

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene

Faculté de Génie Mécanique et Génie des Procédés



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de **Magister**

Spécialité : **Technologie Pharmaceutique**

Par : **LABOUKHI née KHORSI Souhila**

Sujet

**Extraction, identification et évaluation de l'activité
antioxydante des flavonoïdes issus de *Bassia muricata* L.**

Soutenu publiquement, le : 17/ 03 /2011, devant le jury composé de :

Mr K.DAOUD	Professeur à l'USTHB	Président
Mme S.IDJERLMECHERARA	Maître de conférence A à l'USTHB	Directrice de mémoire
Mme A .HASSANI	Professeur à l'ENS	Examinatrice
Mme H .MOGHRANI	Maître de conférence A à l'USTHB	Examinatrice

L'objectif de ce travail était d'extraire une des famille des polyphénols ; les flavonoides, à partir d'une plante médicinale utilisée dans le sud-est du pays (région d'El oued) : *Bassia muricata* L. plusieurs méthodes ont été utilisées pour l'extraction ; la macération, l'extraction au soxhlet et l'extraction aux ultrasons. Les flavonoides étant des molécules photosensibles, chaque extraction a été réalisée à la lumière du jour et à l'abri de la lumière. Ceci nous a permis de comparer les différents rendements obtenus.

Dans la seconde étape de ce travail, chaque extrait a été analysé par Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) après optimisation des conditions opératoires, et sa composition identifiée grâce à la méthode de l'étalonnage externe.

Dans la dernière partie de ce mémoire, nous avons essayer d'évaluer l'activité antioxydante de chaque extrait par la méthode du DPPH, en utilisant l'UV/VISIBLE comme technique de lecture, nous avons de la même manière déterminer la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC_{50}).

Des résultats très satisfaisants ont été obtenus au cours de ce travail, nous avons pu ainsi valoriser une plante largement répandue dans le sud du pays mais encore mal exploitée sur le plan scientifique.



Je dédie ce modeste travail à :
Mon mari Kamel
La mémoire de ceux que j'aime et perdus trop tôt.
Mes chers parents
Mon adorable fils Abderrahmane, ma fille Halla et mon futur bébé
Mes beaux parents
Ma grande mère
Mes charmantes nièces :Nawa et Nouha
Ma sœur Hassiba et son époux
Mes frères : Samir, Redouane et Hamza
Ma future belle sœur Noura
Ma belle sœur Fatima
Mes belles sœurs, mes beaux frères ainsi que leurs conjoints
Toute ma famille
Mes ami(e)s.



Remerciements

Louange à dieu seul et unique à qui nous adressons nos amples remerciements.

Un bouquet de remerciements à la personne qui m'a soutenue, veillée sur moi et toujours présente à mes cotés à chaque moment de réussite dans ma vie, quoi que je fasse je ne saurais assez la remercier, à toi ma très chère Mère.

Ce travail a été physiquement effectué avec les moyens techniques du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques (CRAPC), au niveau du laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle de la Faculté de Chimie, l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB).

Je tiens à rendre un hommage à Monsieur le Professeur B.Y. MEKLATI, Directeur du CRAPC, d'avoir mis à ma disposition tout ce qui était matériellement possible afin de réussir ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour ses encouragements.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse Madame S. MECHERARA-IDJERI pour sa disponibilité et la précieuse aide avec lesquelles elle m'a dirigé tout au long de ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect.

A Monsieur le Professeur A. BAALIOUAMER (Directeur du laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle, USTHB), j'exprime ma sincère reconnaissance pour m'avoir accepté dans son laboratoire, ainsi qu'aux membres du laboratoire pour leurs encouragements.

A Monsieur K.DAOUD (professeur Faculté Génie Mécanique & Génie des procédés, USTHB), j'exprime ma sincère reconnaissance pour l'honneur qu'il me fait de présider ce Jury.

Que Madame A.HASSANI (professeur ENS) et Madame H.MOGHRANI (Maître de Conférences, Faculté Génie Mécanique & Génie des procédés, USTHB) trouvent ici l'expression de mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur Benamor larbi, Madame O.ABROUS et Madame N.MIROUCHE (Faculté de Biologie, USTHB), Madame A.HASSANI et Madame BERKA (ENS).

Mes remerciements vont également à Madame N.SAHRAOUI (Faculté Génie Mécanique & Génie des procédés, USTHB) pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée.

J'adresse également mes remerciements à tous mes collègues du CRAPC, en particulier ceux du Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle pour leur soutien, leurs encouragements et leurs précieux conseils.

Je tiens à exprimer mon éternelle reconnaissance et ma profonde gratitude à mon mari, mes parents et à tous les membres de ma famille pour m'avoir aidé, soutenu et encouragé.

Que tous mes ami(e) s trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour leurs encouragements.

Que tous ceux qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce mémoire et qui n'ont pas été cités, trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Liste des abréviations

L. : **Carl Linnæus** (1707-1778), puis **Carl von Linné** après son anoblissement, naturaliste suédois, fondateur de la nomenclature binominale)

Asch : **Paul Ascherson** (1834–1913), botaniste allemand

UV-B : ultraviolet -B (315-280 nm)

FRAP : Ferric Reducing Ability of Plasma

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

ABTS : 2,2'-azobis (3-éthylthiazoline-6-acide sulfonique)

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

TEAC : Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity

AAPH : 2,2'-azobis (2-méthylpropionamide) Dichlorhydrate)

NIST : National Institute of Standards and Technology

US EPA : The U.S. Environmental Protection Agency

VMHD : Vacuum Microwaves Hydrodistillation

MAE : Microwave Assisted Extraction

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Sommaire

<u>Sommaire</u>		<u>page</u>
Introduction		1
<u>Partie bibliographique</u>		
<u>Chapitre I : <i>Bassia muricata</i> L.</u>		
I.1. Famille des Chénopodiacées		3
I.2. <i>Bassia muricata</i> (L.) Asch		3
I.3. Utilisations traditionnelles		5
<u>Chapitre II : Les flavonoides</u>		
II.1. Structure chimique des flavonoides		6
II.2. Classification des flavonoides		7
II.3. Diversité et distribution		10
II.4. Rôle des flavonoides dans les plantes		11
II.5. Flavonoides et santé		11
II.6. Mesure du pouvoir antioxydant		12
<u>Chapitre III : Méthodes d'extractions des flavonoides</u>		
III.1. Les procédés d'extraction conventionnels		17
III.1.1. L'extraction par solvant volatil		17
III.1.2. L'extraction par l'appareil de Soxhlet		18
III.2. Les techniques d'extraction innovantes		19
III.2.1. L'extraction par les ultrasons		19
III.2.2. L'extraction assistée par micro-ondes		21
III.2.3. L'extraction par fluide supercritique		23
<u>Chap IV : Méthodes d'identifications des flavonoides</u>		
IV.1. Méthodes chromatographiques		26
IV.1.1. Chromatographie en phase liquide à haute performance		26
IV.1.1.1. Principe de fonctionnement		26
IV.1.1.2. Appareillage		27
IV.2. Méthodes spectrales		28
IV.2.1. Spectrophotométrie UV Visible		28
IV.2.1.1. Principe		29
IV.2.1.2. Éléments constituant un spectrophotomètre U.V./visible		31
IV.2.2. Résonance magnétique nucléaire		31

Partie expérimentale

Chapitre V : Echantillonnage et extraction

V.1. Echantillonnage	33
V.1.1. La récolte	33
V.1.2. Identification de la plante	33
V.1.3. Préparation de la matière végétale	33
V.2. Extraction des flavonoides	34
V.2.1. Extraction par macération	34
V.2.2. Extraction par soxhlet	35
V.2.3. Extraction par ultra sons	36
V.2.4. Extraction à l'abri de la lumière	37
V.3. Récupération des résidus secs	37
V.4. Résultats et discussion	39

Chapitre VI : Identification des flavonoides

VI.1. Analyse par Chromatographie Liquide à Haute Performance	41
VI.1.1. Conditions opératoires	41
VI.1.2. Analyse des échantillons	42
VI.2. Résultats et discussion	42

Chapitre VII : Mesure du pouvoir antioxydant

VII.1. Mode opératoire	51
a- Préparation de la solution alcoolique de DPPH	51
b- Préparation d'une solution mère d'échantillon	52
c- Protocole expérimental	52
d- Témoin positif	52
VII.2. Résultats et discussion	53

Conclusion	59
-------------------	-----------

Références bibliographiques	61
------------------------------------	-----------

Introduction

Les substances naturelles d'origine végétale sont primordiales pour les scientifiques qui les ont de tout temps considéré comme sources de matières premières et comme modèles.

Ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en oeuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale.

Ces produits naturels se présentent souvent sous forme d'un mélange complexe constitué de plusieurs dizaines de composés en proportions variables. Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les flavonoïdes, ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé.

Les flavonoïdes sont des pigments naturels répandus dans tout le règne végétal où ils interviennent comme filtre UV et comme agent de protection contre les organismes pathogènes. Ils sont apportés au niveau de l'organisme grâce à la consommation des fruits, des légumes, des céréales et de boissons ^[1,2].

Ces molécules ont fait l'objet de plusieurs travaux. Il s'agit essentiellement des propriétés de ces molécules, des différentes techniques d'extraction végétale, de leur identification et fonctionnalisation. L'intérêt pour ces composés est justifié par les nombreux effets biologiques qu'on leur attribue, tels que leur rôle protecteur contre les inflammations ^[3], les allergies ^[3], les maladies cardio-vasculaires ^[3], les cancers ^[3], la stimulation du système immunitaire ^[3], les infections bactériennes et virales ^[3]. Ces effets sont reliés à leur pouvoir antioxydant et inhibiteur d'enzymes ^[1, 3].

Des flavonoïdes tels que la rutine, la quercétine, la naringine, l'hesperitine, etc., à l'état pur et sous forme d'extraits, sont aujourd'hui de plus en plus commercialisés pour diverses applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

La valorisation de ces produits, quel que soit leur débouché, requiert en général une étape de caractérisation qui inclut l'analyse de leur composition chimique. Ainsi, dans le cadre de la connaissance et la valorisation des produits naturels Algériens principalement d'origine végétale, nous nous sommes intéressées à l'extraction des flavonoides à partir d'une plante médicinale : *Bassia muricata* L.

Dans la première partie de ce travail nous décrirons la matrice utilisée et la famille de composés ciblée par l'extraction ; les flavonoides. Nous passerons en revue les techniques, conventionnels et innovantes, utilisées pour l'extraction ainsi que les méthodes analytiques utiliser pour d'identification des flavonoides.

Dans la seconde partie de ce travail, nous donnerons les résultats expérimentaux des rendements obtenus par trois méthodes d'extraction (macération, extraction par Soxhlet et aux ultrasons) une première extraction exposée à la lumière et une deuxième extraction à l'abri de la lumière. Nous détaillerons la méthode d'analyse par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) utiliser pour l'identification de quelques flavonoides ainsi que la méthode du DPPH (2,2 - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl) utiliser pour l'étude du pouvoir antioxydant de nos échantillons obtenus à partir de *Bassia muricata* L. et nous valoriserons ainsi les vertus antioxydants de cette plante désertique.

Partie bibliographique

Chapitre I :
Bassia muricata L.

I.1. Famille des Chénopodiacées

Famille de plantes, à fleurs sans pétales, qui comprend en particulier des espèces cultivées, des espèces poussant dans les décombres ou sur des sols salés. Environ 1 500 espèces, réparties en une centaine de genres, sont présentes dans le monde, principalement dans les régions tempérées.

De nombreuses espèces de chénopodiacées poussent en bordure de mer, dans les marais salants et les déserts salés.

Ces espèces, dites " halophiles ", sont adaptées pour supporter de fortes teneurs en sel dans le sol. Ainsi, comme les plantes adaptées à la sécheresse, les chénopodiacées ont souvent une tige et, parfois, des feuilles charnues, qui leur permettent de stocker l'eau ^[4].

Les plus connues des chénopodiacées cultivées sont les diverses variétés de bettes et betteraves (*Beta vulgaris*) et l'épinard (*Spinacia oleracea*). Citons également l'arroche des jardins ou bonne dame (*Atriplex hortensis*), épinard sauvage (*Chenopodium bonus-henricus*), qui peuvent être consommées comme des épinards, ou le quinoa (*Chenopodium quinoa*), cultivé en Amérique du Sud comme céréale. D'autres espèces sont considérées comme plantes médicinales tel que *Bassia muricata* L. Asch., *Chenopodium ambrosioides* L. et *Chenopodium multifidum* L. ^[4, 5].

I.2. *Bassia muricata* L. Asch

Bassia muricata L. Asch fut décrite par deux botanistes Linné et Ascherson. C'est une herbe arénacée poussant dans les déserts. C'est une plante d'espèce Saharo-Arabique commune dans tout le Sahara et en particulier dans les sols argileux après la pluie ^[5-7].

Taxonomie :

Famille : CHENOPODIACEAE

Genre : *Bassia*

Épithète spécifique : *muricata*

Nom accepté dans la liste de contrôle et la base de données « Plantes Africaines »

Bassia muricata (L.) Asch. [Famille CHENOPODIACEAE]

Synonyme : *Salsola muricata* L. [Famille CHENOPODIACEAE]

Nom tamahaq : Ouhas

Nom arabe : الغبيرة



Figure I.1 : *Bassia muricata* L. Asch_– Tassili N’ Ajjer-Oued Sersouf.

Bassia muricata L. est une plante herbacée annuelle, sa taille est de 20 à 50 centimètres de hauteur. Elle a de longues tiges pouvant être étalées sur le sol ou dressées. Toute la plante est couverte d'un duvet blanc grisâtre.

Les feuilles sont grisâtres, étroites et velues. Les fleurs laineuses et sans pétales, sont présentes par deux à l'aisselle des feuilles. Elles ont cinq étamines et cinq sépales qui portent une épine dorsale jaunâtre s'allongeant avec la maturité ^[5].

Fleurit au printemps mais elle se déshydrate rapidement à l'approche de la saison de sécheresse. Elle fournit un bon fourrage pour de nombreux animaux surtout pour les chameaux car on dit qu'elle augmente la production de leur lait ^[6].

I.3. Utilisations traditionnelles

Bassia muricata L. est peu connue et ses vertus médicinales sont mal exploitées. Cependant dans les régions où elle pousse spontanément, les feuilles fraîches coupées ou la plante sèche pulvérisée sont utilisées pour en faire une pâte en utilisant l'eau ou l'huile, elle est ensuite incorporée au beurre local. Cette préparation est employée comme pommade analgésique locale et crèmes antiparasitaires (dermatose, blessures infectées ...) ^[7].

Elle est également indiquée pour les douleurs rhumatismales ainsi que certaines maladies rénales. La partie aérienne pulvérisée est utilisée en infusion pour traiter les diarrhées ^[7].

Les autochtones utilisent cette plante par dose. Chaque dose est mesurée par un pincement de trois doigts. Le patient boit un à deux verres de thé de boisson pour chaque dose. La fréquence de la dose est rarement indiquée, elle est souvent adaptée à chaque cas ^[7].

Chapitre II :
Les flavonoïdes

Les composés phénoliques constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires des plantes. Ils possèdent dans leur squelette, un ou plusieurs cycles aromatiques portant un ou plusieurs groupes hydroxyles. Généralement, ils sont subdivisés en : acides phénoliques, stilbenes, coumarines, huiles essentielles, tannins et flavonoïdes ^[1].

Dans les fruits et légumes, les flavonoïdes constituent par le nombre de composés et les quantités présentes, la principale classe de polyphénols anti-oxydants et capteurs de radicaux libres. Ils sont particulièrement abondants dans les aliments et boissons comme le raisin et les préparations dérivées, le thé et le cacao, dont la consommation est réputée avoir des effets protecteurs contre différentes affections chroniques (maladies cardiovasculaires, diabète de type 2, cancers, maladies neurodégénératives). Ils entrent en outre dans la composition de médicaments et d'adjuvants alimentaires ^[8-10].

II.1. Structure chimique des flavonoïdes

La structure chimique des flavonoïdes est basée principalement sur un squelette de quinze (15) atomes de carbones : le 2- phenyl-benzo [α] pyrane, ou le noyau flavane, constitué de deux cycles benzéniques (A et B) reliés par un hétérocycle, le noyau pyrane (C) ^[11,12], ce qui donne aux flavonoïdes, un faible poids moléculaire ^[13].

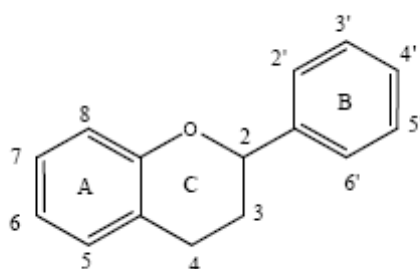


Figure II.1 : Le squelette de noyau flavane ^[11,12].

La variation du degré d'oxydation et la différence des substituants de l'hétérocycle C peuvent subdiviser les flavonoïdes en familles bien distinctes : flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et chalcones ^[11, 13].

La nature chimique des flavonoïdes dépend de la structure de chaque classe, le degré de l'hydroxylation, autres substitutions et conjugaisons et le degré de la polymérisation ^[14].

II.2. Composition des flavonoïdes

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les chalcones, les auronnes, les anthocyanes, les anthocyanines et les anthocyanidines.

II.2.a. Flavones et flavonols

Structuralement, les flavones sont caractérisées par la présence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 de l'hétérocycle du squelette flavane, et un groupement carbonyle en position 4 (4-oxo). Le cycle aromatique B est attaché à la position 2, et généralement la position 3 du flavone reste libre. Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement hydroxyle en position C3^[11].

