

Introduction générale.

Etant donné, la richesse de notre région en plantes aromatiques, connus pour leurs vertus médicinales, cosmétiques et autres, une étude approfondie de celles-ci s'impose dans le cadre de la mise valeur de la flore steppique et dans le contexte de la création d'une banque de données qui regroupe et illustre les valeurs propres à chaque espèce.

Actuellement, plus de 50% des médicaments et les quasi-totalités des substances anticancéreuses (ellipicène, celiptium tropicale, etc....) sont issus de plantes ou dérivés. Presque tous les médicaments dits « majeurs » résultent d'une recherche, parfois très ancienne sur les plantes[1].

Les plantes médicinales sont employées en nature ou sont utilisées comme matières premières pour l'extraction de principes actifs. Elles peuvent servir de modèles pour la synthèse. Les molécules naturelles peuvent aussi être retouchées par l'homme pour être améliorées[2].

La découverte de nouvelles propriétés pharmacologiques et l'extraction de nouveaux principes actifs (huiles essentielles, flavonoïdes, composés phénoliques, alcaloïdes, hétérosides...) contribuent au développement de la médecine par les plantes. Ces découvertes ont montré qu'ils avaient de nombreuses possibilités thérapeutiques dans le règne végétal[5].

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'extraction des huiles essentielles d'une plante par différents solvants organiques et à l'activité antioxydante et le pouvoir inhibiteur de la formation des calculs urinaires de nos extraits.

Ce travail est subdivisé en quatre parties :

- La première partie consiste en une synthèse bibliographique sur les plantes médicinales et les méthodes d'extraction des huiles essentielles.
- La deuxième partie est consacrée à l'extraction et l'étude phytochimique des extraits.
- La troisième partie porte sur l'étude de l'activité antioxydante et le pouvoir inhibiteur de la formation des calculs urinaires de nos extraits.
- Enfin, une conclusion générale résume l'essentiel de nos résultats.

Sommaire

Introduction générale.....	(1)
----------------------------	-----

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I-plantes aromatiques et médicinales	(2)
--	-----

I.1. Définitions des substances naturelles	(2)
--	-----

-Les huiles essentielles	(2)
--------------------------------	-----

▪ Introduction.....	(2)
---------------------	-----

▪ Définition	(2)
--------------------	-----

I.2. Composition chimique et propriétés physico-chimiques des HES	(3)
---	-----

▪ Mode d'obtention des HES.....	(4)
---------------------------------	-----

▪ Domaine d'utilisation des HES.....	(4)
--------------------------------------	-----

▪ Aperçu sur le mode d'action des HES.....	(5)
--	-----

I.2.1. Les composés terpéniques	(5)
---------------------------------------	-----

▪ Constituants terpéniques des huiles essentielles.....	(5)
---	-----

▪ Les monoterpènes	(6)
--------------------------	-----

▪ Les sesquiterpènes	(6)
----------------------------	-----

I.2.2. Les composés phénoliques	(7)
---------------------------------------	-----

▪ Définition.....	(7)
-------------------	-----

▪ Les Flavonoïdes	(8)
-------------------------	-----

▪ Les tanins	(9)
--------------------	-----

▪ Les coumarines.....	(10)
-----------------------	------

▪ Les alcaloïdes	(10)
------------------------	------

▪ Les saponines	(11)
-----------------------	------

II-Activités biologiques des extraits des plantes.....	(11)
--	------

▪ Activité antimicrobienne	(11)
----------------------------------	------

▪ Activité antioxydante	(12)
-------------------------------	------

▪ Activité antiviral	(12)
----------------------------	------

▪ Activité neurale	(12)
--------------------------	------

III. Techniques d'extraction des substances naturelles	(12)
--	------

III.1. Méthodes traditionnelles d'extraction des HES	(12)
--	------

III.1.1. Hydrodistillation	(12)
----------------------------------	------

III.1.2. Entraînement à la vapeur	(13)
---	------

Sommaire

III.1.3. Expression à froid	(13)
III.2. Extraction des extraits aromatiques par solvant organique	(13)
III.3. Méthodes innovantes d'extraction	(13)
III.3.1. Hydrodistillation assistée par ultrasons	(14)
III.3.2. Extraction assistée par micro-ondes	(14)
III.3.3. Extraction par fluide supercritique et par l'eau sub-critique.....	(15)
▪ Extraction par fluide supercritique	(15)
▪ Avantages et inconvénients de l'utilisation du CO ₂ supercritique....	(16)
▪ Extraction par l'eau sub-critique.....	(17)
▪ Propriétés spécifiques de l'eau sub-critique.....	(18)
▪ Constante diélectrique de l'eau.....	(19)

Chapitre II: partie pratique.

❖ Partie 1	(20)
➤ Méthode d'extraction.....	(20)
1. Extraction des extraits aromatiques par solvant organique sur appareillage Soxhlet.....	(20)
▪ Matériels utilisés	(20)
▪ Les produits	(20)
2. Mise en évidence des phytoconstituants	(21)
➤ les tests phytochimique :.....	(21)
1-les flavonoides	(21)
2-les tanins	(21)
3- les saponines (test de mousse).....	(21)
4- les quinones.....	(21)
5- Les sterols et triterpènes.....	(21)
6- test des sucres	(21)

❖ Partie 2 :

- Préparation de l'urine artificielle.....	(23)
-Mode opératoire.....	(23)

Sommaire

Partie 3 :

✓ Test d'oxydation :.....	(26)
▪ <u>Introduction</u> :	(26)
▪ <u>Principe de cette méthode</u> :.....	(26)
▪ <u>Mode opératoire</u> :.....	(26)
▪ <u>Expression des résultats</u> :.....	(27)
Conclusion générale.....	(29)
Référence bibliographique.....	(30)

Sommaire

I. plantes aromatiques et medicinales :

Les plantes médicinales sont des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Il est peu fréquent que la plante soit utilisée entière, le plus souvent, il s'agit d'une ou de plusieurs parties qui peuvent avoir chacune des utilisations différentes[1].

Depuis la plus haute antiquité, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition. Plusieurs théoriciens ont entrepris d'expliquer l'action des plantes sur l'organisme [2]. Les grandes civilisations anciennes ont eu recours aux PAM pour leurs propriétés médicinales, parfumantes ainsi que des utilisations rituelles[3].

Les plantes médicinales ont été toujours associées aux comportements et au savoir traditionnel culturels. Selon les statistiques de 2003 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 80% de la population mondiale a recours aux médecines traditionnelles pour satisfaire des besoins en soins de santé primaire [3]. Il pousse dans le monde plus de 20000 espèces de végétaux, à usages condimentaires, médicinaux ou cosmétiques, dont 50% est utilisée en industrie pharmaceutique[4].

I-1-Définition des substance naturelles :

-Les huiles essentielles :

▪ Introduction :

Les HE, existant dans les plantes aromatiques sont responsables des différentes senteurs qu'elles dégagent. Les HE se retrouvent dans des grandes minuscules situées dans différentes parties de la plante aromatique : l'écorce (cannelle), et pour certaines plantes, c'est dans les racines (ail) [5].

▪ Définition :

-Les HE sont des liquides volatiles, réfringents, optiquement actifs, voisins des huiles, d'odeur tout à fait caractéristique. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire[6].

Chapitre 1

Synthese bibliographique

- Les HE sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques.
- Ces produits odorants sont extraits par entraînement à la vapeur d'eau ou par pression (cas des agrumes)[8].
- A son tour, la norme A.F.NOR NF T 57-006 a donné la définition suivante d'un HE : « produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de Citrus, soit par la distillation sèche . »[9].

I-2-composition chimique et propriétés physico-chimiques :

Composition chimique des HE:

Les HE ont une composition assez complexe [10].

On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques :

Les composés terpéniques et les composés aromatiques, dérivés du phénylpropane.

