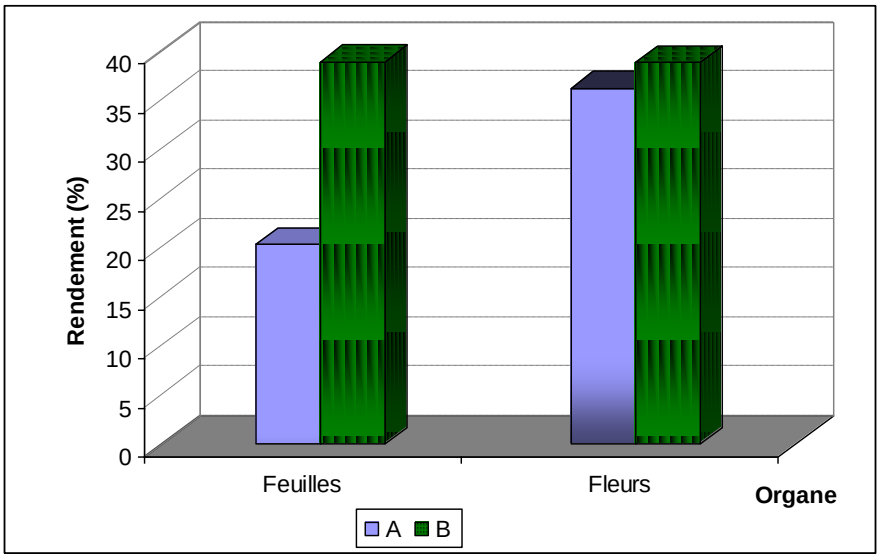


Fig II-3. Histogramme illustrant le rendement d'extraction par le méthanol à **A** : température ambiante et à **B** : température élevée.

II-5/ Tests phytochimique /ou screening chimique

Ces tests ont été effectués pour mettre en évidence la présence de certains groupements chimiques qui peuvent être responsables des activités biologiques étudiées.

Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé.

Selon ces réactions de caractérisation, les résultats sont traduits par :

- Absence : négative (-)
- Présence : positive (+).

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur les feuilles et les fleurs du romarin, notre plante étudiée, épuisées par le méthanol absolu à deux températures différentes sont comme suit :

II-5-1/ Stérols et polyterpènes

Les réactions caractéristiques des stérols et polyterpènes ont été révélées par l'intermédiaire **LIEBERMANN- BURCHARDT** traduisais par une coloration verte ou de violette. Les résultats sont réunis dans le tableau II-4 :

Tableua II-4. Résultats de recherches des stérols et triterpènes

Extrait MeOH	Méthode D'extraction	Résultat	coloration
Feuilles	**A**	**+**	anneau rouge brunâtre. surnageant vert
	B	**+**	
Fleurs	**A**	**+**	
	B	**-**	**Pas de coloration**

Fig II-4. Caractérisation des stérols polyterpènes

II-5-2/ Recherche des tanins

L'intensité de la coloration verte olive donnée suite à la réaction des tanins condensés des différents extraits avec le $FeCl_3$ aqueux est mentionnée dans le tableau II-5.

Tableau II-5. Résultats de recherche des tanins condensés dans les différents extraits

Extrait MeOH	Méthode D'extraction	Résultat	coloration
Feuilles	**A**	+	**bleue - noire**
	B	+	
Fleurs	**A**	+	
	B	+	

Fig II-5. Caractérisation des tanins, (**A**) : temoin acide gallique et (**B**) : extraits MeOH

II-5-3/ Recherche des saponosides

Après agitation, la mousse persistante dans les tubes pour plus d'un quart d'heure et avec une hauteur plus d'un 1cm indique la présence de saponosides.

Tableau II-6. Résultats de recherche des saponosides

Extrait MeOH	Méthode D'extraction	Résultat	
Feuilles	**A**	-	**Mousse inférieure à 1cm**
	B	+	Mousse supérieure à 1cm
Fleurs	**A**	+	Mousse supérieure à 1cm
	B	+	Mousse supérieure à 1cm

Remarque : le test été considéré positif simplement pour les cas où la mousse > 1cm (voir la partie expérimentale – chapitre I).