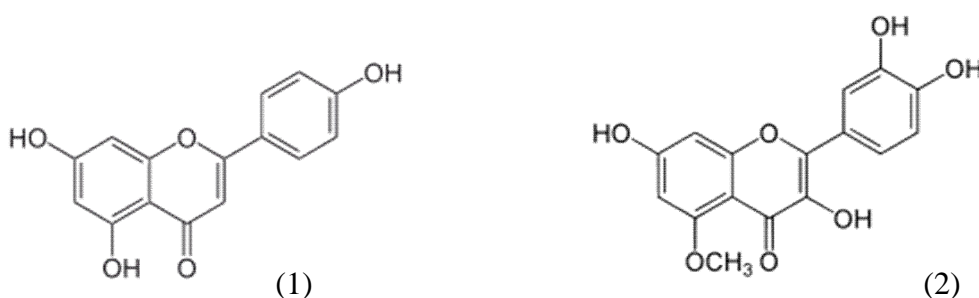


Figure II.2 : Exemples des flavones (1 : **apigénine**) et flavonols (2 : **azaléatine**).

II.2.b. Flavanones et dihydroflavonols

Les flavanones présentent des structures uniques qui diffèrent des autres flavonoïdes, par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2, à l'exception des 3-hydroxyflavanones ou les dihydroflavonols qui sont caractérisés par deux carbones chiraux en positions 2 et 3^[15,16].

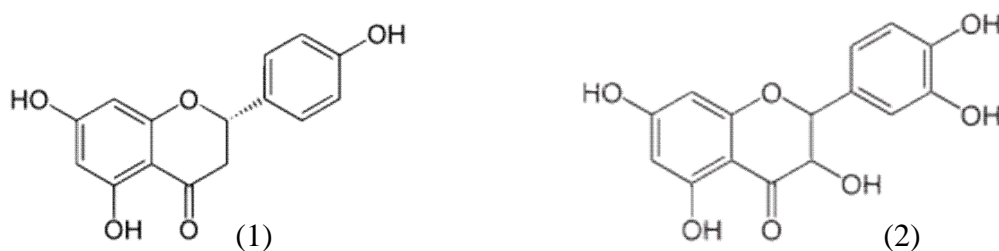


Figure II.3 : Exemples de flavanones (1 : **naringinine**) et dihydroflavonols (2 : **taxifoline**).

II.2. c. Isoflavones

Les isoflavones constituent une branche spécifique des flavonoïdes, qui diffèrent des autres par la position du noyau phénolique B (en position 3). Jusqu'à présent, plus de 1600 isoflavonoïdes aglycones et glycosides ont été identifiés, dont la grande majorité se trouvent chez la famille des légumineuses ^[17].

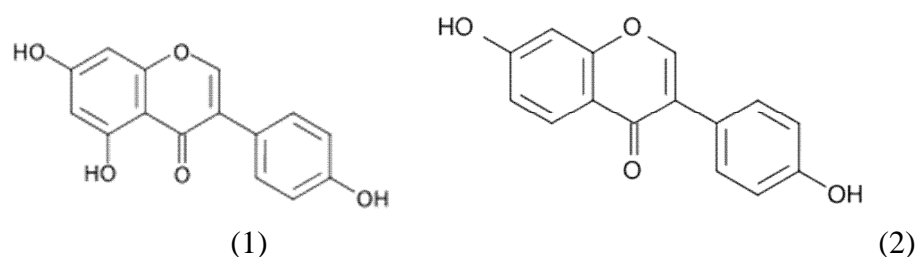


Figure II.4 : Quelques exemples d'isoflavones (1 : **génisteine**, 2 : **daïdzeine**).

II.2.d. Chalcones et aurones

Les chalcones, ou 1,3-diaryl-2-propen-1-one, représentent une des classes majeures des produits naturels appartenant à la famille des flavonoïdes.

Chimiquement, elles sont constituées par deux unités aromatiques, reliées par une chaîne tricarbonée, ouverte, cétonique et α , β insaturée. Ces substances naturelles sont souvent polyhydroxylées sur les cycles aromatiques ^[18,19].

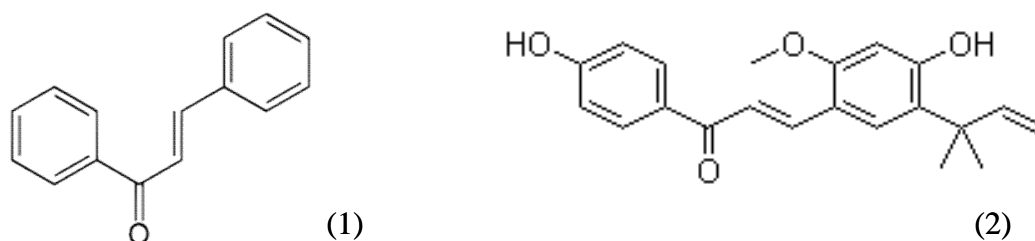


Figure II.5 : Exemples de chalcones (1 : **squelette de chalcones**, 2 : **licochalcone A**).

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène-coumaran-3-one, renfermant plusieurs fonctions hydroxyles sur leurs cycles aromatiques.

Le terme aurone provenant du latin « *Aurum* » signifiant « Or », car ces composés sont responsables de la coloration dorée (jaune brillante) de nombreuses fleurs ornementales des familles Scroplulariaceae ^[20].

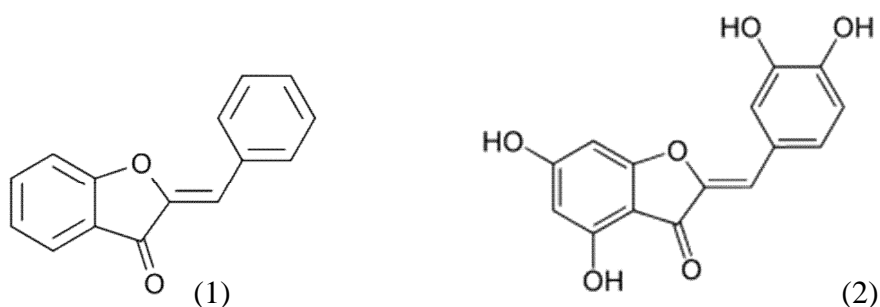


Figure II.6 : Exemple des aurones (1 : **squelette aurone**, 2 : **aureusidine**).

II.2.e. Anthocyanines et anthocyanidines

Les anthocyanines (en grec *anthos* signifie fleur, et *kyanos* signifie bleue) représentent les pigments les plus importants des plantes, ces pigments sont visibles à l'oeil nu.

Les anthocyanines désignent un vaste groupe des flavonoïdes, se sont les glucosides des polyhydroxy et polymétoxy des dérivés de 2-phenylbenzopyrylium ou les sels de flavylum.

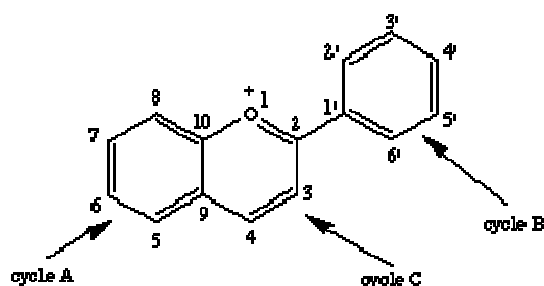


Figure II.7 : Structure de base de cation flavylum.

Les différences de structures entre les anthocyanines sont reliées au nombre de groupes hydroxyles, la nature et le nombre de sucres attachés à la molécule, la position de cette liaison, la nature et le nombre des acides aliphatiques ou aromatiques attachés au sucre dans la molécule.

Basé sur les résultats publiés dans différentes revues, il est estimé que le nombre des anthocyanines identifiés dans les plantes a largement dépassé 400 ^[21,22].

II.3. Diversité et distribution

Les flavonoides peuvent se trouver sous différentes formes dans les plantes, ces formes sont modifiées par une hydroxylation, méthylation et plus généralement par une glycosylation ^[26]. Cette dernière peut changer la polarité de la molécule et même ses propriétés biologiques, et sensiblement accroître le poids moléculaire des flavonoides ^[14].

La glycosylation joue un rôle très important, en rendant les flavonoides moins réactifs, et plus soluble dans l'eau, et par conséquent elle présente une forme essentielle de protection dans les plantes en empêchant les lésions cytoplasmiques, d'une part, et permet l'accumulation et le stockage des flavonoides dans les vacuoles des cellules, d'autre part ^[14].

La distribution des flavonoides dans les plantes dépend de plusieurs facteurs, notamment la variation en fonction de la phylogénétique, l'ordre, la famille de la plante, et la variation des populations à l'intérieur des espèces ^[14].

Ces composés sont largement abondants dans : les végétaux, les céréales, les noix, les graines ^[10-24]. D'autres travaux ont reportés la présence de ces composés dans le miel et la propolis ^[25], on en trouve également en quantité dans nombreuses plantes médicinales.

Leurs répartitions dépendent de leur degré d'accessibilité à la lumière. En effet, la formation des flavonoides les plus oxydés est accélérée par la lumière. Ainsi, les flavonols sont presque exclusivement présents dans les légumes à feuilles et les fruits, à l'état glycosylé. Cependant, certains flavonols ont été identifiés sous forme de traces dans les parties de la plante au-dessous de la surface du sol ^[14-26,27].

II.4. Le rôle des flavonoides dans les plantes

Une des fonctions majeures des flavonoides est la coloration des fleurs, ces couleurs exercent un effet attracteur sur les insectes ^[10-24,28], dans les feuilles, ces composés sont associés à de nombreux processus physiologiques des plantes ; ainsi, les flavonoides protègent la plante vis-à-vis des radiations UV-B, et les pathogènes fongiques ^[29,30]. De plus les flavonoides sont impliqués dans la photosensibilisation, le transfert d'énergie, et le développement des plantes, en interagissant avec les diverses hormones, et régulateurs de croissance ^[31]. En effet, les flavonoïdes ont récemment été décrits comme une nouvelle classe d'hormones ^[32].

On peut également noter que les flavonoides ont un rôle dans le contrôle de la respiration, la photosynthèse et la détermination du sexe ^[29,30].

II.5. Flavonoides et santé

L'alimentation est un facteur déterminant dans le maintien de l'organisme dans un état satisfaisant du point de vue de la santé et l'acquisition de cette connaissance a permis d'établir des recommandations nutritionnelles ^[33,34]. L'investigation des relations entre nutrition et santé met également en évidence les mécanismes moléculaires auxquels participent les nutriments. Il apparaît ainsi que l'interface de ces mécanismes avec le fonctionnement physiologique dépasse souvent la fonction de nutrition. Cette prise de conscience s'accompagne de nombreux développements autour du caractère fonctionnel des aliments et des nutriments.

Des données expérimentales mettent aujourd'hui en évidence l'effet des nutriments et des constituants de l'alimentation sur un grand nombre de cibles biologiques ^[34,35].

A coté de leurs fonctions importantes, dans la biochimie, la physiologie et l'écologie des plantes, les flavonoides représentent une partie intégrale des composés importants pour la nutrition et la santé humaine ^[36]. Ainsi, la consommation quotidienne moyenne recommandée des flavonoides est environ 1g pour chaque personne ^[37]. Ces données permettent d'établir le lien entre fruits, et légumes, et effet bénéfique sur la santé, en effet toutes les études épidémiologiques et animales, ont suggérées qu'une alimentation riche en flavonoides, est plus particulièrement les flavones, peut réduire le risque de nombreux cancers (cancer de poumon et de colon), les maladies coronaires, et les inflammations chroniques ^[6].

De nos jours, les propriétés thérapeutiques attribuées aux flavonoïdes sont largement étudiées, ils sont notamment : Anti-oxydants, anti-carcinogéniques, anti- oestrogéniques [10-26], inhibiteurs d'enzyme, anti-microbiens [30], anti-allergiques [10], cytotoxiques et anti-tumoraux [27].

II.6. Mesure de l'activité antioxydante

Les flavonoïdes forment l'une des plus importantes familles de molécules ayant des activités antioxydantes, une caractéristique associée à la présence dans leur structure des groupes hydroxyles liés à des noyaux aromatiques.

La diversité de la nature et la complexité des composés phytochimiques des extraits de plante imposent l'élaboration de plusieurs de méthodes pour évaluer l'activité antioxydante et pour estimer l'efficacité de ces substances. La majorité de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Elles peuvent également être basées sur :

- ☞ le métal réduisant la puissance (puissance antioxydante réductrice ferrique, FRAP) ;
- ☞ le balayage radical de peroxy (capacité radicale d'absorbance de l'oxygène, ORAC);
- ☞ le balayage radical d'hydroxyle (analyse de deoxyribose), ;
- ☞ le balayage radical organique qui nécessite l'utilisation de l'ABTS (2,2 '- azobis (3 - Éthylique benzothiazoline - 6 - acide sulfonique) ou DPPH (2,2 - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl) comme radicaux libres et exprimé en capacité antioxydante équivalente de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (TEAC) [38,39].

Ces méthodes sont généralement appliquées soit dans l'analyse de l'alimentation et le système biologique pour évaluer la peroxydation de lipide ainsi que la mesure du degré d'inhibition d'oxydation, soit dans l'analyse des effets antioxydants des extraits végétaux ou produits pharmaceutiques [40].

II.6.a. Le test DPPH ^[38]

Le DPPH est un radical libre stable, avec une absorption maximale de 515 à 518 nm.

La structure de DPPH est indiquée dans la figure ci-dessous:

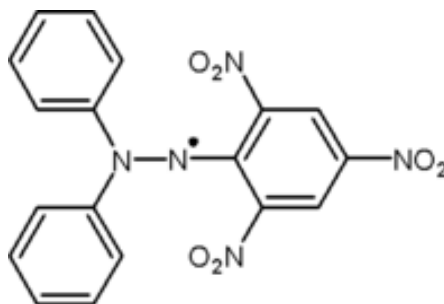


Figure II.8 : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

La méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH[•]. Un antioxydant aura la capacité de donner un électron singulet au radical synthétique DPPH[•] de coloration violette pour le stabiliser en DPPH de coloration jaune-verte. La mesure de la décroissance de coloration violette au cours du temps permet de déterminer l'IC₅₀, temps au bout duquel 50% de coloration est perdue. Généralement interprétée sur la base de la quantité d'un antioxydant nécessaire pour faire diminuer de 50% la quantité initiale de DPPH (IC₅₀), (des comparaisons d' IC₅₀ sont réalisées), le résultat est dépendant de la concentration en DPPH initiale. En ajoutant une référence connue, on pourrait standardiser la méthode, en ramenant par exemple les résultats à un équivalent Trolox (une molécule de référence, analogue structural hydrosoluble de la vitamine E).

Cette méthode est généralement utilisée pour étudier et mesurer la capacité antioxydante totale des extraits végétaux et alimentaires.

Le mécanisme de réaction est illustré dans le diagramme en figure II.9 où AH est l'antioxydant et R[•] est le radical libre:

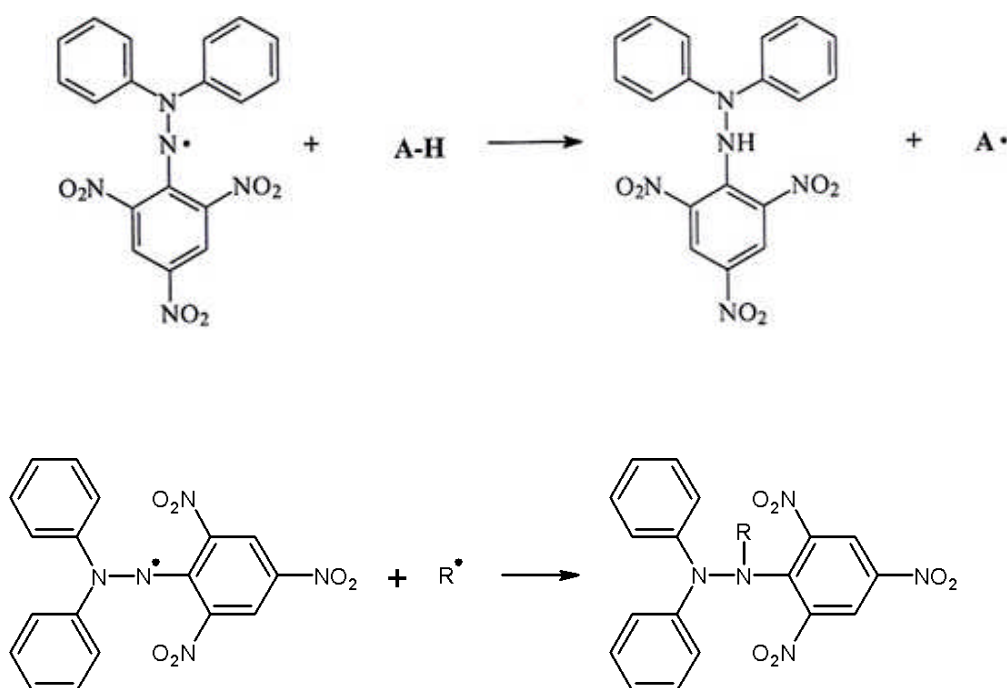


Figure II.9 : Mécanisme de réaction.

II.6.b. Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

La méthode est basée sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'un oxydant chimique l'AAPH (un radical peroxy libre stable). Le produit à tester peut être capable de protéger la fluorescéine et de réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence. Il possède alors un pouvoir antioxydant ^[38,39].

La méthode est réalisée en microplaque dans lesquelles nous mesurons en parallèle, le déclin de la fluorescéine au cours du temps en présence de concentrations croissantes de Trolox, et des échantillons à tester à différentes concentrations. Le but est d'obtenir une réponse comparable à celle de la gamme. On peut ainsi après traitement des données, calculer l'équivalent Trolox ^[38,39].

La méthode faisant intervenir une cinétique, la mesure de la capacité se fait par l'intermédiaire du calcul des aires sous la courbe. C'est la seule méthode qui combine à la fois le pourcentage d'inhibition de la réaction d'oxydation et le temps de cette inhibition en une seule mesure. Elle donne une mesure globale de la capacité antioxydante. L'avantage majeur du test ORAC est de proposer une mesure standardisée et largement acceptée ^[38,39].