Propriétés physico-chimiques des HE :

On trouve généralement les HE incolores ou jaune pâles à l'état liquide à température ordinaire.

Toutes les HE volatiles, odorantes et inflammables.

- Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HE de cannelle.

- Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques.

- Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation[5].

- Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées d'un pouvoir rotatoire.

- Leur point d'ébullition varie de 160°C à 240°C.

Chapitre 1

Synthese bibliographique

▪ **Mode d'obtention des HE :**

Plusieurs techniques d'extraction des essences sont pratiquées, deux seulement sont admises par la pharmacopée Française A.F.NOR et l'I.S.O.

- L'entraînement à la vapeur d'eau

- L'expression à la froid des péricarpes de certains citrus [8].

Les méthodes d'extraction sont adaptées aux propriétés physiques les plus importantes des huiles essentielles :

- Leur volatilité dans l'air et dans la vapeur d'eau .

- Leur solubilité dans les solvants organiques.

▪ **Domaine d'utilisation des HE :**

a-phytothérapie.

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies.

Les HE sont largement utilisés pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). En médecine dentaire, plusieurs HE ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries [4].

b-Parfumerie et cosmétologie :

L'utilisation des HE dans des crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable [11].

c- Industrie alimentaire.

En industrie alimentaire, on cherche toujours à avoir une conservation saine de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une qualité organoleptique meilleure.

Une nouvelle technique pour réduire la prolifération des micro-organismes réside dans l'utilisation des HE. Les plantes aromatiques et leur HE sont utilisées dans la conservation des denrées alimentaires [12].

Chapitre 1

Synthese bibliographique

▪ Aperçu sur le mode d'action des HE :

En effet, certains chercheurs ont montré que la puissance de l'action des HE varie selon leurs constituants majoritaire, et que le mode d'action est principalement lié au profil chimique des constituants de chaque HE qui est largement diversifié [4].

Toxicité des HE :

Plusieurs HE sont connues pour leur toxicité : c'est le cas, par exemple, des essences à anéthol à action convulsivante à forte dose ; il en est de même des essences à thuyone (thuya, absinthe).

Notons que les essences absorbées seules comme médicaments, en usage interne (Aromathérapie) peuvent présenter une certaine toxicité [13].

I-2-1- les composés terpéniques :

Les terpénoides constituent un vaste groupe de métabolisme secondaire de structure diverse, important dans de nombreuses interactions biotiques [2].

-sont formés d'unités isopréniques (en C_5) (ils répondent à la formule brute $(C_5H_8)_n$ [8], et comprennent les monoterpènes en (C_{10}) ,

les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}) et les triterpènes en (C_{30}) .

ils ont la même origine métabolique. ces terpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques, une HE est un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures.

parmi ces composés oxygénés, on peut noter la présence d'alcools, d'esters, d'aldéhydes, de cétones, d'éther-oxydes et de carbures.

La composition chimique des HE varie encore de façon appréciable avec le milieu et la période de la végétation. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extaction ou durant la conservation [4].

▪ Constituants terpéniques des huiles essentielles :

Les HE contiennent principalement des terpènes. elles renferment surtout des monoterpènes, quelques sesquiterpènes, rarement des diterpènes :

Chapitre 1

Synthese bibliographique

- Les monoterpènes :

Dans le cas des hydrocarbures, les composés monoterpéniques correspondent le plus souvent à la formule brute $C_{10}H_{16}$. ils peuvent être

acycliques (myrcène), monocycliques (limonène) ou bicycliques (camphène). [5]

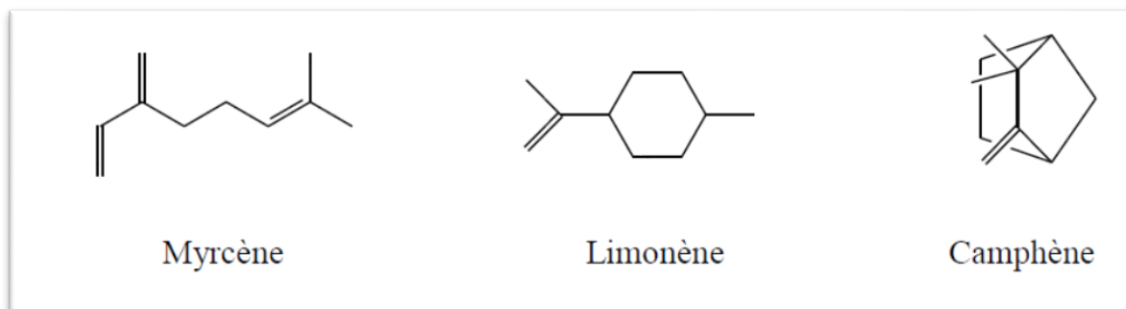


figure .I.1 : exemple sur les monoterpène.

Ils constituent par fois plus 90% de l'HE (citrus, térébenthines).

Les monoterpènes regroupent de nombreuses fonctions :

-**alcools** : acycliques (citronellol), monocyclique (menthol), bicycliques (fenchol).

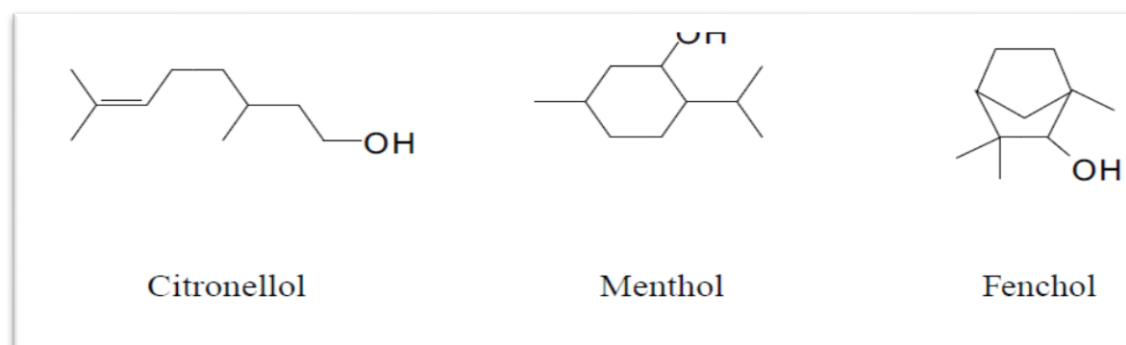


Figure.I.2 : exemple sur les monoterpènes de fonction alcools.

-**aldehydes** : le plus souvent acycliques (citronellal).

-**Ester** : acycliques (acétate de citronellyle), monocycliques (acétate de menthyle). [5]

- les sesquiterpènes :

Les variations structurales dans cette série sont de même nature que dans le cas précédent, carbures, alcools et cétones étant les plus fréquents.

Chapitre 1

Synthese bibliographique

Il convient de remarquer que le fait qu'ils comprennent trois motifs isoprène ils présentent une très grande variété dans les structures (plus d'une centaine de squelettes différents ont été décrits).

.2-2-Les composés phénoliques :

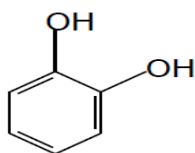
définition:

les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, ou hétérosite [15].

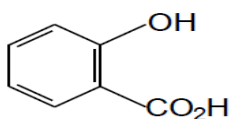
Parmi les composés phénoliques, dont plus de 8000 sont connus, les flavonoïdes, les quinones phénoliques, les coumarines et d'autres classes existent en nombre considérable (tableau 1) [16].

Tableau I.1 : les principaux composés phénoliques.