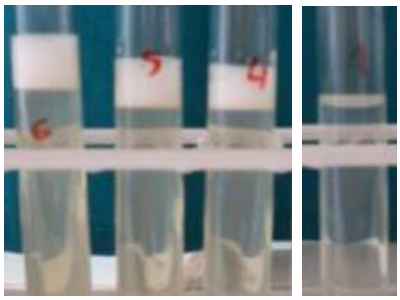


Fig II-6. Caractérisation des saponosides

II-5-4/ Recherche des alcaloïdes

D'après les résultats de cette recherche, on note la présence des alcaloïdes dans les quatre extraits MeOH des parties étudiées.

II-5-5/ Recherche des flavonoïdes

Tableau II-7. Résultats de recherche flavonoïdes

Extrait MeOH	Méthode D'extraction	Résultat	Coloration
Feuilles	**A**	**-**	Pas de coloration
	B	**+**	**Rose orangé**
Fleurs	**A**	**-**	Pas de coloration
	B	**+**	**Rose orangé**

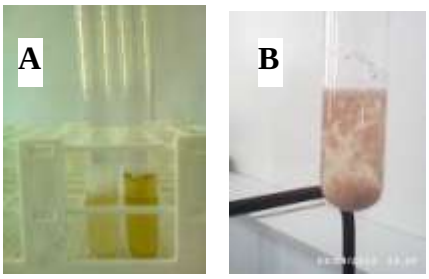


Fig II-7. Caractérisation des flavonoïdes, (**A**) : avant et (**B**) : après l'ajout du réactif Mg-HCl

II-5-6/ Recherche des quinones

D'après les résultats de cette recherche, on note l'absence des quinones dans les quatre extraits MeOH des parties étudiées.

II-5-7/ Recherche des composés réducteurs

Les résultats de la mise en évidence des composés réducteurs à l'aide de la liqueur de Fehling dans les extraits polaires des trois extraits sont résumés dans le tableau II-8.

Tableau II-8. Résultats de caractérisation des composés réducteurs

Organe	Extrait MeOH	résultat
Feuilles	A	+
	B	+
Fleurs	A	+
	B	+

II-6/ Dosage des composés phénoliques

II-6-1/ Courbe étalon de l'acide gallique

La gamme de concentrations d'acide gallique utilisée pour le dosage des phénols totaux ainsi que les absorbances respectives mesurées à 725nm sont représentés dans le tableau II-9.

Tableau II-9. Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique

Concentration d'acide gallique en mg/ml	0,00	0,01	0,02	0,05	0,08	0,10	0,13	0,15	0,17
Absorbance à 760 nm	0,00	0,11	0,27	0,64	1,00	1,20	1,50	1,75	1,96