II.6.c. Le test TEAC/ ABTS.+ Decolorization Assay

Le test Trolox Equivalent Antioxydant Capacity (TEAC) est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS.+ de coloration bleu-verte en le transformant en ABTS+ incolore, par piègeage d'un proton par l'antioxydant ^[38].

Une comparaison, de la capacité des antioxydants, est faite avec la capacité du Trolox à capturer ABTS.+. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre. La capacité antioxydante, exprimée en équivalent Trolox (TEAC), correspond donc à la concentration de Trolox ayant la même activité que la même concentration que la substance à tester ^[38].

Il existe souvent des différences de valeurs entre les méthodes du fait que les sources de radicaux libres soient différentes, et que les antioxydants répondent différemment aux méthodes de mesure ^[38].

Selon les matrices testées, l'une ou l'autre méthode est applicable. Par exemple pour des extraits végétaux, les trois tests sont applicables. En revanche, pour le plasma sanguin, la méthode ORAC semble plus indiquée du fait que les radicaux peroxy utilisés dans le test ORAC sont les plus couramment rencontrés dans le corps humain. La valeur en est de fait plus significative ^[38].

Quelques exemples de capacité antioxydante totale de quelques fruits et légumes mesurée par le test ORAC et exprimée en unité ORAC (μmol equ TROLOX/100 g d'aliments frais) sont portés sur le tableau II.1 ^[41].

Tableau II.1 : Capacité antioxydante totale de plusieurs fruits et légumes mesurée par le test ORAC.

Aliments	Valeur ORAC (unités/100 g d'aliment frais)
Pruneau sec	5770
Raisin sec	2830
Ail	1939
Fraise	1540
Épinard	1260
Chou de Bruxelles	980
Betterave	840
Orange	750
Mais	400
Aubergine	390
Mangue	302
Pomme de terre	301
Chou vert	298
Banane	221
Pomme	218
Carotte	207
Tomate	189
Abricot	164
Pêche	162
Poire	150
Laitue	148
Melon	148
Concombre	65

Récemment, le test standardisé ORAC a été développé par des chercheurs en collaboration avec le Ministère de l'Agriculture Américain dans le but d'évaluer la capacité antioxydante totale (principalement liée aux polyphénols), que représentent 100 g de divers fruits et légumes frais. Les valeurs exprimées en unités ORAC sont reprises pour quelques aliments dans le Tableau II.1. Les chercheurs de l'université de Tufts (États-Unis), qui sont à la base de la création du test ORAC, estime « qu'il faudrait se procurer 3000 à 5000 unités ORAC par jour pour espérer avoir un impact significatif sur la capacité antioxydante du plasma et des tissus »^[41].

Chapitre III :
Méthodes
d'extractions des
flavonoïdes

Les substances organiques sont généralement présentes à de faibles concentrations dans la biomasse de l'aliment. Avant de pouvoir utiliser ou analyser de telles substances, il est nécessaire de les extraire de leur matrice.

Plusieurs méthodes d'extractions des composés naturels ont été mises au point telles que l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur, l'hydrodiffusion, le Soxhlet, la macération et la distillation-extraction simultanée. Cependant, ces composés naturels sont connus comme étant thermo-sensibles et vulnérables aux réactions chimiques. La perte de certains constituants, la dégradation de certains composés insaturés par effet thermique ou par hydrolyse, ainsi que la présence de résidus de solvants organiques plus ou moins toxiques peuvent être engendrés par ces techniques d'extraction ^[42].

Actuellement, les contraintes écologiques, l'émergence de la sécurité humaine et industrielle, incitent les chercheurs à découvrir de nouvelles applications aux technologies innovantes telles que les ultrasons, les micro-ondes et le fluide supercritique dans les procédés d'extractions, qui visent une performance accrue et un meilleur respect de l'environnement.

Chaque procédé d'extraction possède sa propre spécificité et sera ainsi préconisé pour des catégories de molécules particulières (terpènes, alcaloïdes, flavonoides ect..). Ces différents procédés d'extraction sont caractérisés par un ou parfois plusieurs phénomènes physiques tels que l'extraction, la distillation et la séparation ^[42].

III.1. Les procédés d'extraction conventionnels

III.1.1. L'extraction par solvant volatil

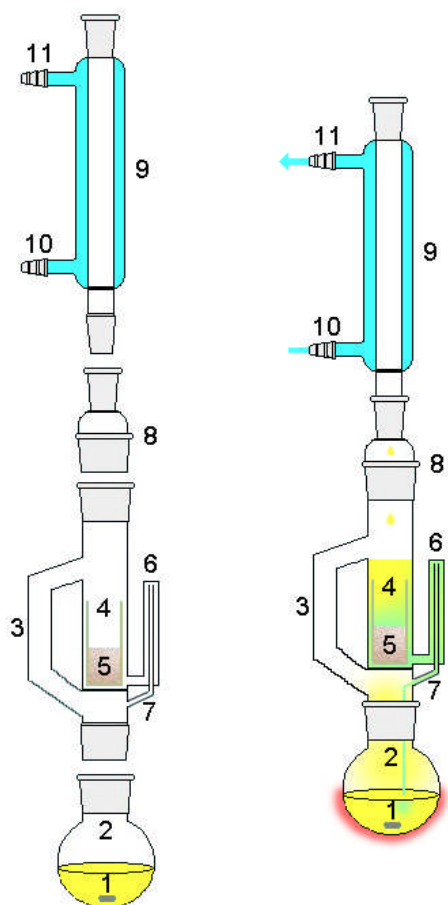
La technique d'extraction « classique » par solvant consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil (hexane ou éthanol) et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de l'eau ou de la vapeur d'eau. Toutefois, l'intervention de solvants organiques peut entraîner des risques d'artéfacts et des possibilités de contaminations de l'échantillon par des impuretés par la suite, parfois difficiles à éliminer ^[32].

Le choix du solvant d'extraction va s'avérer très délicat, d'autant que la législation sur les produits à destination de l'industrie pharmaceutique est extrêmement rigoureuse.

Le solvant choisi, en plus d'être autorisé, devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. Parmi les solvants les plus utilisés, on recense : l'hexane, l'éthanol, l'éther de pétrole ou encore le dichlorométhane. Cependant, depuis quelques décennies, l'extraction par solvant a connu d'intéressantes améliorations. L'extraction par Soxhlet en est l'une des principales méthodes.

III.1.2. L'extraction par l'appareil de Soxhlet

L'extraction au Soxhlet procède par percolation de la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, par des vapeurs de solvants condensées.



1. Agitateur magnétique.
2. Ballon à col rodé.
3. Retour de distillation (tube d'adduction).
4. Corps en verre.
5. Filtre.
6. Haut du siphon.
7. Sortie du siphon.
8. Adaptateur d'expansion.
9. Condensateur.
10. Entrée de l'eau de refroidissement.
11. Sortie de l'eau de refroidissement.

Figure III.1 : Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet.

Un extracteur de Soxhlet (ou appareil de Soxhlet) est une pièce de verrerie utilisée en Chimie analytique qui permet de faire à chaud l'extraction par solvant d'un solide avec une grande efficacité. Cet appareil porte le nom de son inventeur : **Franz von Soxhlet**.

Il se compose d'un corps en verre (4) dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (5), d'un tube siphon (6-7) et d'un tube d'adduction (3). Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon (2) contenant le solvant d'extraction (1). Dans l'extracteur est insérée une cartouche contenant le solide à extraire ; puis un réfrigérant (9-10-11) est adapté au dessus de l'extracteur (Il est également souhaitable d'utiliser un chauffe-ballon avec agitation magnétique intégrée, afin d'éviter des à-coups d'ébullition qui provoquent une remontée du liquide contenu dans le ballon et non de vapeurs de solvant pures. A défaut on peut placer des billes de verres dans le ballon).

Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. Le solvant chargé en extrait retourne dans le ballon de solvant par siphonage et est redistillé et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit donc progressivement en composés solubles. Le cycle peut se répéter indéfiniment, jusqu'à épuisement complet du solide, d'où l'efficacité remarquable de cette technique par rapport à la simple macération ^[42].

Cette technique est fréquemment utilisée pour l'extraction de diverses catégories de molécules ^[43]. En outre, des institutions de standardisation des procédures (NIST, US EPA) l'utilisent pour la certification des différentes matrices. De plus, elle est souvent utilisée comme méthode de référence pour l'étude des autres techniques d'extraction et a été récemment combinée aux micro-ondes ^[44] et aux ultrasons ^[45].

III.2. Les techniques d'extraction innovantes

III.2.1. L'extraction par les ultrasons

Le terme ultrasons est utilisé lorsque l'on se réfère à des ondes vibratoires dont la fréquence est supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz). Ils ne présentent pas de différences physiques avec les sons. Ils sont généralement classés en deux domaines suivant la puissance qu'ils peuvent transmettre au milieu réactionnel.

On distingue les ultrasons de faible puissance utilisés à des fins de diagnostic et de contrôle non destructif et les ultrasons de puissance appliqués à des domaines industriels variés (nettoyage, soudure, extraction, homogénéisation, etc..) ^[42].

III.2.1.1. Principe

La technique d'extraction par ultrasons est basée sur le principe de la cavitation. La propagation d'une onde ultrasonore dans le milieu donne lieu à des régions de compression et de dépression, à cause des oscillations mécaniques des éléments de la matière. Lorsque la pression atteint des valeurs très faibles, il peut se former des bulles d'air ou de vapeur de liquide appelées cavités. Ce phénomène ne peut avoir lieu que si l'intensité acoustique locale est suffisamment importante pour vaincre les forces de cohésion du liquide. Des microbulles d'air existent dans le liquide au repos, emprisonnées dans des crevasses à la paroi du récipient ou dans des impuretés solides ; elles jouent le rôle de nucléis pour les bulles de cavitation et dans ce cas, la puissance nécessaire pour atteindre le seuil de cavitation est moins importante ^[42].

On peut produire des ondes ultrasonores de forte intensité de différentes manières. L'énergie sonore est obtenue par conversion d'une autre forme d'énergie au moyen d'un transducteur. Il comporte trois parties ^[42] :

- Un générateur électrique qui permet de transformer l'énergie électrique de faible fréquence en énergie électrique de fréquence plus importante.
- Un convertisseur (transducteur) qui permet de transformer l'énergie électrique de haute fréquence en énergie mécanique vibratoire de même fréquence.
- Un élément applicateur qui transmet la vibration vers le milieu réactionnel et l'amplifie éventuellement.

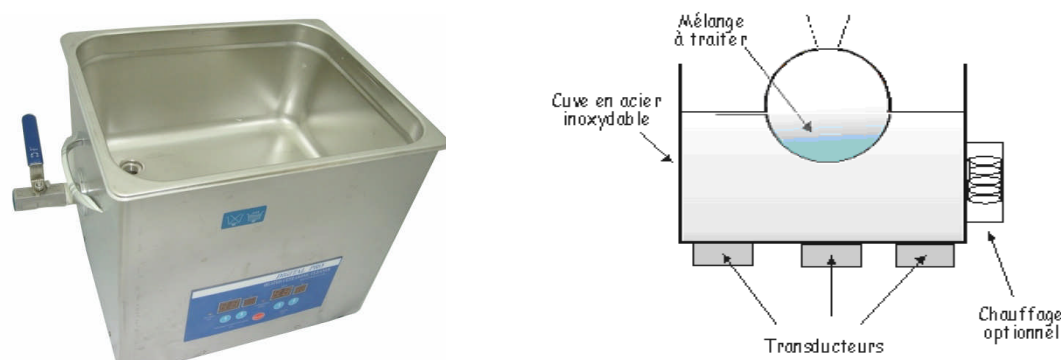


Figure III.3 : Schéma d'un dispositif à ultrasons.

III.2.1.2. Les ultrasons dans les étapes d'extraction

L'introduction d'ultrasons à diverses étapes des procédés conventionnels d'extraction de molécules d'origines végétales semble avoir débuté il y'a environ une trentaine d'années. L'extraction assistée par ultrasons consiste en une macération du matériel végétal dans un solvant, le tout placé sous ultrasons. Les résultats obtenus en terme de rendement et de qualité apparaissent comme plutôt positifs et supérieurs à ceux obtenus par des techniques conventionnelles d'extraction par solvant ^[46].

Des études réalisés par Horomàdkova et coll. ^[46] sur l'effet des ultrasons dans l'extraction des composés majoritaires de la sauge officinale, montrent une meilleure extraction du 1,8-cinéole, α -thujone et bornéol (sous ultrasons à sonde) avec 60% de rendement en moins de 2 h et à une température allant de 8 à 33°C. Dans les mêmes conditions, Vinatoru et coll. ^[47] ont comparé l'extraction des composés dominants des graines d'aneth (*Anethum vulgarea*) par macération à celle réalisée sous ultrasons. Ils ont confirmé l'apport des ultrasons dans l'amélioration du rendement et la réduction du temps d'extraction, en produisant des quantités minimales d'acides gras.

III.2.1.3. Application des ultrasons en industrie

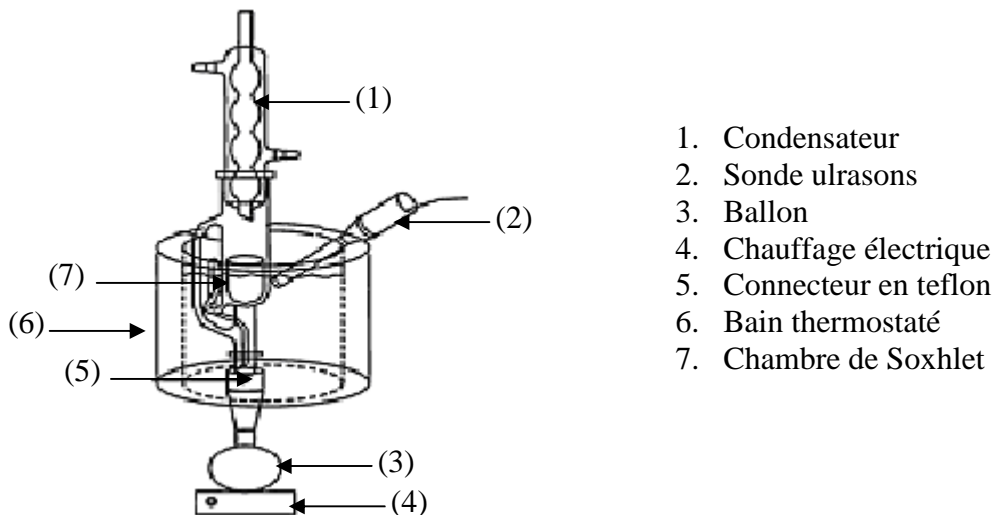
Les ultrasons peuvent ainsi être utilisés dans divers procédés selon l'effet souhaité, aussi bien à des fins de transformation (effet mécanique) que de préservation (effet chimique). L'étendue des applications des ultrasons de puissance dans l'industrie est résumé dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Application des ultrasons dans l'industrie ^[42].

Effets mécaniques	Effets chimiques et biochimiques
- Surgélation accélérée	- Oxydation et vieillissement accéléré
- Cristallisation des graisses et sucres	- Altération de l'activité des enzymes
- Dégazage, découpe	- Action bactéricide
- Mélange et homogénéisation	- Traitement des effluents
- Extraction des arômes	- Désactivation des bactéries et spores
- Filtration et séchage	- Stérilisation des équipements

Un extracteur a été conçu et construit sur la base des principes physico-chimiques de Soxhlet en profitant des effets de l'ultrasons. Il a ensuite été appliqué à l'extraction des lipides totaux à partir des oléagineux comme le tournesol, le colza et le soja. L'approche utilise le Soxhlet classique, mais la chambre de Soxhlet est logée dans un bain thermostatique Fig. 3. Le dispositif expérimental conçu pour l'extraction au Soxhlet assistée par ultrasons à travers lequel les ultrasons sont appliqués au moyen d'un ultrason sonde, comme le montre la figure III.4. L'application d'ultrasons à l'échantillon fournit des résultats similaires ou même supérieurs, à celles obtenus par lixiviation Soxhlet classique (méthode ISO officielle) ^[45].

Cependant, ils diminuent considérablement le nombre de cycles de Soxhlet nécessaires dans les procédures classiques. En dépit de l'effet oxydatif rapporté des ultrasons, les conditions douces utilisées dans cet extracteur ne dégradent pas l'huile extraite ^[45].



1. Condensateur
2. Sonde ultrasons
3. Ballon
4. Chauffage électrique
5. Connecteur en teflon
6. Bain thermostaté
7. Chambre de Soxhlet

Figure III.4 : Le dispositif expérimental conçu pour l'extraction Soxhlet assistée par ultrasons.

III.2.2. L'extraction assistée par micro-ondes

Les premiers travaux utilisant les micro-ondes pour extraire des composés organiques ont été publiés par Ganzler et coll. ^[48] et Lane et Jenkins ^[49] en 1986. Ce procédé consiste à irradier par micro-ondes la matière végétale, préalablement broyée ou non, et cela en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les micro-ondes pour l'extraction de composés apolaires. L'ensemble est chauffé durant de courtes périodes sans jamais atteindre l'ébullition, et entrecoupées par des étapes de refroidissement.

De nombreux travaux de recherches indiquent que le paramètre le plus valorisé est incontestablement le temps d'extraction. Alors que l'ordre de grandeur temporel des extractions classiques réalisées (hydrodistillation, hydrodiffusion ou entraînement à la vapeur d'eau) est l'heure, celui des extractions assistées par micro-ondes est tout au plus la minute.