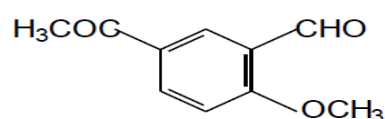
N° de Carbone	Squelette de base	Classe	Exemple
6	C ₆	Phénol simple	- Catéchol (1)
7	C ₆ -C ₁	Acides phénoliques	- Acide Salicylique (2)
8	C ₆ -C ₂	Acétophénone	- 3-acétyl-6-méthoxybenzaldéhyde (3)
9	C ₆ -C ₃	- Acide hydroxycinnamique	- Acide caféique (4)
		- Phénylpropènes	- Eugénol (5)
		- Coumarines	- Ombelliférone (6)
10	C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	- Juglone (7)



(1)



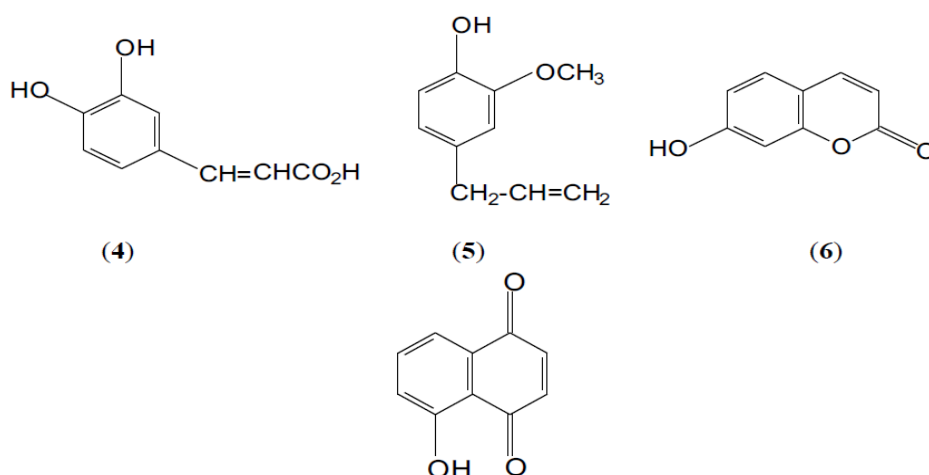
(2)



(3)

Chapitre 1

Synthese bibliographique



Figures. I.3 : Structures chimique de composés phénoliques [16].

■ Flavonoides :

Définition

Les flavonoides sont des substances naturelles issues des plantes présentes dans tout le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles. Et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV.

Les flavonoides sont des dérivés du noyau Flavone ou 2-phényl-chrome portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides.[17]

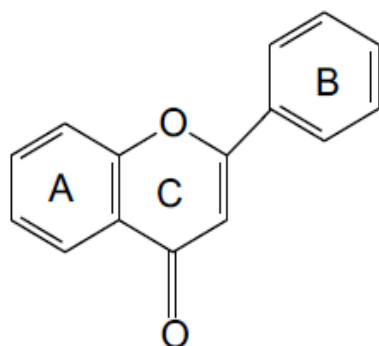
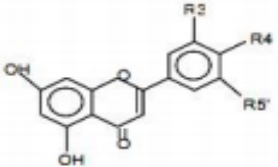
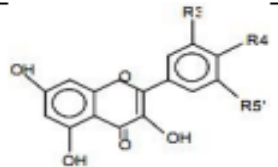
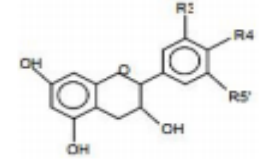
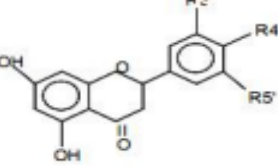
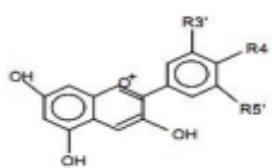
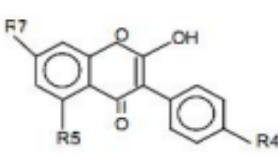


Figure .I.4 : Noyau flavone.

Chapitre 1

Synthese bibliographique

Tableau .I.2 : Classification des flavonoïdes.

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidzeine

▪ Les tanins :

Définition :

Ce sont des composés phénoliques complexes d'origine végétale, ayant une masse molaire comprise entre 500 et 3.000. En plus des réactions classiques des phénols, ils ont la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et de rendre la peau imputrescible en se fixant sur les protéines[18].

Chapitre 1

Synthese bibliographique

Il existe deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biosynthétique :

Les tanins hydrolysables :

Les tanins condensés :

▪ Les coumarines :

Définition :

Sont des composés phénoliques ayant un squelette de base en C6-C3, généralement hydroxylés en position 7, en 6,7 et en 6,7,8 [19].

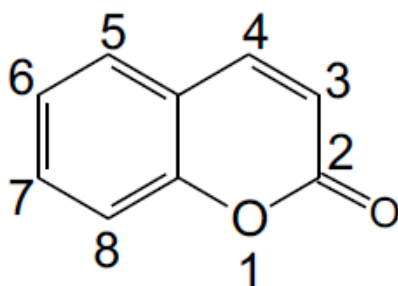


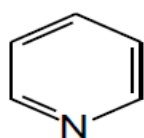
Figure I.5 : composé phénolique.

▪ Les alcaloïdes :

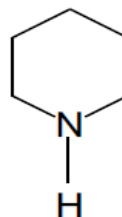
Définition :

Les alcaloïdes sont des composés azotés complexes, de nature basique, présentant généralement de puissants effets physiologiques. Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique[1].

Les alcaloïdes sont des hétérocycliques à caractère alcalin contenus essentiellement dans les plantes[20].



Pyridine



Pipéridine

Figure I.6 : Structure chimiques des alcaloides.

- **Les saponines :**

Définition :

Les saponosides sont une classe d'hétérosides très répandue chez les plantes et les animaux marins. Ce sont des glycosides stéroidique ou triterpéniques qui ont la propriétés de former des solutions moussantes en présence d'eau et de précipiter le cholestérol[21].

II. Activités biologiques des extraits des plantes :

Plusieurs études ont montré que les huiles essentielles sont dotées d'activités biologiques intéressantes.

- **Activité antimicrobienne :**

Les huiles essentielles possèdent des propriétés antimicrobiennes intéressantes et luttent contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne et fongique [22].L'activité antifongique des huiles essentielles peut être due à la présence des terpènes qui causent la rupture des membranes fongiques et inhibent le développement des champignons.

Les huiles essentielles permettent également la protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires .[23]

▪ **Activité antioxydante :**

L'activité antioxydante des huiles essentielles est attribuée à certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques tels que le linalool, le 1,8-cinéole, le géraniol [25]

▪ **Activité antivirale :**

Les huiles essentielles riches en phénols ont montré une activité antivirale contre certains virus notamment [25].

▪ **Activité neurale :**

Les huiles essentielles possèdent une action sédatrice et agissent sur le système nerveux central en stimulant ou en inhibant le système sympathique ou parasympathique. Elles permettent ainsi la régulation de système nerveux périphérique .

Les huiles essentielles possèdent également d'autres activités telles que l'activité désodorisante dans la mesure où certaines huiles essentielles peuvent être utilisées pour lutter contre les mauvaises odeurs. De très nombreuses drogues à huile essentielle (Mentha X citrata, Lippiacitriodora,...) sont réputées efficaces pour diminuer ou supprimer les spasmes gastro-intestinaux [26].

III. Technique d'extraction des substances naturelles :

Les HEs sont obtenues de diverses manières. Le choix de la technique dépend de la localisation histologique de l'huile dans le végétal et de son utilisation[28].

.1- methodes traditionnelles d'extraction des Hs :

Ces techniques d'extraction reposent toutes sur le même principe, basé sur l'entraînement des molécules volatiles de la plante par la vapeur d'eau. Le degré de contact entre la plante et l'eau est le seul paramètre qui diffère.

.1-1- hydrodistillation :

Dans le cas de l'HD, la plante se trouve dans un réacteur où elle est en contact direct avec l'eau bouillante. Selon la densité ou la quantité de la plante utilisée, elle peut flotter ou être complètement immergée dans l'eau. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique.