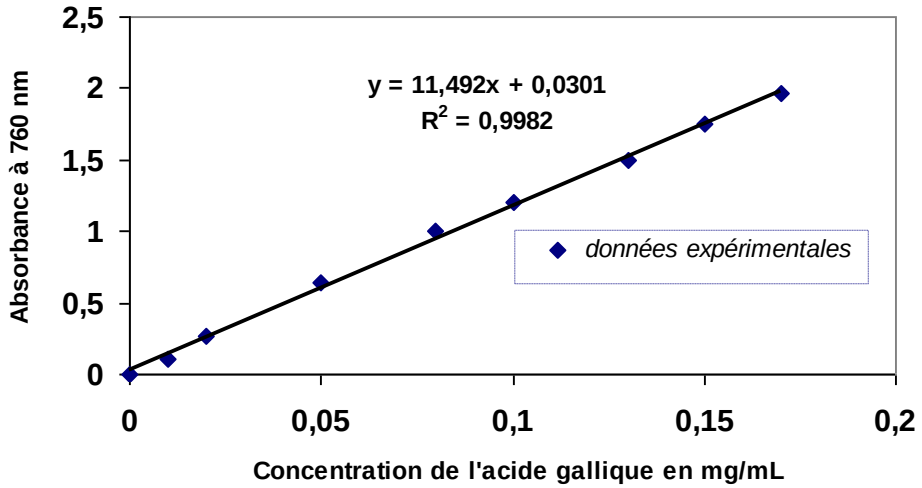


Fig II-8. Courbe d'étalonnage des composés phénoliques solubles totaux

Les concentrations des différents extraits ont été déterminées graphiquement en référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique indiqué dans la figure II-8 , les résultats sont indiqués dans le tableau II-10.

Tableau II-10. Concentration des nos différents extraits méthanoliques

	Méthode	**Absorbance (ou DO)**	**Concentration mg/mL**
Feuilles	A	**1,604**	**0,137**
	B	**0,813**	**0,068**
Fleurs	A	**0,651**	**0,054**
	B	**1,754**	**0,150**

A : extraction à température ambiante et **B** : extraction à température élevée

La conversion des ces concentrations obtenues (mg/mL) en termes d'équivalent d'acide gallique (mg/g de matière sèche) (mg AEG/ g de Ms) a été faite selon la formule indiquée dans le paragraphe **I-9-4** de la 2 ^{me} partie. Et qui sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Tableau II-11. Teneurs en composés phénoliques totaux des extraits méthanoliques de deux parties du romarin (en mg d'équivalent d'acide gallique/g de matière sèche)

Extrait	**Romarin**			
	Feuilles		**Fleurs**	
	A	**B**	**A**	**B**
Méthanolique	**0,408**	**0,783**	**0,730**	**0,779**

Le contenu des composés phénoliques a été déterminé par la méthode de **Folin ciocalteu**. . La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques et possède une absorption maximale aux environs de 760 nm **[11]**.

Les taux des phénols totaux extraits à température élevée (**A**) dans les deux parties du romarin : feuilles 0,783 et les fleurs 0,779 mg AET/g de Ms sont totalement supérieurs aux ceux des extraits à température ambiante par : 0,408 et 0,730 mg AET/g de Ms respectivement.

Ces résultats trouvées par le méthanol sont totalement inférieurs aux résultats trouvés par certains chercheurs à savoir : Bidié **[5]** qui a trouvé 10,42 mg EAT/g d'extrait sec de la plante et Muchuweti **[11]**, dont ils ont estimé 10,83 mg EAG/g pour l'extrait sec du romarin sur lequel ils travaillaient.

Récapitulons ces résultats on peut dire que la quantité des composés phénoliques dans les différents extraits de la plante étudiée dépend essentiellement de : leur origine **[12],** 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 **[13]** et la durée de conservation **[14].**

II-7/ Evaluation du pouvoir antioxydant contre DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs vis-à-vis au radical DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 515nm (Fig II-9). Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires **[9]**.

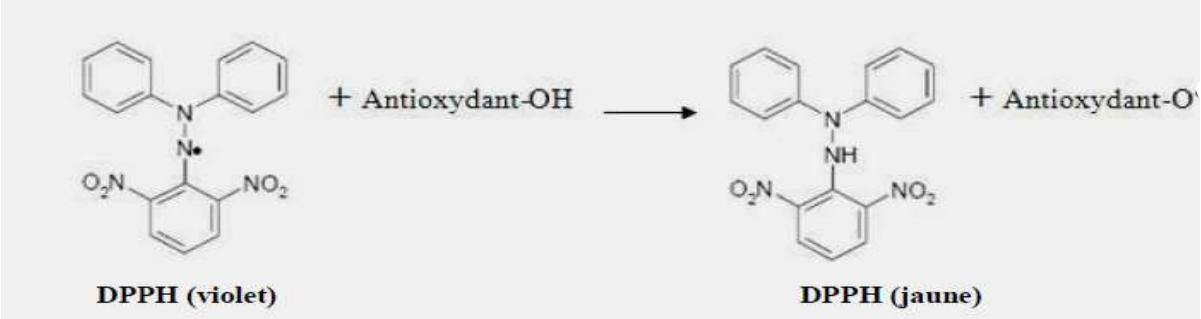


Fig II-9. Réduction d'un antioxydant avec le radical DPPH•

Afin de comparer cette activité antioxydante avec celle de l'acide ascorbique, une courbe d'étalonnage réalisée par ce dernier a été tracée (Tableau II-12, Fig II-10).