Le solvant doit être choisi selon la nature de la matière. Si le solvant possède une faible permittivité ϵ' (le solvant est transparent aux micro-ondes), c'est le matériel végétal qui captera le rayonnement micro-ondes. En revanche, si le solvant absorbe les micro-ondes (ϵ' élevé), le chauffage sera plutôt un chauffage de type conducteur : les micro-ondes vont permettre le chauffage du solvant et ce dernier par conduction chauffera le matériel végétal. Le choix du solvant va donc déterminer le type de chauffage, et, par conséquent, le mécanisme d'extraction et la composition du produit final.

L'extraction par micro-ondes regroupe différents procédés parmi lesquels les deux principaux : l'extraction par solvant assistée par micro-ondes ou « MAE : microwave assisted extraction » brevetée par Paré et coll. ^[50], et le « VMHD : vacuum microwaves hydrodistillation » ou hydrodistillation par micro-ondes sous vide, breveté par Archimex ^[51]. Le domaine d'application du chauffage micro-ondes est à l'heure actuelle étendue à la synthèse organique et inorganique, la décongélation ou le séchage des fruits tropicaux sous vide.

Un nouveau procédé d'extraction Soxhlet assistée par micro-ondes (MIS : Microwave-integrated Soxhlet) a été conçu et développé. Le processus est effectué en quatre étapes, qui assure l'extraction complète, rapide et précise des échantillons ^[44,45].

M.Virot et coll ont comparé l'extraction par MIS, avec la technique classique du Soxhlet, pour l'extraction de l'huile d'olives ^[44].

Les huiles extraites par MIS pendant 32 min ont été quantitativement (rendement) et qualitativement (composition en acides gras) similaires à ceux obtenus par extraction au Soxhlet classique durant 8 h.

MIS est une technologie verte et apparaît comme une bonne alternative pour l'extraction des huiles grasses et des produits alimentaires ^[44].

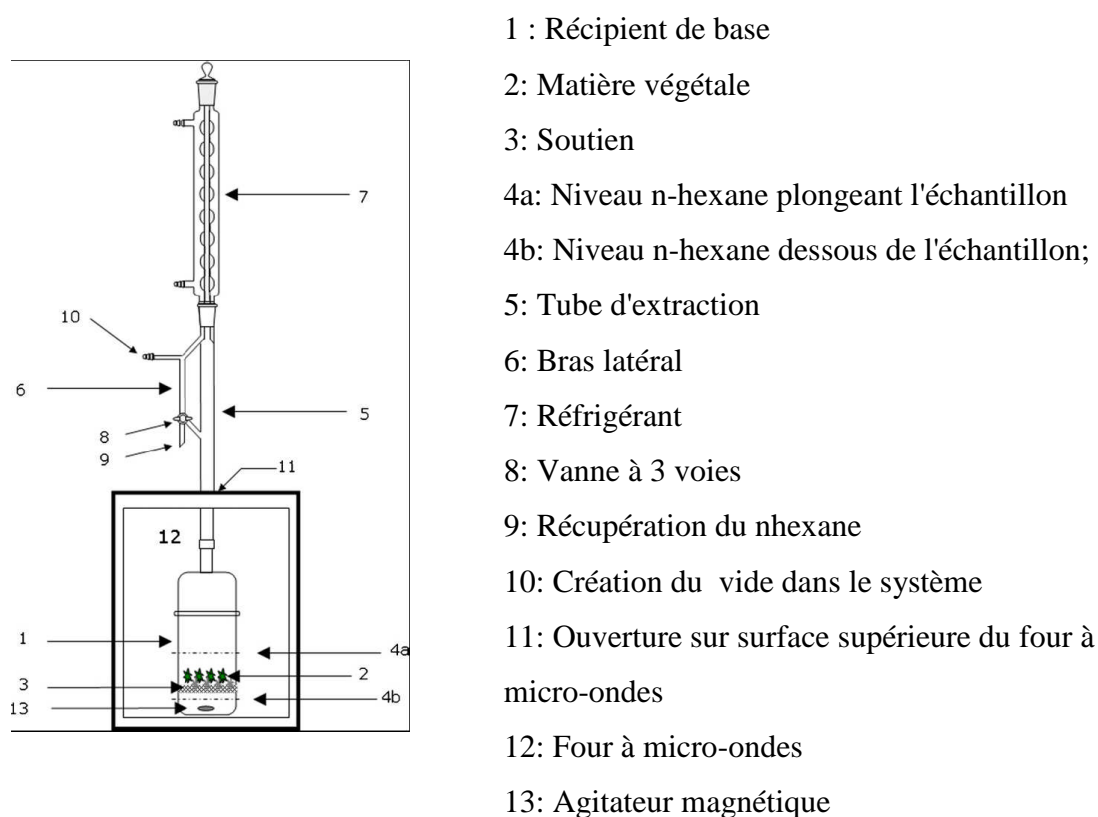


Figure III.5 : Le principe de base du nouveau procédé d'extraction Soxhlet assistée par micro-ondes.

III.2.3. L'extraction par fluide supercritique

Un fluide dont la température et la pression sont toutes les deux supérieures à leur valeur correspondant au point critique est dit dans l'état supercritique. Ces fluides ont des propriétés spécifiques et intermédiaires entre celles des liquides et les gaz. D'un point de vue cinétique, la viscosité des fluides supercritiques est de 5 à 20 fois supérieure à celle des liquides, ce qui entraîne des valeurs des coefficients de diffusion des solutés dans les fluides supercritiques plus grandes que celles mesurées dans les liquides ^[52]. Il s'ensuit une meilleure pénétration des fluides supercritiques dans les matériaux poreux et une cinétique rapide ^[49,52].

La plupart des fluides supercritiques étant gazeux à température ambiante et à pression atmosphérique, leur élimination est réalisée après extraction par simple détente, ce qui facilite la récupération des extraits.

En extraction, le CO₂ est le plus utilisé du fait que les coordonnées de son point critique sont facilement accessibles puisque la température est égale à 31,3°C et la pression est égale à 73,8 bars ^[52]. Sa polarité est voisine de celle du pentane ou de l'hexane.

En pratique, il s'agit de placer la matière végétale à extraire dans une enceinte à travers laquelle circule le CO₂ à l'état supercritique. Il va se charger de molécules solubles dans les conditions opératoires de pression et température définies. Le CO₂ chargé en soluté, est ensuite détendu dans un séparateur pour devenir gazeux, état où son pouvoir solvant est nul. Le soluté précipite et tombe au fond du séparateur. Le CO₂ gazeux passe enfin à travers un échangeur froid, se liquéfie et retourne vers la pompe qui le renvoie dans l'extracteur.

L'extraction au CO₂ supercritique est rapide et permet d'obtenir des rendements en extraits aromatiques supérieurs avec une grande pureté, ce qui rend aux extraits des fragrances très proches du matériel végétal ^[52].

Chapitre IV :
Méthodes
d'identifications des
flavonoïdes

IV.1. Méthodes chromatographiques

La *chromatographie* est une technique d'analyse qualitative et quantitative de la chimie analytique dans laquelle l'échantillon contenant une ou plusieurs espèces est entraîné par un courant de phase mobile le long d'une phase stationnaire qui retient plus ou moins fortement les substances contenues dans l'échantillon à analyser. Chaque espèce se déplace à une vitesse propre, dépendant de ses caractéristiques et de celles des deux phases. Souvent, l'échantillon est analysé par comparaison avec des substances déjà connues dans l'échantillon ou par comparaison avec les résultats de l'analyse d'une solution étalon ^[53].

Il existe de nombreux types de chromatographie, on peut notamment citer :

- la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ;
- la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ;
- la chromatographie sur couche mince (CCM).

Nous détaillons ci-dessous la méthode utilisée : la HPLC.

IV.1.1. Chromatographie en phase liquide à haute performance

La HPLC est une technique de séparation analytique et préparative d'un mélange de composés à haut poids moléculaire. Cette forme de chromatographie est fréquemment utilisée en chimie analytique. Dans la plupart des cas, la HPLC est la méthode proposée dans la monographie pour les qualités de spécificité et de détection qu'elle présente. De plus, elle donne des résultats performants et permet de séparer une grande partie des composants d'un produit pharmaceutique ^[53].

IV.1.1.1. Principe de fonctionnement

L'échantillon à analyser est poussé par un *liquide* (phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie qui permet une meilleure séparation des composants. Le seuil de détection est également plus bas. La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation « haute performance » ^[53].

Les solvants utilisés sont des combinaisons miscibles d'eau et de divers solvants organiques (alcools, acétonitrile, dichlorométhane, ...).

Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit "*gradient*" ou "*élution graduée*" (en opposition au mode "*isocratique*", pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au long de l'analyse).

L'échantillon à analyser est injecté en amont de la colonne au moyen d'un injecteur on-line ou une microsiringue. Le volume d'échantillon est de l'ordre de 20 μL à 500 μL . Le composé séparé, au niveau de la phase stationnaire, est détecté à la sortie de la colonne qui est directement lié à un ou plusieurs détecteurs en série ^[53].

IV.1.1.2. Appareillage

La chromatographie liquide utilise :

- un réservoir de phase mobile qui est pompée à l'aide d'une pompe et envoyée sous pression dans la colonne chromatographique ;
- un dégazeur pour éliminer les bulles d'air ;
- une boucle d'injection qui détermine le volume de l'échantillon à introduire ;
- des colonnes en acier de petite dimension (10 - 50 cm de longueur sur quelques mm de diamètre). Ces colonnes sont remplies sous haute pression (600 bars) avec une phase stationnaire constituée d'un absorbant greffé sur des petites particules de silice (5 - 10 μm) ;
- un four pour contrôler la température (0°C à 60°C) pendant l'analyse ;
- un ou plusieurs détecteurs en série tel que :
 - ❖ le détecteur à absorption UV ou visible.
 - ❖ le détecteur à indice de réfraction.
 - ❖ le détecteur UV à barrette de diodes (DAD).
- un collecteur de fraction ou réservoir de rejets ;
- un ordinateur qui permet l'introduction des données ainsi que la récupération et traitement des résultats ;
- le mode d'analyse est déterminé selon la nature des phases :
 - ❖ mode normale : phase stationnaire polaire, solvant apolaire ;
 - ❖ mode inverse : phase stationnaire apolaire, solvant polaire.

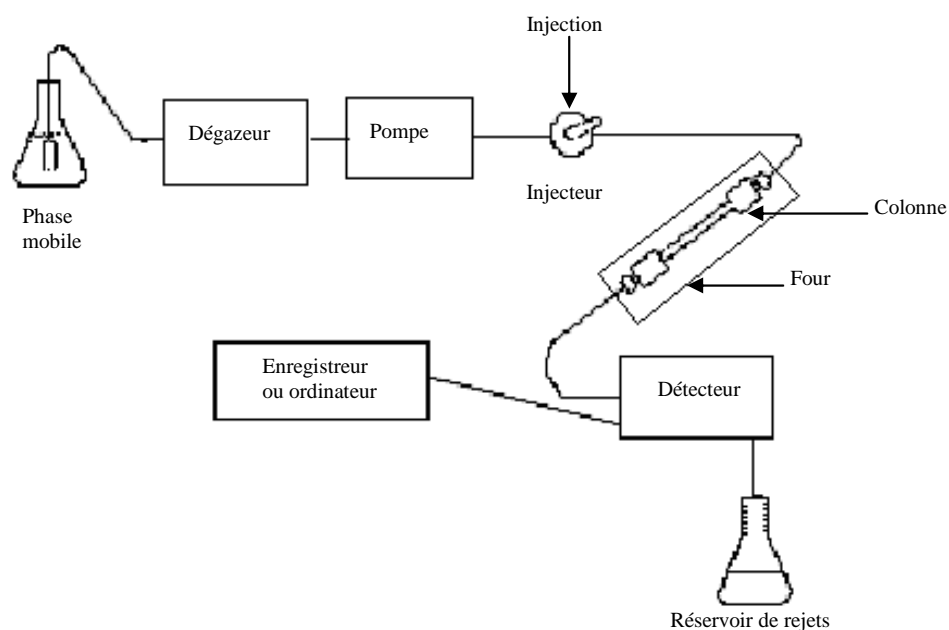


Figure VI.1. : Diagramme montrant les composantes d'un instrument HPLC.

IV.2. Méthodes spectrales

IV.2.1. Spectrophotométrie UV-Visible

La spectrophotométrie UV/Visible est une méthode d'analyse quantitative, fondée sur l'étude du changement d'absorption d'une lumière monochromatique par un milieu en fonction de la variation de la concentration d'un constituant. Cette méthode d'analyse est intéressante et s'applique à un très grand nombre de dosages. Elle permet de travailler sur de faibles quantités de substances et elle n'est pas destructrice vis-à-vis de l'échantillon ^[53].

La spectrophotométrie UV visible est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques. Elle est basée sur l'enregistrement d'un spectre dans le méthanol. Les flavonoides sont caractérisés par deux bandes d'absorption principales ^[53] :

- **La bande I** : présentant un maximum d'absorption entre 300 et 385 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoylé qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison C2-C3, et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.

• **La bande II** : présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A, et donne des informations sur les variations structurales du cycle A.

Le tableau VI.1 donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoides.

Tableau VI.1 : Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoides.

Type de composé flavonique	Bande I	Bande II
Flavone	320-350	250-270
Flavonol	352-385	250-280
Flavanone	300-330	245-275
Isoflavone	300-330	245-275
Chalcone	340-390	230-270
Aurone	380-430	230-270
Anthocyanidin	465-560	270-280

Le maximum d'absorption des deux bandes dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles, méthoxyles ou glycosylés sur le squelette flavonique.

L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacer le maximum d'absorption vers des longueurs d'ondes plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosylés fait déplacer ce maximum vers des longueurs d'ondes plus faibles ^[53].

IV.2.1.1. Principe

Les spectrophotomètres sont des appareils permettant une sélection continue des longueurs d'ondes par un monochromateur (figure IV.2) ^[53].

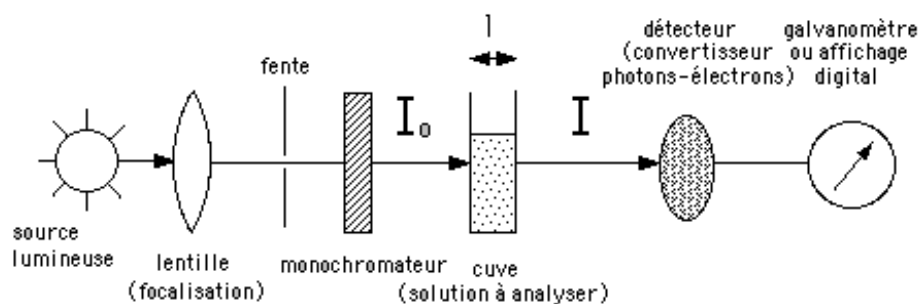


Figure IV.2 : Schéma descriptif d'un spectrophotomètre UV-Visible.

Le principe de la spectrophotométrie consiste à doser directement le soluté en utilisant la relation de Beer-Lambert. Elle permet de déterminer la concentration de chaque substance dans l'échantillon à analyser selon la relation ou loi suivante :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

A : Absorbance (sans unité).

ϵ : Coefficient d'extinction molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$).

l : Trajet optique (cm).

C : Concentration de la substance dans la solution (mol/L).

Pour pouvoir appliquer cette loi quantitative, il faut connaître le coefficient d'extinction de la substance (ϵ). Ce dernier varie en fonction du solvant dans lequel la substance est dissoute et de la longueur d'onde d'absorption ^[53].

Si le ϵ n'est pas connu, il est nécessaire de tracer une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration avec une gamme des concentrations d'un témoin où la loi de Beer-Lambert est vérifiée (linéaire).

Cette loi n'est vérifiée que dans les conditions suivantes :

- ✓ Lumière monochromatique.
- ✓ Solution très diluée (concentration $\leq 10^{-2}$ mol/L).
- ✓ Pas de réflexion, diffusion ou fluorescence du faisceau incident.

IV.2.1.2. Éléments constituant un spectrophotomètre UV-Visible

Un spectrophotomètre comprend quatre parties essentielles :

- *Une source lumineuse* constituée d'une lampe à décharge au deutérium, utilisée dans le domaine de 190 à 400,1nm, ou une lampe à décharge au xénon utilisée dans le domaine UV et visible. Ce type de lampe est très énergétique. Elle fonctionne sous forme de flash, juste au moment de la mesure.

- *Un monochromateur* dont l'élément de base est un prisme, un réseau ou un filtre coloré. Le rôle du monochromateur est d'isoler le rayonnement sur lequel on fait la mesure. Il est composé principalement d'un système dispersif, d'une fente d'entrée et d'une fente de sortie.

- *Une cuve* qui contient soit l'échantillon soit la référence. La largeur de la cuve est définie par le *trajet optique*. Elle doit être en quartz, transparente aux radiations.

- *Un détecteur* photodiode (semi-conducteur) qui peut être utilisé en tant que détecteur optique. L'emploi d'un détecteur à barrette de diodes permet une mesure simultanée sur toute l'étendue du spectre.

IV.2.2. La résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est très employée dans la détermination des structures flavoniques. Cette méthode renferme plusieurs techniques :

- **La RMN du proton:** elle informe sur l'environnement des protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm, elle permet de connaître ^[54-56] :

- ↳ La position et le nombre de divers protons portés par le flavonoïde.
- ↳ Le nombre de substituants méthoxyles porté par le squelette flavonique.
- ↳ Le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.

• **La RMN du carbone 13:** donne des informations utiles et parfois nécessaires pour identifier la molécule telles que ^[56]:

↪ Le nombre total d'atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement.

↪ La connaissance de type des liaisons –C et / ou –O sucres.

Partie expérimentale

Chapitre V :
Echantillonnage et
extraction

Dans cette première partie nous donnons quelques détails sur l'échantillonnage de la plante *Bassia muricata* L., puis aux procédures utilisées pour l'extraction des flavonoides. Trois modes différents ont été appliqués et pour chaque extraction, nous avons étudié également l'effet de la lumière sur nos extraits.