Chapitre 1

Synthese bibliographique

Le chauffage permet l'éclatement et la libération des molécules volatiles contenues dans la matière végétale [29].

.1-2- entraînement à la vapeur :

C'est le moyen le plus répandu pour extraire les molécules volatiles des PAM.

Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, mais la vapeur d'eau produite par une chaudière est injectée et traverse la matière végétale de bas en haut, éclate les cellules et entraîne les molécules volatiles[28].

.1-3-expression à froid :

C'est une technique "physique" simple où les écorces des agrumes (citron, orange,...) sont pressées à froid pour extraire leurs HEs en utilisant des rouleaux ou des éponges. Aucune source de chaleur n'est utilisée, laissant ainsi à l'huile une odeur très proche de l'original.[29]

.2- extraction des extraits aromatiques par solvant organique :

L'extraction par solvant organique à chaud est actuellement largement utilisée. Le principe de cette méthode consiste à faire tremper les plantes dans un solvant organique volatil à chaud, soit pour obtenir des produits que l'on ne peut extraire par un autre procédé, soit en vue de rendements plus élevés [28].

Dans l'appareillage Soxhlet un système de régénération interne du

solvant permet de mettre en contact en permanence le végétal avec du solvant pur. Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité, stabilité,

inertie chimique et température d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale.

.3- Méthodes innovantes d'extraction des HE :

.3-1- Hydrodistillation assistée par ultrasons :

Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement de la plante «pré» ou «post» opératoire. En effet, la structure des parois des plantes et les tissus cellulaires se désorganisent, sous l'effet des ondes ultrasonores et les micros cavitations générées par les ultrasons [30].

Chapitre 1

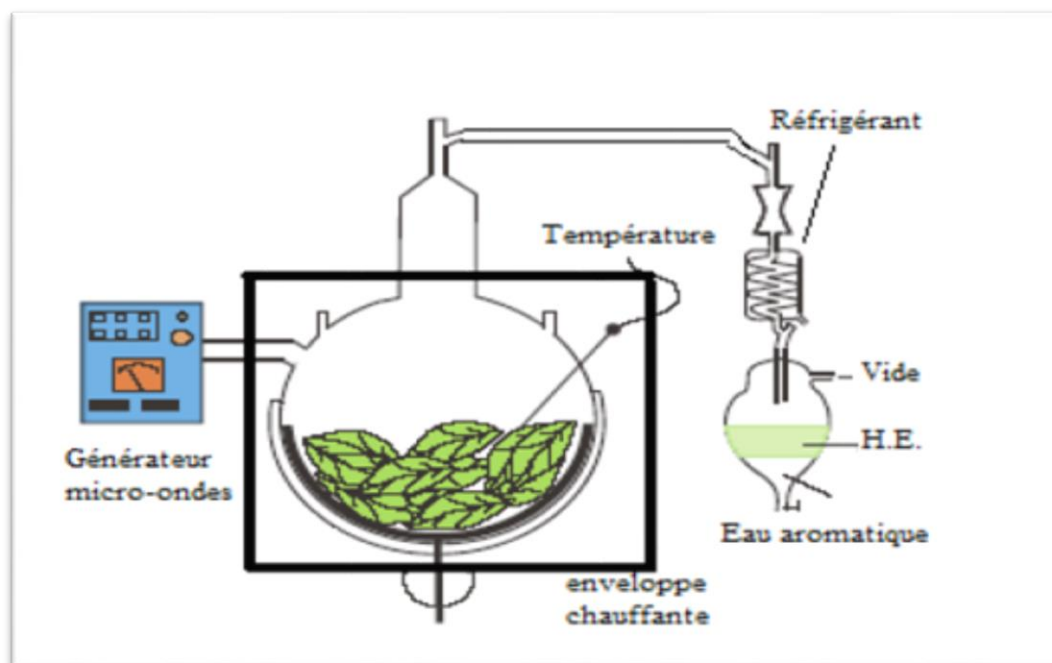
Synthese bibliographique

Ainsi, ces changements favorisent la diffusion de l'eau dans les tissus cellulaires, ce qui peut également influencer sur la cinétique d'extraction des molécules aromatiques des HEs. Les principaux avantages de ce procédé sont l'accélération de la cinétique d'extraction et l'amélioration du rendement.

.3-2- Extraction assistée par micro-ondes :

C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux HEs et aux extraits aromatiques. Dans cette méthode, la plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle : les molécules volatiles sont entraînées dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée [31].

Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile. Les auteurs de ce procédé lui attribuent certains avantages tels que le temps d'extraction (dix à trente fois plus rapide), l'économie d'énergie et une dégradation thermique réduite [32]. »



FigureI.7 : hydrodistillation assistée par micro-ondes.[39]

.3-3-Extraction par fluide supercritique et par l'eau sub-critique :

Les fluides supercritiques :

. Généralité :

Le diagramme de phase pression-température (P,T) d'un corps pur présente les différents états de la matière (solide, liquide et gazeux) en fonction de la pression et de la température. Les domaines de ces trois états sont délimités par les courbes d'équilibre (solide gazeux, solide-liquide et liquide-gazeux). L'état supercritique a été découvert par le Baron Cagniard de la Tour en 1822. Il constata la disparition de la frontière gaz-liquide de certaines substances chauffées en milieu fermé. En effet, tout corps pur possède un point critique correspondant à une pression et une température données. Un fluide est dit à l'état supercritique lorsqu'il est chauffé au-delà de sa température critique et lorsqu'il est comprimé au-dessus de sa pression critique.

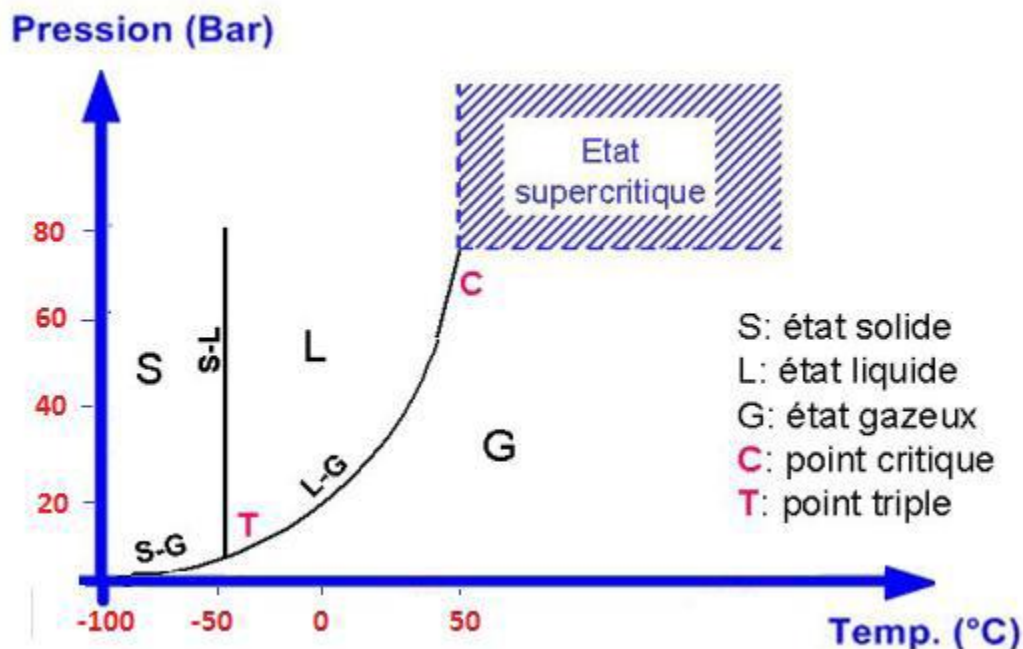


Figure.I.8 : Diagramme de phases P-T du CO₂

Le comportement d'un fluide supercritique est intermédiaire entre celui de l'état liquide et l'état gazeux. En particulier, il possède une masse volumique élevée comme celle des liquides, un coefficient de diffusivité intermédiaire entre celui des liquides et des gaz, et une viscosité faible comme celle des gaz. Cet état supercritique a été appliqué au CO₂ à la fin des années 1970 où il a été observé expérimentalement pour la première fois exposé à 31,1°C et 74 bar. Dans cet état, ce composé possède de

Chapitre 1

Synthese bibliographique

remarquables propriétés de solubilisation des substances organiques. Ainsi, contrairement à la majorité des solvants organiques il n'est pas toxique. La technologie utilisant les fluides supercritiques suscite actuellement beaucoup d'intérêt dans différents domaines : industriel, pharmaceutique et agroalimentaire.