Tableau II-12. Pourcentage de réduction de l'absorbance du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique**.**

Concentration de l'acide ascorbique en (mg/ml)	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2	0,3
DO	0,824	0,769	0,720	0 ,578	0,229	0,0315
% de DPPH à 515nm	12,15	17,96	23,24	38,37	75,58	96,64

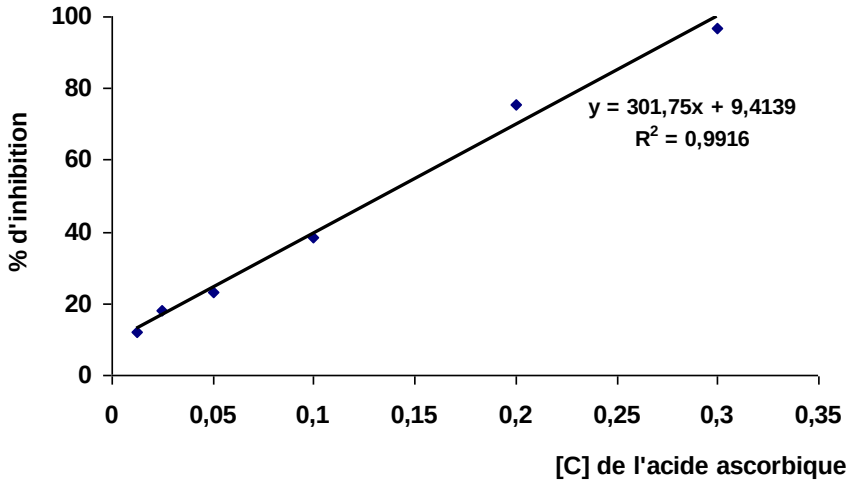


Fig II-11. Pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.

Les figures (II-11et II-12) et l'annexe 01 correspondants rapportent les résultats du pouvoir antioxydant des extraits des feuilles et fleurs par la méthode de piégeage du radical libre DPPH (voir figure II-9).