V.1. Echantillonnage

V.1.1. La récolte

La plante fraîche a été prélevée dans la localité de « Taleb Elarbi » située à l'est de la wilaya d'El oued, vers la fin du mois de novembre 2009.

V.1.2. Identification de la plante

La plante a été identifiée par Mme N.Amirouche (maître de conférence) et membre du laboratoire « Génétique Ecologique », à la faculté de Biologie (U.S.T.H.B) d'après la description de Paul Ozenda dans son livre « Flore du Sahara »^[5].

V.1.3. Préparation de la matière végétale

Le matériel végétal est séché à l'air libre pour sécher pendant quelques jours. La plante est ensuite réduite en poudre à l'aide d'un petit broyeur à hélices de marque **IKA A 10 basic** (figure V.1), puis conservée dans des flacons en verre à l'abri de la lumière.



Figure V.1 : Le broyeur à hélices de marque **IKA A 10 basic**.

V.2. Extraction des flavonoïdes

Plusieurs techniques d'extractions des flavonoïdes ont été décrites. Weihua Xiao et coll.^[57] ont travaillé sur quatre de ces techniques d'extractions (micro-ondes, ultrasons, le Soxhlet et l'extraction sous reflux).

Ils ont étudié et optimisé les conditions expérimentales (puissance micro-ondes, cycles d'extraction, la concentration d'éthanol, la température d'extraction, rapport solvant / matériel) dans le but de conserver la stabilité des flavonoïdes avec un meilleur rendement, moins d'artefact et de pollution.

Parmi les conditions obtenues:

- ↳ La température idéale est entre 10°C et 70°C.
- ↳ Le solvant adéquat est le méthanol ou l'éthanol. Cependant, ce dernier est vivement recommandé pour ses qualités environnementales.
- ↳ La concentration de l'éthanol est de 90% (mélange aqueux).

Les résultats de cette publication ont été pris comme référence dans notre travail.

Trois techniques d'extraction ont été sélectionnées : la macération, l'extraction par Soxhlet et l'extraction par ultrasons.

V.2.1. Extraction par macération**a. Appareillage**

Pour la macération nous avons besoin:

- ↳ D'un erlen meyer d'une capacité de 250ml
- ↳ D'un entonnoir
- ↳ Du coton de verre
- ↳ Des petits flacons ambrés

b. Mode opératoire

On introduit 5g de matière végétale broyée et 130 ml d'un mélange de solvant : éthanol/ eau (90%/10% : V/V) dans un erlen meyer. Nous laissons ensuite macérer pendant 24 heures.



Figure V.2 : L'extraction par macération.

Le lendemain, le mélange est filtré. Nous obtenons une solution de couleur verte opaque, qui est récupérée dans un ballon de 250ml. Elle est ensuite soumise à une évaporation afin d'éliminer le solvant.

V.2.2. Extraction par Soxhlet

a. appareillage

Le montage de l'extraction par soxhlet mis en place est représenté sur la figure V.3. Il comprend essentiellement :

- ↪ un ballon à col rodé et à fond rond de capacité de 250ml
- ↪ une colonne pour mettre la cartouche
- ↪ des cartouches en papier-filtre épais
- ↪ un réfrigérant
- ↪ un chauffe ballon, des raccords et des supports pour lier et maintenir le montage

b. mode opératoire

On introduit 5g de matière végétale broyée dans la cartouche, cette dernière est placée dans la colonne en verre qui est adaptée au ballon dans lequel se trouve le mélange de solvant : éthanol, eau (90%/10% : V/V). Le montage est raccordé à un réfrigérant, le tout est fixé à l'aide de pinces.



Figure V.3 : L'extraction par l'appareil de Soxhlet

Le chauffe ballon est alors mis sous tension pendant 4 heures (on démarre le chronomètre dès le premier cycle). A la fin de l'extraction, une solution de couleur verte –marron foncée est obtenue.

V.2.3. Extraction par ultrasons

a. Appareillage

- ↪ un ballon à col rodé et à fond plat d'une capacité de 250ml
- ↪ du papier Aluminium
- ↪ un bac à ultrasons

b. Mode opératoire

On introduit dans le ballon, 5g de matière végétale broyée et 130 ml d'un mélange de solvants : éthanol/eau (90%/10% : V/V). Le ballon est placé dans le bac à ultrasons à une puissance de 40 khz (100 % de puissance) pendant deux cycles de 30 minutes à 60°C. Le dispositif est représenté sur la figure V.4.



Figure V.4 : L'extraction par ultrasons.

A la fin de l'extraction, nous filtrons le mélange. Une solution de couleur verte est alors obtenue.

V.2.4. Extraction à l'abri de la lumière

Afin d'étudier l'effet de la lumière sur les extraits obtenus, nous avons reproduit les trois extractions (la macération, l'extraction par Soxhlet et l'extraction par ultrasons) dans les mêmes conditions opératoires mais à l'abri de la lumière.

V.3. Récupération des résidus secs

Tous les extraits récupérés ont été soumis à une évaporation afin d'éliminer le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40 °C sous vide. La vitesse de rotation est de 60 à 90 tours par minute. Cet appareil permet d'éliminer rapidement un solvant volatil par évaporation. Le principe est basé sur l'abaissement du point d'ébullition avec la pression (figure V.5).

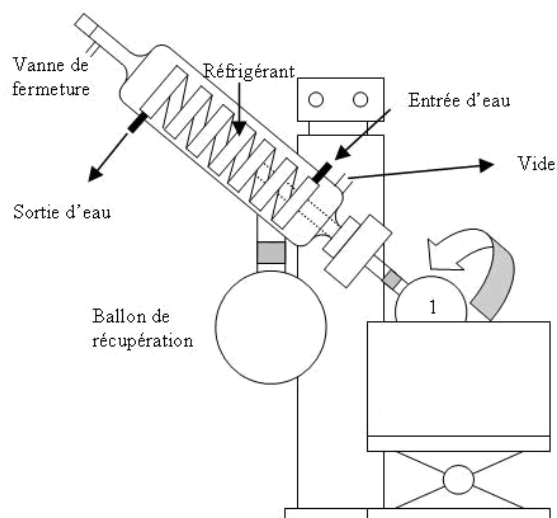


Figure V.5 : Schéma d'un évaporateur rotatif.

La solution contenant le solvant à évaporer est mise dans le ballon (1) qui est ensuite soumis à une rotation. La vanne reliant le montage à la pression extérieure est fermée (vanne de fermeture) afin de faire le vide à l'intérieur de l'appareillage à l'aide d'une trompe à eau. Le ballon (1) est plongé dans le bain marie. L'évaporation peut alors commencer. A la disparition complète du solvant, on ouvre la vanne de fermeture pour remettre la pression atmosphérique à l'intérieur du dispositif.

Une fois le ballon récupéré, le résidu sec est pesé pour calculer le rendement puis il est dissous dans 5ml de méthanol pour une analyse ultérieure.

Chaque extrait est ensuite soumis à une analyse par HPLC pour identifier ses flavonoïdes (par un étalonnage externe) puis la méthode du DPPH est appliquée pour la mesure du pouvoir antioxydant.

V.2. Résultats et discussion

Le calcul des rendements nous a permis de faire une première comparaison entre les différents modes d'extractions et ainsi d'évaluer leur efficacité. Le tableau V.1 résume ces résultats.

Tableau V.1 : Les rendements en résidu sec.

N° de l'extrait	Mode d'extraction	Rendement (%)
1	Macération	11,28
2	Soxhlet	34,31
3	Ultrasons	15,80
4	Macération à l'abri de la lumière	11,04
5	Soxhlet à l'abri de la lumière	36,14
6	Ultrasons à l'abri de la lumière	17,30

La quantité d'extrait récupérée par ultrasons (15-17 % pendant 60 min à 60°C) est comparable avec celle récupérée par macération (environ 11% pendant 24h à la température ambiante). La méthode par ultrasons semble offrir une meilleure efficacité en réduisant le temps nécessaire à l'extraction par rapport à la macération.

En effet, l'amélioration principale apportée par les ultrasons est le temps d'extraction relativement court. Le mécanisme le plus probable proposé pour cette extraction, est l'intensification du transfert de masse par l'éclatement presque total des glandes sécrétrices et pénétration du solvant à l'intérieur des tissus végétaux ce qui favorise le phénomène d'osmose. Cette méthode relativement efficace, est une bonne alternative aux méthodes traditionnelles. Elle a été employée pour l'extraction des produits actifs tels que les flavonoïdes, les antioxydants issus du *Rosmarinus officinalis*, les esters d'acides gras et les stéroïdes et triterpènes à partir de matrices naturelles ^[58].

Cependant, les résultats obtenus par extraction au Soxhlet pendant 4 h sont deux fois plus importants que les rendements calculés par les deux autres modes. Nous pensons que ce rendement élevé est dû au fait que l'extraction par Soxhlet a été effectuée à la température d'ébullition du mélange éthanol/eau, mais aussi parce que la plante broyée a été continuellement imbibée avec le solvant distillé puis condensé. Cette méthode a permis d'épuiser toute la matière végétale.

D'après les résultats du tableau V.2, on constate que l'extraction à l'abri de la lumière n'a pas eu une grande influence sur le rendement en résidu sec. En effet, une augmentation au maximum de 2% a été obtenue pour les trois méthodes.

Chapitre VI:
Identification des
flavonoïdes

Chaque résidu sec est solubilisé dans le méthanol et analysé par HPLC afin d'identifier une partie des flavonoïdes présents dans ces mélanges. L'identification a été réalisée grâce à un étalonnage externe.

VI.1. Analyse par Chromatographie Liquide à Haute Performance

L'appareil HPLC utilisé est de marque Hewlett Packard série 1100, équipé :

- ↗ Des réservoirs en verre pour la phase mobile ;
- ↗ d'un dégazeur pour éliminer les bulles d'air ;
- ↗ d'une pompe quaternaire qui entraîne la phase mobile à travers le circuit ;
- ↗ d'un four ;
- ↗ d'une colonne ;
- ↗ d'un détecteur UV/Visible ;
- ↗ d'une boucle d'injection de 20 µL ;
- ↗ d'un tuyau capillaire à la sortie du détecteur pour récupérer l'échantillon avec la phase mobile ;
- ↗ d'un ordinateur avec un logiciel spécifique qui gère l'appareil.

VI.1.1. Conditions opératoires

Les conditions opératoires ont été optimisées afin d'avoir la meilleure séparation possible. Ces conditions sont détaillées dans le tableau VI.1.

Tableau VI.1 : Les conditions opératoires optimisées pour l'analyse par HPLC.

Colonne	C18 hypersil BDS (250 x 4,6 mm, 5µm)
Phase mobile	Solvant A : Eau Solvant B :Acétonitrile
Détecteur	UV/Visible
Longueur d'onde	230 nm.
Volume injecté	20 µL
Debit	1,2 mL /min
Temperature	Ambiante (22°C)

VI.1.2. Analyse des échantillons

Chaque échantillon est injecté en HPLC suivant un gradient d'éluion (tableau VI.2).

Tableau VI.2 : Le gradient d'éluion.

Temps (min)	% Solvant A	% Solvant B	Débit (mL/min)
0	100	0	1,2
15	72	28	1
30	62	38	1
45	70	30	1

Afin d'identifier le maximum de composés, nous avons injecté treize étalons flavonoïdes dans les mêmes conditions que nos échantillons.

Liste des étalons flavonoïdes utilisés

Flavonoïde	Classe
Isorhamnetine	Flavonol
Quercétine	Flavonol
Fisetine	Flavonol
Rutine	Flavonol
Hespéretine	Flavonol
Luteoline	Flavone
Rhamnetine	Flavonol
Quercitrine	Flavone
Myricétine	Flavonol
Hesperidine	Flavanone
Hyperoside	Flavone
Genestine	Isoflavone

VI.2. Résultats et discussion

Sur les treize étalons injectés, nous avons pu avoir six étalons qui absorbent dans la longueur d'onde choisie et qui ont également un bon profil avec les conditions d'analyse. Nous avons donc identifiés cinq flavonols et une flavone (la luteoline).

Les figures VI.1 et VI.2 représentent les chromatogrammes de nos différents échantillons. Nous observons des profils presque similaires cependant, l'intensité des pics diffère d'un extrait à un autre.

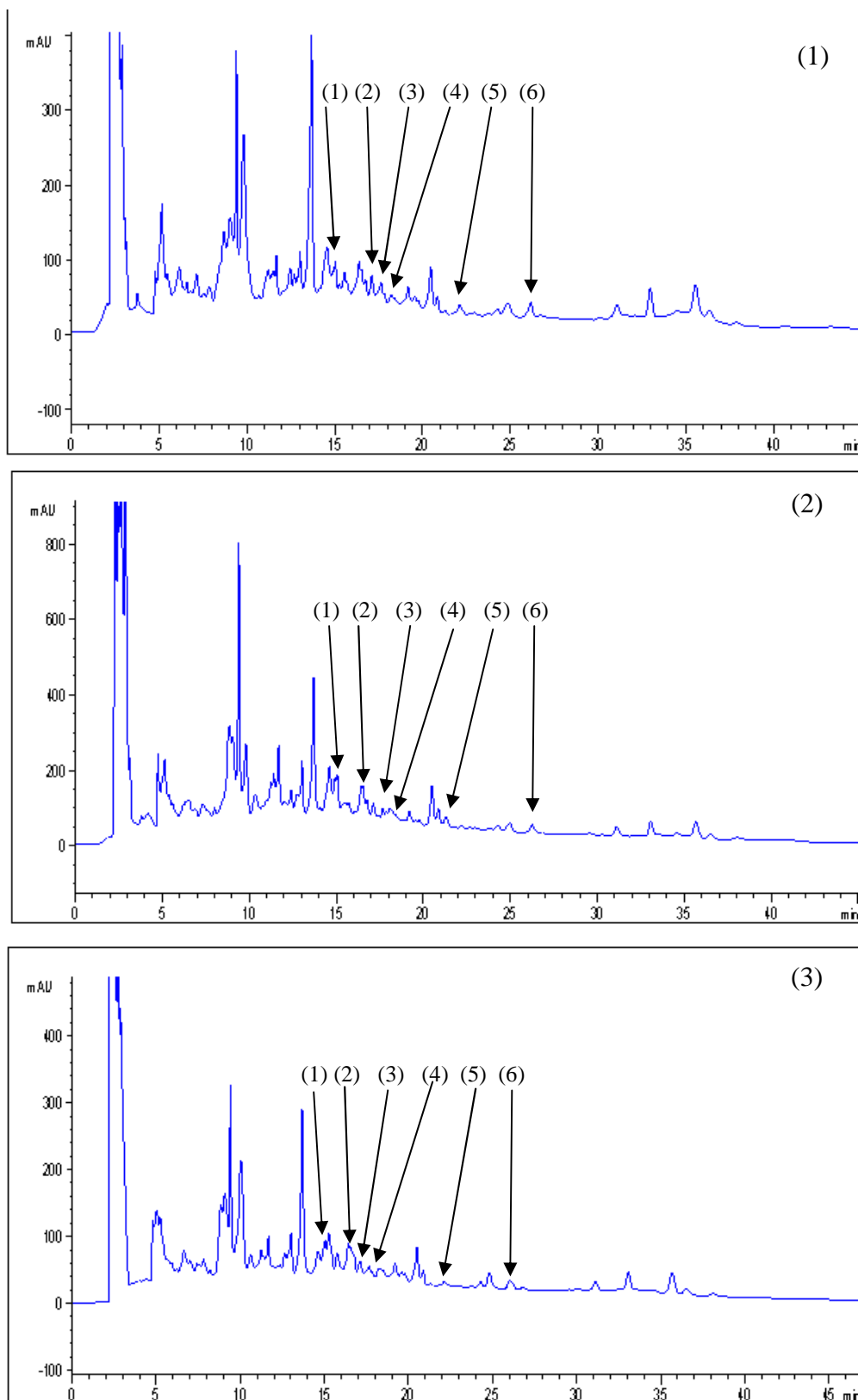


Figure VI.1 : Chromatogrammes des extraits obtenus par :
 1. macération
 2. Soxhlet
 3. ultrasons