Les coordonnées critiques pour certains fluides présentés dans le Tableau . Comme le montre ce tableau, les paramètres critiques (pression, température et densité) varient fortement suivant le choix du fluide supercritique. Cependant, les fluides supercritiques les plus utilisés sont le CO₂ et l'eau. Toutefois cette dernière pose certains problèmes. En effet, ses coordonnées critiques réduisent son accessibilité expérimentale et son caractère corrosif exige un appareillage adapté assez coûteux [34,35].

Tableau I.3: Coordonnées critiques de certains fluides [35].

Composés	Température (T _c °C)	Pression (P _c bar)	Masse volumique (ρ _c g/ cm ³)
CO ₂	31,1	73,8	0,468
Ethane	32,2	48,8	0,203
Ethylène	9,3	50,4	0,2
Propane	96,7	42,5	0,220
Propylène	91,9	46,2	0,23
Toluène	318,6	41,147	0,29
oxyde nitreux	36,5	71,0	0,457
Eau	374,2	220,5	0,272

▪ .Avantages et inconvénients de l'utilisation du CO₂ supercritique :

Le CO₂ supercritique possède plusieurs avantages par rapport aux autres fluides supercritiques industriels. On peut citer le fait qu'il possède une faible température critique (T_c= 31,1°C), qu'il soit non inflammable et non toxique, qu'il n'y a pas de solvant résiduel à la fin du traitement (évacuation sous pression atmosphérique), qu'il est chimiquement inerte, qu'il n'y a pas de problèmes d'oxydation du produit et qu'il pose moins de problèmes de sécurité. De plus, il possède des propriétés de transport très favorables, meilleurs que celles des solvants liquides usuels.

-Les principaux avantages de l'utilisation du CO₂ supercritique dans les différents domaines sont [36] :

- Il est relativement inerte vis-à-vis des composés réactifs, ce qui est un avantage d'un point de vue environnemental et des procédés, dans la mesure où les réactions secondaires avec le CO₂ sont relativement rares.
- Il ne peut pas être oxydé. Cette impossibilité d'oxydation explique son ininflammabilité.
- Il ne crée pas de contamination dans les phases liquides qui sont en contact avec lui.
- Au-dessus de 31°C, les gaz dont la température critique est basse sont miscibles en toutes proportions avec le CO₂. C'est un avantage important pour la mise en oeuvre de procédés chimiques où intervient un contact gaz-liquide.

L'eau sub-critique :

. Généralités :

Le point critique de l'eau est $P_c = 221$ bar et $T_c = 374^\circ\text{C}$. L'eau à l'état sub-critique est une eau surchauffée ou encore une eau chaude pressurisée, généralement à une température inférieure à 250°C et une pression inférieure à 100 bar. Ainsi, dans ces conditions, l'eau est liquide mais certaines de ses propriétés physico-chimiques sont modifiées. En effet, à l'état sub-critique, les molécules d'eau sont plus "libres" les unes par rapport aux autres et sont donc plus "disponibles" pour réagir avec d'autres substances. Il est donc plus facile de solubiliser certaines molécules dans l'eau à l'état sub-critique que dans l'eau en condition standards. Les premiers intérêts pour l'eau sub-critique comme solvant présentant des qualités environnementales, datent des années 70 avec les crises pétrolières de cette époque [37]. Ensuite, les activités de recherche en amont se sont focalisées sur la décontamination des sols, avec une extraction de composés peu ou non polaires de sols pollués ou l'extraction quantitative de composés organochlorés [38,39].

Généralement, l'extraction des produits naturels par eau sub-critique a été utilisée à l'échelle laboratoire. Actuellement, des développements de pilotes à plus grande échelle sont réalisés [2].

▪ Propriétés spécifiques de l'eau sub-critique

Naturellement, l'eau apparaît comme le solvant le plus vert qui soit. En effet, elle est la molécule la plus abondante sur Terre, et elle présente des avantages certains puisque qu'elle est non toxique, non inflammable et inoffensive pour la santé. Bien qu'utilisée très souvent comme solvant dans le domaine de la synthèse organique, un grand intérêt pour l'eau en tant que solvant a été généré par le développement du nouveau concept de chimie verte. L'intérêt principal de l'utilisation de l'eau sub-critique réside dans les variations importantes de ses propriétés physico-chimiques [40].

Le comportement physique de l'eau en tant que corps pur est relativement bien connu. Il se traduit par son diagramme d'état représenté en fonction de la pression et de la température.

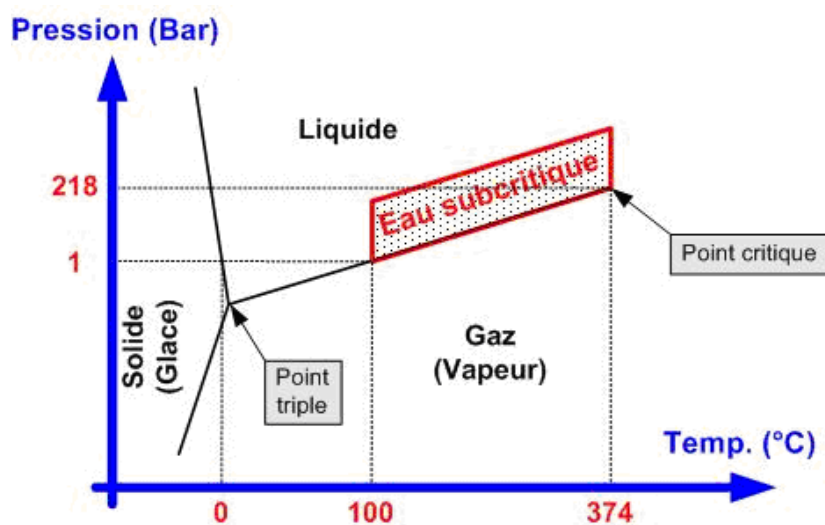


Figure.I.9 : Diagramme de phases de l'eau.

[http://www.valifluid.com/FR/PAGE_Gamme_Service.php]

La particularité de l'eau est d'avoir une courbe d'équilibre solide-liquide ayant une pente négative. Sur ce diagramme, les états classiques (solide, liquide et vapeur), le point critique et le domaine sub-critique sont définis.

▪ **Constante diélectrique de l'eau**

La permittivité relative ou constante diélectrique est définie comme un nombre sans dimension noté ϵ . Il s'agit d'une propriété physique qui décrit la réponse d'un milieu donné à

un champ électrique appliqué. L'eau a une permittivité relative statique d'environ 78,4 à 20°C. Cette valeur élevée est due aux effets collectifs des molécules dipolaires de l'eau. L'évolution de la constante diélectrique de l'eau en fonction de la température pour une pression constante (100, 200 et 300 bar) est représentée dans la Figure I.12 [41].

Sa valeur chute d'une valeur de 80 à $P = 200$ bar et $T = 20^\circ\text{C}$ pour tendre vers 2 à la même pression et $T = 400^\circ\text{C}$, valeur proche du comportement de la vapeur.