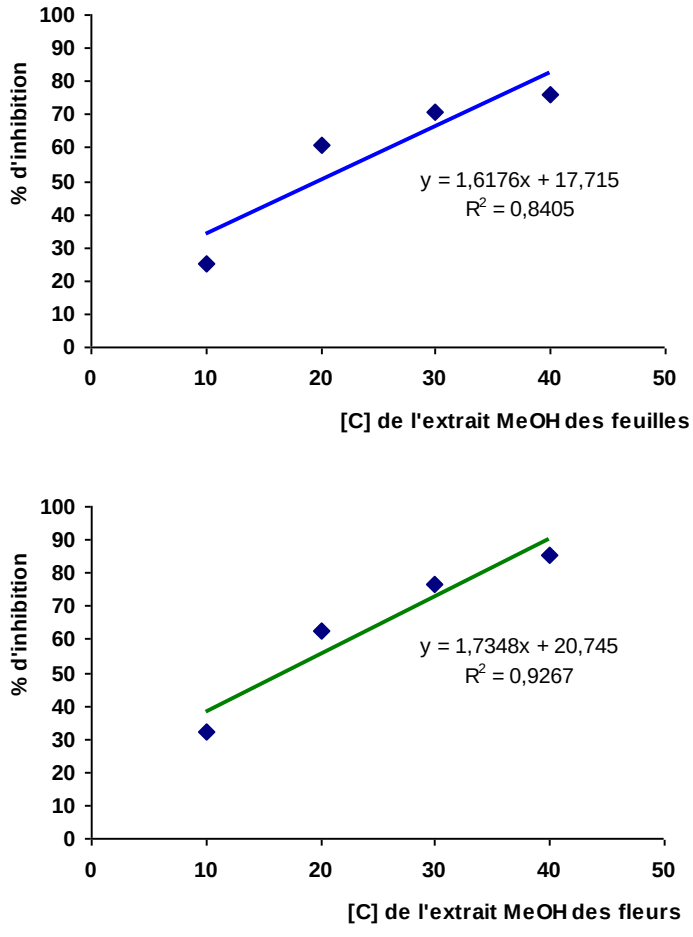


Fig II-12. Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait MeOH des feuilles et des fruits **(A)**

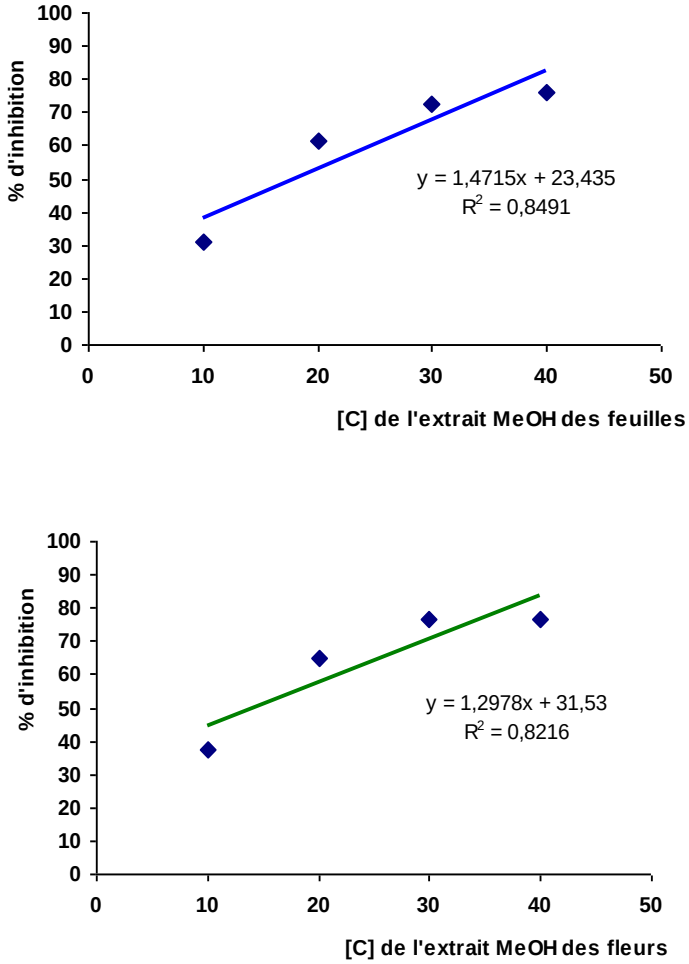


Fig II-13. Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'extrait MeOH des feuilles et des fruits **(B)**

D'une manière générale, tous les extraits testés méthanolique ont provoqué une diminution plus ou moins importante de l'absorbance à 515nm selon leurs concentrations et selon l'état d'extraction.

La **figure II-13**, montre que l' extrait méthanolique des fleurs présente un pouvoir antioxydant plus important que celui des feuilles, surtout à partir de la concentration 20 mg/mL où on a trouvé que la réduction des solutions méthanolique augmente contre le radical DPPH par 64,77 et 61,32 % respectivement.

La **figure II-12** a confirmé ce qu'on a déjà trouvé dans la quantification des teneurs des phénols totaux (paragraphe **II-6**) que ça soit dans les feuilles ou dans les fleurs.

Egalement, on a enregistré que l'activité antiradicalaire est plus significative pour les extraits à haute température (B) que ceux de la température ambiante (A).

Ces résultats montrent que nos extraits possèdent une puissante activité à céder le proton pour neutraliser le radical DPPH.