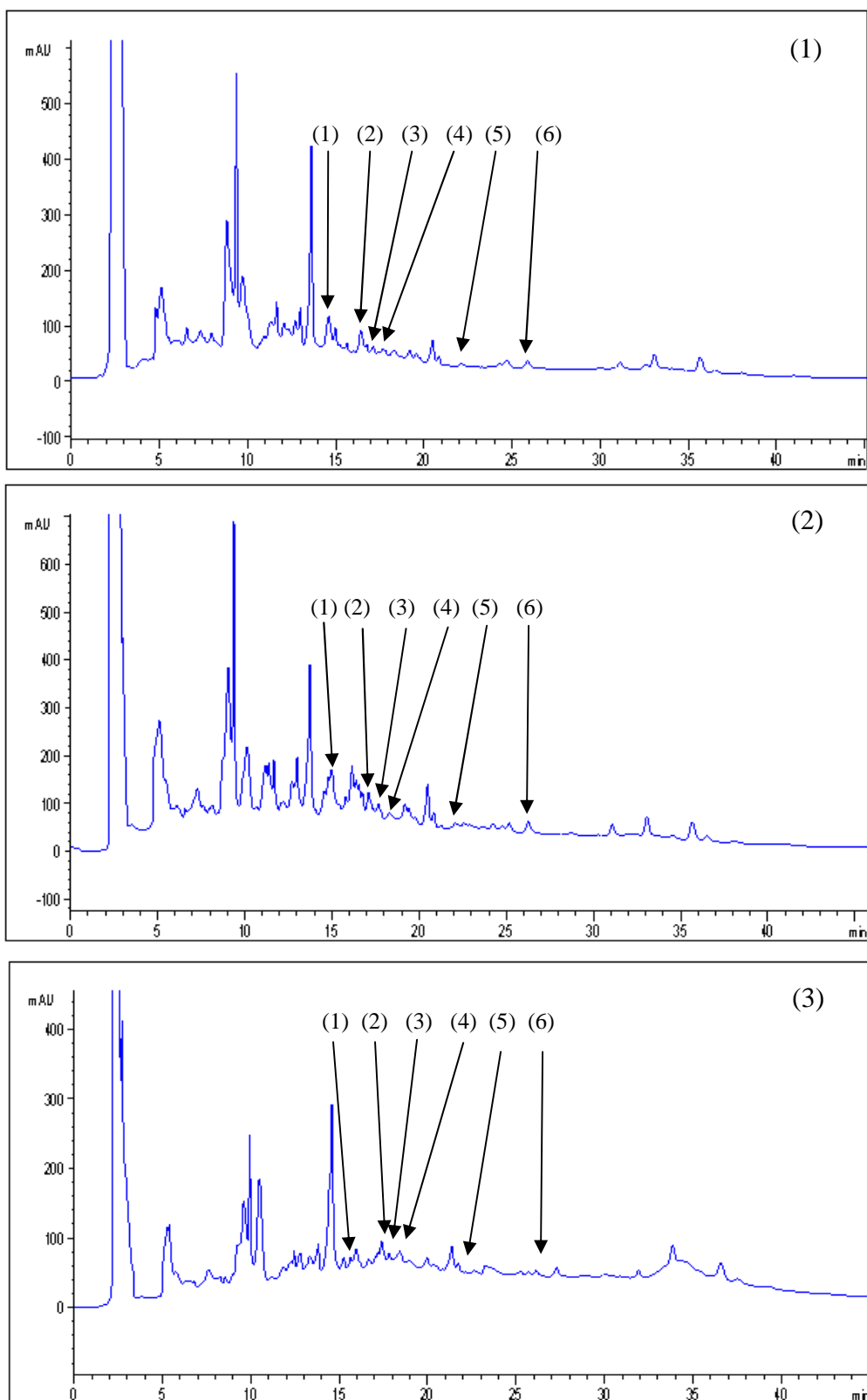
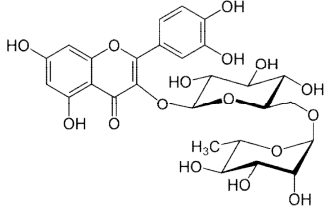
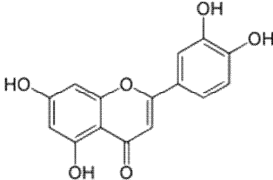
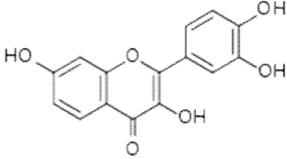
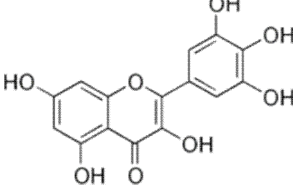
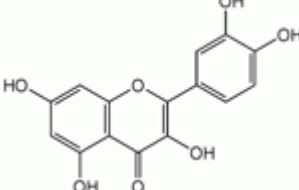
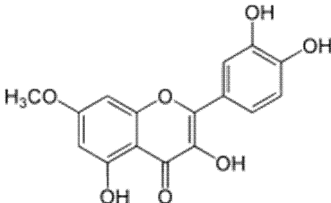


Figure VI.2 : Chromatogrammes des extraits obtenus à l'abri de la lumière par :
 1. macération
 2. Soxhlet
 3. ultrasons

Les six flavonoides identifiés sont décrits dans le tableau VI.3.

Tableau VI.3 : Les flavonoides identifiés.

Flavonoïde	Temps de rétention (min) ± écart-type	Structure chimique
Rutine	15,051 ± 0,102	
Lutéoline	17,307 ± 0,107	
Fisetine	17,584 ± 0,066	
Myricétine	18,590 ± 0,277	
Quercétine	22,499 ± 0,214	
Rhamnetine	26,265 ± 0,145	

Parmi les flavonoïdes identifiés on retrouve la quercétine dont le rôle physiologique a été démontré par Frankel et coll. En effet leurs recherches ont montré qu'une alimentation riche en antioxydants phénoliques dont la quercétine, pouvait être corrélée avec une baisse significative des décès par athérosclérose en diminuant l'oxydation des LDL (low density lipoprotein) ^[59].

On retrouve aussi la lutéoline, à qui on prête à un rôle important dans le corps humain, comme antioxydant, destructeur de radicaux libres, agent préventif d'inflammation, composé aidant aussi au métabolisme des glucides, et comme régulateur du système immunitaire. De nombreuses recherches expérimentales décrivent la lutéoline comme un agent chimique qui réduit considérablement les inflammations et les symptômes du choc septique ^[60].

La fisétine est inscrit comme un médicament luttant contre les effets du vieillissement. Une étude de P. Maher et coll. montre que la fisétine aurait aussi une action bénéfique sur la mémoire à long terme ^[61, 62].

La myricétine possède des propriétés antioxydantes. Des recherches in vitro tendraient à prouver que la myricétine en grande concentration peut modifier le taux de LDL en permettant aux globules blancs de mieux les absorber. Une étude Finlandaise lie une forte consommation de myricétine avec un plus faible taux de cancer de la prostate ^[63].

Une autre étude s'étalant sur huit ans, a montré que trois flavonols (le kaempférol, la quercétine, et la myricétine) réduiraient les risques de cancer du pancréas de 23% ^[64].

La rutine est présente dans plusieurs plantes médicinales, dont l'eucalyptus, l'aubépine, le ginkgo biloba et le millepertuis. Elle fait partie de la grande famille des bioflavonoïdes. Ces derniers sont des composés naturels des végétaux et possèdent une activité vitaminique complémentaire à celle de la vitamine C. Ils ont de multiples effets sur l'organisme, dont la réduction de la fragilité et de la perméabilité des capillaires. Les bioflavonoïdes améliorent l'action de la vitamine C sur l'organisme en augmentant son absorption et en retardant son élimination ^[65].

La rutine est chimiquement très proche de la quercétine, et elle possède des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, vasoprotectrices (protection des vaisseaux sanguins) et antithrombotiques (protection contre la formation de caillots sanguins) ^[65].

La seule étude disponible sur les flavonoïdes de *Bassia muricata* L. est d'origine égyptienne. M. S. Kamel et coll. ont isolé deux flavonoïdes acylés glycosides (quercétine-3-*O*-(6''-caféoyl)-sophoroside et quercétine-3-*O*-(6''-féruloyl)-sophoroside) ainsi que deux flavonoïdes glycosides connus (quercétine-3-*O*-sophoroside et quercétine-3,7-*O*- β -diglucopyranoside ^[6].

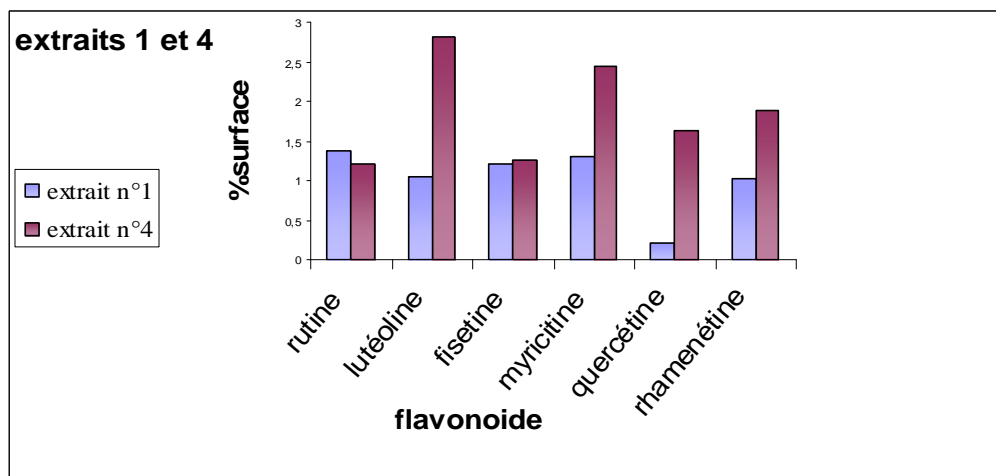
Nous avons essayé de faire une étude semi quantitative sur les composés identifiés afin de designer la meilleure méthode d'extraction. Les teneurs relatives sont données dans le tableau VI.4 ci-dessous :

Tableau VI.4 : Teneurs relatives (%) des composés identifiés.

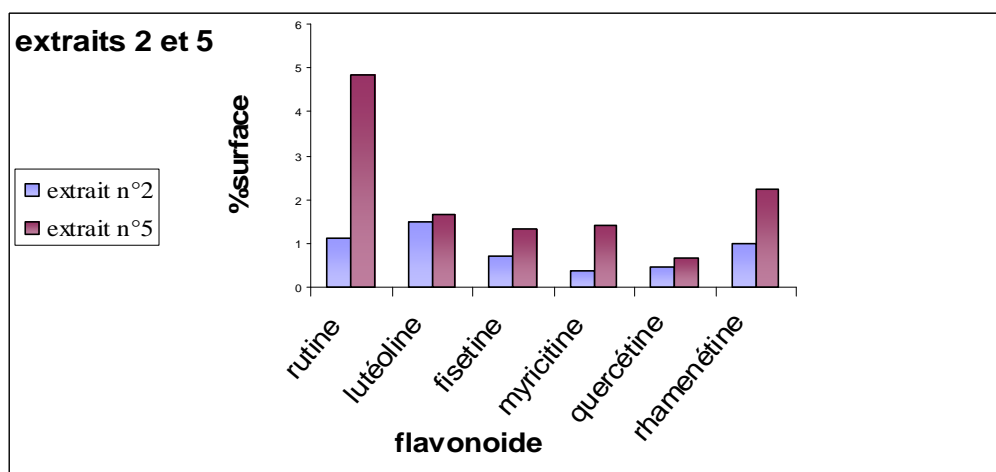
Flavonoïdes	Non protégé de la lumière			A l'abri de la lumière		
	extrait n°1 macération	extrait n°2 soxhlet	extrait n°3 ultrasons	extrait n°4 macération	extrait n°5 soxhlet	extrait n°6 ultrasons
Rutine	1,3696	1,1168	1,0004	1,217	4,8501	1,5016
Lutéoline	1,0505	1,4799	0,9003	2,811	1,6717	1,2507
Fisetine	1,2025	0,7144	1,0352	1,2526	1,3346	1,6635
Myricétine	1,2977	0,3659	0,366	2,436	1,4246	2,0204
Quercétine	0,204	0,4452	0,7553	1,6261	0,6703	1,4375
Rhamnetine	1,0328	0,9996	0,9773	1,887	2,2138	1,2468

Nous remarquons que pour les trois premiers extraits (non protégés de la lumière) les valeurs des pourcentages varient entre 0,7 et 1,48 %, sauf pour la myricétine qui semble mal extraite par soxhlet et ultrasons (sa teneur ne dépassant pas les 0,36%) et la quercétine dont le pourcentage varie entre 0,2 et 0,4% pour la macération et le soxhlet. La rutine présente son meilleur rendement par macération (1,37%) tandis que la lutéoline est mieux extraite par soxhlet (1,48%).

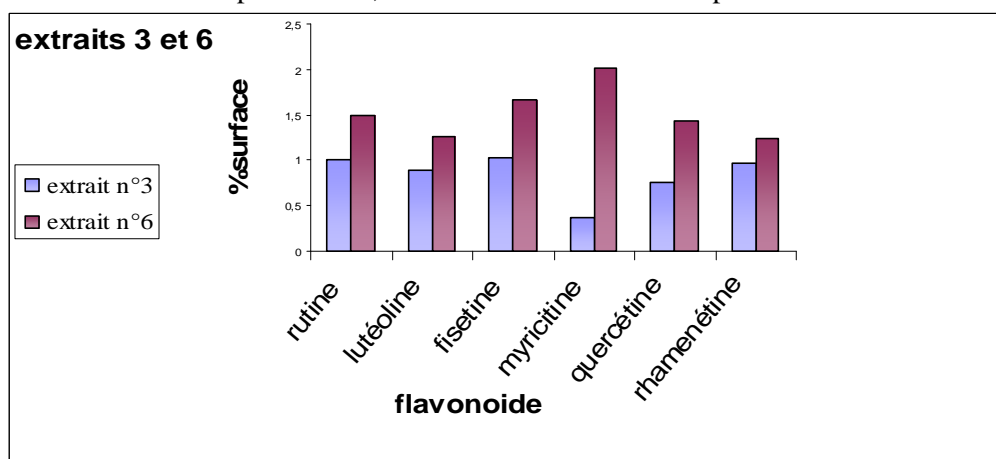
Les extraits obtenus à l'abri de la lumière présentent généralement des teneurs plus élevées (figure VI.3). En effet, le pourcentage en rutine obtenu par le même procédé d'extraction (soxhlet) est quatre fois plus important dans l'extrait 5. La teneur de la myricétine double pour la macération tandis qu'elle est environ quatre fois plus importante pour le soxhlet et les ultrasons. Quant à la quercétine sa teneur est multipliée par huit pour la macération.



Echantillon n°1 : extraction par macération, échantillon n°4 : extraction par macération à l’abri de la lumière.



Echantillon n°2 : extraction par Soxhlet, échantillon n°5 : extraction par Soxhlet à l’abri de la lumière.



Echantillon n°3 : extraction par ultrasons, échantillon n°6 : extraction par ultrasons à l’abri de la lumière.

Figure VI.3 : Étude comparative des flavonoïdes entre les extractions effectuées à la lumière et celles faites à l’abri de la lumière.

Cette étude comparative montre que les flavonoïdes se dégraderaient à la lumière. En effet J.S. Almeida et coll. ont montré que la rutine, exposée pendant 30 minutes à la lumière UV se dégradait de plus de 50%. Pour prolonger sa photostabilité ils ont réussi à conditionner la rutine dans des nanocapsules et nanoémulsions afin de les introduire directement dans des formulations médicamenteuses ^[66]. M.E. Carlotti et coll ont, quant à eux, démontré la photodégradation de la quercétine. Ils ont alors formé un complexe en introduisant la quercétine dans la cavité de la méthyl- β -cyclodextrine, et ont montré que la photodégradation diminuait nettement ^[67].

Chapitre VII:
Mesure du pouvoir
antioxydant

L'oxygène indispensable à notre vie est capable de produire en grande quantité dans notre organisme des dérivés toxiques ; les radicaux libres. Leur formation naturelle, par voie biochimique ou/et photochimique, peut provoquer une oxydation de certaines biomolécules : peroxydation des lipides membranaires, dégradation de l'ADN... Les radicaux libres sont des molécules très instables car ils possèdent un électron non apparié, dit électron célibataire. Ils recherchent donc un état plus stable en re-appariant leurs électrons (nombre pair d'électrons) et ils ont tendance, pour cela, à prendre un électron à l'oxygène. Il se forme alors des radicaux oxygénés ou formes actives de l'oxygène (anion superoxyde, radical hydroxyl, radical peroxyde).

Il existe des mécanismes de défenses cellulaires qui détruisent les radicaux oxygénés ou qui piègent les radicaux libres (vitamine C, acide urique, enzymes, protéines...) mais ils ne suffisent pas lors d'une surproduction de ces radicaux libres résultants d'un stress, telle qu'une exposition prolongée aux radiations UV par exemple, et les conséquences des dégâts infligés peuvent se révéler sous la forme de maladies telles que l'athérosclérose et les cancers. Les molécules antioxydantes, substances capables d'inhiber ou au moins de retarder de façon significatives l'oxydation de biomolécules par les radicaux libres sont donc importantes dans la prévention et la lutte contre ces maladies ^[41].

Les composés phénoliques semblent être de bons candidats pour leur activité antioxydante du fait de la présence de nombreux hydroxyles pouvant réagir avec ces radicaux. La méthode choisie pour évaluer les effets antioxydants antiradicalaires chez *Bassia muricata* L. est celle du DPPH. Le protocole appliqué est celui mis au point et décrit par Monsieur HAZZIT ^[68].

VII.1. Mode opératoire

a- Préparation de la solution alcoolique de DPPH

Nous avons prélevé 60 μmol de DPPH ce qui correspond approximativement à 2.4mg de produit que nous avons dissous dans 100ml de méthanol. La solution doit être préparée à l'avance car la solubilisation est difficile et elle ne se conserve pas plus de 24h à l'obscurité.

b- Préparation d'une solution mère d'échantillon

Nous avons dissous dans 10 ml de méthanol, 60 mg d'extrait de manière à avoir une concentration maximale de 6g /L. cette teneur de la solution mère correspondrait à une solution (extrait +DPPH) de concentration maximale 150mg/L.

A partir de cette solution mère, on prépare par dilution des solutions de concentrations plus faibles qui seront destinées à fournir des concentrations inférieures à celle de 150mg/L (par exemple 130, 110, 80, 50, 20 mg/L etc) pour des mélanges (extrait+DPPH).

c- Protocole expérimental

- La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune, le spectrophotomètre est ainsi réglé à la longueur d'onde 517 nm.
- Pour un échantillon donné et une concentration donnée on procède comme suit : on prélève 975 µL de la solution de DPPH et on mesure son absorbance (A_0). Puis on lui ajoute 25 µL de la solution d'échantillon (à la concentration de 150mg/L par exemple). On laisse le mélange incuber (pendant 30 minutes) à l'abri de la lumière et on mesure son absorbance (A_t , $t = 30$ minutes). On répète cette expérience au moins 3 fois pour la même concentration et le même échantillon.
- L'absorbance lue est ensuite transformée en pourcentage d'inhibition par rapport à l'absorbance de la solution témoin. L'activité antioxydante ($A_{\%}$) est donnée par :

$$A_{\%} = 100 (A_0 - A_t) / A_0 = (1 - (A_t / A_0)) 100$$

d- Témoin positif

Les résultats sont toujours comparés par rapport à un ou plusieurs témoins positifs. Ces témoins sont souvent des antioxydants de synthèse qui sont actuellement utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Les antioxydants les plus couramment utilisés comme témoins positifs sont le BHT (Buthylhydroxytoluene), le BHA (Buthylhydroxyanisole), le TBHQ (Terbutylhydroquinone), le tocopherol etc...