❖ **Partie 1 :**

Méthode d'extraction :

Extraction des extraits aromatiques par solvant organique sur appareillage Soxhlet :

L'extraction par solvant organique à chaud est actuellement largement utilisée.

Le principe de cette méthode consiste à faire tremper les plantes dans un solvant organique volatil à chaud, soit pour obtenir des produits que l'on ne peut extraire par un autre procédé, soit en vue de rendements plus élevés [6].

Dans l'appareillage Soxhlet un système de régénération interne du solvant permet de mettre en contact en permanence le végétal avec du solvant pur. Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité, stabilité, inertie chimique et température d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale [10].



figure.II.1. :montage soxhlet.

Matériels utilisés :

Balance analytique.

- Réfrigérant.
- Tube de 250 ml .
- Balon de 500ml.

Les produits :

- Solvant organique (ether de pétrole, acétone,methanol,hexane).
- Eau distillé.
- Matière végétal 30 g.

Extraction pendant 6h ou bien 6h30min selon le solvant utilisé.

Après on utilise le rota-vapeur pour éliminer totalement le solvant.

Mise en évidence des phytoconstituants :

On a utilisé des méthodes chimiques simples pour la recherche des principes actifs de la plante :

- Des réactions colorées.
- Analyses chromatographiques.

➤ **les tests phytochimique :**

1-les flavonoides

Dans un tube à essai, introduire 1ml d'extrait à tester et ajouter 1ml d'acide chlorhydrique (HCL) et quelques stournares de magnésium. l'apparition d'une coloration rouge, orange ou jaune relève la présence des flavoides.[42].

2-les tanins :

un volume d'extrait auquel sont ajoutée quelques gouttes de solusion de gélatine 1%. L'apparition de précipité blanc indique la présence des tanins[42]

3- les saponines :(test de mousse)

Dans un tube a essai, sont introduit 5ml d'extrait à tester et 5ml d'eau distillé chaude. Le tube est agités quelques secondes puis laissé au repos pendant 15min. une hauteur de mousse persistante indique la présence des saponines[42]

5- les quinones :

A 1ml d 'extrait à analyser, est ajouté 5ml d'une solution aqueuse de NaOH à 10% . la presence des quinones est indiqueé la presence des saponines[42]

6- Les sterols et triterpènes :

Il consiste à evaporer à sec l'extrait à analyser concentré correspondant à 1ml.

Ensuite ,ondissout le residu obtenu dans 1ml d'anhydre acétique puis on ajouter quelques gouttes d'acide sulfirique concentré (H₂SO₄) [42]

7- test des sucres :

A 1ml d'extrait analyser, est ajouté 1ml mélange de la solution de Fehling A et B avec chauffage. L'appariton d'présipité rouge brique indique la présence des sucres[42]

Chapitre II

Partie pratique

Résultat des tests photochimiques représentent dans le **tableau.II.1** :

Tableau.II.1 : les résultats de travail.

Graines					Feuilles				
	hexane	methanol	Ether de pétrole	acétone	hexane	Méthanol	Ether de pétrole	Eau distillée	acétone
Flavonoides	+	+	-		-	++	-	+	++
Tanins	-	+			-	+			
Saponines								++	+
Quinones			++	+					
Triterpènes	++	+	++	-	-	+	+	-	-
Sucre						+		+	

❖ Partie 2 :

pouvoir inhibiteur de la formation des calculs urinaires :

La lithiase urinaire affecte 6 à 15 % de la population dans les pays industrialisés, selon la région géographique. Pour la traiter ou la prévenir, de nombreuses populations à travers le monde ont recours aux plantes médicinales, ce qui constitue une pratique très ancienne. La médecine traditionnelle, principalement basée sur les plantes, est mise en œuvre par presque 80 % de la population mondiale qui utilise des plantes ou leurs extraits contre de très nombreuses pathologies y compris contre les calculs [28].

Chapitre II

Partie pratique

Le but de cette étude est de tester l'efficacité de nos extraits à inhiber la formation des cristaux en particulier les cristaux de phosphates de calcium.

Evaluation de l'inhibition de la formation des cristaux :

Le pourcentage d'inhibition de la formation des cristaux est calculé selon la formule suivante: $I (\%) = (N_{SI} - N_{AI}) / N_{SI} \times 100$, N_{SI} étant le nombre de cristaux formé sans la présence d'inhibiteur et N_{AI} est le nombre de cristaux formé en présence d'inhibiteur.

1. Préparation de l'urine artificielle :

Mode opératoire:

On prépare deux solutions A et B dans deux fioles de 1000ml.

- On mélange 50ml de la solution A avec 50ml de la solution B dans un bain marie avec un PH=7.50 à la température 37C°. le mélange est maintenu sous agitation pour prévenir la sédimentation.

Solution A :	Solution B :
11.02g/l $\text{Na}_2\text{SO}_4, 10 \text{ H}_2\text{O}$; 1.46g/l $\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$; 4.64g/l NH_4Cl ; 12.13g/l KCl ; 0.24g/l Ca^{2+}	2.65 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$; 18.82g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$; 13.05g/l NaCl ; 1g/l $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_3, 2\text{H}_2\text{O}$; 0.05g/l acide oxalique.

- Chaque 5min on prélève des gouttes du mélange et on les observe sous le microscope optique avec un agrandissement de X40 et on dénombre les cristaux formé.
- on filtre le mélange, on sèche les précipités et on les analyse par la spectroscopie FTIR

2. effet des extraits :

On suit la même procédure on ajoutant à chaque fois 5ml d'extrait.

Les résultats sont regroupés dans le **tableau II.2**

Chapitre II

Partie pratique

Tableau II.2 : le nombre des cristaux.

Temps (min)	Nombre des cristaux								
	Urine sans extrait	Feuilles (MF)					Grain (MG)		
		5ml	I%	10ml	I%		I%	10ml	I%
30	10	10	0.00	10	0.00	5	50.00	4	60.00
40	15	12	20.00	9	40.00	4	73.33	3	80.00
45	17	16	5.88	8	52.94	7	58.82	4	76.47
50	21	10	52.38	3	85.71	5	76.19	7	66.67
60	17	7	58.82	5	70.59	4	76.47	5	70.59
65	14	9	35.71	7	50.00	6	57.14	5	64.29
70	15	7	53.33	9	40.00	3	80.00	4	73.33
75	13	4	69.23	5	61.54	6	53.85	6	53.85
80	15	8	46.67	4	73.33	7	53.33	7	53.33
85	15	7	53.33	5	66.67	4	73.33	10	33.33
90	16	6	62.50	4	75.00	6	62.50	5	68.75
95	15	7	53.33	5	66.67	4	73.33	2	86.67
100	15	5	66.67	4	73.33	9	40.00	5	66.67
105	14	5	64.29	4	71.43	7	50.00	6	57.14
110	16	4	75.00	5	68.75	4	75.00	5	68.75
115	16	4	75.00	0	100.00	4	75.00	4	75.00
120	14	3	78.57	3	78.57	6	57.14	4	71.43
125	14	2	85.71	3	78.57	11	21.43	3	78.57
130	16	2	87.50	2	87.50	6	62.50	5	68.75
135	14	3	78.57	1	92.86	3	78.57	4	71.43
140	11	3	72.73	1	90.91	6	45.45	4	63.64
145	11	1	90.91	2	81.82	7	36.36	6	45.45
150	16	3	81.25	3	81.25	8	50.00	4	75.00
155	15	2	86.67	2	86.67	4	73.33	3	80.00
160	15	0	100.00	1	93.33	7	53.33	3	80.00
165	16	1	93.75	1	93.75	3	81.25	2	87.50
170	16	0	100.00	2	87.50	7	56.25	3	81.25
175	17	3	82.35	3	82.35	3	82.35	2	88.24
180	18	2	88.89	1	94.44	4	77.78	3	83.33