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, nous avons introduit deux paramètres :

- ✓ Le calcul de CI_{50} : il définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction

Les valeurs de IC_{50} des deux organes étudiés les feuilles et les fleurs pour les différents extraits méthanolique **(tableau II-13)** ont été estimées en utilisant la courbe de régression linéaire : **y= ax + b**

Où :

y = 50% (pourcentage de réduction de DPPH)

x : IC_{50} (la concentration en extrait et de l'acide ascorbique)

- ✓ Le calcul du pouvoir antiradicalaire : (APR) qui est inversement proportionnel à l'IC_{50} **(tableau II-13). (APR=1/IC_{50})**

Tableau II-13. CI_{50} et ARP de l'acide ascorbique et des substances testées sur la décoloration du DPPH.

Extrait MeOH	Méthode	CI_{50} mg/mL	ARP
Feuilles	**A**	**19,959**	**0,050**
	B	**18,053**	**0,055**
Fleurs	**A**	**16,864**	**0,059**
	B	**14,232**	**0,070**
Acide ascorbique		**0,135**	**7,435**

À des fins comparatives un antioxydant standard est utilisé : l'acide ascorbique. Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec CI_{50} de l'ordre de 0,134mg/mL. La valeur de CI_{50} de l'acide ascorbique est quasi-identique à celle rapportée auparavant (CI_{50} =0,135mg/mL) par **[15].**

Pour nos extraits, on constate que l'activité antioxydante est trop faible, les données de la littérature ont montré que les huiles essentielles du romarin possèdent une activté remarquable comparant à celle des fleurs et des feuilles.
Ces résultats sont en accord avec la littérature.

En ce qui concerne les CI_{50}, La comparaison de ces valeurs avec celle de l'antioxydant standard, l'acide ascorbique (0,135), nous a permis de déduire que le pouvoir antioxydant de l'ensemble des extraits testés est plus faible que celui de l'acide ascorbique.

Références bibliographique

[1]- Audigie C. L., 1978. Manipulation d'analyse biochimique. Ed. Doin. Paris, pp : 27-74.

[2]-Linden G., 1981. Principales techniques d'analyse. Vol 2.Ed Tec et Doc- Lavoisier. Paris, 434 p.

[3]- Békro Y.A., Békro J.A.M., Boua B.B., Tra B.F.H. et Ehilé E.E., 2007. Etude ethnobatanique et screning phytochimique de Caesalpiniabenthamiana baill.) (Caesalpiniace ae). Rev.Sci. Nat. **4:** 217-225.

[4]- Diallo A.M., 2005. Etude des Plantes médicinales de Niafunké (Région de Tombouctou), phyto-chimie et Pharmacologie de Maerua crassifolia Forsk (Capparidacée). Thèse de doctorat.Bamako, 140 p.

[5]- Bidié A.P., Koffi E., N'guessan JD., Djaman A.J. et Guédé-Guina F., 2008. Influence of Mitragyna ciliata (MYTA) on the microsomalactivity of ATPaseNa+/K+ dependent extract on a rabbit (heart) Afr J Trad CAM **5:** 294-301.

[6]- Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc A., Gmira N, .2003. Screening phytochimique d'une endémique ibéro marocaine, thymelaea lythroides. Bull. Soc. Pharm., **142**: 61-78.

[7]-Blouin J., LLORCA L., Montreau F.R., Dufour J.H., 1972. Etude des conditions optimales pour la détermination des composés phénoliques totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu. Connaissance de la vigne et du vin, **6 :** 405-413.

[8]- Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-calixto F. ; 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal Sci. Technology International, **8 :**121-137.

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

[10]-Chen C.W. & Ho C.T., 1995. Antioxidant properties of polyphenols extracted from green tea and black tea. J Lipids, **2:** 35-46.

[11]- Muchuweti M., Kativu E., Mupure C.H., Chidewe C., Ndhlala A.R. et Benhura M. A.N. **2007**. Phenolic composition and antioxidant propreties of some species. American journal of food technolgy., **2** (5) : 414-420.