Quelque soit le témoin positif utilisé, sa préparation et son expérimentation sont identiques à celles des autres échantillons.

La concentration maximale utilisée est dans la quasi-totalité des cas est égale à 1000mg/L car elle correspond à la dose maximale permise d'un antioxydant en tant qu'additif alimentaire.

VII.2. Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VII.1.

Tableau VII.1: Les activités antioxydantes des extraits.

Concentration (mg/L)	A% ± écart-type			
	Echantillon n°1	Echantillon n°2	Echantillon n°3	Témoin (BHA) (Buthylhydroxyanisole)
20	16,73 ± 0,004	28,62 ± 0,005	16,76 ± 0,03	47,30 ± 0,02
50	35,73 ± 0,03	33,51 ± 0,01	22,70 ± 0,08	64,70 ± 0,001
80	41,71 ± 0,03	55,39 ± 0,02	33,17 ± 0,08	89,80 ± 0,001
110	48,38 ± 0,05	67,73 ± 0,08	44,27 ± 0,01	100 ± 0,02
130	55,75 ± 0,01	74,25 ± 0,03	48,99 ± 0,08	100 ± 0,04
150	58,58 ± 0,03	81,66 ± 0,004	61,07 ± 0,03	100 ± 0,11

Echantillon n°1 : extraction par macération, Echantillon n°2 : extraction par Soxhlet, Echantillon n°3 : extraction par ultrasons.

Nous avons choisis une gamme de concentration allant de 20 à 150mg/L pour chaque échantillon. Tous nos extraits présentent une activité antioxydante pour toutes les concentrations étudiées. En effet, le plus faible pouvoir obtenu est de 16.7% pour la concentration minimale considérée (20mg/L).

Cependant nous constatons que l'extrait au Soxhlet donne un pouvoir antioxydant environ deux fois plus important à 20mg/L. Ce pouvoir augmente jusqu'à atteindre la valeur de 81.66% à 150mg/L. En ce qui concerne les deux autres échantillons, ils présentent un pouvoir antioxydant très intéressant puisque il atteint les valeurs de 58.58% et 61.07% respectivement pour l'extrait par macération et l'extrait par ultrasons.

Sur le tableau VII.2 nous présentons les activités antioxydantes des extraits phénoliques obtenus à l'abri de la lumière.

Tableau VII.2: Les activités antioxydantes des extraits à l'abri de la lumière.

Concentration (mg/L)	A% ± écart-type			
	Echantillon n°4	Echantillon n°5	Echantillon n°6	Témoin (BHA)
10	28,94 ± 4,85	32,40 ± 4,26	35.03 ± 0.02	38.53 ± 6.20
25	36,51 ± 0,03	37,00 ± 7,68	41.04 ± 0.03	46.00 ± 0.02
40	43,56 ± 2,18	43,15 ± 4,87	45.50 ± 2.39	59.76 ± 6.33
55	47,64 ± 1,38	49,22 ± 2,24	51.11 ± 0.003	68.86 ± 0.62
65	52,10 ± 0,13	53,11 ± 0,70	56.61 ± 0.77	72.00 ± 4.27
75	62,02 ± 0,17	57,18 ± 0,19	63.13 ± 1.96	77.03 ± 2.08

Echantillon n°4 : extraction par macération, Echantillon n°5 : extraction par soxhlet, Echantillon n°6 : extraction par ultrasons.

Nous constatons que d'une manière générale, le pouvoir antioxydant de ces extraits est nettement plus important que celui obtenu pour les échantillons non protégés de la lumière. En effet, pour une concentration deux fois moins importante (10mg/L vs 20mg/L) nous avons une activité antioxydante plus importante (28.94-35.03% vs 16.76-28.62%). A la concentration maximale considérée (75mg/L) le pouvoir antioxydant atteint des valeurs très intéressantes autour de 60%, tandis que le témoin (BHA) présente une valeur de 77.03%.

On constate ainsi que l'extraction à l'abri de la lumière a permis d'augmenter significativement l'activité antioxydante de nos extraits. Ceci confirme le fait que les polyphénols sont photosensibles et que leur extraction requiert donc d'être réalisée à l'abri de la lumière. En effet, J.S. Almeida et coll. ^[66] ont montré que le fait de conditionner la rutine dans des nanocapsules prolongeait son effet anti-radicalaire et permettrait ainsi de l'introduire dans des formulations thérapeutiques et remplacer ainsi le BHA ou BHT actuellement suspectés d'avoir des effets nocifs sur la santé ^[69].

Il nous est relativement difficile de comparer les données de cette étude avec celles de la littérature car à notre connaissance, rien en ce qui concerne l'activité biologique de *Bassia muricata* L. n'a été publié. Cependant S. Derbel et coll. ^[70] ont étudié l'activité antiradicalaire des extraits méthanoliques de *Henophyton deserti* Coss. plante désertique médicinale utilisée dans le sud Tunisien, et ont obtenu un pouvoir antioxydant de 85.2%.

Le parcours de la littérature a permis de voir que souvent, on exprimait le pouvoir antioxydant par la concentration inhibitrice de 50% des radicaux appelée IC₅₀ ou SC₅₀ ou EC₅₀. Cette grandeur est déterminée en traçant pour un échantillon donné la courbe A% en fonction de la concentration puis on détermine la concentration qui correspond à A% = 50.

M. Contini et coll. ont proposé une méthode pour le calcul de l'IC₅₀^[71]. Ils ont pris les points expérimentaux entre 30% et 70% et ont essayé de vérifier leur linéarité par régression linéaire (le R ≥ 0.98). A partir de cette droite ils ont déterminé l'IC₅₀. Nous avons appliqué la même méthode à nos échantillons. Les résultats obtenus sont reportés sur les figures VII.1, VII.2 et VII.3.

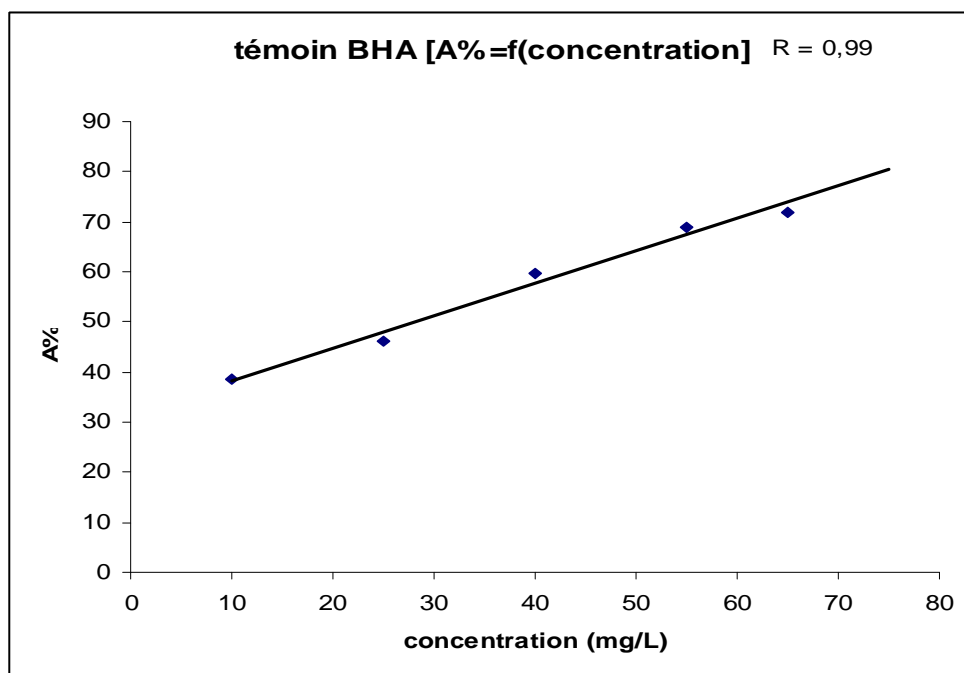
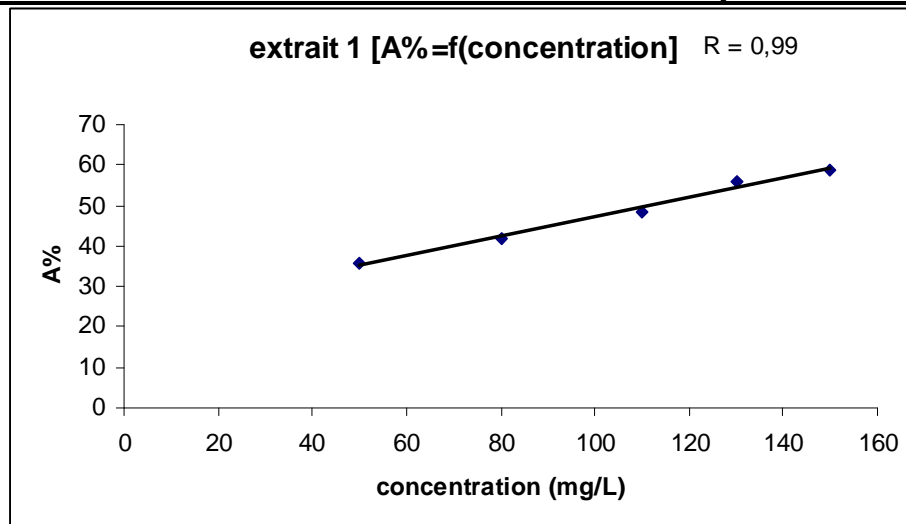
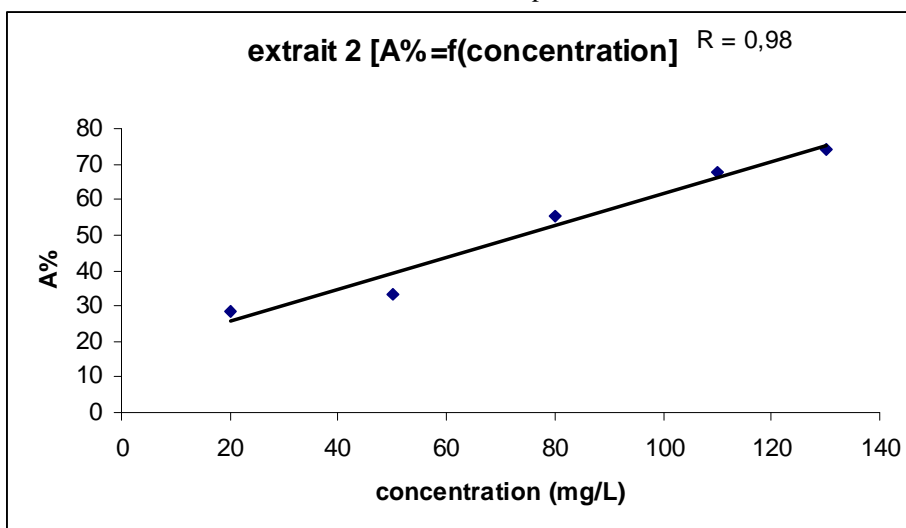


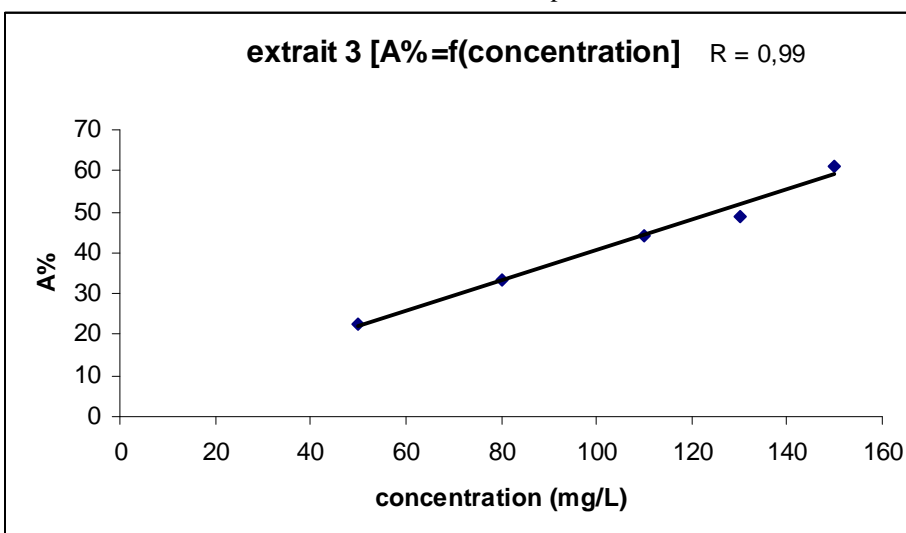
Figure VII.1 : La courbe du témoin BHA par régression linéaire



Echantillon n°1 : extraction par macération.

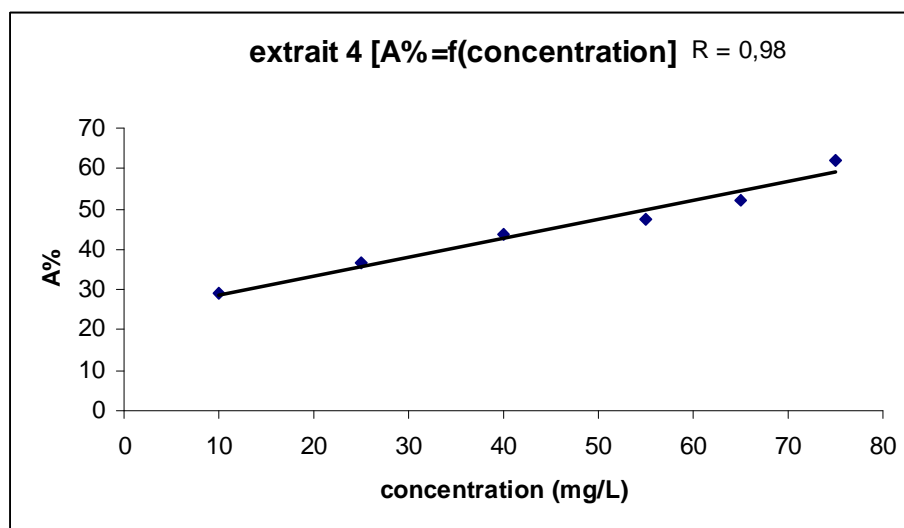


Echantillon n°2 : extraction par Soxhlet.

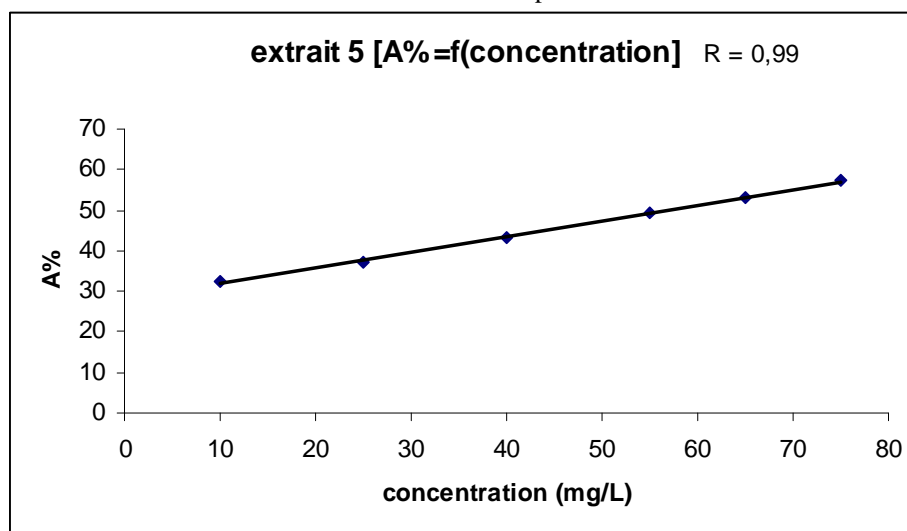


Echantillon n°3 : extraction par ultrasons.

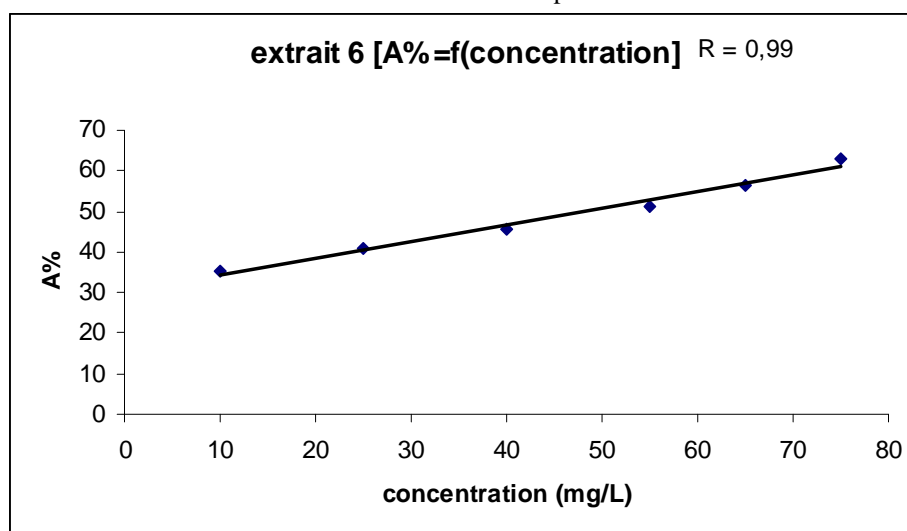
Figure VII.2 : La courbe des extraits obtenus par régression linéaire.