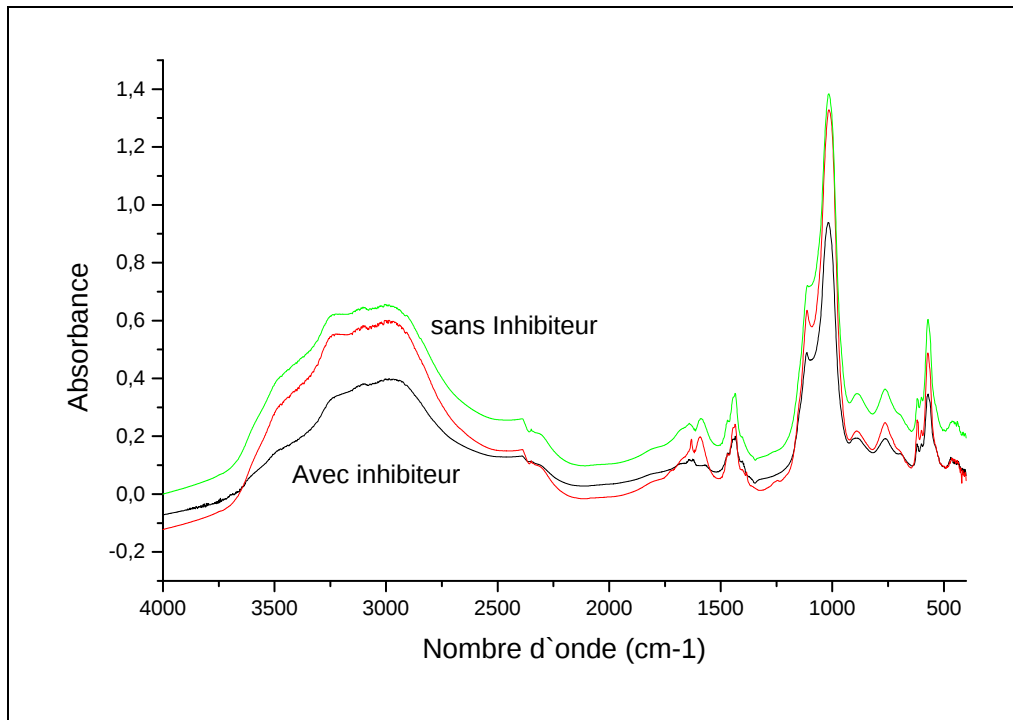


Figure II.2 : spectre IRTF des cristaux formes sans .et avec inhibiteur.

Discussion des résultats :

D'après les spectres infrarouge **figure.II.2**, les phosphates calcique formés sont du type struvite[48].

Dans les premiers prélèvements, on a remarque que les cristaux se forment rapidement dans tout les échantillons (avec et sans inhibiteur), mais l'effet de l'inhibiteur se fait ressentir avec le temps jusqu'à atteindre un taux d'inhibition de **88.89%** et **94.44%** pour **5 ml** et **10 ml** d'extrait **MF** et **82.35%** et **88.24%** pour **5 ml** et **10 ml** d'extrait **MG**.

En comparaison entre les spectres infrarouge des cristaux avec et inhibiteur, on remarque que les extrait n'ont d'effet sur le type de cristaux formés.

Ces résultats montrent que les extraits ont un effet inhibiteur pour la formation des cristaux du phosphate calcique en particulier la struvite.

❖ **Partie 3 :**

Activité antioxydant

Introduction :

L'oxydation des lipides est la cause principale de la détérioration des qualités organoleptiques des viandes et produits carnés. Dans la viande, l'oxydation dépend de nombreux facteurs comme la teneur en fer, le niveau de protection antioxydante, la teneur en acides gras insaturés, et les conditions de conservation. Du fait de leur teneur élevée en acides gras insaturés (dépendante de l'alimentation) et de leur faible teneur en antioxydants, les viandes sont particulièrement sensibles aux phénomènes oxydatifs. L'oxydation des lipides est caractérisée par la formation d'aldéhydes (comme l'aldéhyde malonique, MDA). In vitro, ces aldéhydes peuvent réagir avec l'acide Thio barbiturique (TBA) pour donner un complexe coloré en rose qui absorbe vers 535 nm. Le test TBA reste encore la technique la plus utilisée pour mesurer l'oxydation des lipides dans les viandes[46]. Le TBA réagit également avec d'autres aldéhydes résultant de l'oxydation des AGPI (acides gras polyinsaturés) à longue chaîne. La concentration des substances réactives au TBA (sr-TBA), exprimée en équivalent MDA est évaluée par la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre visible des sr-TBA extraites des échantillons par l'acide trichloroacétique (TCA).

Principe de cette méthode :

L'objectif de la méthode «TBA-rs » est d'estimer l'activité antioxydante d'extraits de plante et mesurer son effet sur l'oxydation des lipides de la viande. Pour ce faire, notre travail a consisté à peser 1g/ml de l'extrait de plante sur 100g de viande haché.

La même opération a été effectuée on utilisant une concentration de 2g/ml d'extrait de plante sur 100g de viande haché.

Il est important de noter qu'un échantillon-témoin (sans extrait de plante) a été soumis à la même préparation.

Ensuite, les trois échantillons ont été emballés dans un film alimentaire et réfrigérés dans l'obscurité à 4 °C pendant 5 jours.

Chapitre II

Partie pratique

Mode opératoire :

Pour mesurer l'indice « TBA » nous avons utilisé la méthode de **Salih [47]**

Un échantillon de 2 gr est placé dans un tube de 25 ml contenant 16 ml d'acide trichloracétique à 5% (p/v) . Le mélange est homogénéisé 3 fois pendant 15 secondes à l'aide d'un homogénéisateur (*Ultra-Turrax*) à une vitesse d'environ 20 000 rpm. Le broyat est passé à travers un papier filtre afin d'obtenir un filtrat. Puis de ce filtrat 2 ml sont additionnés à 2 ml d'acide thiobarbiturique.

Les tubes fermés sont plongés dans un bain-marie à 70°C pendant 30 minutes et placés dans un bain d'eau froide. La dernière étape consiste à lire à l'aide d'un spectrophotomètre l'absorbance du mélange réactionnel à 532 nm et les résultats sont exprimés en mg équivalent MDA (malonaldehyde) /kg.

NB : La coloration reste stable pendant 1 heure.

Expression des résultats :

Les résultats dégagés au cours de ces expériences sont obtenues par la formule suivante :

$$\text{mg équivalent MDA/ kg} = (0,72 / 1,56) \times (A_{532} \text{ cor} \times V_{\text{solvant}} \times V_f) / PE$$

A_{532 cor} : l'absorbance.

V_{solvant} : volume de solution de dilution TAC en ml.

PE : prise d'essai en gramme.

V_f : volume du filtrat prélevé.

0,72 / 1,56 : correspond à la prise en compte du coefficient d'extinction moléculaire du complexe TBA-MDA à la valeur de : 1,56.10⁵ M⁻¹.cm⁻¹ et au poids moléculaire du MDA d'une valeur de 72g. mol⁻¹.

Résultat du travail :

- **Absorbance sans extrait**

A₁=0.273 / A₂=0.270 / A₃=0.267

A_{moy} = 0.27

- **Absorbance avec C1=0.1g/ml**

A₁=0.05 / A₂=0.05 / A₃=0.05

A_{moy} = 0.05

Chapitre II

Partie pratique

- Absorbance avec $C_2=0.2\text{g/ml}$
 $A_1= 0.033$ / $A_2= 0.033$ / $A_3= 0.033$
 $A_{\text{moy}} = 0.033$

Tableau II.3 : résultat du test du pouvoir antioxydant.