[12]- Ebrahimzadeh M. A., Pourmmorad F. et Hafezi S. **2008**. Antioxidant activities of Iranian corn silk. Turkish journal of biology., **32 :** 43-49.

[13]- 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.

[14]-Özgüven M. et Tansi S. 1998. Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L as in influenced by ecological and ontogenetical variation. The Turkish journal of agriculture and forestry., **22 :** 537-542.

[15]-Viuda-Martos M., Yolanda R.N., Sánchez Z., Fernández-López F., José A.; 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. Flavour Fragrance Journal, **25**, 13–19.

II-1/ TENEUR EN EAU..... - 50 -

II-2/ TENEUR EN CENDRES..... - 51 -

II-3/ LE PH ..... - 52 -

II-4/ RENDEMENT D'EXTRACTION..... - 53 -

II-5/ TESTS PHYTOCHIMIQUE /OU SCREENING CHIMIQUE..... - 54 -

II-6/ DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES ..... - 57 -

II-7/ EVALUATION DU POUVOIR ANTIOXYDANT CONTRE DPPH ..... - 59 -

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....64

Conclusion générale

Conclusion générale

La découverte de ressources naturelles du règne végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutique. La présente étude a porté sur l'espèce *Rosmarinus officinalis* L qui appartient à la famille de lamiacées, une des familles les plus importantes dans la flore algérienne et les plus utilisées par les thérapeutes traditionnels.

Elle a permis de mettre en évidence à travers un criblage phytochimique la présence des tanins, des flavonoïdes, des stérols et polyterpènes, des saponosides, des composés réducteurs et des alcaloides. Tandis que les substances quinones libres et combinées sont totalment absentes dans toutes les parties choisies.

Le rendement d'extraction par le méthanol dans les feuilles et les fleurs été plus important à température élevée par un pourcentage de 39 et 38,5 % qu'à température ambiante par un taux de 20,4 et 36,3 % respectivement.

Le dosage des phénols totaux les quatre extraits méthanoliques a révélé des teneurs beaucoup plus importantes à haute température dans les feuilles par 0,783 mgEAG/g Ms et dans les fleurs par 0,779 mg/g qu à température ordinaire.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de réduction piégeage de radical libre $DPPH^{\bullet}$ des extraits méthanoliques des feuilles et des fleurs, nous a permis après comparaison à celle de l'acide ascorbique (antioxydant de référence CI_{50} 0,135) que ces extraits ont un pouvoir antioxydant trop faible.

Nos perspectives de recherche pour le futur sont les suivantes :

- Poursuivre l'étude phytochimique de l'espèce *Rosmarinus officinalis* L afin d'identifier et isoler d'autres métabolites secondaires contenus dans nos extraits.
- Tester d'autres extraits de d'autres solvants de polarités différentes (éther diéthylique, EtOH, H_2O ...etc.) contre le radical libre DPPH a fin de mesurer le pouvoir antioxydant.

Annexes

ANNEXE - 01 -

Les tableaux (**1,2,3** et **4**) regroupants les concentractions [C] (mg/mL), pourcentage d'inhibition du DPPH % et la densité optique (DO) des antioxydants présentent dans les feuilles et les fleurs extraits par le MeOH.

-1-

	[C]	%	DO
Feuilles B	43	**76,01**	0,132
	30	**72,78**	0,149
	20	**61,32**	0,212
	10	**30,78**	0,380

-2-

	[C]	%	DO
Fleurs B	40	**76,87**	0,127
	30	**76,68**	0,128
	20	**64,77**	0,193
	10	**37,58**	0,343

-3-

	[C]	%	DO
Fleurs A	40	**85,43**	0,080
	30	**76,32**	0,130
	20	**62,50**	0,206
	10	**32,21**	0,372

-4-

	[C]	%	DO
Feuilles A	40	**75,96**	0,132
	30	**70,59**	0,161
	20	**60,75**	0,215
	10	**25,32**	0,410

- ***A : extraction à une température ambiante***
- ***B : extraction à une température élevée***