Echantillon n°4 : extraction par macération.



Échantillon n°5 : extraction par Soxhlet.



Echantillon n°6 : extraction par ultrasons.

Figure VII.3 : La courbe des extraits obtenus à l’abri de la lumière par régression linéaire.

Les valeurs d'IC₅₀ obtenues sont résumées dans le Tableau VII.3.

Tableau VII.3: les concentrations inhibitrices

Echantillon	IC ₅₀ (mg/L)	R
N° 1	112.26	0.994
N°2	73.76	0.984
N°3	125.64	0.993
N°4	55,47	0,985
N°5	57.03	0.999
N°6	48,06	0.991
Témoin BHA	28.11	0.991

Echantillon n°1 : extraction par macération, échantillon n°2 : extraction par Soxhlet, échantillon n°3 : extraction par ultrasons. A l'abri de la lumière : échantillon n°4 : extraction par macération, échantillon n°5 : extraction par Soxhlet, échantillon n°6 : extraction par ultrasons.

D'après ces résultats, les meilleures concentrations inhibitrices sont obtenues pour les extractions effectuées à l'abri de la lumière et en particulier pour l'extrait obtenu par soxhlet. Un temps d'extraction plus long aurait certainement été à l'avantage des extraits obtenus par macération et ultrasons car nous aurions éliminés le facteur de thermodégradation des polyhénols.

Afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux de la littérature, nous avons trouvé une étude récente publiée sur *atriplex halimus*, plante desertique de la même famille que *Bassia muricata* L. (chenopodiaceae), où ils ont montré le grand intérêt thérapeutique de ces plantes. Le pouvoir antioxydant obtenu par la méthode du DPPH a donné un IC₅₀ de 31.83 mg/ml pour les extraits méthanoliques des feuilles et 20.58mg/ml pour les extraits méthanoliques des racines. Ils ont démontré également que les flavonols possédaient le pouvoir antioxydant le plus fort par rapport aux autres familles des polyphénols ^[69].

D'après cette modeste contribution à l'étude des effets antiradicalaires de *Bassia muricata* L, nous pouvons dire que cette plante bien que très peu explorée, doit avoir des vertus thérapeutiques certains.

Conclusion

La flore Algérienne est particulièrement riche en plantes médicinales et aromatiques dont la plus part à l'état spontané. Malgré l'apparition et l'utilisation croissante des composés de synthèse, ceux-ci n'ont pu se substituer totalement aux produits naturels car ces derniers restent souvent irremplaçables pour différentes raisons : coût, quantité, disponibilité.

La connaissance approfondie des plantes médicinales utilisées traditionnellement et non encore valorisées, constitue un enjeu important auquel notre laboratoire a la volonté de contribuer. Ainsi, dans le cadre de l'axe de recherche du laboratoire «valorisation, extraction et analyse des produits naturels » nous présentons une contribution à l'étude et à la connaissance d'une des familles des polyphénols ; les flavonoides, issus d'une plante médicinale du désert Algérien « *Bassia muricata* L» connue pour ses vertus thérapeutiques.

L'extraction des flavonoides par l'éthanol et par trois procédés d'extractions (extraction par macération, ultrasons et Soxhlet) à partir de la partie aérienne de cette plante nous a permis de montrer que le meilleur rendement (34%) a été obtenu pour l'extrait au soxhlet. Afin de démontrer la photostabilité des flavonoides, chaque extraction a été réalisée à la lumière du jour et à l'abri de la lumière.

Dans la seconde partie de ce travail, chaque extrait a été analysé par Chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Grâce à la méthode de l'étalonnage externe, nous avons pu identifier six flavonoides : (lutéoline, myricitine, quercétine, fisetine, rutine, rhamenétine).

L'étude semi-quantitative a montré que les teneurs de ces six flavonoides augmentaient considérablement quand l'extraction est pratiquée à l'abri de la lumière. Ceci est particulièrement vérifié pour la rutine et la quercetine dont le rôle thérapeutique a été maintes fois démontré.

Dans la dernière partie de ce mémoire, nous avons essayé d'évaluer le pouvoir antioxydant de chaque extrait par la méthode du DPPH, en utilisant l'UV/visible comme technique de lecture. Les résultats ont montré que nos extraits ont une bonne activité antiradicalaire, en particulier pour les extraits obtenus à l'abri de la lumière (environ 60% pour une concentration de 75mg/L).

De la même manière, nous avons déterminé la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC_{50}). Les meilleures valeurs sont également obtenues pour ces mêmes extraits ($IC_{50} = 52\text{mg/L}$ environ).

Ainsi, ce travail a permis de mettre en évidence les potentialités thérapeutiques de *Bassia muricata* L. à travers ses extraits éthanoliques qui ont montré des pouvoir antioxydants certains. Cette plante largement répandue dans le sud Algérien, est cependant mal valorisée. Pour cela des études supplémentaires et plus approfondies avec plus de techniques d'analyse sont à préconiser.

Références
bibliographiques

- [1]. J. Bruneton ; « Pharmacognosie, Phytochimie Plantes Médicinales » ; 3^e édition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris ; **(2008)**.
- [2]. L.CHEBIL ; « Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle » ; thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de LORRAINE ; (11 Décembre **2006**).
- [3]. V.Bernier, D.Lavoie; « Consultation en nutrition « *Le lycopène : un antioxydant très puissant* » ; revue le clinicien, p.49-56 ; (édition novembre **2001**).
- [4]. A.B. Gadano et coll.; « Argentine folk medicine: Genotoxic effects of Chenopodiaceae family »; J. of Ethnopharmacology 103 246–251; **(2006)**.
- [5]. P.Ozenda. ; « Flore du Sahara » ; 2^{ème} édition CNRS. p 226 ; **(1977)**.
- [6]. M.S. Kamel et coll.; « Acylated flavonoid glycosides from *Bassia muricata* L. »; Phytochemistry 57 1259–1262; **(2001)**.
- [7]. V.Hammiche et K.Maiza ; « Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer »; Journal of Ethnopharmacology 105 358–367; **(2006)**.
- [8]. R.H Liu; “ Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action”; J. of Nutrition 134, 3479S–3485S; **(2004)**.
- [9]. K.K Adom, R.H Liu; “Antioxidant activity of grains”; J. of Agricultural and Food Chemistry 50 6182–6187 ; **(2002)**.
- [10]. Jr. E.Middleton, C.Kandaswami, T.C. Theoharides; “The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heartdisease, and cancer”; Pharmacological Reviews 52, 673–751 ; **(2000)**.
- [11]. W.Heller, G.Forkmann; « Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne, J.B. » ; (Ed.), « The Flavonoids: Advances in Research since 1986 ». Chapman & Hall, London, pp. 499–535 ; **(1993)**.
- [12]. J.P.Brown ; “A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds”; Mutat Res.75,243–77 ; **(1980)**.
- [13]. W. Heller; “ Flavonoid biosynthesis”; In book review : Plant Flavonoids in Biology and Medicine, Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships : Edited by V. Cody, E. Middleton and J. B. Harborne. Alan R. Liss, New York ; **(1986)**.

- [14]. J.B.Harborne; “Nature, distribution, and function of plant flavonoids.”; In book review: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine, Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships* : Edited by V. Cody, E. Middleton and J. B. Harborne. Alan R. Liss, New York ; **(1986)**.
- [15]. E.Wollenweber; “Flavones and flavonols. In: Harborne, J.B. (Ed.), « The Flavonoids – Advances in Research Since 1986 ». Chapman & Hall, London, pp. 259–335 ; **(1994)**
- [16]. S.C.Caccamese, N.P.Caruso, A.Savarino, « High-performance liquid chromatographic separation and chiroptical properties of the enantiomers of naringenin and other flavanones » ; *J. Chromatogr. A* 1076 , 155; **(2005)**.
- [17]. N.Veitch, “Isoflavonoids of the Leguminosae”; *Nat. Prod. Rep.* 24, 417–464 ; **(2007)**.
- [18]. Di Carlo, G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso,F., “Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs” ; *Life Sci.* vol 65, p 337-353; **(1999)**.
- [19]. D.N.Dhar; « The Chemistry of Chalcones and Related Compounds »; John Wiley, New York ; **(1981)**.
- [20]. J.M.Olesen, N.Ronsted, U.Tolderlund, C.Cornett, P.Melgaard, J.Madsen, C. G.Jones and C. E. Olsen; “Mauritian red nectar remains a mystery”; *Nature*, 393, 529 ; **(1998)**.
- [21]. G.Mazza, E.Miniati; ”Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains”; Boca Raton, CRC Press ; **(1993)**.
- [22]. J.-M.Kong, L.-S.Chia, N.-K.Goh, Chia, T.-F. R.Brouillard; “Analysis and biological activities of anthocyanins”; *Phytochemistry* 64, 923-933 ; **(2003)**.
- [23]. T.Iwashina; “The structure and distribution of the flavonoids in plants”; *J. Plant Res.* 113, 287 ; **(2000)**.
- [24]. V.Dewanto, X.Z.Wu, R.H.Liu; “Processed sweet corn has higher antioxidant activity”; *J. of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4959–4964; **(2002)**.
- [25]. J.M.Grange, R.W.Davey; “Antibacterial properties of propolis (bee glue)”; *J .R .Soc. Med* .83,159 –60 ; **(1990)**.
- [26]. M.G.L.Hertog, P.C.H.Hollman, D.P.Venema; “Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits.”; *J Agric Food Chem* 40,1591;**(1992)**.

Références bibliographiques

- [27]. A.Crozier, M.E.J.Lean, M.S.McDonald; “Black C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. J .Agric.Food Chem .45, 590; (1997).
- [28]. J.B.Harborne, C.A.Williams; “Advances in flavonoid research since 1992.” Phytochemistry 55,481–504; (2000).
- [29]. B.Lowry, D.Lee, C.Henabt; “The origin of land plants: a new look at an old problem.”; Taxon 29, 183–197; (1980).
- [30]. J.B.Harborne, H.Baxter; « The handbook of natural flavonoids »; Vols 1 and 2. Chichester, UK: John Wiley and Sons; (1999).
- [31]. H.H.Woo et coll.; « Flavonoids: signal molecules in plant development »; Adv. Exp. Med. Biol., 505, 51; (2002).
- [32]. Ø.M.Andersen & K.R. Markham; « FLAVONOIDS : Chemistry, Biochemistry and Applications »; Taylor & Francis Group, LLC, p 415;(2006)
- [33]. A.C.Martin ; « Apports nutritionnels conseillés pour la population française. » ; Ed.Tec&Doc ;(2001).
- [34]. Haut comité de santé publique ; « Pour une politique nutritionnelle de santé publique en France. Enjeux et propositions. » ; Ed.ENSF ; (2000).
- [35]. M.Gerber, M.C.Bourton Rault, S.Hercberg, E.Riboli, A.Scalbert, M.H.Siess ; « Actualités en cancérologie : fruits, légumes et cancers. Une synthèse du réseau. » ; Nacre, Bull. Cancer 89(3), 293-312 ; (2002).
- [36]. S.Martens, A.Mithofer; “Molecules of Interest: Flavones and flavones synthases.” Phytochemistry 66, 2399-2407; (2005).
- [37]. A.Pengelly; “The constituents of Medicinal Plants: An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine.” CABI publishing; (2004).
- [38]. AGROBIO ; « Evaluer la capacité antioxydante par des tests in vitro», cahier de paillasse du laboratoire ; (Février 2009). www.labo-nutrinov.com.
- [39]. AGROBIO ; « La Mesure du pouvoir antioxydant par la méthode ORAC », cahier de paillasse du laboratoire ; (Novembre 2007). www.labo-nutrinov.com
- [40]. SC.Langley-Evans; “Antioxydant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay.” Int J Food Sc Nutr., 51, 181-188; (2000).
- [41]. J.Pincemail et coll., « Effet d’une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs », Nutrition clinique et métabolisme 21, 66–75. (2007).

[42]. S. CHEMAT ; « *Contribution à l'étude de l'extraction de la carvone et du limonène à partir des graines de Carvi selon des procédés conventionnels, ultrasons et chauffage micro-ondes. Application à l'extraction de polluants organiques de type PCBs et à l'oxydation des acides humiques* », thèse de doctorat Université Sciences et Technologies Houari Boumediène (USTHB), faculté de Génie des Procédés (ex.Chimie Industrielle), (2005).

[43]. F. Peng, L. Sheng, B. Liu, H. Tong, S. Liu; "Comparison of different extraction methods: steam distillation, simultaneous distillation and extraction and headspace co-distillation, used for the analysis of the volatile components in aged flue-cured tobacco leaves."; *J. of Chrom. A*, 1040, 1-17; (2004).

[44]. M.Virot et coll, « New microwave-integrated Soxhlet extraction An advantageous tool for the extraction of lipids from food products », *J. of Chromatography A*, 1174, 138–144; (2007).

[45]. M.D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, « Soxhlet extraction: Past and present panacea », *Journal of Chromatography A*, 1217, 2383–2389; (2010).

[46]. Z. Hromádková, A. Ebringerová, P. Valachovic; "Comparison of classical and ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Salvia Officinalis* L."; *Ultras. Sonochem.* 5, 163-168; (1999).

[47]. M. Toma, M. Vinatoru, L. Paniwnyk, T. J. Mason; "Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction"; *Ultras. Sonochem*, 8, 137-142; (2001).

[48]. M. Romdhane, C. Gourdon; "Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound"; *Chem. Eng. J.*, 87, 11-19; (2002).

[49]. V. Lopez-Avila, R. Young, N. Teplitsky; "Microwave-assisted extraction as an alternative to Soxhlet, sonication, and supercritical fluid extraction"; *J. of AOAC Int.*, 79 (1), 142-156; (1996).

[50]. M. Ericsson, C. Sanchez, H. Carlsson, A. Colmsjö, E. Dyremrk, "Dynamic sonication-assisted solvent extraction of organophosphate esters in air samples", *J. of Chrom. A*, 957, 227-234; (2002).

[51]. K. Ganzler, A. Salgo, K.J. Valko; "Microwave extraction: a novel sample preparation method for chromatography"; *J. of Chrom.*, 371, 229-306; (1986).

Références bibliographiques

- [52]. B. De Gioannis, B. marongiu, S. Porcedda; "Isolation of Thymus herba-barona Volatiles by Supercritical Fluid Extraction"; J. Essent. Oil Res., **13**, 240-244; (2001).
- [53]. G.Burgot et J.L. Burgot ; « Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications » ; ed. TEC & DOC Lavoisier, 2eme édition ; (2006).
- [54]. R.G. Wilson, J.H.Bowie et D.H.Williams ; « Solvent effects in NMR Spectroscopy : Solvent shifts of methoxyl resonances in flavones induced by benzene; an aid to structure elucidation » ; Tetrahedron 24,1407. 1986
- [55]. K.R.Markham; "Flavones, flavonols and their glycosides", in « Methods in plant biochemistry »,P.M.Dey and J.B.Harbone, Academic Press pp.197-262; (1989).
- [56]. K.R.Markham; "13C NMR of flavonoids-II,Flavonoids other then flavone and flavonol aglycones." Tetrahedron32, 2607-2612 ; (1976).
- [57]. W.Xiao, L.Han, B.Shi; « Microwave-assisted of flavonoids from *Radix Astragali* »; Separation and Purification Technology 62 614-618; (2008).
- [58]. S. Albu, E. Joyce, L. Paniwnyk, J.P. Lorimer, T.J. Mason; "Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxydants from Rosmarinus officinalis for the food and pharmaceutical industry"; Ultrason. Sonochem., **11**, 261-265; (2004).
- [59]. E.N. FRANKEL, A.L. WATERHOUSE, P.L. TEISSEDRE; "Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density- lipoproteins"; J.of Agricultural and Food Chemistry, 43,890-894 ;(1995).
- [60]. S.Jang et coll, "Luteolin Inhibits Microglia and Alters Hippocampal-Dependent Spatial Working Memory in Aged Mice"; J. Nutr. October 1, vol. 140 no. 10 1892-1898; (2010).
- [61]. KT.Howitz et coll.; "Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan."; Nature 425 (6954): 191–196; (2003).
- [62]. P. Maher et coll.; "Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory"; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103 (44), pp. 16568-16573; (2006).
- [63]. P.Knekt, J.Kumpulainen, R.Järvinen et coll.; « Flavonoid intake and risk of chronic diseases »; *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 76, n° 3, , p. 560–8; (September 2002).
- [64]. U.Nöthlings, SP.Murphy, LR.Wilkens, BE.Henderson, LN.Kolonel; « Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study »; *Am. J. Epidemiol.*, vol. 166, n° 8, p. 924–31; (October 2007).

[65]. P.Lefrançois et F.Ruby ; « Produits de santé naturels : Rutine et oxérutines » ; société canadienne de recherche sur les produits de santé naturels PSN ; (**MARS 2007**) ; www.passeportsante.net

[66]. J.S. Almeida et coll. ; « Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies » ; *Nanoscale Res Lett* 5:1603–1610 ; (**2010**).

[67]. M. E. Carlotti et coll. ; « On the complexation of quercetin with methyl- β -cyclodextrin: photostability and antioxidant studies » ; *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, DOI 10.1007/s10847-010-9864-7 ; **29 September 2010**.

[68]. M.Hazzit, « Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de thym et d'origan poussant en Algérie » ; Thèse de Doctorat : Chimie organique appliquée : USTHB ; (**2008**).

[69]. N.Benhammou et coll. ; « Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus* » ; *C. R. Chimie* 12 1259–1266 ; (**2009**).

[70]. S. Derbel et coll. ; « Chemical composition and biological potential of seed oil and leaf extracts of *Henophyton deserti* Coss. & Durieu » ; *C. R. Chimie* 13 473–480 ; (**2010**).

[71]. M.Contini et coll.; « Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature » ; *Food Chemistry* 110 659–669; (**2008**).