échantillons	1	2	3
Absorbance moyenne	0.27	0.05	0.033
MDA moyenne (meq g/kg de MDA)	1.99	0.369	0.243

Discussion de resultat :

Au vu des résultats du **tableau II-3**, Il y'a une oxydation des lipides et formation des aldéhydes dans les trois échantillons, mais il y'a une diminution de la quantité moyenne du MDA (meq.g/kg de MDA) dans deux les échantillons 2 et 3 (0.1 et 0.2 g/ml). Ce résultat montre que notre extrait a un pouvoir antioxydant.

Conclusions générales

Cette présente étude avait pour objectif, l'étude photochimique et biologique d'extrait d'une plante.

La première partie, concernait l'étude phytochimique qui montre la richesse des extraits en produits phénoliques, flavonoïdes et triterpènes.

Dans la deuxième partie, nous avons étudié le pouvoir inhibiteur des extraits sur la formation des calculs urinaires. Il a été question de synthétiser une urine artificielle avec et sans la présence des extraits. Le calcul du taux d'inhibition a montré que les extraits ont un pouvoir inhibiteur important sur la formation des cristaux de phosphate calcique.

La troisième partie a été consacrée à l'étude de l'activité oxydante des extraits, nous avons utilisé la méthode «TBA-rs » pour estimer l'activité antioxydante des extraits et mesurer son effet sur l'oxydation des lipides de la viande. Les résultats ont montré que les extraits utilisés ont une importante activité antioxydante, cela est confirmé par la présence des produits polyphénoliques.

Référence bibliographique

- [1] **Vercauteren J.**, 2012. Cours de pharmacognosie.
- [2] **Chevallier A.**, Larousse 2001. Encyclopedia of Medicinal Plants (2nd Edition).
- [3] **Bhar H. et Balouk A.**, 2011. Les Plantes Aromatiques et Médicinales: ces plantes odorantes qui soulagent la douleur!, collaboration avec le Centre de Recherche Forestier et l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques
- [4] **Bermness L.**, Larousse, 2005. Plantes Aromatiques et Médicinales.
- [5] **Jacques G.Paltz s.a.** « le fascinant pouvoir des huiles essentielles ». Fascicule du laboratoire « jacque paltz ».1997
- [6] **Volak, J., ry Stdola ,J.,** « plantes médcinales ». GRUND . Paris .1983.
- [7] **Khadidja.R** « Etude du mécanisme de l'action bactéricide de HE sur Mycobacterium phlei et Mycobacterium fortuitum » , thèse de Doctorat d'état . en biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé . Fés , 2002
- [8] **paris M.et al** : « Abrégé de Matière Médicinales (pharmacognosie) », Tome 1, masson, paris.1981.
- [9] **Bruneton.J** « pharmacognosie phytochimie plantes médicinales », 3ieme édition , Tec & Doc et EM inter, 1999.
- [10] **KAMBOUCHE. N** « Extraction, composition chimique de l'HE d'Ajowan (Nounkha) de la région d'Oran- mise en evidence son activité biologique ». Mémoire de Magister en chimie Organique .Université d'Oran Es- Sénia 2000.
- [11] **Roulier G.** « les huiles essentielles pour votre santé pratique 'aromathérapie :propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes ».Edt .dangles.france ,1992.
- [12] **Hammer K.A., Carson CF I Riley T.V.** "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts".J. Appall Microbiol.1999.
- [13] **Tantaoui-Elaraki A.,Ferhout H & Errifi A.** "composition and antimicrobiol activity of the essentiel oils of Tymus" Broussonetti,T.zygis and T.satureiodes.J.Essent.oil.Res,1993.
- [14] **Binet P.et Brunel J.P.**, « phsiologie végétale », Doin, paris , pp774-782.1968.
- [15] **Harbone, J.B.**, « the flavonoids »,Mabry,TM.Mabry H.EDS :chapman et Hall,london.1975.

Référence bibliographique

- [16] **Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O, Regeat F.** « intérêt nutritionnel des flavonoides ». *Med. Nut.* 1991.
- [17] **Fulbert, J.C, Cals M.J.,** « les radicaux libre en biologie clinique ». *pabthol.Biol.* 1932.
- [18] **Ribereau- Gayan.p et Gautheret.R.T.,** « botanique général », Deboeck university ,Allmagne, 1998.
- [19] **Bnziane M,M ,** « screening phytochimique de la plante *Ruta montana*. Extraction de l'HE et de la rutine .activité antioxydante plante ». *Mémoire d magister en Chimie Organique .université d'Oran Es-Sénia.* 2007.
- [20] **Ouahas.C.,** « chimie organique ,Science biomédicales et science de la nature » , office des publication universitaires, Alger. 1996.
- [21] **Malne, J ? F.parve ,M., Kam,A., Mckevy,A., Ahmed,I. and Bhatti,M.** « journal of the chemical society ». *perkin Transation*, 1980.
- [22] **Kuete V., Penlap Beng V., Etoa F-X., Modjo S.L., Bogne P., Assob J. C., Lontsi D,** 2004. Activités antimicrobiennes de l'extrait total et Des fractions de jus de fruit de *citrus medica* lin. (Rutaceae) *Pharm. Méd. Trad. Afr. Vol.13, p : 91- 101.*
- [23] **Ida Jean F., Collin G., Laparé M. C., Gagnon H., Jubinville N., Bangoura M., Mwingira B. A., Dubé S. et Musabyimana T.,** 2000. info-essences, bulletin sur les huiles essentielles et autres extraits végétaux. 8 p.
- [24] **Mansouri N., Satrani B., Ghanmi M., El Ghadraoui L. et Aafi A.,** 2011. Étude chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ssp. *lycia* et *Juniperus phoenicea* ssp. *turbinata* du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(3), p 415-424.
- [25] **Bourel C.,** 1993. Analyse chimique, activités biologiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse.
- [28] **A. Marrouf, G. Tremblin,** *Abrégé de biochimie appliquée*, EDP sciences 2009.
- [29] **J. Bruneton,** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 3e édition revue, Paris, 1999.
- [30] **E. Constantin,** *Spectrométrie de masse*, Lavoisier Tec, Doc, Paris, 1-14, 1996.
- [31] **M. Romdhane,** *Extraction solide liquide sous ultrasons*, INPT, thèse de doctorat, 1993.

Référence bibliographique

- [32] M.E. Lucchesi, *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des HEs*, Thèse, La Reunion, 2005.
- [33] C.W. Huie, *A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373, 23-30, 2002.
- [34] P.G. Jessop, *Homogeneously-catalyzed syntheses in supercritical fluids*. *Topics in Catalysis* 5, 95-103, 1998.
- [35] M. Mukhopadhyay, *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*, 2000.
- [36] M. Poux, P. Cognet, C. Gourdon, *Génie des procédés durables-Du concept à la concrétisation industrielle*, Paris, 2010.
- [37] G. Brunner, *Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes*. *The Journal of Supercritical Fluids* 47, 373–381, 2009.
- [38] S.B. Hawthorne, Y. Yang, D.J. Miller, *Extraction of organic Pollutants from Environmental Solids with Sub- and Supercritical Water*. *Analytical Chemistry* 66, 2912-2920, 1994.
- [39] J. He, R. Balasubramanian, S. Karthikeyan, U.M. Joshi, *Determination of semi-volatile organochlorine compounds in the atmosphere of Singapore using accelerated solvent extraction*. *Chemosphere* 75, 640–648, 2009.
- [40] F. Mancini, *Traitement des déchets issus de la biomasse pour la génération d'énergie, thèse de doctorat, université Bordeaux I, Ecole doctorale des sciences chimiques*, 2006.
- [41] NIST (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>)
- [42] *Revue ElWahat pour les Recherches et les Etudes* Vol.8 n°1 (2015) : 11 – 18
- [47] Salih et al (1987) ; Botsoglou et al (1994) adaptée par Genot (1996).
- [48] (A. Hesse et al *BON(N)-stones –production and caracterisation of synthetic standard stones from natural material*. *Scanning Microscopy* Vol. 13, N° 2-3, 1999.